Uloga receptora TLR3 u razvoju i liječenju tumora glave i vrata čovjeka

Mikulandra, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:208233

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Martina Mikulandra

ULOGA RECEPTORA TLR3 U RAZVOJU I LIJEČENJU TUMORA GLAVE I VRATA ČOVJEKA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Martina Mikulandra

THE ROLE OF TLR3 RECEPTOR IN THE DEVELOPMENT AND TREATMENT OF HUMAN HEAD AND NECK CANCER

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom dr.sc. Tanje Matijević Glavan, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ŽIVOTOPIS MENTORA

Tanja Matijević Glavan rođena je 28.03.1980. godine u Zagrebu. 2003. godine je diplomirala na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, studij molekularne biologije. Od 2005. do danas zaposlena je u Institutu Ruđer Bošković (Laboratorij za molekularnu onkologiju, od 2016. Laboratorij za personaliziranu medicinu, Zavod za molekularnu medicinu). U ožujku 2010. stekla je titulu doktora znanosti biokemije i molekularne biologije pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, obranivši doktorski rad pod naslovom „Uloga gena/proteina TLR3 u stanicama primarnog karcinoma i metastaza čovjeka". U listopadu 2011. izabrana je u znanstveno zvanje znanstvene suradnice u znanstvenom polju medicine i zdravstva – polje temeljne medicinske znanosti. U srpnju 2013. izabrana je u naslovno nastavno zvanje predavač za područje biomedicine i zdravstva, polje temeljne medicinske znanosti na Veleučilištu u Varaždinu. U travnju 2017. izabrana je u znanstveno zvanje više znanstvene suradnice u znanstvenom području biomedicine i zdravstva – polje temeljne medicinske znanosti. 2017. izabrana je u naslovno znanstveno-nastavno zvanje docenta na Poslijediplomskom interdisciplinarnom sveučilišnom studiju Molekularne bioznanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Od 2015.-2016. bila je voditeljica COGITO bilateralnog projekta s Francuskom. Osim toga, kao suradnica je sudjelovala na dva projekta MZOŠ te jednom HRZZ. Članica je Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR), Europskog društva za istraživanje raka (EACR), Hrvatskog društva za humanu genetiku (HDSG) te Europskog društva za humanu genetiku (ESHG). Sudjelovala je u organizaciji nekoliko domaćih i međunarodnih kongresa. Od 2002.-2016. bila je na nekoliko inozemnih studijskih boravaka (Sveučilište Karl Franzens u Grazu, Austrija; Institut Friedrich Löffler u Greifswaldu, Njemačka te Institut Gustave Roussy u Parizu (Villejuif), Francuska) te sudjelovala na nekoliko radionica. Dobitnica je brojnih stipendija (EACR, MZOŠ, IAESTE, stipendija Instituta Ruđer Bošković i Francuskog Veleposlanstva) te nagrade Zaklade Zergollern-Čupak za najbolje izlaganje mladog znanstvenika na VI. Hrvatskom kongresu humane genetike. Mentor je po jednog rada za rektorsku nagradu te po jednog diplomskog i doktorskog rada. Govori engleski i njemački jezik.

ZAHVALE

Zahvaljujem se u prvom redu svojoj mentorici dr.sc. Tanji Matijević Glavan na nesebičnoj pomoći, ljubaznosti, strpljenju i vodstvu prilikom izrade i pisanja ovog doktorskog rada.

Također veliko hvala svim zaposlenicima Instituta Ruđer Bošković koji su na bilo koji način pomogli i omogućili izvođenje pokusa potrebnih za izradu ovog rada.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

ULOGA RECEPTORA TLR3 U RAZVOJU I LIJEČENJU TUMORA GLAVE I VRATA ČOVJEKA

MARTINA MIKULANDRA

Institut Ruđer Bošković

Receptor *Toll-like* 3 (TLR3) je transmembranski protein čija je ekspresija prvotno otkrivena na stanicama imunološkog sustava. TLR3 je eksprimiran i u stanicama brojnih zdravih i tumorskih tkiva, između ostalog tumora glave i vrata gdje ima dvojaku ulogu. Aktivacija TLR3 može pokrenuti preživljenje i progresiju tumora, ali i apoptozu stanica tumora. U ovom smo radu željeli istražiti je li, i na koji način, moguće potaknuti smrt stanica tumora kombinirajući agonist TLR3, poly(I:C), sa standardnim liječenjem cisplatinom uz zračenje. Naši rezultati pokazali su da poly(I:C) u kombinaciji s cisplatinom inhibira rast stanica tumora, potiče apoptozu aktivacijom kaspaza -3 i -7 i smanjivanjem ekspresije gena inhibitora apoptoze, potiče stvaranje reaktivnih oblika kisika i inducira zaustavljanje staničnog ciklusa u fazi G2/M. Navedeni rezultati ukazuju na to da poly(I:C) sinergistički s cisplatinom smanjuje preživljenje stanica tumora te povećava osjetljivost stanica tumora na zračenje, što ga čini vrijednom terapijskom opcijom u liječenju tumora glave i vrata.

(105 stranica, 18 slika, 4 tablice, 234 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: TLR3, tumori glave i vrata, liječenje, cisplatina, radiosenzitizacija

Mentor: dr.sc. Tanja Matijević Glavan, viša znanstvena suradnica

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
prof. dr. sc. Lidija Beketić-Orešković, dr. med.
dr. sc. Sanja Kapitanović, dr. med.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

THE ROLE OF TLR3 RECEPTOR IN THE DEVELOPMENT AND TREATMENT OF HUMAN HEAD AND NECK CANCER

MARTINA MIKULANDRA

Ruđer Bošković Institute

Toll-like receptor 3 (TLR3) is a transmembrane protein initially found to be expressed in cells of the immune system, but later also found in the cells of numerous normal and tumor tissues, including the head and neck tumors. TLR3 activation can initiate tumor cell survival and progression, but also tumor cell apoptosis. We have investigated whether it is possible to induce tumor cell death by combining TLR3 agonist poly(I:C) with standard treatment with cisplatin and irradiation. Our results showed that poly (I:C) in combination with cisplatin decreases tumor cell growth, promotes apoptosis via caspase -3 and -7 activation and via suppression of genes that inhibit apoptosis, induces ROS formation and cell cycle arrest in G2/M phase. These results suggest that poly(I:C) with cisplatin synergistically reduces the survival and increases the radiosensitivity of tumor cells, thus showing it is a valuable therapeutic option in the treatment of head and neck tumors.

(105 pages, 18 figures, 4 tables, 234 references, original in Croatian)

Keywords: TLR, head and neck cancer, treatment, cisplatin, radio-sensitisation

Supervisor: Tanja Matijević Glavan, PhD, Senior Research Associate

Reviewers: Maja Matulić, PhD, Associate Professor
Lidija Beketić-Orešković, MD, PhD, Full Professor
Sanja Kapitanović, MD, PhD, Scientific Adviser

SADRŽAJ

1. UVOD……...1

2. LITERATURNI PREGLED……..3

2.1. Receptori *Toll like*…….....3

2.1.1. Struktura i smještaj TLR……..3

2.1.2. Ekspresija i uloga TLR u imunosnom odgovoru…..……...3

2.1.3. Prijenos signala receptorima *Toll-like*.……5

2.1.4. TLR i tumori……8

2.2. Receptor TLR3……...10

2.2.1. Građa i smještaj receptora TLR3……10

2.2.2. Ekspresija receptora TLR3…...……..10

2.2.3. Ligandi TLR3……11

2.2.4. Protutumorska uloga TLR3……12

2.2.4.1. Poticanje apoptoze putem TLR3...…….12

2.2.4.2. Poticanje imunološkog antitumorskog odgovora putem TLR3...……...13

2.2.5. Uloga TLR3 u progresiji i metastaziranju tumora…….14

2.2.5.1. Lučenje proupalnih citokina……..15

2.2.5.2. Povišenje ekspresije gena uključenih u progresiju tumora……....15

2.2.5.3. Poticanje migracije stanica, invazije i metastaziranja…….16

2.2.5.4. Poticanje metaboličkog reprogramiranja……...17

2.2.5.5. Povećanje stvaranja molekula ROS……..……18

2.2.6. Dvojna uloga TLR3 u stanicama primarnih i metastatskih tumora……...18

2.3. Tumori glave i vrata……..20

2.3.1. Etiologija tumora glave i vrata……...20

2.3.1.1. Genetski i okolišni čimbenici……21

2.3.1.2. Virusne infekcije……21

2.3.2. Uloga kronične upale u nastanku tumora glave i vrata……..22

2.3.3. Biologija malignih tumora glave i vrata……23

2.3.3.1. Samodostatnost signala za rast……...23

2.3.3.2. Otpornost na signale za inhibiciju rasta……23

2.3.3.3. Izbjegavanje apoptoze……24

2.3.3.4. Neograničena proliferacija……24

2.3.3.5. Neoangiogeneza……25

2.3.3.6. Invazija i metastaziranje……..…26
2.3.4. Liječenje tumora glave i vrata……27
2.3.5. Uloga radioterapije u liječenju tumora glave i vrata……..27
2.3.6. Utjecaj zračenja na mikrookoliš tumora……28
2.3.7. Sustavno liječenje tumora glave i vrata……..30

3. MATERIJALI I METODE……..31
3.1. Tumorske stanične linije…..……..31
3.2. Mjerenje aktivacije signalnog puta TLR3……...33
3.2.1. Izgladnjivanje stanica……33
3.2.2. Izlaganje stanica gama-zračenju……33
3.2.3. Izlaganje stanica uvjetima hipoksije……..34
3.2.4. Izlaganje stanica oksidacijskom stresu……..35
3.3. Preživljenje i apoptoza stanica tumora nakon tretmana s poly(I:C) samostalno i u kombinaciji s cisplatinom i zračenjem……..36
3.3.1. Predtretman stanica FaDu shTLR3 i SQ20B shTLR3……36
3.3.2. Test citotoksičnosti……36
3.3.3. Test apoptoze……38
3.4. Analiza promjene ekspresije gena koji sudjeluju u apoptozi, odnosno preživljenju stanica nakon tretmana……..39
3.4.1. Izolacija RNA i sinteza cDNA……...39
3.4.2. *Real time* PCR……40
3.5. Određivanje unutarstaničnog ROS……..43
3.6. Analiza staničnog ciklusa pomoću protočnog citometra……44
3.7. Statistika…… 46

4. REZULTATI……47
4.1. Aktivacija signalnog puta TLR3……..47
4.2. Preživljenje i apoptoza stanica tumora nakon tretmana s poly(I:C) samostalno i u kombinaciji s cisplatinom i zračenjem …...…….…….50
4.2.1. Test citotoksičnosti……50
4.2.2. Test apoptoze……55
4.3. Analiza promjene ekspresije gena koji sudjeluju u apoptozi, odnosno preživljenju stanica nakon tretmana...……...…….57

4.4. Određivanje unutarstaničnog ROS……..60
4.5. Analiza staničnog ciklusa pomoću protočnog citometra…….61

5. RASPRAVA……...66

6. ZAKLJUČAK……80

7. LITERATURA……..81

8. ŽIVOTOPIS……105

1. UVOD

Receptori *Toll-like* (TLR) su transmembranski receptori koji prepoznaju konzervirane molekularne sljedove porijeklom od patogena te sudjeluju u imunosnom odgovoru organizma na infekciju. Osim u urođenoj, TLR posreduju i u stečenoj imunosti. Naime, TLR mogu biti eksprimirani i u stanicama koje predočuju antigene, kao što su dendritičke stanice i makrofazi. Međutim, ekspresija TLR, osim u stanicama imunosnog sustava pronađena je i u stanicama brojnih drugih tkiva, ali i isto tako i tumora. Prisutnost TLR u stanicama određenih tumora potakla je brojna istraživanja o njihovoj ulozi u kancerogenezi, ali i mogućnosti korištenja njihovih liganada u protutumorskom liječenju. Osim što se agonisti TLR već koriste kao adjuvansi u imunoterapiji tumora, neki od njih se samostalno primjenjuju u liječenju određenih vrsta tumora. Tako se npr. imikvimod, agonist TLR7, u obliku pripravka primijenjenog lokalno uspješno koristi u liječenju bazocelularnog karcinoma kože.

Većina receptora TLR smještena je na površini stanice (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10) gdje prepoznaju i vežu različite lipopolisaharide (TLR4), lipide i lipoproteine (TLR1, TLR2 i TLR6) te peptide i proteine (TLR5). TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 smješteni su u endosomu, gdje prepoznaju dvolančane RNA patogenog ili endogenog porijekla, a ekspresija nekih od njih, poput TLR3, pronađena je i u tumorima, uključujući tumore glave i vrata.

Tumori glave i vrata u svijetu su po učestalosti na šestome mjestu. Uzročno su povezani s konzumacijom duhana i alkohola, ali mogu ih uzrokovati i infekcije određenim virusima. Liječenje ovih tumora ovisi o smještaju, stadiju i patohistološkim obilježjima bolesti, ali prvenstveno uključuje operativni zahvat, radioterapiju, kemoterapiju i, od nedavno, ciljanu terapiju pomoću monoklonskog protutijela na receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR, od engl. *epidermal growth factor receptor*) – cetuksimabom. Standardno liječenje karcinoma glave i vrata zasniva se na kombinaciji liječenja zračenjem i kemoterapije upotrebom cisplatine, no posljedica su brojne nuspojave, osobito kad se primjenjuju skupa i u višim dozama, što je često neophodno u liječenju uznapredovalih tumora.

Nekoliko je istraživanja pokazalo da poly(I:C), sintetski analog dvolančane RNA (engl. *double-stranded* RNA) i ligand TLR3, kada se primijeni zajedno s cisplatinom u tretmanu stanica tumora glave i vrata, značajno povećava smrt stanica, odnosno da je za isti antitumorski učinak potrebna niža doza kemoterapeutika (Matijević i sur., 2011.; Ding i sur., 2017.). Iako taj podatak upućuje na moguću primjenu agonista TLR3 u liječenju tumora glave i vrata, potrebno

je napomenuti da uloga TLR3 u tumorima još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Premda su neka istraživanja dokazala povezanost između aktivacije TLR3 i apoptoze stanica tumora, druga su pak ukazala na njegovu ulogu u progresiji i metastaziranju tumora.

Cilj ovog doktorskog rada bio je istražiti u kojim uvjetima prevladava jedan, a pri kojima drugi učinak te je li na njega moguće utjecati. Pri tome smo se za aktivaciju TLR3 koristili njegovim sintetskim ligandom poly(I:C) (od engl. *polyinosinic:polycytidylic acid*). U većini istraživanja koja su pokazala da aktivacija TLR3 dovodi do apoptoze, poly(I:C) je korišten u koncentracijama vrlo visokim za kliničku primjenu (Matijević i sur., 2011.; Vérillaud i sur., 2012.). Istraživanja u kojima je poly(I:C) primijenjen u niskim koncentracijama većinom su ukazala na to da aktivacija TLR3 doprinosi invazivnosti i metastaziranju tumora (Veyrat i sur., 2016.; Matijević Glavan i sur., 2017.).

Nekrozom stanica tumora oslobađa se dvolančana RNA (dlRNA) koja djeluje kao endogeni ligand TLR3, no nije poznato oslobađaju li se i pri tom i neke druge molekule koje bi također mogle aktivirati TLR3.

Protumorski učinci aktivacije TLR3 dijelom su posredovani povećanjem ekspresije proteina koji inhibiraju apoptozu, kao što su c-IAP2 (od engl. *cellular inhibitor of apoptosis protein-2*) i Survivin (Mikulandra i sur., 2018.). Međutim, pokazano je da kombinacija poly(I:C) s inhibitorima c-IAP2, osim što uzrokuje inhibiciju protumorskih učinaka poly(I:C), također pojačava njegove proapoptotske učinke (Friboulet i sur., 2008.; Friboulet i sur., 2010., Weber i sur., 2010.). S obzirom na to da inhibitori c-IAP2 još uvijek nisu u kliničkoj primjeni, u ovom smo radu željeli istražiti je li sličan sinergistički učinak moguće postići s citostatikom koji je već u standardnoj kliničkoj primjeni – cisplatinom, te može li, i na koji način, kombinacija poly(I:C) i cisplatine povećati osjetljivost stanica tumora na zračenje. Rast i preživljenje stanica tumora glave i vrata ispitivali smo testom citotoksičnosti i testom apoptoze. Mehanizme potencijalnog sinergističkog i radiosenzitizirajućeg učinka kombinacije poly(I:C) i cisplatine istraživali smo proučavajući promjenu ekspresije gena koji sudjeluju u apoptozi, odnosno preživljenju stanica tumora, utjecaj na stvaranje molekula ROS i na stanični ciklus.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Receptori *Toll-like*

Receptori *Toll-like* (TLR) dio su obitelji transmembranskih proteina koji prepoznaju konzervirane molekularne sljedove porijeklom od patogena, poznate još i kao PAMP (od engl. *pattern associated molecular patterns*) (Medzhitov i sur., 1997.; Rock i sur., 1998.). Kao posljedica njihove stimulacije, dolazi do aktivacije transkripcijskih čimbenika NF-κB, AP-1 i IRF, što rezultira lučenjem citokina, kemokina i interferona (IFN). Na taj način TLR posreduju u urođenom, ali i stečenom imunosnom odgovoru domaćina na vanjski patogen (Medzhitov i sur., 1997.; Rock i sur., 1998.; Zhang i sur., 1999.).

2.1.1. Struktura i smještaj TLR

TLR su građeni od tri karakteristične domene. Vanstanična domena (N-kraj) građena je od 16-28 ponavljajućih sljedova bogatih leucinom (LRR, od engl. *leucin-rich repeats*) (Akira i Takeda, 2004.) i mjesto je vezanja liganda, dok se unutarstanična domena (C-kraj) naziva domena TIR (od engl. *Toll/IL-1 receptor*) i odgovorna je za prijenos signala (Bell i sur., 2003.; O'Neill i Bowie, 2007.). Unutarstanična i vanstanična domena povezane su transmembranskom domenom. TLR koji prepoznaju nukleinske kiseline unutar stanice se transportiraju putem interakcije s transmembranskim proteinom UNC93B koji je smješten u endoplazmatskom retikulumu (Brinkmann i sur., 2007.; Kim i sur., 2008.).

2.1.2. Ekspresija i uloga TLR u imunosnom odgovoru

U ljudi je nađeno 10 od ukupno 13 TLR pronađenih u sisavaca. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 i TLR11 smješteni su na površini stanice. TLR1, TLR2 i TLR6 prepoznaju različite lipide i proteine; TLR5 i TLR11 vežu peptide i proteine, a TLR4 lipopolisaharide. TLR3, TLR7/8 i TLR9 smješteni su endosomima i endoplazmatskom retikulumu (ER). Njihovi ligandi su dvolančana RNA (TLR3), jednolančana RNA (TLR7/8) te CpG-DNA i CpG-ODN (TLR9) (Hemmi i sur., 2000.). Različite unutarstanične molekule koje se oslobađaju nakon oštećenja stanica i tkiva također mogu aktivirati signalne puteve TLR (Yu i sur., 2010.), a nazivaju se endogeni ligandi ili molekularni sljedovi porijeklom od oštećenja

ili, skraćeno, DAMP (od engl. *damage-associated molecular patterns*). DAMP mogu biti dijelovi izvanstaničnog matriksa, stanični proteini, lipidi, metaboliti (Miyake, 2007.; Rakoff-Nahoum i Medzhitov, 2009.) i nukleinske kiseline (Kariko i sur., 2004.; Kelly i sur. 2006a.; Sioud, 2006.; Cavassani i sur., 2008.).

TLR su najpoznatiji po svojoj ulozi u pokretanju urođene, ali i stečene imunosti. U najvećoj su mjeri eksprimirani na površini i u endosomima stanica koje predočuju antigene kao što su dendritičke stanice, gdje prepoznaju PAMP, čime se pokreće kaskada signala kojim se aktiviraju nezrele dendritičke stanice. Aktivirane dendritičke stanice potom iz perifernih tkiva putuju u limfne čvorove, gdje sazrijevaju i predočuju antigene naivnim limfocitima T. Sazrijevanjem dendritičkih stanica povećava se količina kostimulacijskih molekula (CD80/86 i CD40) i kompleksa glavnog sustava tkivne snošljivosti MHC (engl. *major histocompatibility complex*) na njihovoj površini, što im omogućuje interakciju s naivnim limfocitima T. Ovisno o tome koji je TLR aktiviran, dendritičke stanice proizvodit će različite vrste citokina. Različiti citokini usmjeravaju proces diferencijacije limfocita T prema Th1, Th2, Th17 ili T-reg (od engl. *T-regulatory*). Tako infekcija bakterijama i unutarstaničnim patogenima potiče odgovor Th1 putem aktivacije TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 i TLR9. Nasuprot tome, alergijske reakcije i parazitske infekcije kroz aktivaciju TLR2/1, TLR2/6 i TLR5 usmjeruju imunološku reakciju prema odgovoru Th2 (Dowling i Mansell, 2016.).

Osim što su TLR eksprimirani na stanicama imunološkog sustava, njihova je ekspresija utvrđena i u mnogim drugim tkivima, kao i tkivima tumora. Među normalnim tkivima, ekspresija TLR pronađena je na stanicama središnjeg živčanog sustava (Suhi sur., 2009.), stanicama epitela, stanicama dijelova ženskog reproduktivnog sustava i krvotvornim matičnim stanicama (Yu i Chen, 2008.). Osim toga, ekspresija TLR2, TLR3 i TLR4 pronađena je u bubrežnim (Papadimitraki i sur., 2009.) i okusnim stanicama (Wang i sur., 2009.). Također, ekspresija TLR nađena je u različitim tumorskim staničnim linijama, kao što su stanice raka želuca (Schmaußer i sur., 2004.), debelog crijeva (Furrie i sur., 2005.), grkljana (TLR2, TLR3, TLR4) (Szczepanski i sur., 2007.), ždrijela (TLR3) (Matijević i sur., 2009.), jetre (TLR2, TLR3 , TLR4, TLR6, TLR9) (Ishimura i sur., 2005.), pluća (TLR 2, TLR3, TLR4, TLR9) (Droemann i sur., 2005.), prostate (TLR3, TLR9) (Ilvesaro i sur., 2007.; Paone i sur., 2008.), dojke (TLR3, TLR4, TLR9) (Merrell i sur., 2006.; Salaun i sur., 2006.), vrata maternice (karcinom pločastih stanica) (TLR5, TLR9) (Lee i sur., 2007.; Kim i sur., 2008.), melanoma (TLR3, TLR5) (Molteni i sur., 2006.; Salaun i sur., 2007a.), multiplog mijeloma (TLR1, TLR7, TLR9) (Jego i sur., 2006.), epitelnog karcinoma jajnika (TLR4) (Kelly i sur., 2006b.) i neuroblastoma (TLR4)

(Hassan i sur., 2006.). Čini se da TLR u tumorima imaju dvije izrazito različite uloge. Dok neke studije ukazuju na to da aktivacija nekih TLR dovodi do apoptoze, drugi ukazuju da TLR mogu imati važnu ulogu u progresiji tumora i invaziji (Salaun i sur., 2007b.).

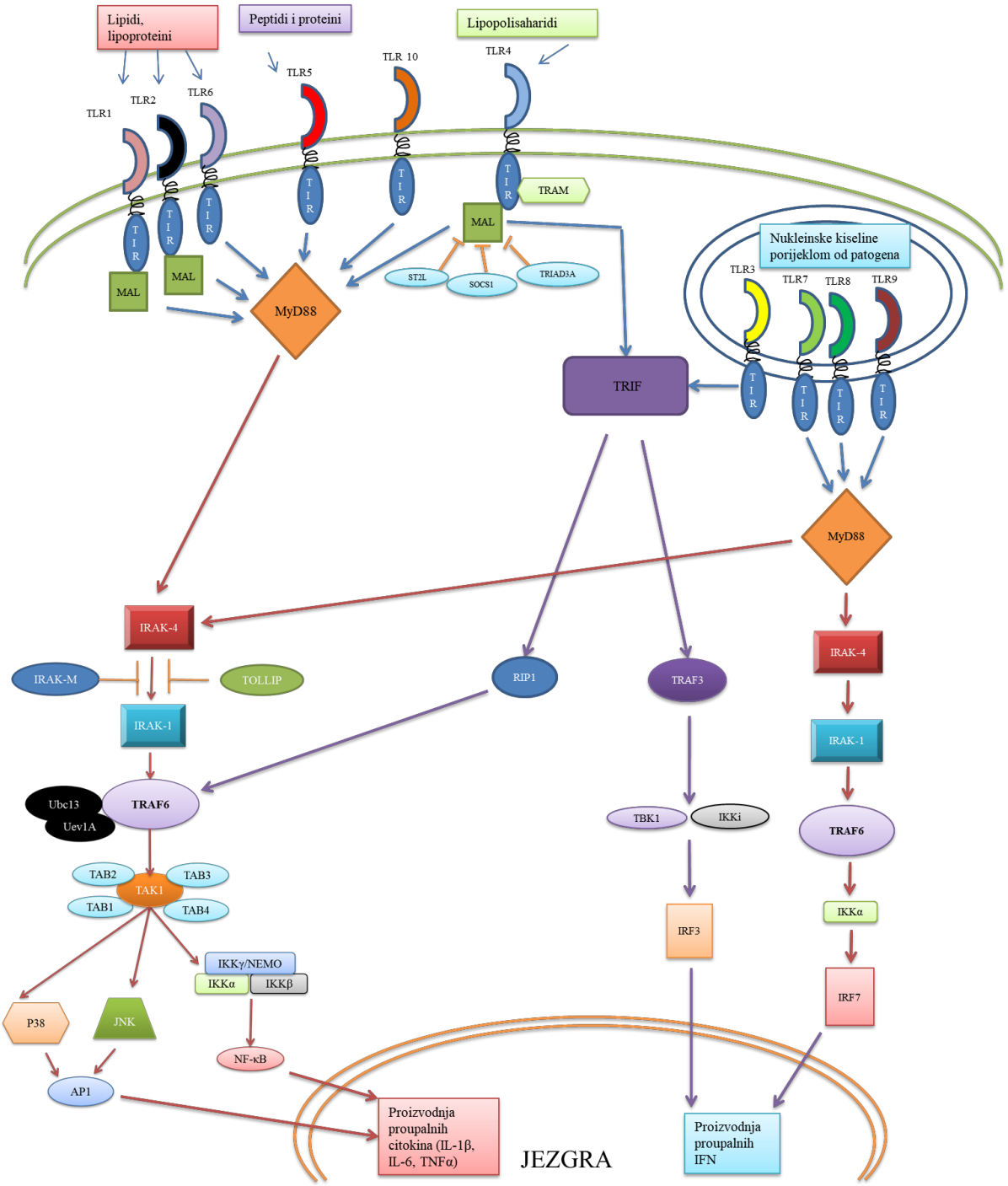
2.1.3. Prijenos signala receptorima *Toll-like*

Nakon vezanja liganda za komplementarni TLR, dolazi do dimerizacije receptora. Ona pak dovodi do konformacijske promjene, što omogućuje novačenje adaptorskih molekula koje sadrže domenu TIR (Slika 1.). U adaptorske molekule spadaju MyD88 (od engl. *myeloid differentiation primary response 88*), TIRAP (od engl. *TIR domain containing adaptor protein*), također poznat kao MAL (od engl. *myelin and lymphocyte protein*) i TRIF (od engl. *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-β*) (Akira i sur., 2003.). Time započinje signalna kaskada koja ovisno o vrsti aktiviranog TLR dovodi do aktivacije više transkripcijskih čimbenika. Dva su glavna signalna puta: signalni put ovisan i neovisan o MyD88. Aktivacija svih TLR osim TLR3 pokreće signalni put ovisan o MyD88 (Medzhitovi sur., 1997.; Brikos i O'Neill, 2008.). Aktivirani MyD88 unovačuje Irak-4 (od engl. *interleukin-1 receptor-associated kinase-4*), koji fosforilira Irak-1. Aktivirani Irak-1 se autofosforilira, što dovodi do aktivacije TRAF6 (od engl. *TNF receptor-associated factor 6*). Irak-M i Tollip (od engl. *Toll-interacting protein*) su pri tome glavni negativni regulatori ovog puta, koji djeluju putem interakcije s Irak-1. TRAF6 aktivira kompleks IKK (od engl. *IkappaB kinase)* preko interakcije s TAK1-TAB (od engl. *TGF-β activated kinase - TAK1 binding proteins*) i kompleksom Ubc13-Uev1A. TAK1 je kinaza MAP (od engl. *mitogen-activated protein kinase*) koja se aktivira udruživanjem s TAB1, TAB2, TAB3 i TAB4. TAB1 stimulira autofosforilaciju TAK1. TAB2 i TAB3 omogućuju povezivanje TAK1 s TRAF6. TAB4 potiče fosforilaciju TAK1-TAB1. To dovodi do aktivacije p38 i JNK (od engl. *c-Jun N- terminal kinase*) kinaza MAP, odnosno AP-1 (od engl. *activating protein-1*) i NF-κB (od engl. *nuclear factor kappa B*). U neaktivnom stanju, NF-κB je povezan s IκB (od engl. *inhibitor of kappa B*). Aktiviran kompleks IKK uzrokuje razgradnju IκB i oslobađanje NF-κB, koji odlazi u jezgru gdje potiče transkripciju ciljnih gena. Rezultat je lučenje proupalnih citokina, kao što su interleukini i TNF-α (od engl. *tumor necrosis factor alpha*) (Li i sur., 2010.). Osim gena koji reguliraju lučenje citokina i kemokina, NF-κB i AP-1 reguliraju i gene supresore tumora, gene koji potiču rast tumora, gene koji reguliraju stanični ciklus, gene koji reguliraju apoptozu, faktore rasta, itd. (Matijević i Pavelić, 2012.).

Signalizacija putem TLR4 može biti ovisna i neovisna o MyD88. Za aktivaciju oba signalna puta, osim adaptorske molekule MAL (TIRAP) potreban je TRAM (od engl. *TRIF-related adaptor molecule*).

Prijenos signala putem TLR3 (preko adaptora TRIF koji je specifičan za TLR3) je neovisan o MyD88 i može ići u dva smjera. Adaptor TRIF putem interakcije s RIP1 (od engl. *receptor-interacting protein-1),* aktivira TRAF6, odnosno TAK1, pokrećući signalnu kaskadu koja dovodi do aktivacije NF-κB i AP-1. Adaptor TRIF također može aktivirati i TRAF3. Aktivacija TRAF3, preko TBK1 (od engl. *TRAF family member-associated NF-κB activator (TANK) binding kinase*) i IKKi (od engl. *inducible IkappaB kinase* (Akira i Takeda, 2004.), rezultira aktivacijom IRF3 (od engl. *interferon-regulatory factor 3*). Pri tome se čini da aktivacija TBK1 i IKKi potiče preživljavanje i proliferaciju stanica tumora (Clément i sur., 2008.), dok aktivacija IRF3 ima tumor-supresorski učinak (Duguay i sur., 2002.). Aktivacija IRF dovodi do lučenja interferona tipa I, što znači da je signalni put ovisan o TRIF uglavnom odgovoran za imunosni odgovor na virusnu infekciju (Dowling i Mansell, 2016.).

Prijenos signala ovisan o TLR7, TLR8 i TLR9 posredovan je putem MyD88 i uglavnom dovodi do aktivacije IRF7, za koji je dokazano da ima i onkogeni i protutumorski potencijal (Ning i sur., 2011.).



Slika 1. Prijenos signala TLR (Mikulandra i sur., 2017.). Aktivacija TLR dovodi do novačenja adaptorskih molekula MyD88 i/ili TRIF čime se pokreće signalna kaskada koja dovodi do aktivacije čimbenika transkripcije NF-κB, AP-1 ili IRF koji potiču proizvodnju proupalnih citokina i interferona.

2.1.4. TLR i tumori

Spoznaja da su TLR eksprimirani u stanicama brojnih tumora izazvala je veliko zanimanje za istraživanje njihove uloge u tumorima. Nakon što je otkriveno da aktivacija TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 i TLR9 može potaknuti programiranu staničnu smrt, velik dio istraživanja je usmjeren ka potencijalnoj primjeni njihovih agonista u liječenju tumora. Međutim, postupno je sve veći broj studija pokazao da aktivacija ovih receptora može imati upravo suprotan učinak, odnosno da potiče rast, preživljenje pa čak i metastaziranje tumora. Nedavno je pokazano da aktivacija TLR2 potiče samoobnavljanje matičnih stanica tumora dojke i metastaziranje (Conti i sur., 2013.), sudjeluje u očuvanju svojstava matičnih stanica tumora želuca (Echizen i sur., 2016.), a uz to može potaknuti i neoangiogenezu neovisno o čimbeniku rasta vaskularnog endotela (VEGF, od engl. *vascular endothelial growth factor*) (West i sur., 2010.). U tumorima glave i vrata dokazana je povezanost između ekspresije TLR2 i gradusa, odnosno duboke invazije tumora (Mäkinen i sur., 2015.). Aktivacija TLR3 može potaknuti apoptozu, ali i rast, povećanje migracije i metastaziranje stanica tumora. Nedavno je pokazano da aktivacija TLR3 u stanicama tumora dojke istovremenom aktivacijom prijenosa signala preko β-katenina i NF-κB uzrokuje razvoj fenotipa matičnih stanica (Jia i sur., 2015.). Visoka ekspresija ovog receptora nađena je upravo u tumorima glave i vrata, no zanimljivo je da isti nije bio eksprimiran u stanicama okolnog zdravog tkiva, čak ni na udaljenosti od 5 mm od tumora (Pries i sur., 2008.). TLR4 je najviše proučavan od svih TLR. Njegova je ekspresija pronađena u brojim tumorima, uključujući tumore glave i vrata, probavnog sustava i melanoma, a dokazano je da njegova aktivacija pomaže tumorima u izbjegavanju imunosnog odgovora (Szczepanski i sur., 2009.). Dokazana je povezanost između aktivacije TLR4 endogenim ligandima, poznatijim kao DAMP, i rasta i metastaziranja tumora (Riddell i sur., 2010.; Yu i sur., 2014.). Kao i u slučaju TLR2, i kod ovog je receptora pronađena povezanost između razine ekspresije i gradusa, odnosno dubine invazije tumora (Mäkinen i sur., 2015.). Dokazano je, također, da aktivacija TLR4 potiče proces epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) te migracije stanica tumora (He i sur., 2015.). Dvojnu ulogu u tumorima ima i TLR5. Dok s jedne strane aktivacija ovog receptora inhibira rast tumora dojke (Cai i sur., 2011.), pluća (Zhou i sur., 2014.) i melanoma (Yang i sur., 2015.), s druge strane potiče proliferaciju tumora želuca (Song i sur., 2011.) i limfoma (Mastorci i sur., 2016.). Povećana ekspresija TLR5 pronađena je i u tumorima glave i vrata. Premda nije nađena povezanost ekspresije ovog receptora s gradusom i stadijem tumora, pokazalo se da je ekspresija TLR5 mogući prediktivni čimbenik preživljenja, odnosno povrata tumora (Kauppila i sur., 2013.). Agonist TLR7, imikvimod, već se koristi u

protutumorskom liječenju određenih kožnih karcinoma u obliku topikalnog pripravka. Međutim, aktivacija TLR7, ali i TLR8, povezana je s progresijom određenih vrsta tumora, prvenstveno s karcinomom pluća nemalih stanica, kao i s otpornošću na sistemsku terapiju (Chatterjee i sur., 2014.). U tumorima glave i vrata, ekspresija TLR7 povezana je sa slabijom diferencijacijom i lošijom prognozom (Ni i sur., 2015.). TLR9 također mogu aktivirati endogeni ligandi, a čini se da njegova aktivacija potiče ekspresiju gena odgovornih za „matičnost“ stanica tumora (Moreira i sur., 2015.). Matičnost je sposobnost stanica da se samoobnavljaju i diferenciraju koja stanicama tumora omogućuje rast i metastaziranje. Tumorske stanice ovo obilježje mogu razviti kao odgovor na različite stimulanse iz okoline. Posljedica je dediferencijacija stanica tumora, odnosno poprimanje fenotipa matičnih stanica. Matičnost tumora povezana je s progresijom i metastaziranjem tumora, kao i s otpornošću na kemoterapiju i zračenje. (Aponte i Caicedo, 2017.). Povišena ekspresija TLR9 nađena je, između ostalog i u tumorima glave i vrata, gdje je utvrđena pozitivna uzročno-posljedična povezanost između ekspresije ovog receptora i slabije diferencijacije, veće invazivnosti i općenito lošije prognoze tumora (Kauppila i sur., 2015.).

2.2. Receptor TLR3

2.2.1. Građa i smještaj receptora TLR3

TLR3 se nalazi unutar endosoma mnogih epitelnih stanica, a osnovna mu je funkcija prepoznavanje dvolančane RNA porijeklom od patogena. Kao i ostali TLR, građen je od tri domene. Vanjska domena ima oblik potkove, a građena je od 23 podjedinice bogate leucinom (Sen i Sarkar, 2005.). Svaka od podjedinica građena je od 24 aminokiseline, a aminokiseline unutar LRR 20 podjedinice služe kao mjesto vezanja liganda (Bell i sur., 2006.). TLR3 aktivira infekcija virusom ili tretman s poly(I:C), sintetskim analogom dlRNA (Okahira i sur., 2005.). Pri tome duljina dlRNA ne može biti manja od 45 parova baza. Prilikom aktivacije, dolazi do dimerizacije receptora TLR3 za što su odgovorne C-terminalne LRR podjedinice (LRR 20-22). Važno je i napomenuti da je vanstanična domena bogato glikolizirana (N-glikozilacija na 15 mjesta, od kojih je 11 vidljivo u kristalnoj strukturi). dlRNA ulazi u interakciju s dva mjesta na neglikoliziranom dijelu vanstanične domene, od čega je jedan blizu N-terminalnog kraja (N-terminalni LRR i LRR 1-3), a drugi blizu C-terminalnog kraja (LRR 19-23). Ove dvije točke prilikom aktivacije receptora također stupaju i u međusobnu interakciju (Botos i sur., 2011.). Za prijenos signala odgovorna je unutarstanična domena (domena TIR). Između transmembranske i domene TIR (u tzv. *linker* regiji) nalaze se strukturni sljedovi koji određuju smještaj TLR3 unutar stanice.

2.2.2. Ekspresija receptora TLR3

Ekspresija TLR3 nađen je u dendritičkim stanicama (Muzio i sur., 2000.), NK (od engl. *natural killer*) stanicama (Schmidt i sur., 2004.), makrofazima (Heinz i sur., 2003.), fibroblastima (Matsumoto i sur., 2002.), stanicama posteljice, gušterače, jetre, srca, limfnih čvorova (Assmann i sur. 2015.), crijevnog epitela (Zarember i Godowski, 2002.), pluća (Murray i sur., 2008.), kao i astrocitima i mikroglijama mozga (Suh, Brosnan i Lee, 2009.). O ekspresiji TLR3 u monocitima, granulocitima te limfocitima T i B postoje proturječni podaci. Dok neka istraživanja potvrđuju ekspresiju TLR3 na ovim stanicama, druga ga negiraju (Muzio i sur., 2000.; Zarember i Godowski, 2002.). TLR3 je u fibroblastima i epitelnim stanicama eksprimiran unutar i na površini stanice, dok je u dendritičkim stanicama eksprimiran samo u

endosomu, što ukazuje na različitu ulogu pojedinih stanica u obrani organizma od virusa (Assmann i sur., 2015.). Ekspresija TLR3 nađena je i u stanicama brojnih tumora, kao što su tumor želuca (Schmaußer i sur., 2004.), debelog crijeva (Furrie i sur., 2005.), usne šupljine (Han i sur., 2016.), ždrijela (Matijević i sur.,2009.), grkljana (Szczepanski i sur., 2007.), jetre (Ishimura i sur., 2005.), pluća (Droemann i sur., 2005.), prostate (Paone i sur., 2008.), dojke (Salaun i sur., 2006.), bubrega (Morikawa i sur., 2007.) i kože (Salaun, i sur., 2007a.). Zanimljivo je da je pronađena visoka ekspresija TLR3 u malignim stanicama tumora glave i vrata (kao i visoka aktivnost transkripcijskog čimbenika NF-κB), dok isti nije bio eksprimiran u stanicama okolnog zdravog tkiva, ni na udaljenosti od 5 mm od tumora (Pries i sur., 2008.).

2.2.3. Ligandi TLR3

Prirodni ligand TLR3 je dlRNA, porijeklom od patogena (uglavnom od virusa). Vezanje liganda odvija se na sljedeći način: TLR3 prvo slabo veže dlRNA na N- i C- terminalnim veznim mjestima te potom formira stabilan kompleks putem međudjelovanja s drugim TLR3. Pri tome je za uspješnu aktivaciju signalnog puta ključna dimerizacija receptora. Na mjestima gdje je TLR3 slabo eksprimiran, udaljenost između dva receptora je veća, pa je i sama vjerojatnost dimerizacije i aktivacije signalnog puta manja. Također, molekule dlRNA manje od 45 parova baza (kao što su endogene t-RNA, mikroRNA i ribosomska RNA) ne mogu formirati stabilne komplekse s TLR3 i tako ih aktivirati. Na taj način se organizam štiti od prekomjerne i neselektivne aktivacije signalnog puta TLR3 (Wang i sur., 2010.). Neki od liganada koje otpuštaju umiruće stanice mogu aktivirati TLR. U slučaju TLR3, to su stanične RNA, uglavnom mRNA. Cavassani i suradnici su u studiji na miševima istraživali važnost endogene RNA iz nekrotičnih stanica u razvoju upalnog odgovora te dokazali da TLR3 u tom slučaju djeluje kao endogeni senzor nekroze, neovisno o aktivaciji vanjskim patogenom (Cavassani i sur., 2008.). Takemura i suradnici dokazali su da RNA oslobođene iz stanica razorenih zračenjem, aktivacijom TLR3 potiču upalni odgovor te u konačnici dovode do razvoja postiradijacijskog gastrointestinalnog sindroma u zračenih miševa. Blokadom TLR3 spriječen je nastanak navedenog sindroma (Takemura i sur., 2014.). Poly(I:C) je sintetski analog dlRNA , koji također aktivira TLR3. Međutim, poly(I:C) nije specifičan ligand TLR3, već može aktivirati i receptore MDA-5 (od engl. *melanoma differentiation-associated protein 5*) i RIG-I (od engl. *retinoic acid- inducible gene I*). Poly(A:U) je također sintetski analog

dlRNA, no za razliku od poly(I:C) je specifičan za TLR3 (Perrot i sur., 2010.).

2.2.4. Protutumorska uloga TLR3

TLR3 djeluje protiv tumora na dva osnovna načina: poticanjem apoptoze te poticanjem imunološkog antitumorskog odgovora.

2.2.4.1. Poticanje apoptoze putem TLR3

Aktivacija antiapoptotskih gena, odnosno deaktivacija proapoptotskih gena gotovo je uvijek povezana s razvojem, progresijom i metastaziranjem tumora. Dokazano je da aktivacija TLR3 aktivira vanjski i unutrašnji put apoptoze (Sun i sur., 2011.). Proizvodnja IFN-β (nakon aktivacije TLR3) dovodi do povišene ekspresije kaspaza (Juang i sur., 2004.), TRAIL (od engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (Chawla-Sarkar i sur., 2002.; Morrison i sur., 2005.) i p53 (Takaoka i sur., 2003.). Dokazano je da u tumorima glave i vrata poly(I:C) potiče apoptozu aktivacijom kaspaza -3 i -9 (Pisani i sur., 2017.). Osim navedenog, TLR3 može potaknuti apoptozu i putem aktivacije proteina RIP1, poznatog po svojoj ulozi u odluci stanice da preživi (putem aktivacije kinaza MAP) ili podlegne apoptozi (Festjens i sur., 2007.). Unutrašnji je put apoptoze reguliran proteinskom obitelji Bcl-2 (od engl. *B-cell lymphoma-2*), koja se sastoji od antiapoptotskih čimbenika kao što su Bcl-2, Bcl-XL (od engl. *B-cell lymphoma-extra large*) i Mcl-1 (od engl. *myeloid cell leukemia-1*) koji čuvaju cjelovitost mitohondrijske membrane i proapoptotskih čimbenika, kao npr. Bax (od engl. *Bcl-2 associated X*), Bak (od engl. *Bcl-2 homologous antagonist/killer*), Noxa i Puma (od engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*) koji povećavaju propusnost iste. Park i suradnici pokazali su da poly(I:C) snižava ekspresiju *Bcl-2* (Park i sur., 2012.). Bax i Bak, pak, promiču oslobađanje citokroma c iz mitohondrija, koji se u citoplazmi veže na adaptorski protein Apaf1 (od engl. *apoptotic protease activating factor 1*), čineći kompleks koji aktivira prokaspazu -9, čime se pokreće kaskadna reakcija koja u konačnici dovodi do apoptoze (Bisen i sur., 2013.). Tu je kaskadu moguće prekinuti, za što su zaslužni neki od proteina IAP (od engl. *inhibitor of apoptosis protein*), koji inhibiraju apoptozu putem inhibicije kaspaza -3 i -7 (Deveraux i sur., 1997.). Jedan od pripadnika gena obitelji IAP je *Survivin*, koji je normalno eksprimiran tijekom fetalnog razvoja. Dok je *Survivin*

rijetko eksprimiran u zdravim tkivima odraslih jedinki, ekspresija mu je dokazana u stanicama brojnih tumora (Ambrosini, i sur., 1997.; Satoh i sur., 2001.). Nomi, Kodama i Suzuki pokazali su da aktivacija TLR3 inducira apoptozu stanica tumora glave i vrata, pri čemu je ekspresija Survivina snižena (Nomi i sur., 2010.). Stanični IAP2, ili skraćeno cIAP2 (od engl. *cellular IAP2*) inhibira apoptozu putem interakcije s kaspazama te potiče proliferaciju, invazivnost i metastaziranje stanica tumora. Riječ je o ubikvitin ligazi E3 koja se veže na TRAF2 i TRAF3 te s njima formira kompleks koji, putem razgradnje ovisne o ubikvitinu, regulira razne aspekte upalnog i imunološkog odgovora (Yang i Sun, 2015.). Friboulet i suradnici su u uzorcima tkiva nazofaringealnog karcinoma pozitivnog na EBV (od engl. *Epstein-Barr virus*) opisali izrazito povišenu razinu proteina cIAP2 koji je inhibirao apoptozu posredovanu aktivacijom TLR3 (Friboulet i sur., 2008.).

Ono što svakako valja napomenuti jest da, iako je većina studija koje su pokazale proapoptotski učinak u pokusima koristila vrlo visoke koncentracije poly(I:C) (10-100 μg/ml) (Salaun i sur., 2006.; Morikawa i sur., 2007.; Jiang i sur., 2008.), Friboulet i suradnici su dokazali da, iako poly(I:C) povećava ekspresiju cIAP2 u stanicama tumora, kad se primijeni u kombinaciji s inhibitorom proteina IAP RMT 5265, inhibira rast i potiče apoptozu stanica tumora čak i u vrlo niskim koncentracijama (500 ng/mL) (Friboulet i sur., 2010.). Druga je studija ukazala na to da je inhibitorni učinak poly(I:C) na rast stanica tumora direktno ovisan o dozi (Park i sur., 2012.).

Iz mitohondrija se također oslobađaju proteini koji mogu inhibirati IAP, kao što je npr. Diablo. Određeni kemoterapeutici, kao što su npr. paklitaksel i doksorubicin, mogu smanjiti ekspresiju gena *IAP* i tako potaknuti apoptozu tumorskih stanica (Rathore i sur., 2017.).

2.2.4.2. Poticanje imunološkog antitumorskog odgovora putem TLR3

Odumiranjem stanica tumora dolazi do ispuštanja endogenih liganada u tumorski mikrookoliš gdje mogu aktivirati dendritičke stanice. Pretpostavlja se da na sličan način dolazi i do oslobađanja endogenih liganada TLR3 koji u teoriji mogu na sličan način aktivirati dendritičke stanice, međutim, trenutno dostupne spoznaje većinom endogene ligande TLR3 dovode u svezu s poticanjem rasta i metastaziranja tumora.

Ipak, s obzirom na to da aktivacija TLR3 u dendritičkim stanicama može potaknuti

sistemski antitumorski odgovor, agonisti TLR ispitivani su u brojnim studijama kao mogući imunoterapeutici. Zbog svoje sposobnosti da pokrene imunološki odgovor i potakne programiranu staničnu smrt, poly(I:C) je jedan od obećavajućih kandidata u budućnosti imunoterapije tumora. Poly(I:C), odnosno njegova manje toksična modifikacija Ampligen®, na imunološki sustav djeluje tako da se veže na TLR3 na dendritičkim stanicama i tako ih aktivira. Aktivirane dendritičke stanice iz perifernih tkiva migriraju u limfne čvorove, gdje sazrijevaju i predočuju antigene naivnim limfocitima T te potiču njihovo sazrijevanje. Zreli citotoksični limfociti T luče interferon γ (IFNγ), koji aktivira NK stanice i tako stimulira antitumorski odgovor (Jelinek i sur., 2011.). Tako je tretman stanica neuroblastoma čovjeka sa poly(I:C) značajno inhibirao rast stanica s visokom ekspresijom TLR3 i potaknuo njihovu apoptozu (Chuang i sur., 2011.). Aktivacija TLR3 na stanicama karcinoma bubrega svijetlih stanica također je inhibirala rast stanica tumora (Morikawa i sur., 2007.). Nedavno je pokazano da je poly(I:C) učinkovit u liječenju neinvazivnog raka mokraćnog mjehura, a učinkovitost je bila još veća kad je poly(I:C) primijenjen u kombinaciji s imunoterapijom *Bacillus Calmette–Guérin* (Ayari i sur., 2016.). Zanimljivi su rezultati istraživanja Ming Lima i suradnika, koji su dokazali da aktivacija TLR3 poboljšava imunostimulatorni potencijal cetuksimaba, antitijela na EGFR u liječenju tumora glave i vrata (Ming Lim i sur., 2013.).

2.2.5. Uloga TLR3 u progresiji i metastaziranju tumora

Aktivacija TLR3 može dovesti i do progresije tumora putem pojačanog lučenja proupalnih citokina, poticanja migracije stanica tumora, povećanog lučenja metaloproteinaza, povećanja ekspresije faktora rasta VEGF, poticanja proliferacije stanica putem indukcije signalnog puta Myc, poticanja metaboličkog reprogramiranja te povećanog stvaranja molekula ROS (od engl. *reactive oxygen species*) (Pries i sur., 2008.; Matijević i Pavelić, 2011.; Matijević Glavan i sur., 2017.). Pokazano je da je povišena razina ekspresije TLR3 u tkivima tumora glave i vrata povezana sa slabom diferencijacijom tumora i perineuralnom invazijom (Chuang i sur., 2012.).

2.2.5.1. Lučenje proupalnih citokina

Dokazana je prisutnost povišenih koncentracija proupalnih citokina u tumorskim tkivima, kao i njihov utjecaj na progresiju tumora. Naime, proupalni citokini mogu inhibirati apoptozu i stimulirati diobu stanica, mogu aktivirati proupalne signalne puteve i time dovesti do kronične upale u mikrookolišu tumora, dovesti do oštećenja DNA, stimulirati angiogenezu i povećati metastatski potencijal tumora (Kundu i Surh, 2008.). Chuang i suradnici dokazali su da poly(I:C) uzrokuje povećano lučenje interleukina-6 i CCL5 (od engl. *chemokine (C-C motif) ligand 5*) u stanicama pločastog karcinoma usne šupljine te potiče migraciju stanica tumora (Chuang i sur., 2012.). Osim IL-6, aktivacija TLR3 potiče lučenje i brojnih drugih citokina koji potiču rast i razvoj tumora, kao što su IL-8, IL-1α, IL-1β, IL-12p40, TNF-α, VEGF, TGF-β (od engl. *trasforming growth factor beta*) i MCP-1 (od engl. *monocyte chemoattractant protein 1*) (Matijević i sur., 2009.; He i sur., 2014.). Pri tome je proizvodnja IL-6 i TNF- α posredovana isključivo putem NF-κB (He i sur., 2014.). Poznato je da IL-8 i IL-1α potiču izražaj metaloproteinaza matriksa (MMP). Osim toga, IL-8 može direktno potaknuti preživljenje i rast stanica i potaknuti ekspresiju MMP-2 i -9 (Li i sur., 2003.).

2.2.5.2. Povećanje ekspresije gena uključenih u progresiju tumora

Na stanicama tumora ždrijela dokazano je da poly(I:C) dovodi do povišenja ekspresije gena uključenih u progresiju tumora, kao što su *VEGF, RORB, PLAUR* i *MMP9* (Matijević i Pavelić, 2011.). Paone i suradnici pokazali su da aktivacija TLR3 posredno dovodi do pojačane transkripcije *VEGF* u stanicama tumora prostate putem indukcije *HIF-1α* (engl. *hypoxia-inducible factor 1α*) (Paone i sur., 2010.). Na stanicama metastaza tumora crijeva pokazano je da poly(I:C) direktno povećava ekspresiju gena *CXC10* (od engl. *C-X-C motif chemokine 10*), čiji proteinski produkt ima važnu ulogu u angiogenezi i metastaziranju tumora (Keeley i sur., 2010.; Bugge i sur., 2017.).

2.2.5.3. Poticanje migracije stanica, invazije i metastaziranja

Sposobnost stanica tumora da razgrade dijelove izvanstaničnog matriksa i tako postanu invazivne ovisi dijelom i o povećanoj ekspresiji MMP. Dokazano je da MMP mogu inducirati epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) (Radisky i Radisky, 2010.). EMT je proces u kojem se gube adhezivne veze između pojedinih stanica epitela, čime one steknu sposobnost migracije i invazivnosti, postajući pri tome mezenhimalne stanice. Ovaj je proces prvi korak u metastaziranju tumora. Dokazano je i da, osim što potiče ekspresiju MMP (između ostalog MMP13 koja je neophodna za invaziju i metastaziranje melanoma (Zigrino i sur., 2009.), aktivacija TLR3 izravno dovodi i do jačeg izražaja drugih proteaza uključenih u reorganizaciju tkiva i staničnu migraciju, kao što je urokinazni aktivator plazminogena. Osim toga, pojačava i ekspresiju integrina β1 te smanjuje ekspresiju E-kadherina, što je jedan od prvih događaja u EMT (Matijević i Pavelić, 2011.). Osim toga, aktivacija TLR3 dovodi i do snižene ekspresije kalretikulina, proteina odgovornog za adheziju stanica (putem interakcije s integrinima) te njihovu migraciju (Lu i sur., 2015.). Smanjenje ekspresije kalretikulina dovodi do smanjenja inhibicije stanične proliferacije, što može doprinijeti progresiji tumora. Osim snižene ekspresije kalretikulina, aktivacija TLR3 dovodi i do povišene ekspresije profilina-1, proteina koji veže aktin čija je pojačana ekspresija pronađena i u drugim tumorima, kao što su tumor bubrega, želuca i fibrosarkom kože (Matijević i Pavelić, 2012.). Studija rađena na stanicama vaskularnog endotela pokazala je da profilin-1 igra važnu ulogu u staničnoj migraciji, ali i u razgradnji izvanstaničnog matriksa (poticanjem lučenja MMP2) i invaziji, ukazujući na njegovu važnost u angiogenezi (Ding i sur., 2009.). Dokazano je da aktivacija TLR3 uzrokuje povećanje ekspresije biljega EMT (vimentin, fibronektin i Snail) i aktivaciju Rac1 (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) u stanicama metastaza tumora ždrijela (Matijević Glavan i Mikulandra, 2017.). Rac1 je protein iz obitelji Rho GTP-aza za koje je poznato da utječu na brojne biološke procese, kao što su regulacija staničnog ciklusa, regulacija prepisivanja gena, kontrola apoptoze, restrukturiranje citoskeleta te promet kroz staničnu membranu (Moon i Zheng, 2003.). Čini se da su aktivacija Rac1 i EMT međusobno povezani procesi. Nekoliko je radova ukazalo na to da aktivacija Rac1 potiče epitelno-mezenhimalnu tranziciju u raznim vrstama tumora (Gulhati i sur., 2011.; Chen i sur., 2015.; Fang i sur., 2017.).

2.2.5.4. Poticanje metaboličkog reprogramiranja

Povećana ekspresija TLR3 pronađena je u stanicama tumora glave i vrata, gdje je izgledno da ima važnu ulogu u poticanju metaboličkog reprogramiranja, odnosno prelaska s oksidativne fosforilacije na aerobnu glikolizu (Veyrat i sur., 2016.; Matijević Glavan i sur., 2017.). Ovaj se oblik reprogramiranja metabolizma učestalo povezuje s malignim fenotipom te je poznat pod nazivom Warburgov učinak (Vander Heiden i sur., 2009.). Važna karika u tom procesu je HIF-1. HIF-1 je čimbenik transkripcije koji regulira više staničnih procesa, uključujući i apoptozu, kao odgovor na hipoksiju, a koji se sastoji od dvije podjedinice - HIF-1α i HIF-1β. U uvjetima normalne oksigenacije (normoksije), HIF-1α je podložan proteasomskoj razgradnji te su njegove razine u stanici niske. U hipoksičnim uvjetima razine HIF-1α su dovoljno visoke da se može vezati na HIF-1β i tako formirati funkcionalni HIF-1 kompleks (Brahimi-Horn i Pouyssegur, 2009.). Veyrat i suradnici pokazali su da je stimulacija TLR3 uzrokovala povišenje ekspresije proteina HIF-1α čak i u uvjetima normoksije, dok je inhibicija TLR3, čak i uvjetima hipoksije dovela do smanjenja ekspresije ovog proteina (Veyrat i sur., 2016.). Također je pokazano da u stanicama tumora usne šupljine postoji pozitivna povratna sprega između aktivacije TLR3 i TLR4 i ekspresije HIF-1. Naime, aktivacija TLR3 i TLR4 povećava ekspresiju HIF-1 putem NF-κB, a NF-κB pak dovodi do povećanja ekspresije TLR3 i TLR4 u stanicama tumora (Han i sur., 2016.). Paone i suradnici pokazali su da aktivacija TLR3 u tumoru prostate potiče lučenje VEGF-a putem indukcije HIF-1α te tako stimulira neoangiogenezu (Paone i sur., 2008.).

Međutim, HIF nije jedini čimbenik važan za metaboličko reprogramiranje tumora, odnosno njegov prelazak na aerobnu glikolizu. Važnu ulogu u tom procesu imaju čimbenik transkripcije Myc i kinaze MAP (od engl. *mitogen-activated protein*).

Protein RIP1 (poznat i kao RIPK1, od engl. *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) koji je dio signalne kaskade TLR3, ima važnu ulogu u odluci stanice da krene u apoptozu ili da preživi. Preživljenje stanice ovisno je o aktivaciji kinaza MAP, koje pak reguliraju Myc, važan čimbenik transkripcije vezan za regulaciju staničnog metabolizma (Miller i sur., 2012.). Dokazano je da aktivacija TLR3, putem aktivacije čimbenika Myc, potiče sintezu nekoliko proteina uključenih u metabolizam tumora, kao što su hnRNPA1 (od engl. *nuclear ribonucleoprotein A1*) i PKM2 (M2 izoforma piruvat kinaze) (Matijević i Pavelić, 2012.). hnRNPA1 potiče ekspresiju CD44, važnog receptora za hijaluronan koji stupa u interakcije i s drugim proteinima izvanstaničnog matriksa. Nedavno je dokazano da

prekomjerna ekspresija hnRNPA1 putem CD44 potiče invazivnost hepatocelularnog karcinoma (Zhou i sur., 2013.). Osim toga, hnRNPA1 potiče preferencijalno izrezivanje varijante PKM2, promovirajući na taj način aerobnu glikolizu (David i sur., 2010.). PKM2 je izoforma M2 enzima piruvat kinaze, prisutna u samoobnavljajućim tkivima, kao što su embrionalna tkiva, matične stanice te tkiva tumora. Već je ranije proteomskom analizom pokazana povezanost između aktivacije TLR3 i povećane ekspresije ovog enzima (Matijević i Pavelić, 2012.).

Pretpostavlja se da aktivacija TLR3, putem RIP1 dovodi do aktivacije kinaza MAP, odnosno Myc, koji utječe na povećanu ekspresiju hnRNPA1. hnRNPA1 preferencijalno izrezuje varijantu PKM2 i potiče ekspresiju CD44. Oni pak, u suradnji s HIF-1, utječu na prelazak na aerobnu glikolizu te potiču proliferaciju i invazivnost tumora (Matijević Glavan i sur., 2017.).

2.2.5.5. Povećanje stvaranja molekula ROS

Više je studija pokazalo da tretman poly(I:C)-om može izazvati stvaranje ROS (Harashima i sur., 2014.; Chen i sur., 2016.). Oksidacijski stres putem molekula ROS dovodi do oštećenja makromolekula unutar stanica te može posredno dovesti do stanične smrti. Što je manja količina ROS, manja je i vjerojatnost da će njima uzrokovana oštećenja dovesti do stanične smrti, a veća da će izazvati rast i progresiju tumora. Poznato je da male količine ROS potiču proliferaciju i utječu na pokretljivost stanica tumora, naročito u kombinaciji sa smanjenjem količine antioksidansa u stanici. Dokazano je da aktivacija TLR3 utječe na povećano stvaranje ROS te na smanjenje razina glutationa, važnog staničnog antioksidansa (Matijević Glavan i sur. 2017.). S druge pak strane ROS može učiniti stanice tumora osjetljivijima na zračenje (Sharma i sur., 2010.; Dayal i sur., 2014.).

2.2.6. Dvojna uloga TLR3 u stanicama primarnih i metastatskih tumora

Zanimljiva je i dvojna uloga TLR3 u stanicama primarnih i metastatskih tumora gdje je primijećena značajna razlika između ekspresije TLR3 i njegove funkcionalnosti. U stanicama tumora debelog crijeva nađeno je da je TLR3 eksprimiran i u linijama primarnog (SW480) i

metastatskog tumora (SW620), i, premda nije bio funkcionalan ni u jednima, transfekcija egzogenog gena TLR3 pokazala je da stanice metastatskog karcinoma imaju funkcionalan signalni put TLR3. U karcinomu ždrijela dokazano je da je TLR3 eksprimiran u stanicama primarnog tumora (FaDu), kao i u stanicama metastaza karcinoma ždrijela (Detroit 562), no da je funkcionalan samo u potonjima (Matijevići sur., 2009.; Matijević i Pavelić, 2011.).

Umemura i suradnici primijetili su da su stanice metastatskih tumora glave i vrata osjetljivije na apoptozu od stanica primarnih tumora. Autori su ustanovili da aktivacija TLR3 dovodi do apoptoze putem ogranka signalnog puta TLR3, molekule IRF. Signalni put IRF bio je aktivan u obje linije stanica, dok je signalni put NF-κB u liniji stanica metastaza bio nefunkcionalan. Rezultati istraživanja su pokazali da su stanice metastaza tumora glave i vrata nakon tretmana s poly(I:C) u većoj mjeri podlegle programiranoj staničnoj smrti. Također je poznato da aktivacija NF-κB potiče preživljenje stanica. Iz toga se može zaključiti da je za pojačanu apoptozu stanica metastaza tumora glave i vrata nakon aktivacije TLR3 odgovoran poremećaj u prijenosu signala putem NF-κB (Umemura i sur., 2012.). Daljnje su studije pokazale da je za poremećen prijenos signala putem NF-κB u metastatskim tumorima odgovorna smanjena ekspresija proteina RIP1, do kojeg vjerojatno dolazi zbog pojačane metilacije promotora RIP1 u stanicama tumora (McCormick i sur., 2016.).

2.3. Tumori glave i vrata

Tumori glave i vrata, s incidencijom od oko 7% među muškarcima i 1% među ženama u Hrvatskoj (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak, 2018.), u svijetu su šesti po incidenciji među tumorima (Duvvuri i Myers, 2009.). U Europi je 2012. samo od tumora glave i vrata oboljelo oko 250000, a umrlo oko 63500 ljudi (Gatta i sur., 2015.). Zbog posebnosti anatomskog smještaja, ovi tumori mogu izrazito narušiti izgled i funkcije organa smještenih u području glave i vrata što često dodatno pogoršavaju agresivne metode liječenja (opsežni kirurški zahvati, visoke doze zračenja). Iako se ovi tumori razlikuju prvenstveno prema anatomskom smještaju, a time i liječenju, imaju i mnoga zajednička obilježja. U 90% slučajeva histološki se radi o karcinomima pločastih stanica.

Prema anatomskoj regiji u kojoj nastaju ovi se tumori dijele na sljedeće:

1. Tumori gornjeg ždrijela (nazofarinksa)
2. Tumori srednjeg ždrijela (orofarinksa)
3. Tumori donjeg ždrijela (hipofarinksa)
4. Tumori usne šupljine, uključivo i prednje dvije trećine jezika
5. Tumori baze jezika
6. Tumori tonzila
7. Tumori mekog nepca
8. Tumori grkljana (larinksa)
9. Tumori žlijezda slinovnica
10. Tumori paranazalnih sinusa

2.3.1. Etiologija tumora glave i vrata

U nastanku tumora glave i vrata važnu ulogu igraju genetski i okolišni čimbenici, ali i određene virusne infekcije.

2.3.1.1. Genetski i okolišni čimbenici

Tumori glave i vrata ponekad se javljaju u sklopu nasljednih malignih sindroma, kao što su ataksija teleangiektazija, xeroderma pigmentosum i Fanconijeva anemija, no mogu se javiti i kao tzv nasljedni obiteljski tumori glave i vrata, koje se povezuje s nasljednim defektom tumor supresorskog gena *MTS1* (od engl. *multiple tumor suppressor gene 1*) te tumor supresorskog gena *p14ARF* (od engl. *alternate reading frame*) (Philip i sur., 2016.).

Već je duže vrijeme poznata uzročno-posljedična povezanost između pušenja i konzumacije alkohola i razvoja tumora glave i vrata. Zlouporaba alkohola i duhana poznati je etiološki čimbenik u nastanku tumora usne šupljine, orofarinksa, hipofarinksa i larinksa. Procijenjeno je da je čak tri četvrtine svih tumora usne šupljine i ždrijela uzrokovano konzumacijom alkohola i duhana (Hashibe i sur., 2009.).

Duhanski dim sadrži kancerogene spojeve koji uzrokuju oštećenja DNA. Popravak tih oštećenja uglavnom se odvija putem izrezivanja baza (engl. *base excision repair*) ili izrezivanja čitavih nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*). Određeni polimorfizmi gena uključenih u procese popravka DNA mogu doprinijeti povećanom riziku za nastanak ovih tumora (Philip i sur., 2016.). Dokazano je također i da pušenje uzrokuje mutacije *p53* (Brennan i sur., 1995.).

2.3.1.2. Virusne infekcije

U novije vrijeme dokazana je i veza između infekcije humanim papiloma virusom (HPV) (osobito tipa 16) i razvoja tumora orofarinksa pločastih stanica (osobito tumora krajnika i tumora baze jezika) (Gillison, 2004.; Marur i sur., 2010.) te Epstein-Barrovog virusa i nazofaringealnog karcinoma (Niedobitek, 2000.).

Tumori pozitivni na HPV čine ukupno 20% tumora glave i vrata. Češće se nalaze u mlađoj populaciji i imaju bolju prognozu od HPV negativnih tumora te bolje reagiraju na kemoterapiju i zračenje. HPV sadrži onkogene E6 i E7 koji inaktiviraju RB (retinoblastom) i p53, što dovodi do poremećaja staničnog ciklusa (Philip i sur., 2016.). Također, dokazano je da je TLR3 važan posrednik u razvoju nazofaringealnog karcinoma uzrokovanog infekcijom virusom Epstein- Barr (Li i sur., 2015.).

2.3.2. Uloga kronične upale u nastanku tumora glave i vrata

Ono što se je zajedničko konzumaciji duhana i alkohola te infekciji jest izazivanje upale u mikrookolišu iz kojeg potencijalno može doći do razvoja tumora. U slučaju tumora glave i vrata, duhanski dim, a naročito alkohol, neovisno o njihovim ostalim mutagenim učincima, neposredno izazivaju kroničnu iritaciju sluznice gornjih dišnih puteva, uzrokujući mikrooštećenja te iste sluznice, što u konačnici dovodi do razvoja kronične upale. Prilikom upale dolazi do oslobađanja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i reaktivnih dušikovih spojeva (RNS), koji mogu dovesti do oštećenja DNA, lipida i proteina te mutacija u onkogenima, odnosno tumor supresorskim genima. To je faza inicijacije tumora.

Inicijacija označava početno nakupljanje mutacija i oštećenja DNA do kojih dolazi pod utjecajem kancerogenih tvari te produkata upale te stvaranja klonalne populacije stanica. Nakupljanjem daljnjih mutacija stanice postaju otpornije te dolazi do klonalne ekspanzije stanica i nastanka polja stvaranja tumora (promocija). Ako se nakupljanje mutacija nastavi i dalje dolazi do stvaranja više klonalnih populacija stanica te razvoja tumora (progresija) okruženog zonom premalignih stanica. Upravo je ta zona odgovorna za pojavu lokalnih recidiva, ali i nastanak novih primarnih tumora (Braakhuis i sur., 2002.). Upala ima važnu ulogu, ne samo u inicijaciji, već i u promociji i progresiji tumora. U mikrookolišu tumora luče se brojni proupalni citokini, kao što su IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α i TGF-β. Ovi citokini remete epitelnu barijeru, potiču nastanak molekula ROS i RNS, što doprinosi daljnjim oštećenjima DNA, te u mikrookoliš tumora privlače druge proupalne stanice. TGF-β potiče proces epitelno-mezenhimske tranzicije te tako promovira metastaziranje tumora. IL-10 i IL-17 sudjeluju u angiogenezi, ali i u diferencijaciji makrofaga u smjeru M2 (Landskron i sur., 2014.). Makrofazi M2 putem lučenja VEGF-a, urokinaznog plazminogenskog aktivatora i njegovog receptora potiču neoangiogenezu, a povećanjem ekspresije MMP, i metastaziranje tumora (Sica i sur., 2008.). Također, navedeni citokini u mikrookoliš tumora privlače i fibroblaste vezane uz tumor (engl. *cancer-associated fibroblasts*), kao i limfocite T-reg. Fibroblasti vezani uz tumor čine glavninu strome tumora, a luče MMP te faktore rasta neophodne za rast i razvoj tumora (Bhowmick i sur., 2004.). Limfociti T-reg se u mikrookolišu tumora nalaze u obilju gdje značajno ograničavaju antitumorski imunološki odgovor i potiču imunotoleranciju stanica tumora. Osim toga, dokazano je i da limfociti T-reg potiču i neoangiogenezu putem povećanog lučenja VEGF (Facciabene i sur., 2012.).

2.3.3. Biologija malignih tumora glave i vrata

Hanahan i Weinberg su opisali šest ključnih bioloških osnova nastanka i širenja malignih tumora (engl. *hallmarks of cancer*) (Hanahan i Weinberg, 2000.). To su:

1. Samodostatnost signala za rast
2. Otpornost na signale za inhibiciju rasta
3. Izbjegavanje apoptoze
4. Neograničena proliferacija
5. Neoangiogeneza
6. Invazija i metastaziranje

2.3.3.1. Samodostatnost signala za rast

Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) je prekomjerno eksprimiran u više od 90% tumora glave i vrata s tim da je njegova ekspresija veća u stanicama tumora usne šupljine i ždrijela, u odnosu na stanice tumora grkljana (Kalyankrishna i Grandis, 2006.). Aktivacijom ovog receptora dolazi do aktivacije različitih signalnih puteva koji dovode do povećane proliferacije stanica, inhibicije apoptoze te poticanja angiogeneze. Povećana ekspresija ovog receptora obično se veže uz uznapredovale i slabo diferencirane tumore otporne na kemoterapiju, ali osjetljive na zračenje (Takes i sur., 1998.; Ang i sur., 2002.)

Receptor faktora rasta sličnog inzulinu tipa 1 (engl. *insulin-like growth factor type-1 receptor*) je tirozin-kinazni receptor čija aktivacija također dovodi do otpornosti na apoptozu i povećane proliferacije stanica (Philip i sur., 2016.).

2.3.3.2. Otpornost na signale za inhibiciju rasta

Najvažniji signalni put koji je inhibiran u tumora glave i vrata je onaj vezan za TGF-β. TGF-β je citokin koji sprječava nekontroliranu proliferaciju epitelnih, endotelnih i

hematopoetskih stanica. U stanicama tumora dolazi do promjena u prijenosu signala putem TGF-β koje mijenjaju njegovu funkciju. Tako TGF-β, citokin koji u normalnim stanicama djeluje antitumorski, u tumorskim stanicama promovira njihovo preživljenje, rast i metastaziranje (Tian i sur., 2011.). Naime, TGF-β je odgovoran za aktivaciju fibroblasta pridruženih tumoru, koji su poznati po tome da potiču epitelno-mezenhimalnu tranziciju, između ostalog putem pojačanog lučenja MMP i čimbenika rasta (Erdogan i Webb, 2017.). Osim toga, pokazano je da TGF-β *in vitro* inhibira učinak citotoksičnih limfocita CD8+ te tako potiskuje protutumorski odgovor (Woo i sur., 2001.).

2.3.3.3. Izbjegavanje apoptoze

Oko 10-20% tumora glave i vrata izbjegavaju programiranu staničnu smrt mutacijama u signalnom putu PI3K-PTEN-AKT (Kozaki i sur., 2006.). PI3K (fosfoinozitid 3-kinaza) utječe na promjene staničnih funkcija u odgovoru na izvanstanične signale. *PTEN* (engl. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) je tumor supresorski gen koji je smješten na kromosomu 10. Njegova je inaktivacija pronađena u brojnim tumorima (Bonneau i Longy, 2000.). AKT je serin-treonin kinaza koja posreduje u brojnim nizvodnim učincima PI3K. Pri nastanku tumora dolazi do gubitka ekspresije gena *PTEN*. Budući da proteinski proizvod gena *PTEN* inhibira nizvodnu signalizaciju PI3K, gubitak ekspresije ovog gena uzrokuje povećanu ekspresiju proteina AKT. Protein AKT, osim što inhibira brojne proapoptotske čimbenike, putem aktivacije NF-Kβ može aktivirati prepisivanje antiapoptotskih gena (npr. *cIAP*) (Paez i Sellers, 2003.).

2.3.3.4. Neograničena proliferacija

Do neograničene proliferacije stanica raka dolazi zbog sprječavanja prirodnog starenja stanice koje onemogućava neograničenu diobu.

Telomere su ponavljajući sljedovi nukleotida na krajevima kromosoma koje štite kromosome od oštećenja, odnosno fuzije sa susjednim kromosomima. U stanicama normalnih tkiva telomere onemogućuju neograničenu proliferaciju stanica. Naime, prisustvo telomera onemogućava sintezu novog lanca DNA do kraja kromosoma, što uzrokuje njihovo skraćenje

pri svakoj diobi stanice. Nakon određenog broja dioba, zbog prisustva telomera, stanica se više neće moći dijeliti, što uzrokuje njeno starenje (senescenciju). Stanice tumora, za razliku od normalnih stanica, u visokoj mjeri eksprimiraju enzim telomerazu, koja je odgovorna za produžavanje telomera i sprječavanje starenja stanica tumora.

Mutacije gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa također potiču njihovu neprekidnu diobu. Ključne mutacije u tumora glave i vrata događaju se u genima *TP53, CCND1* (od engl. *cyclin D1*), *CDKN2A* (od engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) (HPV negativni tumori) te *TP53, Rb1, Rbl1* (od engl. *retinoblastoma-like 1*), *Rbl2* (od engl. *retinoblastoma-like 2*) (HPV pozitivni tumori) (Philip i sur., 2016.).

U stanicama normalnih tkiva protein Rb1 (od engl. *retinoblastoma 1*) sprječava nekontroliranu progresiju staničnog ciklusa. Protein Rb1 je u svom nefosforiliranom (aktivnom) stanju vezan za čimbenik transkripcije E2F. Kompleks ciklina D1 i kinaza ovisnih o ciklinu CDK4/6 (od engl. cyclin-dependent kinase 4/6) u kasnoj fazi G1 staničnog ciklusa pod utjecajem faktora rasta fosforilira (inaktivira) Rb1 koji podliježe konformacijskoj promjeni te otpušta E2F koji potiče transkripciju gena potrebnih za prelazak stanice u fazu S. Mutacija gena *Rb1* rezultira inaktivnim proteinom koji ne može vezati E2F, što posredno dovodi do neometane progresije staničnog ciklusa. Na ovaj način protein Rb1 djeluje slično kao i faktori koji utječu na "samodostatnost faktora rasta" što upućuje na međusobnu isprepletenost i povezanost navedenih mehanizama važnih u nastanku malignih tumora.

Prekomjerna ekspresija telomeraze, kao i mutacije gena uključenih u izbjegavanje programirane stanične smrti te poticanje rasta stanica tumora često su prisutne u matičnim stanicama tumora. Matične stanice su subpopulacija stanica tumora sa sposobnošću samoobnavljanja, diferencijacije i proliferacije. Smatra se da su upravo matične stanice tumora najodgovornije za progresiju i širenje tumora te njegovu otpornost na liječenje (Clay i sur., 2010.) i relaps.

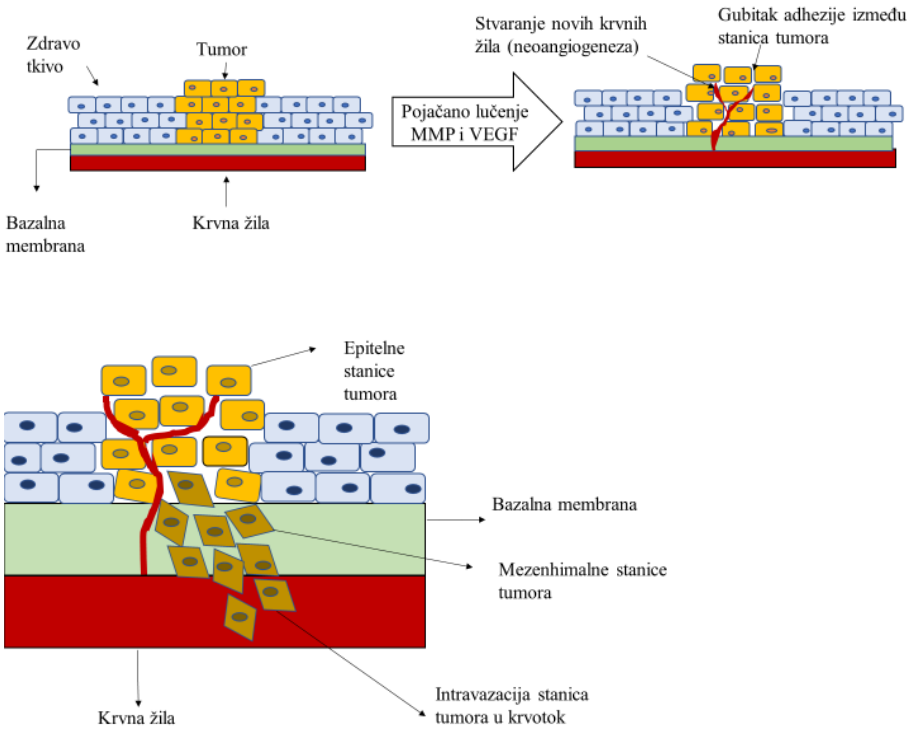
2.3.3.5. Neoangiogeneza

Kad tumor dosegne određenu veličinu (1-2 mm^3) dostupna količina kisika više nije dovoljna za daljnji rast tumora. U stanicama tumora dolazi do stresa uzrokovanog hipoksijom. Dolazi do lučenja brojnih proupalnih citokina koji stimuliraju stvaranje novih krvnih žila (TNF-

α, TGF-β, IL-6, IL-10) te privlačenja upalnih stanica (makrofazi M2, fibroblasti vezani uz tumor, limfociti T-reg) koje luče VEGF.

2.3.3.6. Invazija i metastaziranje

Za invaziju i metastaziranje tumora ključni su sljedeći događaji: gubitak polarnosti epitelnih stanica, komunikacija između stanica tumora i strome, neoangiogeneza, lučenje MMP te EMT. EMT je kulminacija niza događaja koji dovode do reprogramiranja stanica koje gube epitelni fenotip kojim su čvrsto povezane sa susjednim stanicama čvrstim i adherentnim vezama i stječu sposobnost migracije, što dovodi do invazije okolnih tkiva i metastaziranje (Slika 2.). Smatra se da EMT ima ključnu ulogu u visokorizičnim tumorima glave i vrata (Landskron i sur., 2014.).



Slika 2. Invazija i metastaziranje tumora. Pojačano lučenje MMP dovodi do gubitka polariteta i adhezije među stanicama tumora. Epitelne stanice tumora time stječu sposobnost migracije i invazivnosti, prelazeći pri tome na mezenhimalni tip stanica. Uvjeti hipoksije potiču lučenje VEGF te stvaranje novih krvnih žila unutar tumora.

2.3.4. Liječenje tumora glave i vrata

Terapijski pristup u liječenju tumora glave i vrata vrlo je kompleksan i ovisi o sijelu i stadiju tumora, kao i patohistološkom nalazu, a u načelu uključuje operativni zahvat, radioterapiju, kemoterapiju i, od nedavno, ciljanu terapiju pomoću cetuksimaba, kimeričnog monoklonskog protutijela s visokim afinitetom za receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR).

Prema navedenim podacima određuje se vrsta i opseg kirurškog zahvata, ciljni volumeni i doze zračenja kao i indikacije za kemoterapiju. U načelu, 30%-40% bolesnika u ranim stadijima bolesti moguće je liječiti samo kirurški ili radioterapijski, dok se u 60% bolesnika (s tumorima uznapredovalih stadija) zasniva na kombinaciji radioterapije (zračenja) i kemoterapije zasnovane na cisplatini. Takvo je liječenje obilježeno visokom toksičnošću i brojnim nuspojavama, osobito kad se primjenjuje zajedno i u višim dozama, što je često neophodno u liječenju uznapredovalih tumora.

2.3.5. Uloga radioterapije u liječenju tumora glave i vrata

Radioterapija je jedan od ključnih načina liječenja tumora glave i vrata. Primarni je način liječenja tumora nazofarinksa, ali u određenim slučajevima može biti primarni oblik liječenja i tumora glave, vrata i ostalih sijela. Najčešće se, ipak, koristi u adjuvantne svrhe, kao konsolidacijska terapija nakon kirurškog liječenja, u slučajevima kada na osnovi patohistološkog nalaza postoji osnovana sumnja na postojanje mikroskopske bolesti.

Ciljni volumeni i doze zračenja također se određuju s obzirom na gore navedene parametre, ukupnim dozama koje variraju od 50-70 Gy. Pojedinačne dnevne doze najčešće iznose 2 Gy, što je standardna doza frakcioniranja. No, sve se više koriste i hiperfrakcionirani protokoli, koji podrazumijevaju primjenjivanje više manjih frakcija u toku dana. Ideja hiperfrakcioniranog protokola zasnovana je na radiobiološkim svojstvima tumora glave i vrata, odnosno njihovoj povećanoj osjetljivosti na niže pojedine doze zračenja koje se primjenjuju u kraćim intervalima.

Nuspojave zračenja područja glave i vrata mogu biti subjektivno vrlo neugodne. U polju zračenja dolazi do upale sluznice (mukozitisa) te do oslabljenog lučenja sline, što povećava rizik za razvoj gljivičnih i bakterijskih oboljenja usne šupljine i zuba, a jačina nuspojava ovisna je o primijenjenoj dozi zračenja.

2.3.6. Utjecaj zračenja na mikrookoliš tumora

Fotoni dolaze u interakciju s materijom na razne načine tijekom prolaska kroz tkivo. Posljedica ovih reakcija su ionizacije i stvaranje nestabilnih molekula i slobodnih radikala unutar stanica organizma. To rezultira brojnim fizikalno-kemijskim reakcijama koje dovode do oštećenja lipida, proteina i DNA, odnosno do oštećenja i smrti stanica.

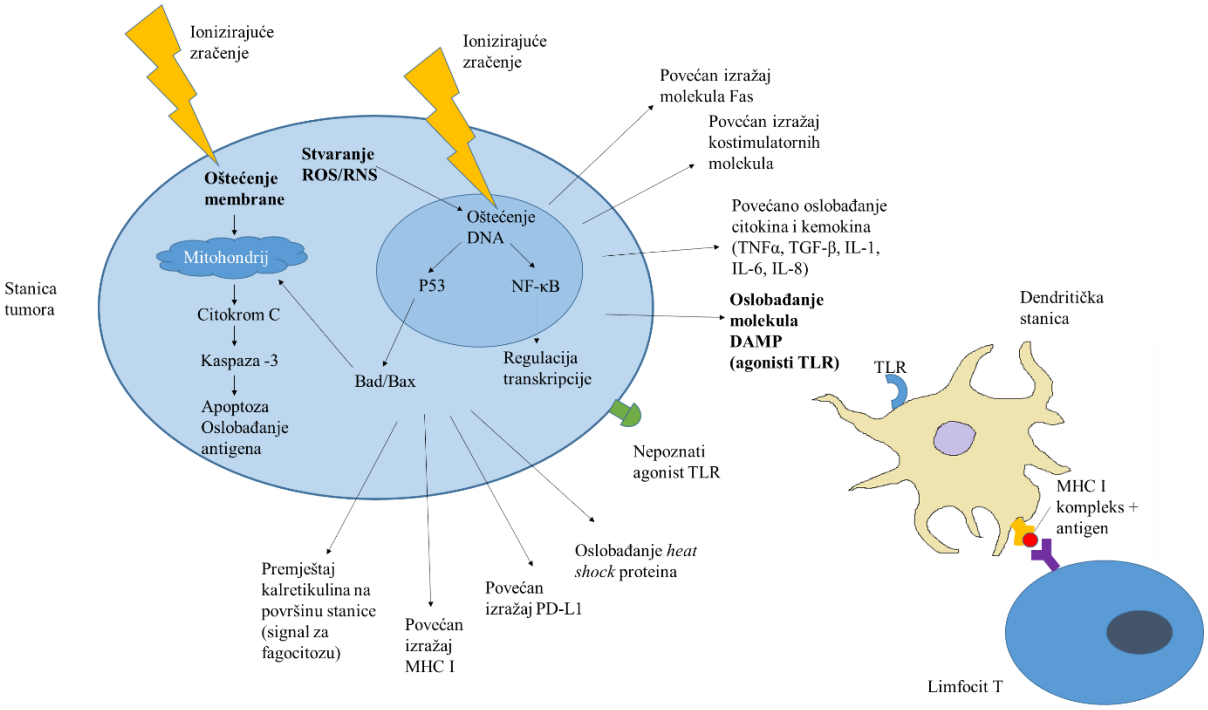
Zamisao da zračenje jednog dijela tijela može utjecati na čitav organizam, ubijajući stanice tumora u udaljenim dijelovima organizma, začeta je još 1953., kada je Mole prvi opisao pojam apskopalnog učinka (Mole, 1953.). Naziv apskopalni učinak (od engl. *abscopal effect*) dolazi od latinske riječi *ab*, što znači „od“ i grčke riječi *scopus*, što znači „meta“, a odnosi se na protutumorsko djelovanje zračenja u dijelovima tijela udaljenima od samog područja zračenja (Chen i sur. 2015.). Riječ je o rijetkoj pojavi, koja je u zadnjih šest desetljeća zabilježena na primjeru nekolicine kliničkih slučajeva (Nobler, 1969.; Rees i Ross, 1983.; MacManus i sur., 1994.; Okuma i sur., 2011.) Navedena opažanja potaknula su daljnja istraživanja kojima je dokazano da zračenje modulira imunosni sustav (Kalbasi i sur., 2013.).

Radioterapija utječe na imunosni sustav na više razina. S jedne strane, zračenje uzrokuje tzv. imunogeničnu smrt stanice koju odlikuju jedinstveni procesi koji se u stanici događaju na nivou molekula. Oni uključuju premještanje kalretikulina na površinu stanice, oslobađanje ATP-a, pojačanu ekspresiju kostimulatornih molekula te pojačano oslobađanje molekula DAMP (D'Souza i sur., 2016.). One aktiviraju dendritičke stanice imunosnog sustava na sličan način kao i PAMP, odnosno djeluju kao endogeni ligandi TLR, što u konačnici dovodi do aktivacije citotoksičnih limfocita T (Krysko i sur., 2012.; Kroemer i sur., 2013.; Reynders i sur., 2015.). Najpoznatija takva molekula je HMBG-1 (od engl. *high-mobility group box-1*), koja aktivira TLR4 (Apetoh i sur., 2007.; Sharabi i sur., 2015.).

Poznato je i da radioterapija dovodi do pojačane ekspresije molekula Fas (jedan od okidača programirane stanične smrti) i glavnog kompleksa tkivne snošljivosti - MHC I (od engl. *major histocompatibility complex*) (Reits i sur. 2006.; Tang i sur. 2014.; Reynders i sur., 2015.), koji je odgovoran za prezentaciju antigena citotoksičnim limfocitima CD8+. Osim navedenog, čini se da radioterapija aktivira limfocite CD8+ i putem indukcije interferona tipa I (Burnette i sur., 2011.; Lim i sur., 2014.). Nekoliko studija na životinjskim modelima potvrdilo je da je aktivacija limfocita CD8+ ključna za radiosenzitivnost primarnog tumora (Slone i sur., 1979.; Demaria i sur., 2005.; Lee i sur., 2009.; Dovedi i sur., 2014.), kao i za nastanak apskopalnog

učinka (Demaria i sur., 2004.).

S druge pak strane, zračenje, osim što ima imunostimulatorni učinak, djeluje i imunosupresivno, povećavajući ekspresiju PD-L1 (od engl. *programmed death-ligand 1*), koji na limfocite T djeluju inhibicijski. To je jedan od načina na koji stanice tumora izbjegavaju imunosni odgovor domaćina. Isto tako, zračenje dovodi do povišenja koncentracije TGF-β, poznatog posrednika invazivnosti tumora i epitelno-mezenhimalne tranzicije (Dancea i sur., 2009.), novačenja limfocita T-reg (Kachikwu i sur., 2011.) te polarizaciju makrofaga u smjeru M2 (Tsai i sur., 2007.). El-Saghire i suradnici pokazali su da radioterapija raka prostate inducira proupalni odgovor povećavajući ekspresiju TLR3, SH2D1A i IL18 (El-Saghire i sur., 2014.). Zbirni prikaz učinaka ionizirajućeg zračenja prikazan je na Slici 3.



Slika 3. Dvojni učinci ionizirajućeg zračenja na stanicu. Zračenje ima antitumorske, ali i protumorske učinke na stanicu tumora. Ono oštećuje staničnu membranu i DNA direktno, ali i indirektno, putem indukcije reaktivnih spojeva. U ozračenoj stanici pojačana je ekspresija molekula Fas, što pospješuje smrt stanice, kompleksa MHC I kalretikulina. Smrću stanice oslobađaju se molekule DAMP koje djeluju kao ligandi TLR na stanicama koje predočuju antigene, pojačavajući tako prezentaciju antigena citotoksičnim limfocitima T. Također dolazi

do oslobađanja brojnih citokina i kemokina te stvaranja imunotolerantnog mikrookoliša pogodnog za rast i širenje tumora (prerađeno prema Sharabi i sur., 2015.).

2.3.7. Sustavno liječenje tumora glave i vrata

U sustavno liječenje tumora spadaju kemoterapija i imunoterapija. Osnovni kemoterapeutik koji se primjenjuje u liječenju tumora glave i vrata je cisplatina. Osim u liječenju tumora glave i vrata, cisplatina se koristi i u liječenju brojnih drugih tumora, kao što su tumori pluća, mokraćnog mjehura, određeni ginekološki tumori, itd. Mehanizam djelovanja cisplatine zasniva se na vezanju za purinske baze i interferenciji s mehanizmima popravka DNA, što uzrokuje oštećenje DNA te apoptozu stanica tumora. Liječenje cisplatinom praćeno je brojnim nuspojavama, kao što su oštećenje bubrega i/ili sluha, gastrointestinalni poremećaji, krvarenja, smanjena otpornost na infekcije i alergijske reakcije. Dodatan problem je i rezistencija. U svrhu prevladavanja rezistencije na cisplatinu, kao i smanjenja toksičnosti, sve se češće razmatraju kombinirane terapije s drugim agensima, kao što su paklitaksel (tumor želuca), tegafur-uracil (neki oblici tumora pluća), doksorubicin (mezoteliom), gemcitabin (tumor žučnjaka), vitamin D (rak debelog crijeva), itd. (Shaloam i Tchounwou, 2014.).

Cetuksimab je kimerično monoklonsko antitijelo usmjereno protiv EGFR, s afinitetom većim 5-10 puta od onog endogenih liganada. Osim što sprječava vezanje endogenih liganada, cetuksimab također potiče i internalizaciju receptora, smanjujući tako njegovu ekspresiju na površini stanica. Dokazano je da cetuksimab pojačava osjetljivost tumora na zračenje (Huang i sur., 1999.). Može se dati umjesto ili u kombinaciji sa standardnim kemoterapeuticima, ovisno o sijelu i stadiju tumora. Postoje dokazi da kombinacija cetuksimaba s agonistima TLR3 poboljšava njegov učinak (Ming Lim i sur., 2013.).

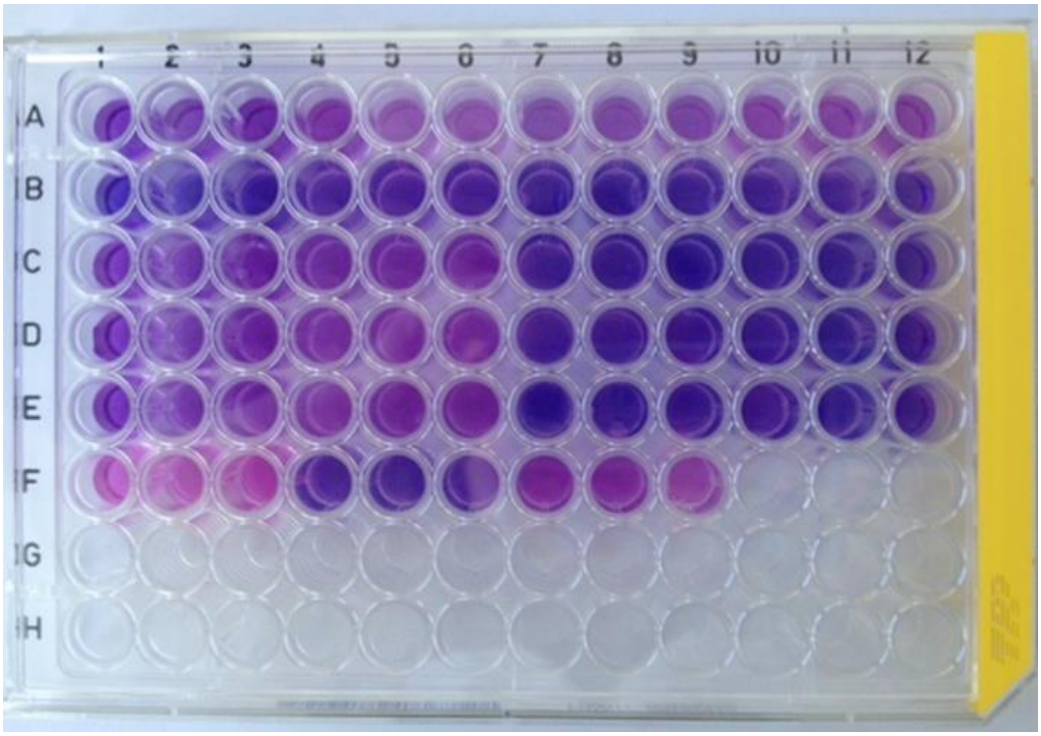
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Tumorske stanične linije

Istraživanja su provedena na komercijalno dostupnim linijama stanica nabavljenih od ATCC (od engl. *American Type Culture Collection*).

Stanice FaDu (ATCC® HTB-43™) su stanice primarnog planocelularnog karcinoma ždrijela (hipofarinks). Stanice SQ20B su stanice primarnog karcinoma grkljana. FaDu shTLR3 i SQ20B shTLR3 su linije stanica FaDu i SQ20B koje su stabilno transficirane plazmidom za shRNA koja inducibilno utišava TLR3. Kontrola ovim stanicama su stanice FaDu shcontrol i SQ20B shcontrol, koje odgovaraju stanicama stabilno transficiranim kontrolnim plazmidom. Stanice Detroit 562 (ATCC® CCL-13™) dobivene su iz pleuralne efuzije čovjeka. Radi se o stanicama metastaza planocelularnog karcinoma ždrijela.

Stanice HEK-Blue™ hTLR3 dizajnirane su za proučavanje stimulacije signalnog puta TLR3 u ljudi putem promatranja aktivacije NF-κB. Stanice HEK-Blue™ hTLR3 dobivene su ko-transfekcijom gena *hTLR3* i reporter-gena *SEAP* (od engl. *secreted embryonic alkaline phosphatase*). Stimulacija ovih stanica ligandom TLR3 aktivira NF-κB i AP-1, što potiče proizvodnju SEAP-a. Njegova razina lako se određuje pomoću posebnog medija (QUANTI-Blue™) koji detektira SEAP u supernatantu stanica. Ovaj medij sadrži specifični supstrat za SEAP. SEAP hidrolizira ovaj supstrat, pri čemu dolazi do plavo-ljubičastog obojenja medija, što se s lakoćom vidi i golim okom, a može se mjeriti i pomoću spektrofotometra (Slika 4.).



Slika 4. Plavo-ljubičasto obojenje medija nakon hidrolize supstrata u mediju pomoću SEAP-a. Intenzitet obojenja proporcionalan je aktivaciji signalnog puta TLR3.

Stanice FaDu i Detroit 562 uzgajane su u mediju DMEM (od engl. *Dulbecco's modified Eagle medium*), obogaćenim s 2 mM glutaminom i 10% FBS-a (od engl. *fetal bovine serum*).

Stanice HEK-Blue™ uzgajane su u gore navedenom mediju u koji smo dodali 30 µg/ml Blasticidina i 10 µg/ml Zeocina™. Blasticidin omogućuje preživljavanje stanica s plazmidom koji kodira *hTLR3*, a Zeocin™ preživljavanje stanica s plazmidom koji kodira *SEAP* u stanicama HekBlue™ u selektivnom mediju.

Stanice FaDu shTLR3 i SQ20B shTLR3 uzgajane su u mediju DMEM (od engl. *Dulbecco's modified Eagle medium*), obogaćenim s 2 mM glutaminom, 0,04 µL/mL puromicina (20 µL puromicina na 500 mL medija) i 10% FBS-a (od engl. *fetal bovine serum*). Dodatak puromicina u medij omogućuje selekciju stabilno transficiranih stanica.

Kulture stanica uzgajane su u inkubatoru na 37 ºC uz 5% CO_2 i vlagu.

3.2. Mjerenje aktivacije signalnog puta TLR3

U ovom dijelu istraživali smo otpuštaju li nekrotične stanice tumora ligande za TLR3. Stanice FaDu, Detroit 562 i SQ20B nasađene su u sterilnu pločicu s 96 bunarića u količini $1x10^4$, odnosno $2x10^4$ st/bunariću ovisno o pokusu te su nakon inkubacije od 24 sata izlagane različitim oblicima stresa. Pod izlaganjem stresu podrazumijevamo izgladnjivanje stanica (engl. *serum starvation*), izlaganje gama-zračenju (jednokratna doza od 5 Gy odnosno 10 Gy), hipoksiju te izlaganje oksidacijskom stresu pomoću vodikovog peroksida.

3.2.1. Izgladnjivanje stanica

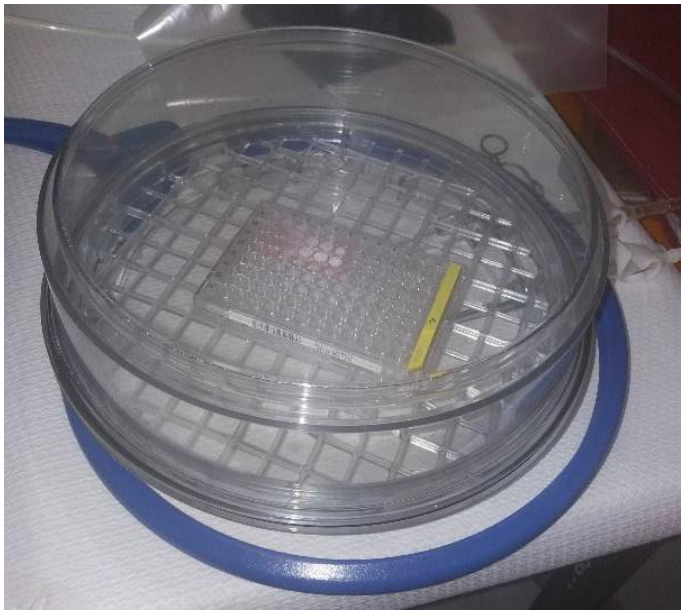
Stanice FaDu, Detroit 562 i SQ20B nasađene su u sterilnu pločicu s 96 bunarića u količini $1x10^4$ st/bunariću te su inkubirane tijekom 24 sata na temperaturi 37ºC uz 5% CO_2 i vlagu. Potom je sa stanica odstranjen medij, stanice su isprane dva puta s medijem bez seruma te je u svaku jažicu dodano 120 µL medija bez seruma. Stanice su potom inkubirane 48 sati.

3.2.2. Izlaganje stanica gama-zračenju

Stanice FaDu, Detroit 562 i SQ20B nasađene su u količini od $1x10^4$ st/bunariću te su zračene nakon inkubacije od 24 sata. Tretman zračenjem proveden je putem panoramskog uređaja s ^{60}Co izvorom gama zračenja u pravokutnoj komori dimenzija 4.9 m x 3.9 m x 3.5 m. Zračenje je provedeno na udaljenosti od 260 cm od centra izvora (244 cm od plašta), brzinom doze 2 Gy/min, do ukupne doze od 5 Gy, odnosno 10 Gy. Gama zračenje čine elektromagnetski valovi valnih duljina kraćih od 10^{-13} m, odnosno fotoni. Radionuklidni izvor izotop ^{60}Co svojim raspadom emitira fotone visokih energija, koji pak, osim što direktno oštećuju DNA živih stanica, svojim interakcijama s elektronskim omotačem atoma proizvode i brojne druge fizikalno-kemijske učinke u smislu sekundarnih ionizacija i stvaranja slobodnih radikala koji dalje oštećuju stanice, onemogućujući im daljnju diobu i inducirajući staničnu smrt. Po provedenom zračenju, stanice su inkubirane 48 sati.

3.2.3. Izlaganje stanica uvjetima hipoksije

Za ovaj pokus stanice FaDu, Detroit 562 i SQ20B nasađene su u količini od $2x10^4$ st/bunariću te su izložene hipoksiji nakon inkubacije od 24 sata. Ovaj je pokus izveden u posebnoj hipoksičnoj komori (Slika 5.).



Slika 5. Hipoksična komora

Radi se o hermetički zatvorenoj komori izrađenoj od visokokvalitetnog polikarbonata koji omogućuje veliku izdržljivost. U području poklopca svi su dijelovi O-prstena jednako komprimirani prstenastom kvačicom, što čini spoj nepropusnim za zrak. Prilikom izvođenja pokusa u komoru se dovodi smjesa dušika i ugljičnog dioksida sve dok se razina kisika u komori ne spusti ispod 0.5%. Komora se potom umetne u laboratorijski inkubator pri 37ºC gdje se ostavlja dvadeset i četiri sata.

3.2.4. Izlaganje stanica oksidacijskom stresu

Stanice FaDu, Detroit 562 te SQ20B nasađene su u količini od $2x10^4$ st/bunariću te su nakon inkubacije od 24 sata tretirane vodikovim peroksidom u koncentraciji 200 μM, odnosno 500 μM. Sa stanica je uklonjen medij te je u bunariće nakapana otopina vodikovog peroksida. Stanice su inkubirane tijekom 24 sata.

Nakon inkubacije tretiranih stanica, njihovim supernatantom tretirane su stanice HEK-Blue™, također nasađene u sterilnu pločicu s 96 bunarića, u količini od $3x10^4$ st/bunariću.

Tretman stanica proveden je tako da je sa stanica HekBlue™ odstranjen medij te je u bunariće nakapan kondicionirani medij stanica FaDu, Detroit 562 i SQ20B. Stanice su inkubirane tijekom 24 sata.

Za pokuse mjerenja aktivnosti TLR3, u novu sterilnu pločicu od 96 bunarića prenešeno je po 50 μL supernatanta sa stanica HekBlue™ te je svaki bunarić dopunjen sa 150 μL QuantiBlue medija. Pločice su pohranjene u inkubatoru na 37°C do mjerenja. Aktivacija signalnog puta TLR3 mjerena je očitavanjem apsorbancije na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica Infinite (Tecan). Očitavanje je vršeno nakon 1, 2 i 4 sata.

S obzirom na to da se nekrozom stanica oslobađa i RNA, a ligand za TLR3 je dvolančana RNA, kako bismo provjerili je li oslobođena RNA jedini ligand, medij je tretiran RNazom nakon čega je ponovno mjerena aktivacija signalnog puta TLR3. Stanice FaDu, Detroit 562 i SQ20B nasađene su na sterilnu pločicu s 96 bunarića u količini $1x10^4$ st/bunariću i tretirane po jednakoj shemi kao što je ranije navedeno. Tretman RNazom proveden je 24 sata nakon izlaganja hipoksiji i oksidativnom stresu, odnosno 48 sati nakon zračenja i dodavanja medija bez seruma. Sa stanica je potom odstranjen medij u kojeg je dodana RNaza (1.5 μL na 300 μL supernatanta). Medij s RNazom je inkubiran u termobloku na 37 °C tijekom 2 sata te su potom njime tretirane stanice HekBlue™ i provedeno je mjerenje apsorbancije prema gore opisanim uvjetima.

3.3. Preživljenje i apoptoza stanica tumora nakon tretmana s poly(I:C) samostalno i u kombinaciji s cisplatinom i zračenjem

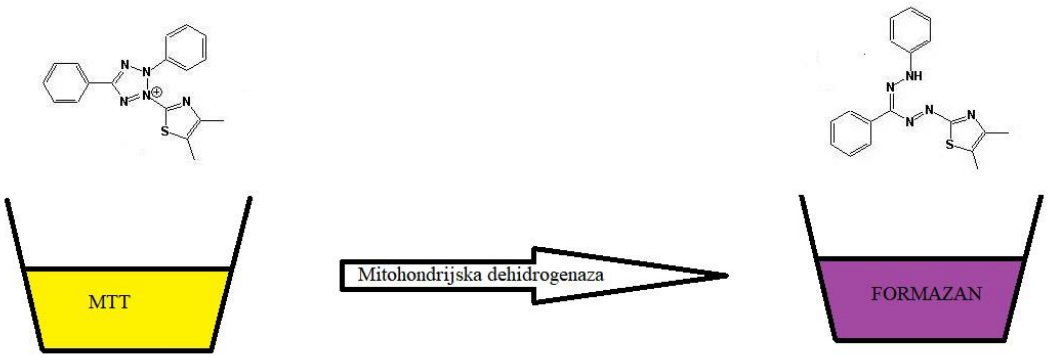
3.3.1. Predtretman stanica FaDu shTLR3 i SQ20B shTLR3

U ovom pokusu korištene su linije stanica FaDu i SQ20B stabilno transficirane plazmidom za shRNA koja inducibilno utišava TLR3.

Stanice su nasađene na sterilnoj pločici s 96 bunarića u količini $1x10^4$ st/bunariću. Za tretman stanica s poly(I:C) u 3 mL DMEM dodano je 60 µL poly(I:C) (konačna koncentracija poly(I:C) bila je 10µg/µL), a za tretman s cisplatinom u 3 mL DMEM dodana su 2µL cisplatine (konačna koncentracija cisplatine bila je 1 µM). Za tretman kombinacijom poly(I:C) i cisplatine pripravljena je otopina od 3 mL DMEM u koji je dodano 60 µL poly(I:C) te 2 µL cisplatine. Poly(I:C) i cisplatina čuvani su u zamrzivaču pri temperaturi -20ºC. U svaku od otopina dodano je i 6 µL doksiciklina. Dodatak doksiciklina u medij omogućuje prepisivanje shRNA za TLR3 s plazmida i tako utišava ekspresiju TLR3 (regulacija ekspresije shRNA ovisi o aktivnosti transregulatornog proteina koji može biti aktiviran ili potisnut od strane tetraciklina ili njegovog analoga doksiciklina). Navedene stanice su potom izložene gama-zračenju u jednokratnim dozama od 2.5 Gy ili 7.5 Gy. Zračenje je provedeno putem panoramskog uređaja s ^{60}Co izvorom gama zračenja u pravokutnoj komori dimenzija 4.9 m x 3.9 m x 3.5 m, na udaljenosti od 382 cm od plašta, na visini 72 cm od poda, brzinom doze od 20 mGy/s tijekom 125 sekundi do ukupne doze od 2.5 Gy, ili 375 sekundi do ukupne doze od 7.5 Gy.

3.3.2. Test citotoksičnosti

Citotoksično djelovanje liganada TLR3 u istraživanim stanicama mjereno je testom MTT. Test MTT je standardni kolorimetrijski test kojim se mjeri aktivnost enzima mitohondrijske dehidrogenaze koji reducira topivi žuti MTT (dimetiltiazol difenil tetrazolium bromid) u netopivi ljubičasti formazan. Pri tom je absorbancija nastalog obojenja mjera vijabilnosti stanica, odnosno njihove mitohondrijske aktivnosti (Slika 6.).



Slika 6. Shematski prikaz testa MTT

Test citotoksičnosti na ispitivanim stanicama proveden je nulti (0.) i treći (3.) dan.

Nakon uklanjanja medija iz bunarića, u svaki je bunarić nakapano 40 µL razrijeđenog reagensa MTT (1x). Nakon inkubacije od 3 sata, netopivi talog formazana otopljen je u 160 µL dimetil-sulfoksida (DMSO) (Kemika, Hrvatska).

Apsorbancija je mjerena pri 570 nm pomoću čitača za mikrotitarske pločice, a dobivene vrijednosti apsorbancije su preračunate u postotak rasta stanica (PG, od engl. *percentage of growth*) pomoću sljedeće formule:

$$PG=100 \times \frac{\text{srednja vrijednost ODtest} - \text{srednja vrijednost ODt0}}{\text{srednja vrijednost ODk} - \text{srednja vrijednost ODt0}}$$

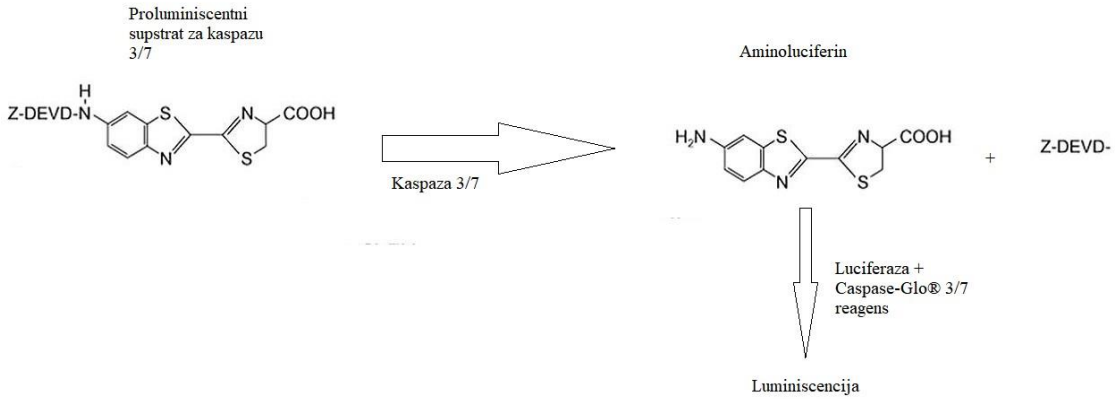
Pri tome je ODtest izmjerena vrijednost apsorbancije uzoraka nakon mjerenog vremena, ODt0 izmjerena vrijednost apsorbancije uzoraka prije izlaganja uzoraka određenoj tvari i ODk izmjerena vrijednost stanica bez tretmana.

3.3.3. Test apoptoze

Test apoptoze (Caspase-Glo® 3/7 Assay, Promega, SAD) mjeri aktivnost kaspaza -3 i -7 u kulturama stanica. Test sadrži proluminiscentni supstrat za kaspazu 3/7, koji sadrži tetrapeptidnu sekvencu DEVD (Asp-Glue-Val-Asp). Cijepanjem ovog supstrata nastaje aminoluciferin, supstrat za luciferazu. Dodatak reagensa Caspase-Glo® 3/7 dovodi do lize stanica, cijepanja supstrata aktivnošću kaspaze i stvaranja luminiscentnog signala koji se mjeri na luminometru (Slika 7.). Pri tome je luminiscencija proporcionalna prisutnoj aktivnosti kaspaza.

U pokusu su korištene stanice SQ20B (kontrolne i shTLR3), koje su nasađene na sterilnu bijelu mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića u količini $1.5x10^4$ st/bunariću uz dodatak doksiciklina. Nakon 24 sata, iz bunarića je odstranjen medij te je proveden predtretman stanica s poly(I:C) u koncentraciji 10 μg/mL, 1 μM cisplatinom te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine. Stanice su inkubirane 45 minuta na temperaturi od 37ºC uz 5% CO_2 i vlagu, nakon čega je provedeno zračenje putem panoramskog uređaja s ^{60}Co izvorom gama zračenja u pravokutnoj komori dimenzija 4.9 m x 3.9 m x 3.5 m, na udaljenosti od 370 cm od plašta i visini 70 cm od poda, brzinom doze od 20 mGy/sec tijekom 390 sekundi, odnosno do ukupne doze 7.5 Gy. Stanice su potom inkubirane dvadeset i četiri sata, nakon čega je proveden test apoptoze.

U svaki bunarić nakapano je 80 μL reagensa (koji se dobije miješanjem Caspase-Glo® 3/7 supstrata koji sadrži tetrapeptidnu sekvencu DEVD (Asp-Glue-Val-Asp) i pufera). Mjerenje luminiscencije provedeno je nakon inkubacije od 30 minuta, odnosno 1 sata, na luminometru (Fluoroscan ascent FL, Thermo, Finska), prema protokolu koji je unaprijed određen programom instrumenta.



Slika 7. Mehanizam djelovanja testa Caspase-Glo® 3/7

3.4. Analiza promjene ekspresije gena koji sudjeluju u apoptozi, odnosno preživljenju stanica nakon tretmana

Za analizu promjena ekspresije gena koji sudjeluju u apoptozi, odnosno preživljenju stanica tumora korištena je metoda *real time* RT-PCR.

3.4.1. Izolacija RNA i sinteza cDNA

Stanice SQ20B (kontrolne i shTLR3) nasađene su u sterilne posude te su drugi dan tretirane 45 minuta s poly(I:C) u koncentraciji 10 μg/mL, 1 μM cisplatinom, kombinacijom poly(I:C) i cisplatine te zračenjem u dozi od 7.5 Gy. Izolacija RNA provedena je 24 sata nakon tretmana korištenjem RNeasy Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Stanice su raspršene i homogenizirane u puferu RLT (od engl. *RNeasy Lysis Buffer*). Potom je u lizat dodan 70%-tni etanol u jednakom volumenu. Suspenzija etanola i lizata je potom preseljena u spin kolonu. Na njezinom se dnu nalazi specijalna silikonska membrana na koju se RNA selektivno veže. Nakon centrifugiranja 15 sekundi na 8 000 okretaja/min, spin kolona je isprana sa 700 uL pufera RW1 te je sadržaj centrifugiran 15 sekundi na 8 000 okretaja/min. Potom je spin kolona isprana s 500 μL pufera RPE te je sadržaj ponovno centrifugiran 15 sekundi na 8 000 okretaja. Postupak je ponovljen, ovaj put s centrifugiranjem na 8 000 okretaja/min tijekom 2 minute. Potom je u spin kolonu dodano 50 μL destilirane vode te je sadržaj centrifugiran 1 minutu na 8 000 okretaja/min.

Izolirana RNA čuvana je na temperaturi od -80ºC. Količina i kvaliteta izolirane RNA provjerena je na spektrofotometru i gelu agaroze. Spektrofotometrijsko mjerenje služi za određivanje koncentracije RNA i onečišćenje solima i proteinima.

Koncentracija RNA određuje se računski, prema sljedećoj formuli:

$C_{RNA(\mu g/mL)} = A_{260}$ x 40 x razrjeđenje.

Pri tome je A_{260} apsorbancija u jedinicama optičke gustoće pri valnoj duljini od 260 nm, a 40 ekstincijski koeficijent RNA. Onečišćenje uzorka solima računa se iz omjera apsorbancija pri 260 i 230 nm, a poželjna je vrijednost omjera ≥ 2.0. Onečišćenje uzorka proteinima računa se iz omjera apsorbancija pri 260 i 280 nm, a poželjni su omjeri od 1.6-1.9.

Za procjenu cjelovitosti molekule RNA i eventualnog zagađenja genomskom DNA služi analiza na gelu agaroze. S obzirom na to da je ribosomska RNA, s udjelom od 80 do 85% kvantitativno najzastupljenija RNA u stanici, utvrđivanje cjelovitosti izolirane RNA vrši se upravo na temelju njenog izgleda. Pri tome obje ribosomske pruge moraju biti jasno definirane, a omjer gornje i donje pruge mora biti 2:1. mRNA je u gelu agaroze vidljiva kao razmaz između dvije ribosomske pruge, a tRNA čine najdonju difuznu prugu. Pruga vidljiva u jažici, ili koja je tek izišla iz jažice označava zagađenje genomskom DNA. Onečišćenje genomskom DNA dodatno je provjereno reakcijom PCR s početnicama koje su smještene u intronskom dijelu DNA, pri čemu u reakciji u koju je dodana čista RNA ne dolazi do stvaranja produkta PCR-a.

Sinteza cDNA odvija se reakcijom obrnutog prepisivanja (engl. *reverse transcriptase*) RNA u komplementarnu cDNA. Za ovaj pokus korišten je komplet TaqMan® Reverse Transcription Reagens Kit (Applied Biosystems, Branchburg, SAD) prema uputama proizvođača.

U reakcijsku smjesu od 25 µL dodana su 2.5 µL 10x RT pufera (sastav 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 500 mM KCl, 1% Triton® X-100), 1.0 µL 10 mM dNTP-a, 2.5 µL 50 µM početnica u obliku nasumičnih heksamera, 1.25 µL enzima reverzne transkriptaze (50 U/µL), te 1.25 µL inhibitora RNAze (20 U/µL), po 0.1 µg RNA izolirane iz svakog od tretiranih uzoraka te je smjesa nadopunjena vodom do 25 µL.

Sinteza cDNA odvijala se prema programu: sparivanje početnica 10 minuta pri 95ºC, sinteza prvog lanca 60 minuta pri 37ºC i inaktivacija reverzne transkriptaze 5 minuta pri 95ºC.

3.4.2. *Real time* PCR

S obzirom na to da je klasična metoda RT-PCR (od engl. *reverse transcription polymerase chain reaction,* odnosno lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja) semikvantitativna, razvijen je kvantitativni ili *real time q*PCR. *Real time* qPCR je precizna i pouzdana metoda za kvantifikaciju ekspresije gena, za koju su dovoljne i vrlo male količine mRNA. Produkti reakcije PCR obilježavaju se fluorescencijskom bojom i kontinuirano se analiziraju tijekom nastajanja.

Fluorescentna boja korištena u ovom radu je Sybr® Green (Applied Biosystems, Velika Britanija), koja se veže na dvolančanu DNA u uzorku. Tijekom reakcije PCR DNA polimeraza umnaža zadanu sekvencu DNA i tako se povećava količina produkta reakcije PCR. Boja Sybr®

se potom veže na svaku novu kopiju dvolančane DNA. Rezultat je porast intenziteta fluorescencije koji je razmjeran količini produkta reakcije PCR .

Prije samog izvođenja pokusa napravljena je analiza početnica. Radi utvrđivanja mogu li se rezultati analizirati relativnom kvantifikacijom, odnosno napraviti izračun prema formuli $2^{-\Delta\Delta CT}$, izrađene su standardne krivulje. Da bi se dobila standardna krivulja potrebno je prvo napraviti seriju razrjeđenja cDNA. Vrijednost C_T (*treshold value*) označava broj ciklusa nakon kojeg se fluorescentni signal detektira. Na temelju te vrijednosti program proizvodi standardnu krivulju. Adekvatna standardna krivulja mora imati R^2>0.98 i nagib između -3.3 do -3.6, što znači da se produkt u svakom ciklusu umnoži s efikasnošću od 90-100%. Sve početnice korištene u ovom radu provjerene su standardnom krivuljom i zadovoljavale su navedene uvjete. Korištene početnice koncentracije 50 μM razrijeđene su u omjeru 1:10 te su prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Početnice korištene za izvođenje *real time* RT-PCR reakcije. Početnice su koncentracije 25 nmol i zadovoljavajuće čistoće (engl. *desalted*).

Naziv početnice	Naziv umnažanog gena	Slijed nukleotida
BAD-F	*BAD*	5'-CTC CGG AGG ATG AGT GAC GAGT-3'
BAD-R		5'-ACT TCC GCC CAT ATT CAA GAT-3'
BAX-F	*BAX*	5'-TTT GCT TCA GGG TTT CAT CC-3'
BAX-R		5'-CAG TTG AAG TTG CCG TCA GA-3'
NOXA-F	*NOXA*	5'-GAG ATG CCT GGG AAG AAG G-3'
NOXA-R		5'-TCC TGA GCA GAA GAG TTT GGA-3'
PUMA-F	*PUMA*	5'-GAT GGC GGA CGA CCT CAA C-3'
PUMA-R		5'-TGG GAG TCC AGT ATG CTA CAT GGT-3'
SURVIVIN-F	*SURVIVIN*	5'-TGA GCT GCA GGT TCC TTA TCT G-3'
SURVIVIN-R		5'-GAA TGG CTT TGT GCT TAG TTT T-3'
DIABLO-F	*DIABLO*	5'-TGA CTT CAA AAC ACC AAG AGT A-3'
DIABLO-R		5'-TTT CTG ACG GAG CTC TTC TA-3'
BCL-XL-F	*BCL-XL*	5'-GCA GGC GAC GAG TTT GAA CT-3'
BCL-XL-R		5'-GTG TCT GGT CAT TTC CGA CTG A-3'

Reakcijska smjesa za analizu ekspresije gore navedenih gena napravljena je u količini od 10 μL, a sastojci su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Sastojci reakcije RT-PCR

Sastojak	Volumen (μL)
Sybr® Green Master Mix	5.0
Početnica F	0.3
Početnica R	0.3
cDNA	1.0
qH_2O	3.4
Ukupni volumen	10.0

Pri tome je cDNA razrijeđena u omjeru 1:5, a početnice u omjeru 1:10. Uzorci su nakapani u jažice u triplikatima te kratko centrifugirani pri 1000 rpm.

PCR reakcija izvedena je pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija izvođena je 10 minuta pri 95 ºC, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa s denaturacijom od 30 sekundi pri 95ºC, sparivanje parova početnica s DNA u trajanju od 30 sekundi pri 62ºC i produljivanje lanca u trajanju od 30 sekundi pri 60ºC. Reakcija PCR odvijala se u aparatu CFX96™ Real Time PCR Detection System (BioRad, SAD).

Za izračun razlike u ekspresiji određenog gena u dva različita uzorka korištena je metoda ΔΔCT. Promjena ekspresije gena se računa pomoću formule $2^{-\Delta\Delta CT}$. Prvo se izračuna vrijednost ΔΔCT. Ona se dobije tako da se od C_T vrijednosti gena od interesa oduzme C_T vrijednost osnovnog, konstitutivnog gena koji ima stabilnu ekspresiju (engl. *housekeeping*). Tako se dobije ΔCT vrijednost. ΔΔCT vrijednost jest razlika između ΔCT vrijednosti tretiranog uzorka i kontrole.

3.5. Određivanje unutarstaničnog ROS

Za određivanje unutarstaničnog ROS-a nakon tretmana stanica, korištena je proba 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA, Fluka). Radi se o najčešće korištenoj probi za detekciju unutarstaničnog vodikovog peroksida i drugih oksidansa. Proba prolazi kroz staničnu membranu. Unutar stanice se hidrolizira u DCFH karboksilatni anion, koji se zadržava u stanici. Njegovom oksidacijom pomoću ROS-a nastaje fluorescentni produkt pod nazivom diklorofluorescein (DCF), a čiji signal možemo mjeriti na fluorimetru.

Proba DCFH-DA čuvana je u zamrzivaču pri temperaturi od -20ºC.

Stanice SQ20B (kontrolne i shTLR3) nasađene su u sterilnu bijelu mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića u količini $2x10^4$ st/bunariću uz dodatak doksiciklina u koncentraciji 2 µL/mL. Nakon 24 sata, iz bunarića je odstranjen medij te su stanice isprane su sa 100 µL svježe pripremljenog pufera HBSS-a (od engl. *Hank's buffered salt solution*) nakon čega je u svaki bunarić nakapano 100 µL 10 µM DCFH-DA. Stanice su potom inkubirane u inkubatoru 30 minuta na 37ºC uz 5% CO_2 i vlagu. Nakon inkubacije stanice su ponovno isprane sa 100 µL HBSS-a te su tretirane s poly(I:C) u koncentraciji 10 µg/mL, cisplatinom koncentracije 1 µM te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine. Pokus je napravljen u kvadriplikatima. Tretirane stanice potom su inkubirane na 37ºC uz 5% CO_2 i vlagu. Mjerenje fluorescencije provedeno je nakon 30 minuta, 1 sat, 2 sata te 4 sata. Mjerenje je provedeno na fluorimetru Infinite® 200 PRO microplate reader (Tecan), pri ekscitaciji 500 nm i emisiji 529 nm.

3.6. Analiza staničnog ciklusa pomoću protočnog citometra

Analiza staničnog ciklusa temelji na činjenici da stanice u različitim fazama staničnog ciklusa imaju različitu količinu DNA. Stanice u fazi G2/M imaju dvostruko više DNA od stanica u fazi G2/G1, dok se količina DNA u fazi S nalazi između ove dvije vrijednosti. Mjerenje se vrši posredno, korištenjem fluorescentnih proba koje se vežu za DNA u staničnoj jezgri, pri čemu je fluorescentni signal koji se detektira proporcionalan udjelu DNA u stanici. Mjerenjem fluorescencije svake stanice u populaciji moguće je odrediti broj stanica u određenoj fazi ciklusa.

Fluorescentna boja korištena u ovom pokusu je propidij-jodid.

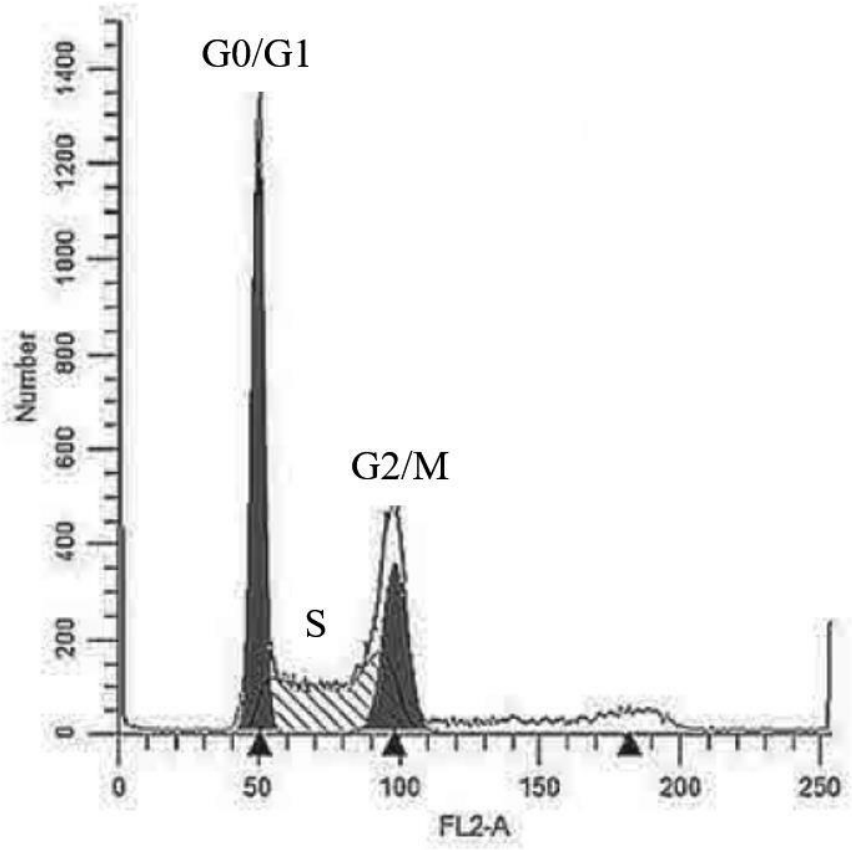
U ovom pokusu korištena je linija stanica Detroit 562. Stanice su nasađene u sterilne pločice s 12 bunarića te tretirane s poly(I:C) u koncentraciji 10 μg/mL, cisplatinom koncentracije 1 μM te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine, nakon čega su zračene ukupnom dozom od 2.5 Gy. Stanice su potom inkubirane 24 ili 72 sata, nakon čega je mjeren udio stanica u određenim fazama staničnog ciklusa.

Nakon inkubacije, sa stanica je uklonjen medij koji je premješten u sterilne epruvete od 2 mL (Eppendorf, Njemačka). Stanice su potom isprane s 300 μL PBS-a, nakon čega je dodano 200 μL tripsina. Nakon petominutne inkubacije, stanice su resuspendirane u bunariću medijem u kojem su rasle, preseljene u epruvete od 2 mL te centrifugirane 5 minuta pri 3000 rpm i 4°C. Potom su stanice dva puta isprane s 500 μL PBS-a te ponovno centrifugirane 5 minuta pri 3000 rpm i 4°C. Nakon centrifugiranja, epruvete sa stanicama su preseljene na led i resuspendirane u 500 μL PBS-a i 1 mL apsolutnog etanola (čuvanog na -20ºC), koji je dodavan kap po kap uz blago miješanje vorteksom. Tako pripremljene stanice do analize su pohranjene na -20ºC.

Prije analize stanice su isprane s 500 μL PBS-a i centrifugirane tijekom 5 minuta pri 3000 rpm. Nakon centrifugiranja iz epruveta sa stanicama odstranjen je PBS. Stanice su resuspendirane u 150 μL razrijeđene otopine RNAze (koncentracija 0.1 μg/μL) i inkubirane u vodenoj kupelji temperature 37ºC 15 minuta. Stanice su potom resuspendirane u 150 μL propidij-jodida (50 μg/μL). Nakon toga je sav sadržaj preseljen u prethodno obilježene epruvete za mjerenje na protočnom citometru te je inkubiran na ledu, zaštićen od svjetlosti, tijekom 30 minuta, nakon čega su stanice analizirane na protočnom citometru.

Analiza uzoraka u ovom radu provedena je pomoću protočnog citometra FACSCalibur™ (Becton Dickinson, SAD) i programa CellQuest Pro. Protok stanica namješten je na brzinu od 200-400 događaja (engl. *events*) u sekundi, a za svaki pojedini uzorak skupljeni su podaci o 15 000 stanica. Dobiveni podaci su analizirani programom ModFit (Verity Software House, Topsham, ME, SAD).

Prilikom analize definirane su koordinatne osi tako da je na ordinati prikazan broj stanica, a na apscisi količina stanične DNA (u vidu parametra FL2-A) (Slika 8.).



Slika 8. Histogram staničnog ciklusa. Na ordinati je prikazan broj stanica, dok je na apscisi prikazana količina DNA u stanici. Prvi brijeg bi označavao broj stanica u fazi G0/G1 staničnog ciklusa, drugi brijeg broj stanica u fazi G2/M staničnog ciklusa, dok iscrtano područje između dva brijega označava broj stanica u fazi S staničnog ciklusa.

3.7. Statistika

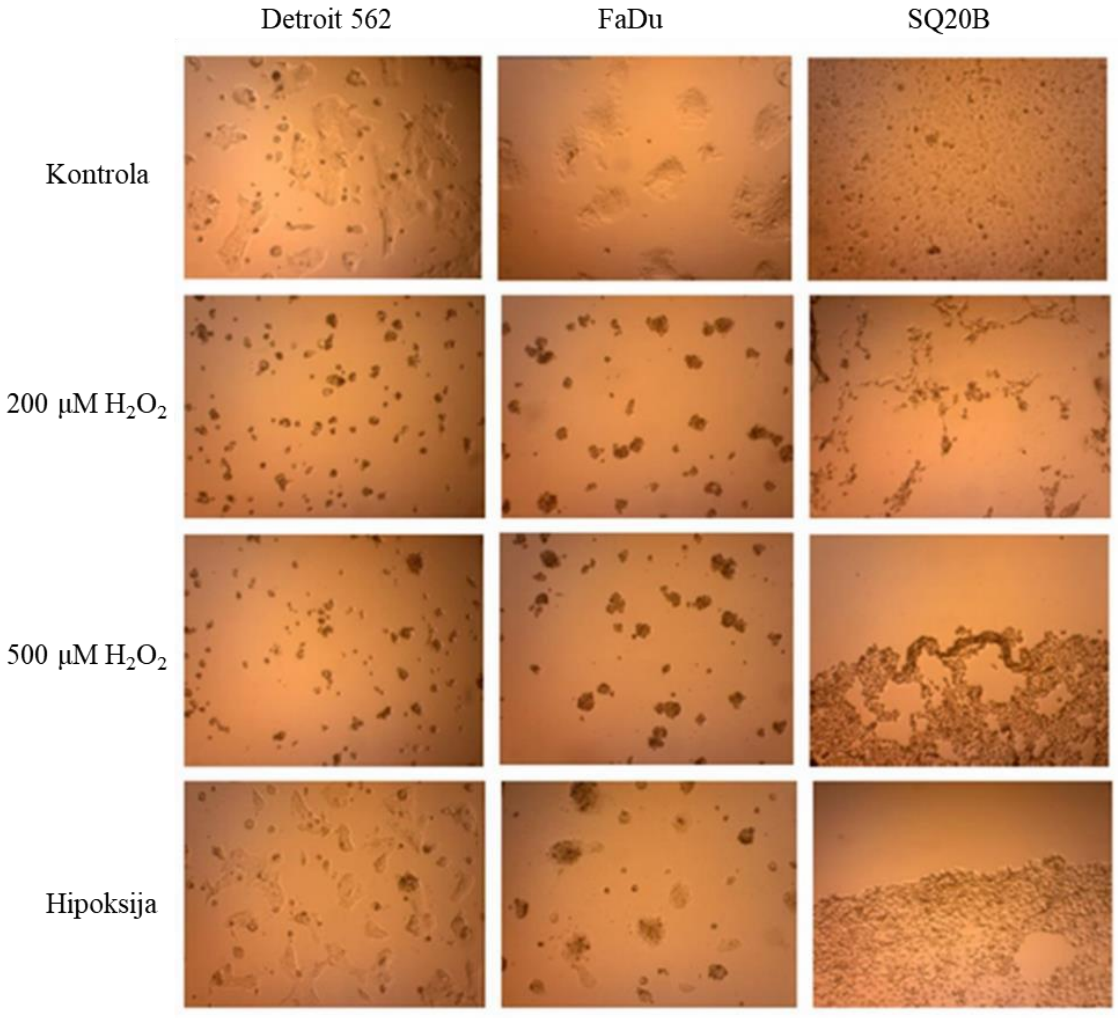
Statistička analiza je provedena korištenjem softvera GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software, SAD). Statistička značajnost izračunata je pomoću Studentovog t-testa (engl. *two-tailed*), a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Statistička značajnost je prihvaćena pri $p < 0.05$.

4. REZULTATI

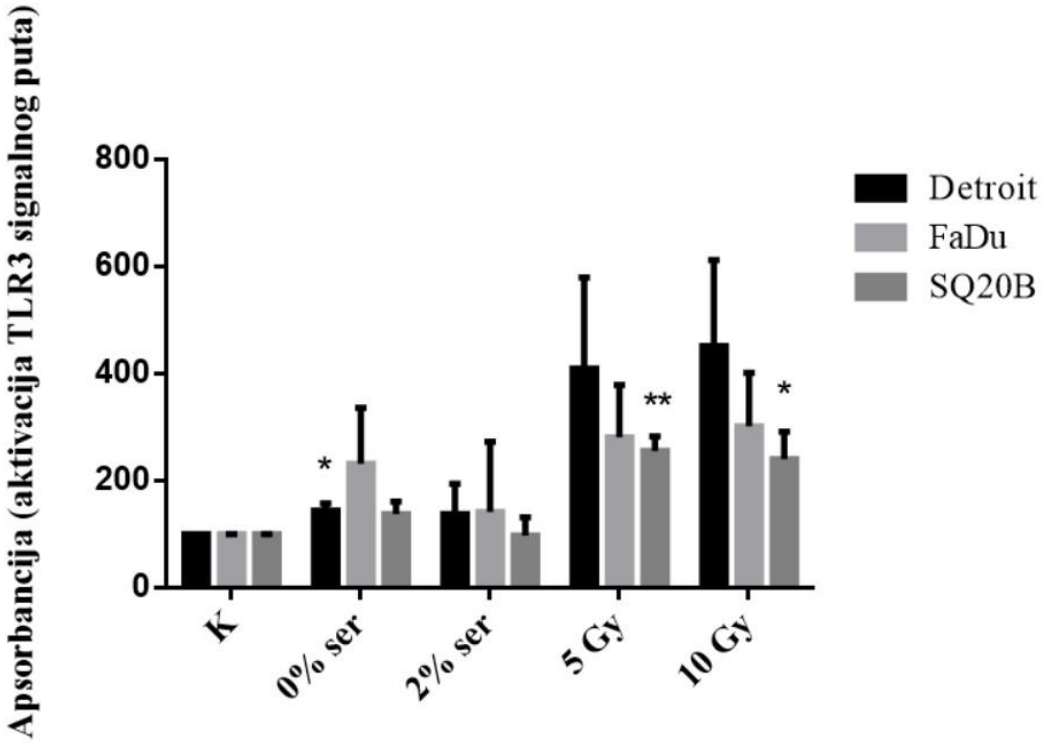
4.1. Aktivacija signalnog puta TLR3

Kako bismo provjerili otpuštaju li nekrotične stanice tumora glave i vrata endogene ligande za TLR3, stanice primarnog (FaDu) i metastatskog (Detroit 562) karcinoma ždrijela te stanice primarnog karcinoma grkljana (SQ20B) izlagali smo hipoksiji, oksidativnom stresu, izgladnjivanju i zračenju, koji su u različitoj mjeri prouzročili nekrozu stanica (Slika 9.).



Slika 9. Prikaz stanica Detroit 562, FaDu i SQ20B pod svjetlosnim mikroskopom nakon izlaganja oksidativnom stresu i hipoksiji.

Nakon izlaganja stanica stresu (i tretiranja medija RNazom), supernatantom tih stanica tretirali smo stanice HekBlue™. Kako bismo provjerili je li oslobođena RNA jedini ligand, medij smo tretirali RNazom te istraživali aktivira li se i dalje signalni put TLR3. Aktivaciju signalnog puta mjerili smo očitavanjem apsorbancije na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Dobiveni rezultati prikazani su kao postotak promjene u odnosu na kontrolu (Slika 10.).



Slika 10. Aktivacija signalnog puta TLR3 nakon inkubacije stanica Detroit 562, FaDu i SQ20B u mediju bez seruma (0% ser), u mediju s 2% seruma (2% ser), te nakon zračenja u dozi od 5 (5 Gy), odnosno 10 Gy (10 Gy). Zvjezdicom (*) označene su statistički značajne vrijednosti razlike u odnosu na kontrolne stanice *$p<0.05$, **$p=0.01$.

Nakon inkubacije stanica u mediju bez seruma, povećanje aktivacije signalnog puta TLR3 zabilježeno je u sve tri linije stanica, no statistički je značajno bilo samo u liniji stanica Detroit 562 ($p<0.03$), gdje je iznosilo 44.4%.

Nakon inkubacije u mediju s 2% seruma statistički značajan porast aktivnosti signalnog

puta TLR3 nije zabilježen niti u jednoj liniji stanica.

Aktivnost signalnog puta TLR3 nakon zračenja u dozi od 5, odnosno 10 Gy statistički je značajno porasla samo u liniji stanica SQ20B, i to oko 2.5 puta. Pri tome zračenje u dozi od 10 Gy nije značajnije utjecalo na aktivaciju signalnog puta TLR3 u odnosu na zračenje u dozi od 5 Gy.

Porast aktivnosti signalnog puta TLR3 u stanicama Detroit 562 zabilježen je nakon izlaganja oksidativnom stresu i hipoksiji. Porast aktivnosti TLR3 u stanicama Detroit 562 iznosio je 57.6% nakon izlaganja oksidativnom stresu, odnosno 55% nakon izlaganja hipoksiji. Nakon izlaganja hipoksiji i oksidativnom stresu aktivnost signalnog puta TLR3 u stanicama FaDu bila je snižena u odnosu na kontrolu. (Tablica 3.).

Tablica 3. Aktivacija signalnog puta TLR3 nakon izlaganja stresu (zračenje u dozi od 10 Gy, H_2O_2, izgladnjivanje u mediju bez seruma i hipoksija) te tretmana RNazom.

	Detroit 562 (% kontrole)	FaDu (% kontrole)	SQ20B (% kontrole)
K	100.00	100.00	100.00
10 Gy	135.84	187.85	151.56
10 Gy+RNaza	119.74	170.87	125.20
H_2O_2	157.64	97.73	123.53
H_2O_2 + RNaza	125.44	89.29	106.49
bez seruma	92.14	142.75	88.37
bez seruma+RNaza	114.98	107.10	74.80
hipoksija	154.98	95.60	138.23
hipoksija+RNaza	139.92	88.58	120.58

K: kontrola. 10 Gy: zračenje jednokratnoj dozi 10 Gy, H_2O_2: vodikov peroksid u koncentraciji 200 μM.

Tretman RNazom blago je smanjio aktivaciju signalnog puta TLR3 nakon svih navedenih tretmana, osim u skupini stanica Detroit 562 koja je izgladnjivana u mediju bez seruma.

4.2. Preživljenje i apoptoza stanica tumora nakon tretmana s poly(I:C) samostalno i u kombinaciji s cisplatinom i zračenjem

Stanice FaDu i SQ20B, stabilno transficirane plazmidom za shRNA koja utišava TLR3, tretirali smo kombinacijom poly(I:C), cisplatine i zračenja, nakon čega smo analizirali preživljenje stanica nakon tretmana i odlazak u apoptozu, što smo proveli uz pomoć testa MTT te testa apoptoze (Caspase-Glo® 3/7 Assay, Promega, SAD).

4.2.1. Test citotoksičnosti

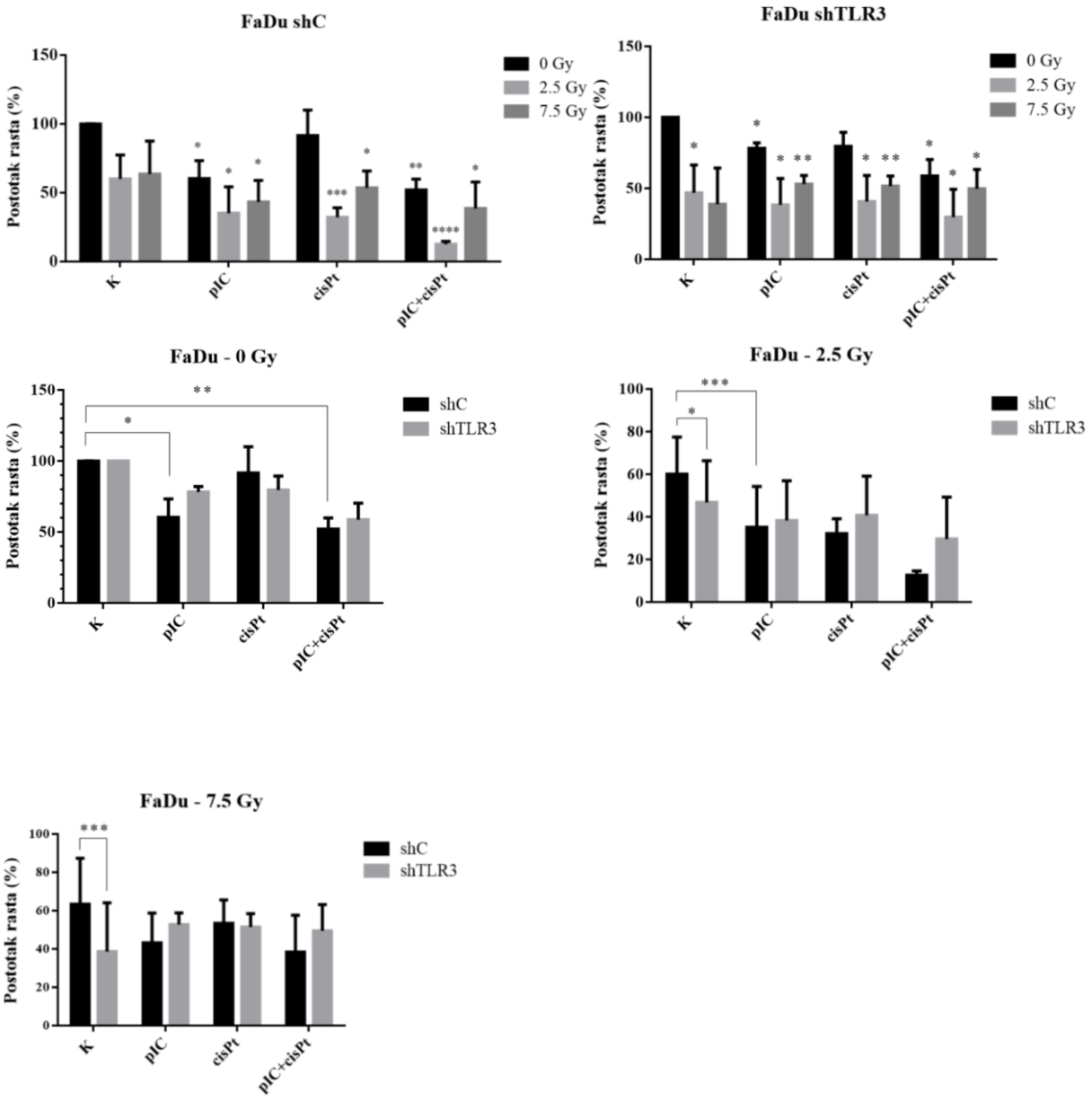
Tretman stanica FaDu s poly(I:C) inhibirao je rast stanica s eksprimiranim TLR3 (shC) za 39.7%, a stanica s utišanim TLR3 (shTLR3) za 21.8% u odnosu na stanice kontrole (Slika 11.).

Kombinirani tretman stanica FaDu s poly(I:C) i cisplatinom inhibirao je rast stanica s eksprimiranim TLR3 za 48% ($p<0.01$), a stanica s utišanim TLR3 za 41.4% ($p<0.03$) u odnosu na stanice kontrole.

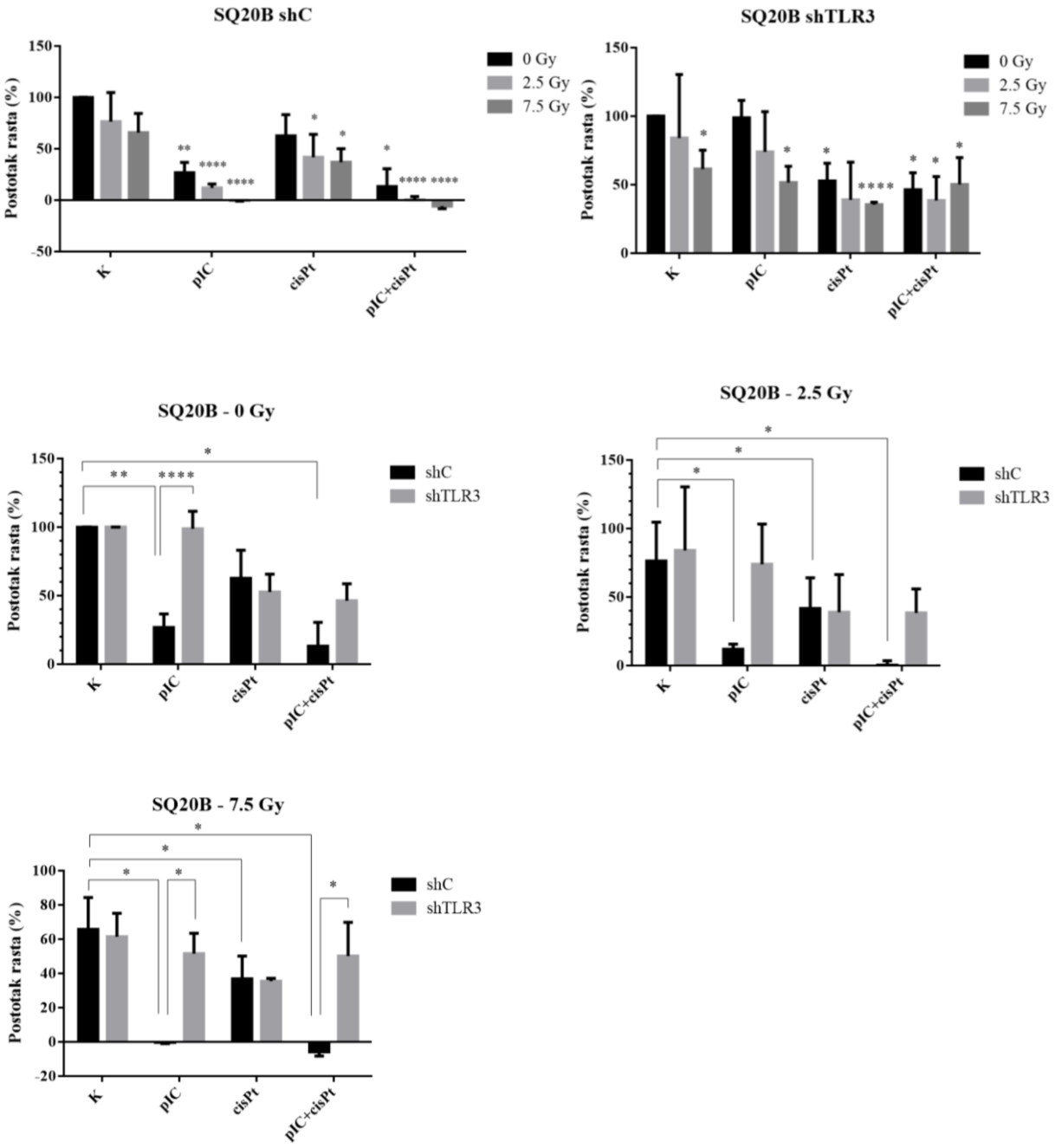
Zračenje kao samostalan tretman, primijenjeno u dozi od 2.5 Gy statistički značajno je jedino inhibiralo rast stanica FaDu s utišanim TLR3, i to za 40% u odnosu na kontrolu.

Postotak rasta stanica s eksprimiranim TLR3 koje su tretirane s poly(I:C) iznosio je 35.2% kontrole u skupini zračenoj dozom od 2.5 Gy, odnosno 43.3% kontrole u skupini zračenoj dozom od 7.5 Gy. U oba slučaja ta je razlika bila statistički značajna. Kombinacija poly(I:C) i zračenja inhibirala je i rast stanica s utišanim TLR3 (u skupini zračenoj dozom od 2.5 Gy postotak rasta stanica je iznosio 38.3% kontrole, odnosno 52.9% kontrole u skupini zračenoj dozom od 7.5 Gy). Dodatak cisplatine zračenju statistički značajno je inhibirao rast stanica s eksprimiranim i s utišanim TLR3. Postotak rasta stanica s eksprimiranim TLR3 tretiranih cisplatinom i potom zračenih dozom od 2.5 Gy iznosio je 32%, odnosno 53.5% kontrole u skupini stanica zračenoj dozom od 7.5 Gy. Postotak rasta stanica s utišanim TLR3 nakon tretmana cisplatinom i zračenjem iznosio je 40.7% kontrole kada je aplicirana doza zračenja od 2.5 Gy, odnosno 51.6% kontrole kada je primijenjena doza zračenja od 7.5 Gy.

Kombinirani tretman zračenjem, cisplatinom i s poly(I:C) statistički je značajno inhibirao rast svih skupina stanica, a najizraženiji učinak zamijećen je u skupini stanica s eksprimiranim TLR3 gdje je postotak rasta iznosio 12.6% u skupini zračenoj dozom od 2.5 Gy, odnosno 38.6% u skupini zračenoj dozom od 7.5 Gy u odnosu na stanice kontrolne skupine. Preživljenje stanica s utišanim TLR3 iznosilo je 29.6% u skupini zračenoj dozom od 2.5 Gy, odnosno 49.6% u skupini zračenoj dozom od 7.5 Gy u odnosu na stanice kontrolne skupine.



Slika 11. Postotak rasta stanica FaDu s eksprimiranim i utišanim TLR3 u odnosu na (netretiranu) kontrolu nakon tretmana s poly(I:C) (10 μg/ml), cisplatinom (1 μM) i njihovom kombinacijom tijekom 45 min te ozračivanja u dozi 2.5 i 7.5 Gy. Analiza je provedena testom MTT nakon 3 dana. Zvjezdicom (*) označene su statistički značajne vrijednosti *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.005$. shC: stanice s eksprimiranim TLR3, ali transficirane kontrolnim plazmidom, shTLR3: stanice s utišanim TLR3. K: kontrola, pIC: poly(I:C), cisPt: cisplatina, poly(I:C)+cisPt: kombinacija poly(I:C) i cisplatine.



Slika 12. Postotak rasta stanica SQ20B s eksprimiranim i utišanim TLR3 u odnosu na (netretiranu) kontrolu nakon tretmana s poly(I:C) (10 μg/ml), cisplatinom (1 μM) i njihovom kombinacijom tijekom 45 min te ozračivanja u dozi od 2.5 i 7.5 Gy. Analiza je provedena testom MTT nakon 3 dana. Zvjezdicom (*) su označene statistički značajne vrijednosti *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001. shC: stanice s eksprimiranim TLR3, ali transficirane kontrolnim plazmidom, shTLR3: stanice s utišanim TLR3. K: kontrola, pIC: poly(I:C), cisPt: cisplatina, pIC+cisPt: kombinacija poly(I:C) i cisplatine.

Tretman stanica SQ20B s poly(I:C) statistički je značajno inhibirao rast stanica s eksprimiranim TLR3, umanjivši ga za 73.2% ($p<0.01$) u odnosu na kontrolu (Slika 12.), dok nije imao značajni utjecaj na rast stanica s utišanim TLR3. Tretman cisplatinom nije značajnije utjecao na rast stanica s eksprimiranim TLR3, dok je statistički značajno inhibirao rast stanica s utišanim TLR3, i to za 47.3% ($p<0.03$) u odnosu na kontrolu. Kombinirani tretman s poly(I:C) i cisplatinom statistički je značajno inhibirao rast stanica s eksprimiranim TLR3 za 76.8% ($p<0.02$) u odnosu na kontrolu, a stanica s utišanim TLR3 za 53.7% ($p<0.02$) u odnosu na kontrolu.

Zračenje kao samostalan tretman, primijenjeno u dozi od 7.5 Gy statistički značajno je jedino inhibiralo rast stanica SQ20B s utišanim TLR3, i to za 38.6% u odnosu na kontrolu.

Tretman s poly(I:C) doveo je do daljnje inhibicije rasta u skupini stanica s eksprimiranim TLR3 koje je u skupini stanica zračenih dozom od 2.5 Gy iznosilo 11.9% u odnosu na kontrolu, dok je nakon zračenja u dozi od 7.5 Gy zabilježen čak i citotoksičan učinak (postotak rasta iznosio je -0.2% kontrole).

Nakon tretmana s poly(I:C), postotak rasta stanica s utišanim TLR3 iznosio je 73.9% u odnosu na kontrolu u skupini stanica zračenih dozom od 2.5 Gy, odnosno 51.5% u odnosu na kontrolu u skupini zračenoj dozom od 7.5 Gy.

Rast stanica tretiranih cisplatinom i zračenjem bio je sličan u svim tretiranim skupinama. Postotak rasta stanica s eksprimiranim TLR3 nakon tretmana cisplatinom i zračenjem u dozi od 2.5 Gy iznosio je 41.7%, a u skupini zračenoj dozom od 7.5 Gy 36.9%. Postotak rasta stanica s utišanim TLR3 iznosio je 38.9% nakon tretmana cisplatinom i zračenja u dozi od 2.5 Gy, odnosno 35.5% nakon zračenja u dozi od 7.5 Gy.

Najveće inhibicija rasta zabilježena je u skupini stanica s eksprimiranim TLR3 nakon kombiniranog tretmana s poly(I:C), cisplatinom i zračenjem. Postotak rasta stanica s eksprimiranim TLR3 iznosio je 0.37% u skupini zračenoj dozom od 2.5 Gy i tretiranoj s poly(I:C) i cisplatinom, dok je u skupini zračenoj dozom od 7.5 Gy zabilježen citotoksični učinak (postotak rasta stanica iznosio je -5.7% kontrole). Postotak rasta stanica s utišanim TLR3 nakon kombiniranog tretmana s poly(I:C), cisplatinom i zračenjem u dozi od 2.5 Gy iznosio je 38.4%, odnosno 50.2% kontrole u skupini stanica zračenih dozom od 7.5 Gy.

Zaključno, tretman s poly(I:C) značajno je inhibirao rast stanica FaDu. Inhibicija rasta je

bila prisutna u skupini stanica s aktivnim, kao i u skupini stanica s utišanim TLR3, premda je u potonjoj bilo nešto manje izražena. Tretman kombinacijom poly(I:C) i cisplatine također je u obje skupine stanica doveo do statistički značajne inhibicije rasta u odnosu na stanice kontrolne skupine. Inhibicija rasta stanica FaDu koje su predtretirane s poly(I:C) i potom zračene bila je usporediva sa inhibicijom rasta nakon tretmana cisplatinom i zračenjem. Gotovo 90%-tna inhibicija rasta stanica FaDu s eksprimiranim TLR3 zabilježena je nakon predtretmana stanica s kombinacijom poly(I:C) i cisplatine, nakon čega je uslijedilo zračenje.

Poly(I:C) je samostalno inhibirao rast stanica SQ20B s eksprimiranim TLR3 za više od 70%, dok nije imao učinka na stanice kod kojih je signalni put TLR3 bio utišan. Taj je učinak dodatno pojačan kada su stanice tretirane kombinacijom poly(I:C) i cisplatine. Najizrazitiji utjecaj na rast stanica SQ20B uočili smo nakon predtretmana stanica SQ20B s eksprimiranim TLR3 kombinacijom poly(I:C) i cisplatine, nakon čega je uslijedilo zračenje. Pri tome je zračenje u dozi od 2.5 Gy dovelo do gotovo 100% inhibicije rasta, dok je zračenje u dozi od 7.5 Gy imalo čak i citotoksičan učinak.

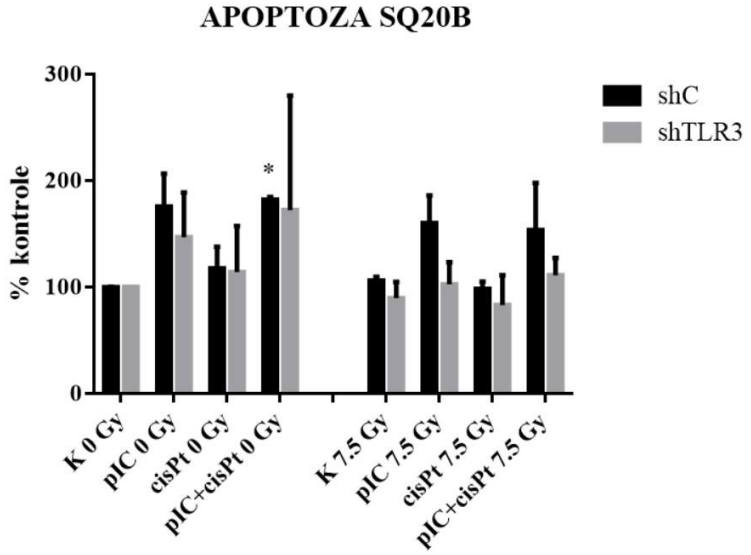
4.2.2. Test apoptoze

Povećana aktivnost kaspaza 3/7 zabilježena je u svim stanicama SQ20B tretiranim s poly(I:C), cisplatinom te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine, no statistički je značajna bila samo u skupini nezračenih stanica s eksprimiranim TLR3 i to nakon tretmana kombinacijom poly(I:C) i cisplatine (Slika 13.).

U skupini stanica koje nisu zračene poly(I:C) povećao je aktivnost kaspaza 3/7 za 75.7% u kontrolnoj skupini, dok je povećanje aktivnosti u skupini s utišanim TLR3 iznosilo 46.9%. Gotovo podjednako blago povećanje aktivnosti kaspaza 3/7 nakon tretmana cisplatinom zabilježeno je u obje skupine stanica (shC i shTLR3) te je u kontrolnoj skupini iznosilo 17.6%, a u skupini s utišanim TLR3 14.1%. Kombinacija poly(I:C) i cisplatine povećala je aktivnost kaspaza u stanicama kontrole za 82.2%, a u stanicama s utišanim TLR3 za 72.3%.

Zračenje u dozi od 7.5 Gy povećalo je aktivnost kaspaza 3/7 u stanicama kontrole tek za 6.2%, a u stanicama s utišanim TLR3 smanjilo je aktivnost kaspaza 3/7 za 10.4%. U skupini zračenih stanica, dodatak poly(I:C) doprinio je povećanju aktivnosti kaspaza 3/7 u kontrolnoj

skupini za 60%, a u stanicama s utišanim TLR3 za 2.5%. Predtretman zračenih stanica SQ20B cisplatinom smanjio je aktivnost kaspaza 3/7 u svim tretiranim stanicama i to u kontrolnoj skupini za 1.7%, a u skupini stanica s utišanim TLR3 za 16.8%. Kombinacija poly(I:C), cisplatine i zračenja povećala je aktivnost kaspaza 3/7 u kontrolnoj za 53.6%, a u skupini stanica s utišanim TLR3 za 11.2%.



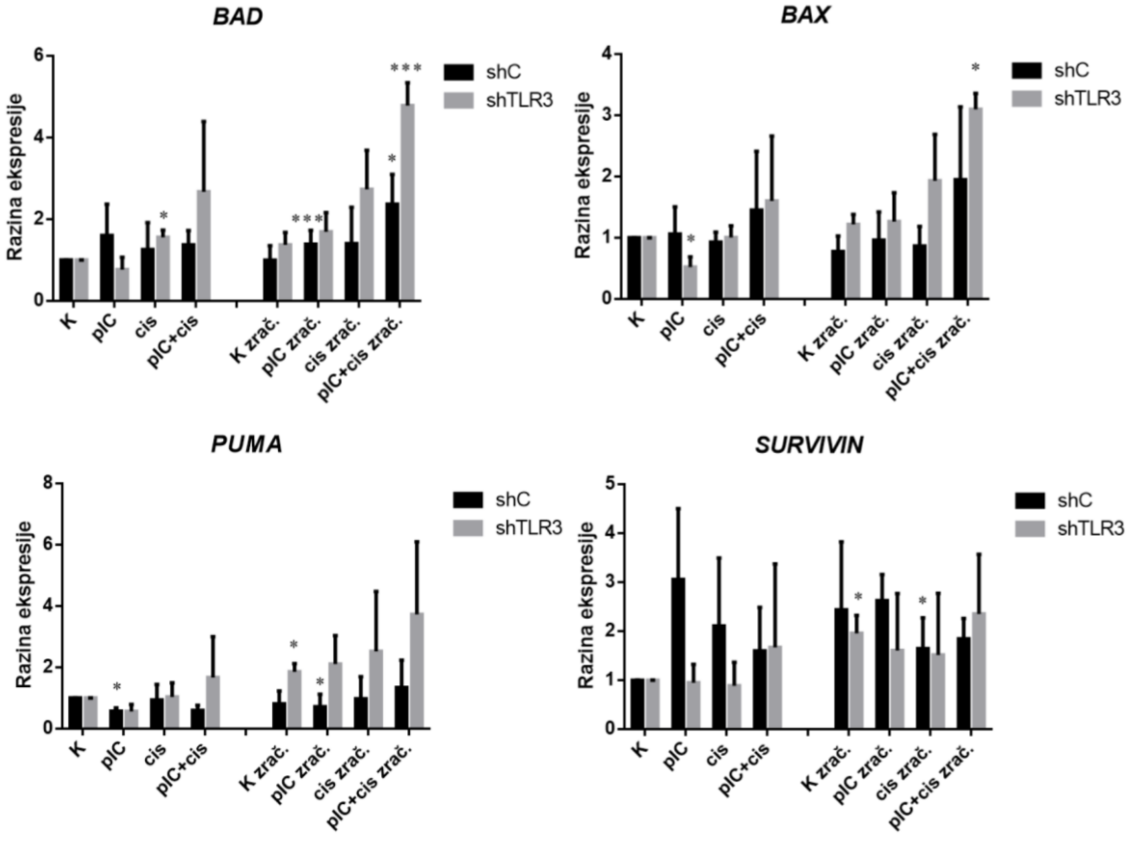
Slika 13. Apoptoza stanica SQ20B s eksprimiranim i utišanim TLR3 nakon tretmana s poly(I:C), cisplatinom i njihovom kombinacijom te ozračivanja u dozi od 7.5 Gy. U svaki bunarić nakapano je 80 µL reagensa (koji se dobije miješanjem Caspase-Glo® 3/7 supstrata koji sadrži tetrapeptidnu sekvencu DEVD (Asp-Glue-Val-Asp) i pufera). Mjerenje luminiscencije provedeno je nakon inkubacije od 30 minuta, na luminometru (Fluoroscan ascent FL, Thermo, Finska). Statistički značajna aktivnost kaspaza 3/7 (*) zabilježena je u stanica s eksprimiranim TLR3 nakon tretmana kombinacijom poly(I:C) (10 µg/ml) i cisplatine (1 µM) (*$p<0.05$). K 0 Gy – nezračena kontrola, pIC 0 Gy: tretman samo s poly(I:C), cisPt 0 Gy: tretman samo s cisplatinom, pIC + cisPt 0 Gy: tretman kombinacijom poly(I:C) i cisplatine, K 7.5 Gy: kontrola zračena s 7.5 Gy, pIC 7.5 Gy: predtretman s poly(I:C) nakon čega je uslijedilo zračenje s 7.5 Gy, cisPt: predtretman s cisplatinom nakon čega je uslijedilo zračenje s 7.5 Gy, pIC + cisPt 7.5 Gy: predtretman kombinacijom poly(I:C) i cisplatine nakon čega je uslijedilo zračenje s 7.5 Gy, shC: stanice s eksprimiranim TLR3, stabilno transficirane s kontrolnim plazmidom, shTLR3- stanice s utišanim TLR3.

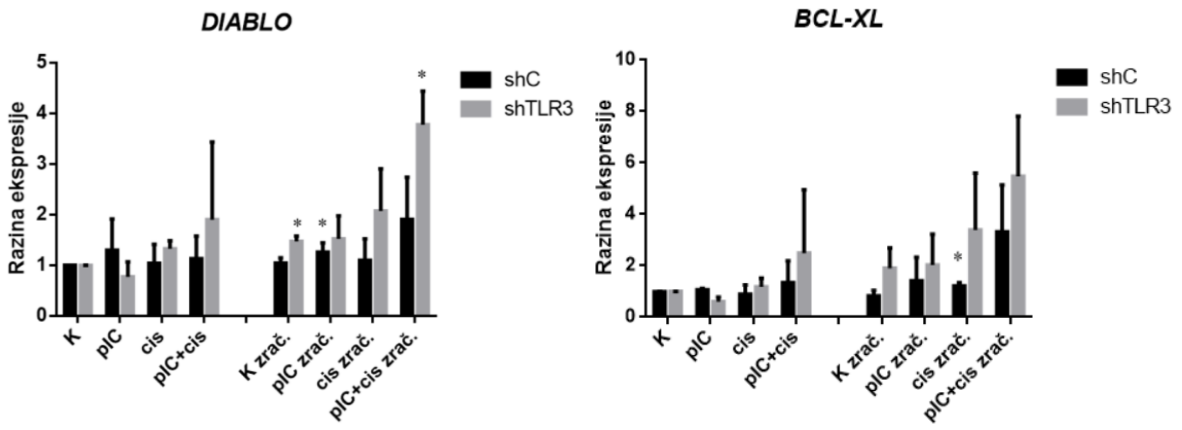
Zaključno, poly(I:C) u samostalnoj primjeni diže aktivnost kaspaza 3/7 u stanicama

SQ20B za preko 75%, a uz dodatak cisplatine taj se broj penje na preko 82% u usporedbi s netretiranim stanicama. Pri tome je utišavanje TLR3 dovelo do smanjenja aktivnosti kaspaza 3/7 za 30-60%. Zračenje nije doprinijelo povećanju aktivnosti kaspaza 3/7.

4.3. Analiza promjene ekspresije gena koji sudjeluju u apoptozi, odnosno preživljenju stanica nakon tretmana

Analiza ekspresije gena *Bad, Bax, Puma, Survivin, Diablo i Bcl-XL* provedena je metodom *real time* PCR-a nakon tretmana stanica SQ20B (kontrole i shTLR3). Stanice su tretirane s poly(I:C), cisplatinom i zračenjem te kombinacijama navedenih tretmana nakon čega su analizirane promjene ekspresije navedenih gena, a rezultati su prikazani kao promjena razine ekspresije (engl. *fold change*) u odnosu na ekspresiju osnovnog, konstitutivnog gena (Slika 14.).





Slika 14. Prikaz relativne ekspresije gena *Bad*, *Bax, Puma, Survivin*, *Diablo* i *Bcl-XL* u usporedbi s ekspresijom osnovnog (konstitutivnog) gena, nakon tretmana stanica SQ20B s eksprimiranim i utišanim TLR3 s poly(I:C) (10 μg/ml), cisplatinom (1 μM) i njihovom kombinacijom tijekom 45 min te ozračivanja u dozi od 7.5 Gy. Za izračun razlike u ekspresiji određenog gena u dva različita uzorka korištena je metoda ΔΔCT. Statistički značajne vrijednosti obilježene su zvjezdicom.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005. K: kontrola, pIC: poly(I:C), cisPt: cisplatina, pIC+cisPt: kombinacija poly(I:C) i cisplatine, zrač - zračenje u dozi 7.5 Gy, shC - stanice s eksprimiranim TLR3, ali transficirane kontrolnim plazmidom, shTLR3: stanice s utišanim TLR3.

Nakon tretmana cisplatinom ekspresija gena *Bad* povećana je 1.6 puta u liniji stanica s utišanim TLR3 u odnosu na ekspresiju osnovnog, konstitutivnog gena ($p<0.05$). Statistički značajan porast ekspresije gena *Bad* od 1.4 puta u odnosu na osnovni, konstitutivni gen također je zabilježen u stanicama kontrole koje su tretirane kombinacijom poly(I:C) i zračenja, odnosno u liniji stanica s utišanim TLR3 koje su tretirane cisplatinom.

Tretman s poly(I:C) nije značajno mijenjao ekspresiju gena *Bax* u stanicama s eksprimiranim TLR3. U stanicama s utišanim TLR3 tretman s poly(I:C) statistički je značajno smanjio ekspresiju gena *Bax* za 50% gena u odnosu na ekspresiju osnovnog, konstitutivnog gena.

Kombinacija zračenja, poly(I:C) i cisplatine uvećala je ekspresiju gena *Bax* 3.1 puta u stanicama s utišanim TLR3 u usporedbi s ekspresijom osnovnog, konstitutivnog gena. U stanicama s eksprimiranim TLR3 kombinirani tretman zračenja, poly(I:C) i cisplatine nije značajnije utjecao na ekspresiju gena *Bax*.

Tretman poly(I:C) umanjio je ekspresiju gena *Puma* u skupinama s eksprimiranim i

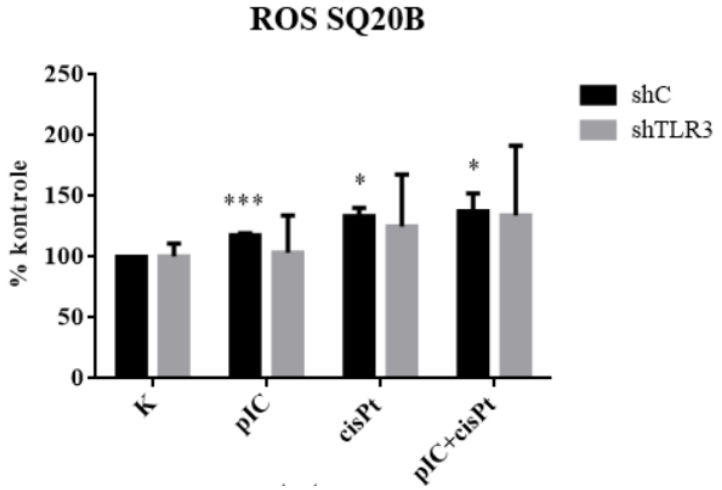
utišanim TLR3 za 44% u odnosu na ekspresiju osnovnog, konstitutivnog gena. Tretman cisplatinom u obje skupine stanica nije imao značajniji učinak na ekspresiju gena *Puma*. Zračenje je statistički značajno uvećalo ekspresiju gena *Puma* u skupini stanica s utišanim TLR3, i to 1.9 puta, dok u skupini stanica s eksprimiranim TLR3 nije utjecalo na ekspresiju gena *Puma*. Međutim, kombinacija poly(I:C) i zračenja je za 30% umanjila ekspresiju gena *Puma* u odnosu na ekspresiju osnovnog, konstitutivnog gena.

Tretman s poly(I:C) je u skupini stanica s eksprimiranim TLR3 nakon tretmana s poly(I:C) uvećao ekspresiju gena *Survivin* 3 puta u odnosu na ekspresiju osnovnog, konstitutivnog gena. Kada su stanice tretirane kombinacijom poly(I:C) i cisplatine, zabilježeni porast ekspresije gena *Survivin* u odnosu na osnovni, konstitutivni gen bio je gotovo upola manji (1.6 puta) nego kad su stanice tretirane samo s poly(I:C). Zračenje je doprinijelo povećanju ekspresije gena *Survivin* u svim tretiranim stanicama, premda je statistički značajan porast izražaja zabilježen jedino u skupini stanica s utišanim TLR3 koje su samo zračene te u skupini stanica s eksprimiranim TLR3 koje su tretirane kombinacijom cisplatine i zračenja.

Statistički značajan porast ekspresije gena *Diablo* u odnosu na osnovni, konstitutivni gen zabilježen je u skupini stanica s utišanim TLR3 nakon tretmana zračenjem (1.5 puta) te kombinacijom poly(I:C), cisplatine i zračenja 3.8 puta. U skupini stanica s eksprimiranim TLR3 tretman kombinacijom poly(I:C) i zračenja uvećao je izražaj gena *Diablo* 1.3 puta u odnosu na osnovni, konstitutivni gen. Poly(I:C) samostalno, kao ni u kombinaciji s cisplatinom nije statistički značajno utjecao na promjenu ekspresije gena *Bcl-XL* niti u skupini stanica s eksprimiranim TLR3, niti u skupini stanica s utišanim TLR3. Statistički značajan, premda blag porast ekspresije gena *Bcl-XL* od 1.2 puta u odnosu na osnovni, konstitutivni gen zabilježen je samo u skupini stanica s eksprimiranim TLR3 nakon tretmana cisplatinom i zračenjem.

4.4. Određivanje unutarstaničnog ROS

Kako bismo utvrdili je li povećano stvaranje ROS molekula mehanizam kojim radiorezistentne stanice tumora glave i vrata postaju radiosenzitivne, tretirali smo stanice SQ20B s poly(I:C), cisplatinom, odnosno kombinacijom poly(I:C) i cisplatine, nakon čega smo mjerili količinu stvorenih ROS molekula. Rezultati pokusa prikazani su na Slici 15.



Slika 15. Oslobađanje molekula ROS u stanicama SQ20B s eksprimiranim i utišanim TLR3 nakon tretmana s poly(I:C) (10 μg/ml), cisplatinom (1μM), odnosno kombinacijom poly(I:C) i cisplatine Stanice su inkubirane tijekom 30 min uz 2',7'- diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA, Fluka). Mjerenje fluorescencije provedeno je nakon 2 sata na fluorimetru Infinite® 200 PRO microplate reader (Tecan), pri ekscitaciji 500 nm i emisiji 529 nm.*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.005$. K: kontrola, pIC: poly(I:C), cisPt: cisplatina, pIC+cisPt: kombinacija poly(I:C) i cisplatine, shC: stanice s eksprimiranim TLR3, ali transficirane kontrolnim plazmidom, shTLR3: stanice s utišanim TLR3.

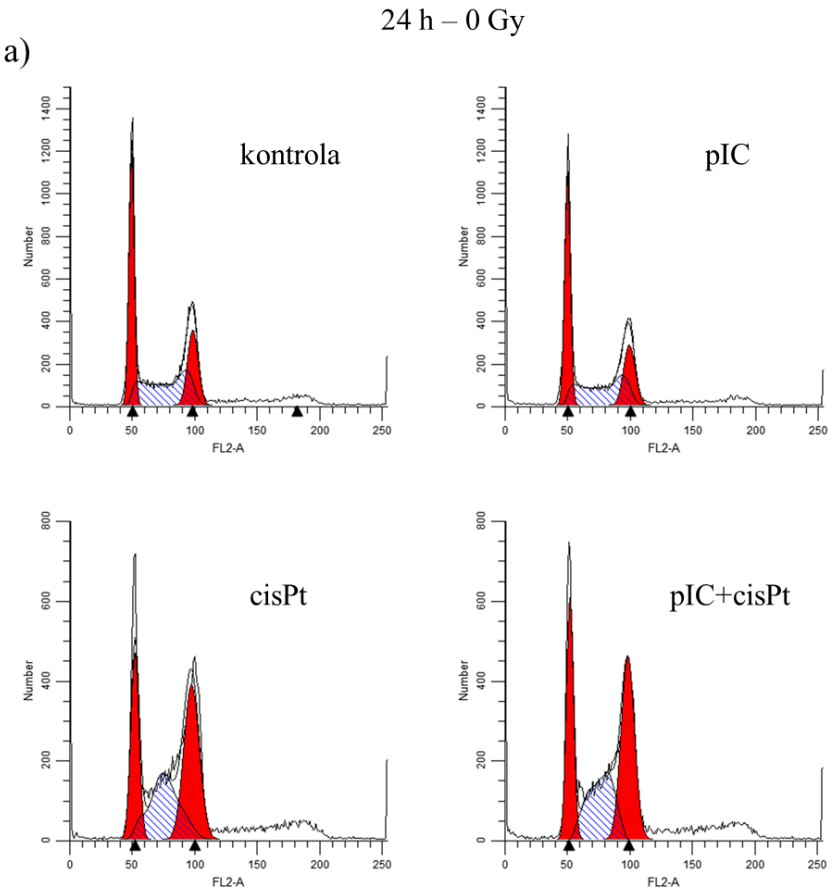
Statistički značajno povećanje količine molekula ROS zabilježeno isključivo u stanicama SQ20B s eksprimiranim TLR3, i to nakon tretmana s poly(I:C), cisplatinom te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine. Nakon tretmana stanica s eksprimiranim TLR3 s poly(I:C) došlo je do statistički značajnog povećanja molekula ROS za 17.7% u odnosu na kontrolu. Tretman cisplatinom povećao je količinu ROS molekula za 33.6%, dok je kombinacija poly(I:C) i

cisplatine dovela do povećanja količine molekula ROS za 37.6%, što je tek blago povećanje u odnosu na tretman cisplatinom.

Navedeni rezultati ukazuju na to da je stvaranje ROS nakon tretmana s poly(I:C) ovisno o TLR3, za razliku od stvaranja ROS nakon tretmana s kombinacijom poly(I:C) i cisplatine, koje je vjerojatnije posljedica povećanog stvaranja ROS nakon tretmana cisplatinom.

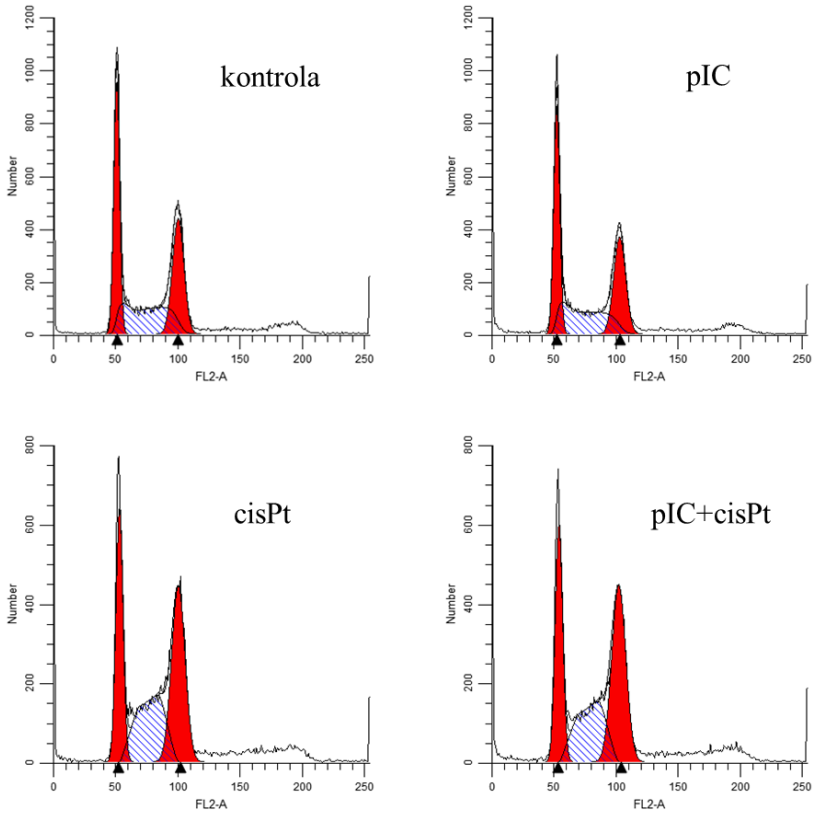
4.5. Analiza staničnog ciklusa pomoću protočnog citometra

Analiza staničnog ciklusa provedena je pomoću protočnog citometra. U pokusu su korištene stanice primarnog karcinoma ždrijela (Detroit 562). Stanice su tretirane s poly(I:C), cisplatinom i zračenjem u dozi od 2.5 Gy te su inkubirane 24 i 72 sata nakon čega je provedeno mjerenje. Rezultati pokusa su prikazani na Slici 16.



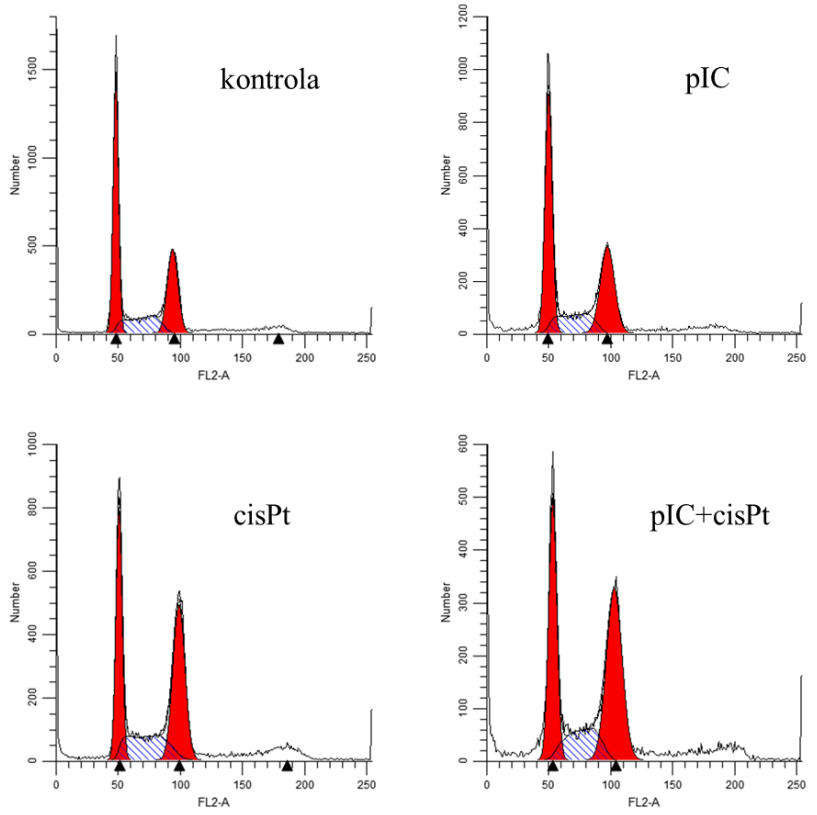
24 h – 2.5 Gy

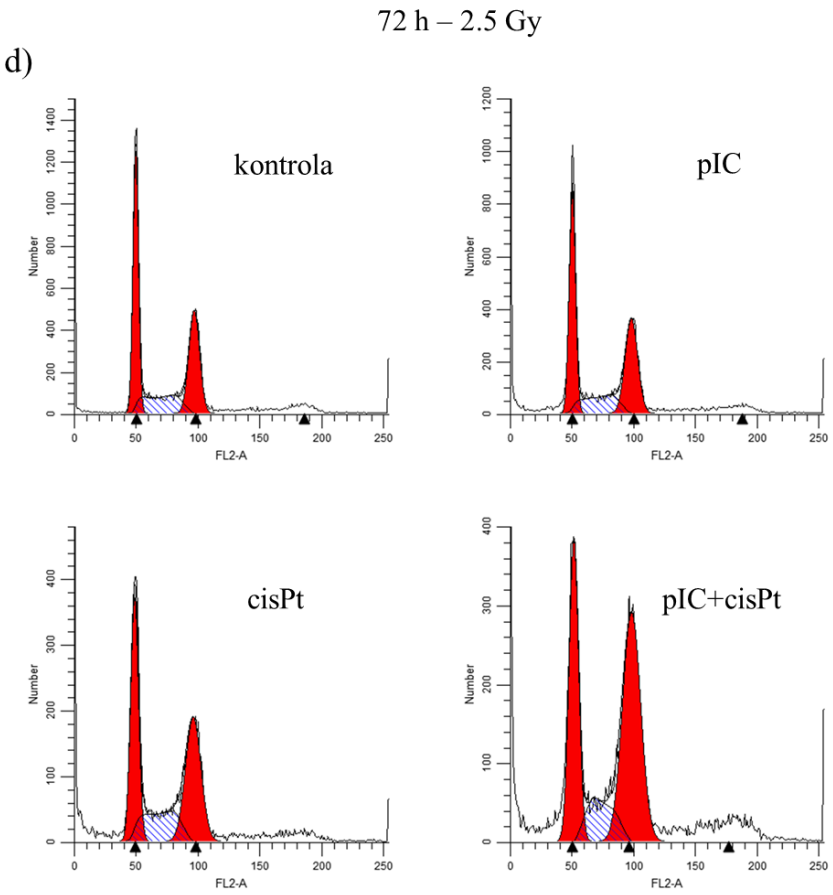
b)



72 h – 0 Gy

c)

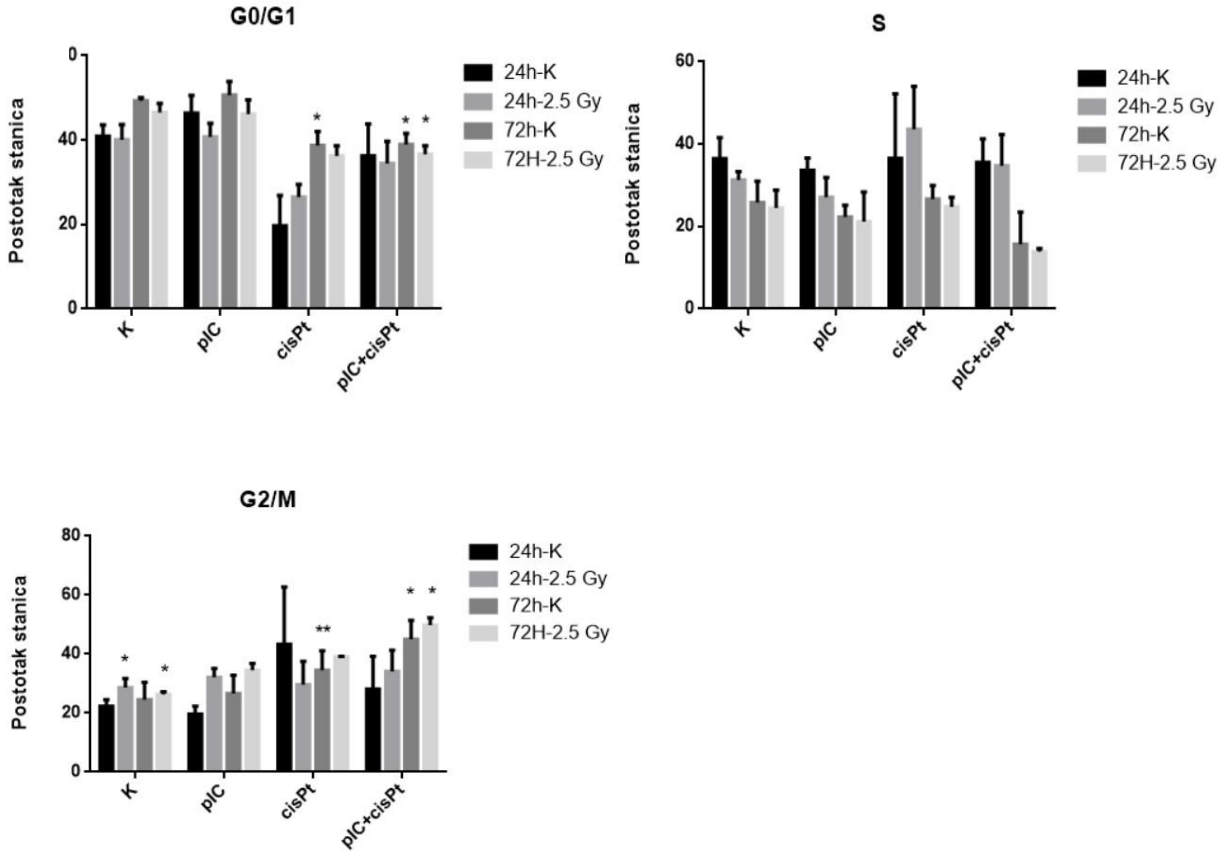




Slika 16. Analiza staničnog ciklusa. Histogrami protočne citometrije predstavljaju raspodjelu stanica Detroit 562 nakon tretmana s poly(I:C) (10 μg/ml) i cisplatinom (1 μM) tijekom 24 h (a) i 72 h (c) nakon čega je uslijedio tretman zračenjem u dozi 2.5 Gy (b i d). Analiza je napravljena protočnom citometrijom i analizirana programom ModFit (Verity Software House, Topsham, ME, SAD). Prilikom analize definirane su koordinatne osi tako da je na ordinati prikazan broj stanica, a na apscisi količina stanične DNA (u vidu parametra FL2-A). Prvi crveno obojani brijeg bi označavao broj stanica u fazi G0/G1 staničnog ciklusa, drugi crveno obojani brijeg broj stanica u fazi G2/M staničnog ciklusa, dok iscrtano područje između dva brijega označava broj stanica u fazi S staničnog ciklusa. 24 h – 0 Gy: histogram staničnog ciklusa stanica tretiranih s poly(I:C), cisplatinom te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine nakon inkubacije od 24 sata. 24 h – 2.5 Gy: histogram staničnog ciklusa stanica tretiranih s poly(I:C), cisplatinom te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine nakon inkubacije od 24 sata i zračenja u dozi od 2.5 Gy. 72 h – 0 Gy: histogram staničnog ciklusa stanica tretiranih s poly(I:C), cisplatinom te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine nakon inkubacije od 72 sata. 72 h – 2.5 Gy: histogram staničnog ciklusa stanica tretiranih s poly(I:C), cisplatinom te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine nakon inkubacije od 72 sata i zračenja u dozi od 2.5 Gy. pIC: poly(I:C) (10 μg/ml),

cisPt: cisplatina (1 μM), poly(I:C) + cisPt: kombinacija poly(I:C) (10 μg/ml) i cisplatine (1 μM).

Statistička analiza udjela stanica Detroit 562 u pojedinim fazama staničnog ciklusa prikazana je na Slici 17.



Slika 17. Statistička analiza staničnog ciklusa. Stanice Detroit 562 su tretirane s poly(I:C) u koncentraciji 10 μg/mL, cisplatinom koncentracije 1 μM te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine tijekom 24 i 72 h nakon čega je uslijedio tretman zračenjem u dozi 2.5 Gy. Analiza je napravljena protočnom citometrijom i analizirana programom ModFit (Verity Software House, Topsham, ME, SAD). *p<0.05,**p<0.01. 24 H – K: postotak stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa tretiranih s poly(I:C), cisplatinom te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine nakon inkubacije od 24 sata. 24 H – 2.5 Gy: postotak stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa tretiranih s poly(I:C), cisplatinom te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine nakon inkubacije od 24 sata i zračenja u dozi od 2.5 Gy. 72 H – K: postotak stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa tretiranih s poly(I:C), cisplatinom te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine nakon inkubacije od 72 sata. 72 H – K: histogram staničnog ciklusa stanica tretiranih s poly(I:C),

cisplatinom te kombinacijom poly(I:C) i cisplatine nakon inkubacije od 72 sata i zračenja u dozi od 2.5 Gy. K: kontrola, pIC: poly(I:C) (10 μg/ml), cisPt: cisplatina (1 μM), poly(I:C) + cisPt: kombinacija poly(I:C) (10 μg/ml) i cisplatine (1 μM).

Postotak stanica u fazi G0/G1 staničnog ciklusa bio je u svim skupinama stanica veći nakon inkubacije od 72 h u odnosu na inkubaciju od 24 sata (Slika 17.). Tretman s poly(I:C) nije značajnije utjecao na postotak stanica u fazi G0/G1 staničnog ciklusa. 72 sata nakon tretmana cisplatinom 38% stanica bilo je u fazi G0/G1, nasuprot 49% stanica kontrole. Nakon tretmana kombinacijom poly(I:C) i cisplatine i inkubacije od 72 sata 39% stanica bilo je u fazi G0/G1 staničnog ciklusa, nasuprot 49% stanica kontrole. U skupini stanica koja je predtretirana kombinacijom poly(I:C) i cisplatine te potom zračena 37% stanica bilo je u fazi G0/G1 staničnog ciklusa, nasuprot 47% stanica kontrole.

Postotak stanica u fazi S staničnog ciklusa manji je u svim skupinama stanica nakon inkubacije od 72 sata u odnosu na inkubaciju od 24 sata, pri čemu je zračenje u dozi od 2.5 Gy dodatno smanjilo postotak stanica u fazi S staničnog ciklusa. Tretman s poly(I:C) i cisplatinom, samostalno i u kombinaciji nije značajnije utjecao na broj stanica zaustavljenih u fazi S staničnog ciklusa.

Zračenje je blago, ali statistički značajno povećalo broj stanica zaustavljenih u fazi G2/M staničnog ciklusa. Nakon inkubacije od 24 sata, odnosno 72 sata, postotak stanica zaustavljenih u fazi G2/M iznosio je 29%, odnosno 26%.

Tretman s poly(I:C) samostalno nije statistički značajno povećao broj stanica u fazi G2/M staničnog ciklusa. Nakon tretmana cisplatinom i inkubacije od 72 sata 35% stanica bilo je u fazi G2/M, što je statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolu.

Kombinirani tretman s poly(I:C) i cisplatinom u najvećoj je mjeri inducirao zastoj staničnog ciklusa u fazi G2/M. Nakon inkubacije od 72 sata čak je 45% stanica tretiranih s poly(I:C) i cisplatinom bilo u fazi G2/M, nasuprot 25% stanica kontrole. Nakon zračenja u dozi od 2.5 Gy, postotak stanica zaustavljenih u fazi G2/M staničnog ciklusa koje su predtretirane kombinacijom poly(I:C) i cisplatine dodatno je povećan do 50%.

5. RASPRAVA

Liječenje malignih bolesti jedno je od najvećih izazova suvremene medicine i znanosti. Kemoterapeutici, također poznati i kao citostatici, niz su desetljeća, uz zračenje, bili stupovi liječenja tumora. Međutim, citostatici imaju i brojne mane. Učinkovitost im je često ograničena, a zbog relativno velike neselektivnosti u djelovanju na maligne u odnosu na zdrave stanice, njihova primjena praćena je i značajnom toksičnošću. To je osobito slučaj u liječenju tumora glave i vrata. Naime, kombinacija cisplatine i zračenja koja se koristi u radikalnom liječenju ovih tumora praćena je brojnim nuspojavama, kao što su nefrotoksičnost, ototoksičnost, hematotoksičnost, mukozitis, itd. S obzirom na nedostatke primjene citostatika, fokus istraživanja se od početka novog tisućljeća preselio na proučavanje bioloških molekula. One djeluju ciljano na receptore koje stanice tumora eksprimiraju u pojačanoj mjeri te inhibicijom odnosno aktivacijom određenih signalnih puteva, potiču smrt stanica tumora i zaustavljaju njihov rast. Posljednjih smo godina svjedoci najvećem i najbrže rastućem napretku u istraživanjima na području imunoterapije i biološke terapije tumora. Rezultati ovih istraživanja samo su u zadnjem desetljeću u potpunosti izmijenili načine liječenja određenih malignih bolesti, kao što su melanom i rak pluća. Otkriće cetuksimaba, kimeričnog monoklonskog IgG1 protutijela na receptor za epidermalni čimbenik rasta EGFR (od engl. *epidermal growth factor receptor*), donijelo je značajan napredak u liječenju tumora glave i vrata. Naime, poznato je da stanice tumora glave i vrata pojačano eksprimiraju receptor EGFR (Zimmermann i sur., 2006.). Cetuksimab se kompetitivno veže na izvanstaničnu domenu receptora EGFR i blokira vezanje epidermalnog čimbenika rasta EGF (od eng. *epidermal growth factor*) i drugih čimbenika rasta, kao što je npr. TGF-α. Osim toga, vezanje cetuksimaba na receptor EGFR potiče internalizaciju receptora u citoplazmu stanice, onemogućujući tako stupanje u interakciju s ligandom (Misiukiewicz i sur., 2016.). Oba mehanizma rezultiraju zaustavljanjem rasta stanica tumora, poticanjem programirane stanične smrti, smanjenjem angiogeneze i metastaziranja (Zimmermann i sur., 2006.).

S obzirom na to da je TLR3 također pojačano eksprimiran u stanicama tumora glave i vrata, ali ne i u okolnom tkivu (Pries i sur, 2008.), željeli smo podrobnije istražiti njegovu ulogu u razvoju tumora glave i vrata te potencijalnu primjenu u liječenju ovih tumora, korištenjem liganda koji aktivira signalni put TLR3, samostalno i u kombinaciji s cisplatinom i zračenjem.

Zamisao korištenja agonista TLR3 u liječenju tumora zasniva se na dva osnovna

antitumorska učinka koju ima aktivacija TLR3: poticanju apoptoze stanica tumora te indukciji sistemskog imunološkog antitumorskog odgovora. Poznato je da stimulacija TLR3 pojačano aktivira dendritičke stanice, koje potom potiču sazrijevanje i citotoksičnost CD8+ limfocita. Na taj način bi aktivacija TLR3 dovela do povećanog lučenja interferona γ (IFNγ), koji aktivira NK stanice i tako stimulira antitumorski odgovor (Schölch i sur., 2015.). Tako je nedavno pokazano da aktivacija TLR3 u sinergiji sa zračenjem zaustavlja rast radiorezistentnih stanica tumora pluća u miševa, što je objašnjeno povećanom aktivacijom citotoksičnih limfocita T i makrofaga vezanih uz tumor te povećanim stvaranjem TNF-α u mikrookolišu tumora (Yoshida i sur., 2018.).

Osim što poly(I:C) može utjecati i mijenjati imunološki mikrookoliš tumora, može ga mijenjati i zračenje. U novije vrijeme sve veći se značaj pridaje imunomodulirajućim učincima zračenja. S jedne strane, zračenje dovodi do povećanja ekspresije molekule Fas, koja je pokretač programirane smrti stanica, i glavnog kompleksa tkivne podudarnosti - MHC I (Reits i sur., 2006.; Tang i sur., 2014.; Reynders i sur., 2015.) koji je odgovoran za prezentaciju antigena citotoksičnim limfocitima CD8+, a s druge strane, zračenje može aktivirati limfocite CD8+ i putem indukcije IFN I (Burnette i sur., 2011.). Na primjeru raka prostate dokazano je da zračenje izaziva proupalni odgovor putem aktivacije TLR3, IL-18 i SH2D1A (El-Saghire i sur., 2014.). Također je pokazano i da aktivacija TLR3 i TLR7 u kombinaciji sa zračenjem pojačava smrt stanica raka dojke izazvanu autofagijom (Kang i sur., 2010.).

Uzrokujući nekrozu stanica tumora, zračenje uzrokuje oslobađanje endogenih liganada, tzv. molekula DAMP koji djeluju kao agonisti različitih TLR i koji djeluju dvojako. S jedne strane mogu potaknuti imunogeničnu smrt stanica tumora, dok s druge strane mogu doprinijeti njihovom preživljenju poticanjem kronične upale i imunosupresije (Hernandez i sur., 2016.). U slučaju TLR3, endogeni ligand koji se oslobađa nakon nekroze stanica tumora je dvolančana RNA.

Kako bismo vidjeli da li, i u kolikoj mjeri, nekrotične stanice tumora glave i vrata otpuštaju endogene ligande TLR3, analizirali smo aktivaciju signalnog puta TLR3 nakon izlaganja stanica Detroit 562, FaDu i SQ20B različitim oblicima stresa. Naši rezultati potvrđuju otprije poznatu činjenicu da se TLR3 ponaša kao endogeni senzor nekroze, prepoznajući RNA koja se oslobađa nekrozom stanica (Kariko i sur., 2004.; Cavassani i sur., 2008.). Porast aktivnosti signalnog puta TLR3 nakon zračenja zabilježili smo u svim tretiranim linijama stanica. S obzirom na to da tretman supernatanta RNazom nije statistički značajno smanjio

aktivaciju signalnog puta TLR3 niti u jednoj skupini stanica, možemo zaključiti da dvolančana RNA koja je oslobođena nakon nekroze stanica nije jedini ligand TLR3.

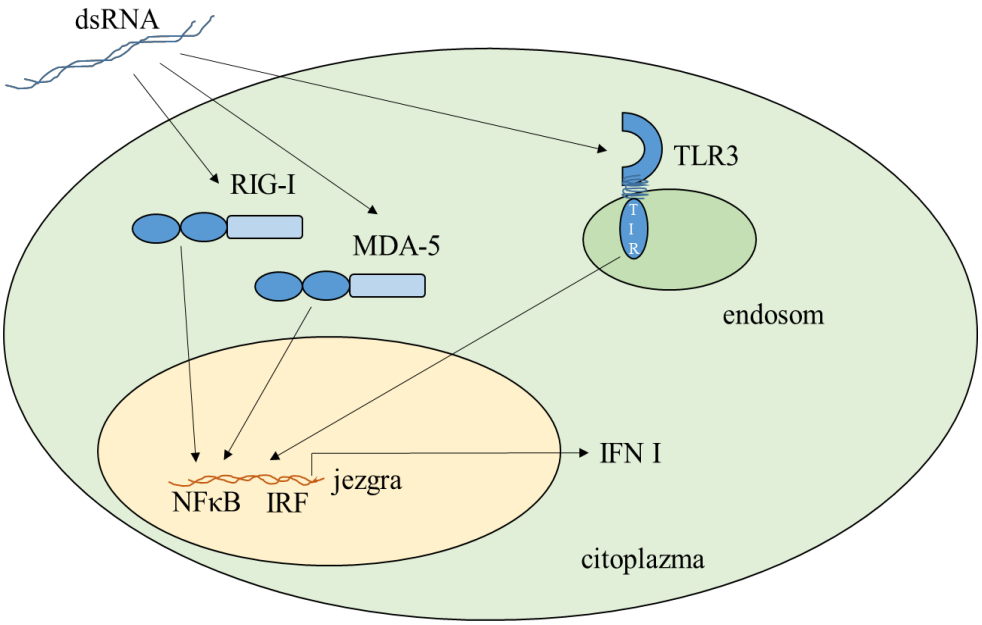
Naime, nekrozom stanica tumora, u izvanstanični prostor oslobađaju se ligandi DAMP, od kojih je najzastupljeniji HMGB1 (od engl. *high mobility group box protein 1*). Pokazano je da se HMGB1 veže za DNA ili RNA u citoplazmi i aktivira TLR3, TLR7 i TLR9 (Yanai i sur., 2012.). Isto je tako moguće da je potrebna veća koncentracija RNAze i/ili produljena inkubacija za potpunu razgradnju RNA.

Zahvaljujući sposobnosti da pokrene imunološki odgovor i potakne programiranu staničnu smrt, poly(I:C) i njegove modifikacije u novije su vrijeme u centru brojnih istraživanja vezanih za imunoterapiju tumora. Novije mogućnosti liječenja uključivale bi kombinaciju poly(I:C) s drugim komponentama, kao što su citostatici, aktivatori apoptoze, drugi ligandi TLR i peptidi koji aktiviraju imunosni sustav (Glavan i Pavelić, 2014.). U ovom smo radu željeli istražiti učinkovitost primjene poly(I:C) u liječenju tumora glave i vrata, samostalno i u kombinaciji s cisplatinom i zračenjem.

Kako bismo istražili utječe li aktivacija TLR3 na rast i apoptozu stanica tumora glave i vrata, tretirali smo stanice primarnog karcinoma ždrijela te radiorezistentne stanice primarnog karcinoma grkljana s poly(I:C), samostalno i u kombinacijama s cisplatinom i zračenjem. Zanimalo nas je može li poly(I:C) u kombinaciji s cisplatinom povećati radiosenzitivnost stanica tumora glave i vrata. Pri tome je zanimljiv podatak da se upravo aktivacija TLR3 neizravno dovodi u vezu s pojavom otpornosti na kemoterapiju i zračenje u tumorima glave i vrata, i to putem aktivacije Rac1. Naime, visoka ekspresija Rac1 je pronađena u kemoradiorezistentnim stanicama tumora glave i vrata, dok je u stanicama zdravog tkiva ekspresija Rac1 bila niska (Skvortsov i sur., 2014.). Autori sugeriraju inhibiciju Rac1 kao terapijsku strategiju. S obzirom da smo pokazali da stimulacija TLR3 aktivira Rac1 (Matijević Glavan i Mikulandra, 2017.), a TLR3 je visoko eksprimiran u tumorima glave i vrata (ali ne i u okolnim tkivima), moguće je da je povišena ekspresija i aktivnost Rac1 posredno uzrokovana aktivacijom TLR3.

Tretman s poly(I:C) u kombinaciji s cisplatinom je značajno inhibirao rast kontrolne skupine stanica FaDu. U skupini stanica u kojima je TLR3 bio inhibiran putem shRNA, rast stanica je bio veći. Također, nakon tretmana s poly(I:C) postotak rasta stanica FaDu bio je veći od 50% u odnosu na kontrolu, odnosno stanice FaDu su se pokazale manje osjetljivima na istu koncentraciju poly(I:C) od stanica SQ20B. Dodatak zračenja poly(I:C)-u, čak i u dozi od 7.5

Gy, nije znatno doprinio inhibiciji rasta stanica FaDu. Kombinacija cisplatine i zračenja blago je inhibirala rast stanica kontrolne skupine, dok je u skupini stanica u kojima je TLR3 bio inhibiran putem shRNA postotak rasta stanica bio veći. Dokidanjem ekspresije TLR3 se statistički značajno ne poveća postotak rasta stanica nakon tretmana s poly(I:C) što ukazuje na to da su u ovaj efekt uključeni i neki drugi receptori. Poznato je da poly(I:C) nije specifičan ligand TLR3, već može aktivirati i receptore MDA-5 (od engl. *melanoma differentiation associated gene-5*) i RIG-I (od engl. *retinoic acid-inducible gene-I*) (Perrot i sur., 2010.). MDA-5 i RIG-I pripadaju obitelji RLR (od.engl. *RIG-I-like receptors family*) i smješteni su u citoplazmi. Za njih je karakteristično da posjeduju domenu CARD (od engl. *caspase activation and recruitment domain*) putem koje, nakon aktivacije, novače adaptor Cardif koji pak novači TRAF i RIP, aktivirajući na taj način IRF i NF-κB (Meylan i Tschopp, 2006.), slično kao i što to čini aktivacija TLR3 (Slika 18.).



Slika 18. Aktivacija receptora RIG-I, MDA-5 i TLR3 dvolančanom RNA. Prerađeno prema Levitzki. (Levitzki, 2012.).

Činjenica da dvolančana RNA može istovremeno aktivirati više receptora te sličnih signalnih puteva, može se objasniti evolucijskom prilagodbom organizma na brži i učinkovitiji odgovor na virusne infekcije. Receptori MDA-5 i RIG-I izravno prepoznaju dvolančanu RNA koja se sintetizira tijekom replikacije virusa u citoplazmi stanice. Nekrozom zaraženih stanica,

dvolančana RNA se oslobađa i odlazi u izvanstanični prostor gdje biva fagocitirana od strane makrofaga u čijim endosomima aktivira TLR3.

Naši rezultati upućuju na to da je inhibitorni učinak kombinacije poly(I:C) i zračenja na rast stanica FaDu sličan učinku kombinacije cisplatine i zračenja. Također smo pokazali da kombinacija poly(I:C), cisplatine i zračenja djeluje sinergistički, inhibirajući rast stanica primarnog karcinoma ždrijela za više od 50% u odnosu na tretman koji je još uvijek standard u liječenju tumora glave i vrata, a to je kombinacija cisplatine i zračenja.

Tretman s poly(I:C) pokazao je znatni inhibitorni učinak na rast stanica SQ20B s eksprimiranim TLR3. Tretman cisplatinom imao je znatno slabiji učinak jer smo koristili vrlo nisku koncentraciju kako bismo istražili adjuvantni učinak. Kombinacija poly (I:C) i cisplatine dodatno je inhibirala rast stanica SQ20B.

Od ranije je poznato da su stanice SQ20B radiorezistentne (Maalouf i sur., 2009.). U ovom smo radu pokušali utvrditi može li ih kombinacija poly(I:C) i cisplatine učiniti osjetljivijima na zračenje.

Naši rezultati su pokazali da kombinacija poly(I:C) u kombinaciji sa zračenjem i cisplatinom djeluje sinergistički, pojačavajući citotoksični učinak zračenja i cisplatine. Navedeni rezultati potvrdili su našu pretpostavku da poly(I:C), samostalno i u kombinaciji s cisplatinom, može radiorezistentne stanice tumora učiniti radiosenzitivnima.

Naša su opažanja dodatno potvrdila rezultate drugih autora da poly(I:C) sinergistički s kemoterapeutikom inducira smrt stanica tumora. Pokazano je sinergističko djelovanje poly(I:C) u kombinaciji s nekoliko standardnih citostatika (hidroksiureja, 5-fluorouracil, metotreksat i cisplatina) na stanicama raka ždrijela. Pri tome je kombinacija poly(I:C) i citostatika pokazala značajno veću citotoksičnost u odnosu na sam poly(I:C), odnosno citostatik (Matijević, i sur., 2011.). Taura i suradnici opisali su povećanu ekspresiju TLR3 u stanicama raka debelog crijeva s funkcionalnim p53 nakon tretmana s 5-fluorouracilom te pojačanu apoptozu stanica tumora nakon tretmana kombinacijom poly(I:C) i 5-fluorouracila, pri čemu su zamijetili pojačanu aktivnost kaspaze -3 (Taura i sur., 2010.).

Ding i suradnici tretirali su kulturu stanica karcinoma usne šupljine s poly(I:C) i zapazili da je navedeni tretman putem aktivacije TLR3 i kaspaze -3 povećao količinu cisplatine u stanici, i samim time njezinu citotoksičnost (Ding i sur., 2017.). Sličan sinergistički učinak dlRNA s citostaticima karboplatinom i paklitakselom je pokazan i na primjeru karcinoma jajnika (Van i

sur., 2012.). U oba slučaja autori su pokazali da je mehanizam sinergije barem djelomično zasnovan na poticanju apoptoze putem aktivacije TLR3 i kaspaza -3, -8 i -9.

U svrhu određivanja je li inhibicija rasta stanica nakon tretmana s poly(I:C) posredovana pojačanom apoptozom, proveli smo test apoptoze na stanicama SQ20B. S obzirom na to da su stanice FaDu na tretman kombinacijom poly(I:C) i cisplatine nakon kojih je slijedilo zračenje pokazale ipak značajno slabiji odgovor od stanica SQ20B, izostavili smo ih iz idućih pokusa. Rezultati pokusa na stanicama SQ20B pokazali su da tretman s poly(I:C) značajno povećava aktivnost kaspaza -3 i -7, a taj je učinak blago povećan dodatkom cisplatine. Porast aktivnosti kaspaza -3 i -7 zabilježen je i u skupini stanica s utišanim TLR3, premda u manjoj mjeri.

U našem istraživanju provjerili smo koja je razina ekspresije nekih pro- i antiapoptotskih gena. Gen *Bad* (engl. *Bcl-2 associated agonist of cell death*) kodira protein Bad, koji je, kao i proteini Bax i Bcl-XL, pripadnik obitelji proteina Bcl-2, poznatih po svojoj ulozi u regulaciji programirane stanične smrti. Bad djeluje proapoptotski, stvarajući heterodimere s Bcl-XL i Bcl-2 i inhibirajući njihovo antiapoptotsko djelovanje, a njegova je aktivnost regulirana putem fosforilacije. U ovom smo radu pokazali da tretman s poly(I:C) sa ili bez dodatka cisplatine ne utječe značajno na ekspresiju gena *Bad*. Međutim, kombinacija predtretmana s poly(I:C) i cisplatinom, nakon čega je provedeno zračenje uzrokovala je udvostručenje njegove ekspresije. Interesantno je opažanje kako kombinacija ova tri tretmana u stanicama u kojima je signalni put TLR3 utišan povećava ekspresiju gena *Bad* čak 5 puta. Slična opažanja zabilježili smo i u slučaju gena *Bax* i *Bcl-XL*. Ekspresija gena *Bax* (engl. *Bcl-2 associated X, apoptosis regulator*) regulira tumor supresorski gen/protein p53. Protein Bax potiče apoptozu tako da formira poru u vanjskoj membrani mitohondrija koja omogućuje citokromu c da iziđe iz mitohondrija i započne kaskadu programirane stanične smrti. Protein Bcl-XL (od engl. *Bcl2 like 1*) sprječava pokretanje kaskade programirane stanične smrti inhibirajući otpuštanje citokroma c iz mitohondrija (Jürgensmeier i sur., 1998.).

Zanimljivo je da je ekspresija gena *Bax* i *Bcl-XL*, kao i gena *Bad* u stanicama s utišanim TLR3 višestruko uvećana nakon tretmana kombinacijom poly(I:C), cisplatine i zračenja, dok u ostalim skupinama stanica nije došlo do statistički značajne promjene ekspresije ovih gena. S obzirom na navedeno, može se zaključiti da je navedeni porast ekspresije gena *Bad, Bax* i *Bcl-XL* najvjerojatnije posljedica zračenja, odnosno kombinacije zračenja i cisplatine. Također se čini da aktivacija signalnog puta TLR3 ne doprinosi značajno povećanju ekspresije gena *Bad, Bax* i *Bcl-XL*. Dapače, u skupini stanica s utišanim signalnim putem aktivacija signalnog puta

TLR3 čak i smanjuje ekspresiju gena *Bax*, što upućuje na mogućnost da je djelovanje poly(I:C) na ekspresiju gena *Bax* vjerojatno posredovano drugim receptorima.

Gen *Survivin* (poznat i kao *BIRC5*, od engl. *baculoviral IAP repeat containing 5*) pripadnik je obitelji gena inhibitora apoptoze (IAP). Poznato je da *Survivin* inhibira programiranu staničnu smrt prvenstveno putem inhibicije kaspaza -3 i -7 (Deveraux i sur., 1997.). Ekspresija *Survivina* je visoka tijekom embrionalnog razvoja, no niska u normalnim tkivima odraslih (Garg i sur., 2016.). Povećana ekspresija *Survivina* pronađena je različitim vrstama malignih tumora, što snažno upućuje na njegovu ulogu u karcinogenezi (Ambrosini i sur., 1997.; Satoh i sur., 2001.).

Nedavno je pokazano da aktivacija TLR3 potiče programiranu staničnu smrt u stanicama karcinoma vrata maternice aktivacijom kaspaza -3 i -9, povećanim stvaranjem ROS i, konačno, regulacijom ekspresije određenih proapoptotskih, odnosno antiapoptotskih gena. Naime, nakon transfekcije poly(I:C) u stanice tumora grlića maternice, zabilježen je porast proapoptotskih proteina Bax i Bid, dok je snižena razina antiapoptotskih proteina Bcl-2 i Survivina (Chen i sur., 2016.). Nomi, Kodama i Suzuki su pokazali kako poly(I:C) može potaknuti programiranu staničnu smrt u stanicama tumora glave i vrata koje eksprimiraju TLR3 te da u tijeku programirane stanične smrti ekspresija Survivina snižena (Nomi i sur., 2010.). Premda u ovom radu nismo dokazali statističku značajnost promjene ekspresije *Survivina* nakon tretmana s poly(I:C), dobiveni rezultati pokazuju jasan trend povećanja ekspresije *Survivina* u liniji stanica SQ20B nakon tretmana s poly(I:C), kao i to da dodatak cisplatine taj učinak smanjuje. Pri tome je bitno naglasiti da smo slično opažanje nedavno zabilježili i na primjeru stanica Detroit 562, u kojim je ekspresija *Survivina* i *cIAP2*, kao i njihovih proteinskih produkata statistički značajno porasla nakon tretmana s poly(I:C), a taj učinak je bio potisnut dodatkom cisplatine. (Mikulandra i sur., 2018.).

Tumor supresorski gen/protein p53 je poznat po svojim ulogama u kontroli staničnog ciklusa, apoptozi, popravku DNA, autofagiji, proliferaciji matičnih stanica, starenju i inhibiciji angiogeneze. Njegove su mutacije dovedene u vezu sa smanjenjem apoptoze i pojačanim rastom brojnih tumora (Bhattacharyya i sur., 2017.). Poznato je da divlji (ali ne i mutirani) tip p53 može smanjiti ekspresiju *Survivina* te da je gubitak funkcije Survivina djelomični posrednik u apoptozi koju potiče p53 (Chen i sur., 2016.). Iako su sve linije stanica koje smo koristili u ovom istraživanju nosioci mutacije *TP53*, stanice Detroit 562 i FaDu nositeljice su egzonskih mutacija c.524G>A (p.R175H), odnosno c.743G>T (p.R248L) koje rezultiraju

nefunkcionalnim proteinom p53 (Nichols i sur., 2012.). Stanice SQ20B nositeljice su intronske mutacije c.376-1G>A, koja rezultira proizvodnjom nefunkcionalnog proteina p53 (Maalouf i sur., 2009.). S obzirom na to da p53 regulira ekspresiju brojnih gena uključenih u proces apoptoze, kao što su *Bax* i *Puma* (od engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*, također poznatog i kao *BBC3*, od engl. *Bcl2 binding component 3*), funkcionalnost njegovog proteinskog produkta izravno utječe na ekspresiju ovih gena.

Puma kodira protein koji inhibira antiapoptotske proteine kao što su Bcl-2 i Bcl-XL. Protein Puma potiče programiranu staničnu smrt putem interakcije s Bcl-XL, sprječavajući njegovu interakciju s Bax. Yu i suradnici su pokazali da je *Puma* glavni posrednik u apoptozi stanica tumora debelog crijeva potaknutoj aktivacijom p53. Autori su također ukazali i na ključnu ulogu gena *Puma* u apoptozi potaknutoj kemoterapeutikom doksorubicinom, odnosno hipoksijom (Yu i sur., 2003.). Dokazana je i povezanost između gubitka alela *Puma* i radiorezistencije (Vávrová i Rezáčová, 2014.).

Rezultati naših pokusa pokazali su da poly(I:C), bilo primijenjen samostalno ili u kombinaciji s cisplatinom, ali i samo zračenje smanjuju ekspresiju gena *Puma* u stanicama SQ20B. U našem nedavno objavljenom istraživanju pokazali smo da radiorezistentne stanice SQ20B i radiosenzitivne stanice Detroit 562 i Cal27 imaju različite obrasce ekspresije gena *Puma* i *Diablo* što je možda povezano s vezom između radiorezistencije i gubitka alela *Puma* (Mikulandra i sur., 2018.).

Diablo (od engl. *diablo IAP-binding mitochondrial protein,* također poznat i kao *Smac,* od engl. *second mitochondria-derived activator of caspase*) kodira protein koji djeluje tako da veže protein inhibitor apoptoze (IAP) i tako sprječava inhibiciju apoptoze. Riječ je o mitohondrijskom proteinu koji u toku apoptoze ulazi u citoplazmu, i vežući se za protein IAP omogućuje aktivaciju kaspaza i odlazak stanice u apoptozu (Adrain i sur., 2001.).

Mimetici Smac su spojevi koji oponašaju Smac, odnosno Diablo, i suprimiraju proteine inhibitore apoptoze te na taj način mogu pojačati apoptozu posredovanu s TLR3 (Bianchi i sur., 2017.). Friboulet i suradnici pokazali su da poly(I:C), iako samostalno povećava razinu c-IAP2, u kombinaciji s mimetikom Smac RMT 5265 djeluje sinergistički, potičući apoptozu (Friboulet i sur., 2010.). Ti su rezultati sukladni rezultatima našeg ranijeg istraživanja, u kojem smo pokazali da tretman stanica Detroit 562 s poly(I:C) povećava razinu proteina c-IAP2, dok smanjuje ekspresiju gena *Diablo*. Također smo primijetili da tretman kombinacijom poly(I:C) i cisplatine poništava taj učinak, što ukazuje na sličnost djelovanja ove kombinacije i

kombinacije poly(I:C) i mimetika Smac (Mikulandra i sur., 2018.).

U ovom istraživanju, statistički značajno povećanje ekspresije gena *Diablo* uočili smo samo nakon predtretmana stanica SQ20B s poly(I:C) nakon čega je uslijedilo zračenje. Zanimljivo je da smo čak četverostruki porast ekspresije zabilježili u skupini stanica s utišanim TLR3 koje su tretirane kombinacijom poly(I:C), cisplatine i zračenja. S obzirom da je povećana ekspresija gena *Diablo* zabilježena i nakon zračenja kao samostalnog tretmana u stanicama s utišanim TLR3, navedeni porast ekspresije vjerojatno je posljedica zračenja.

Premda smo pokazali da poly(I:C) samostalno potiče programiranu staničnu smrt, kao i povećano stvaranje molekula ROS, pri čemu dodatak cisplatine tek blago doprinosi učinku, pravu značajnost kombiniranog tretmana dokazali smo analizom staničnog ciklusa.

Guinn i Petro su nedavno pokazali sinergistički učinak kombinacije poly(I:C) i IFN-γ na stanicama karcinoma usne šupljine, gdje je kombinirani tretman inducirao zastoj rasta tumorskih stanica zaustavljanjem staničnog ciklusa u fazi G1, potičući aktivnost kaspaze -3 te smanjujući ekspresiju PD-L1 na stanicama tumora (Guinn i Petro, 2018.). Slično zapažanje zabilježili su i na stanicama melanoma miševa (Guinn, i sur., 2017.). Naši su rezultati pokazali da tretman s poly(I:C) nije značajnije utjecao na postotak stanica u fazi G0/G1 staničnog ciklusa. Međutim, tretman kombinacijom poly(I:C) i cisplatine značajno je povećao postotak stanica primarnog tumora grkljana u fazi G2/M staničnog ciklusa, dok je tek 15% stanica bilo u fazi S. Poznato je da su stanice najosjetljivije na zračenje u fazi G2/M staničnog ciklusa, a najotpornije u fazi S (Pawlik i Keyomarsi, 2004.). Navedeni podaci snažno sugeriraju da kombinacija poly(I:C) i cisplatine može radiorezistentne stanice tumora učiniti radiosenzitivnima zaustavljajući ih u fazi staničnog ciklusa koja je najosjetljivija na zračenje.

Budući da je poly(I:C) *in vivo* vrlo toksičan, odnosno može uzrokovati šok, zatajenje bubrega, hipersenzitivnost i koagulopatije (Robinson i sur., 1976.), u kliničkim se studijama koriste znatno manje toksične modifikacije poly(I:C), kao što su poly(I:C12U) (rintatolimod, Ampligen®) i poly-ICLC (Hiltonol®). Premda većina kliničkih studija koristi agoniste TLR3 većinom kao adjuvanse u antitumorskim cjepivima, u tijeku je i nekoliko kliničkih studija koje ispituju potencijalnu primjenu agonista TLR3 kao aktivne djelatne tvari, samostalno i u kombinaciji s drugim oblicima liječenja tumora (Tablica 4.). Dvije studije faze I i I/II (NCT02061449, NCT01976585) trenutno istražuju učinak poly-ICLC-a u kombinaciji sa zračenjem u bolesnika s limfomima (Mikulandra i sur., 2017.).

Za sada su objavljeni rezultati tek dvije multiinstitucionalne studije faze II, koje su

ispitivale učinke poly-ICLC u liječenju tumora mozga. Premda su rezultati jedne studije pokazali da poly-ICLC u samostalnoj primjeni ne utječe na produljenje šestomjesečnog preživljenja bez znakova progresije bolesti u bolesnika s recidivnim ili progresivnim anaplastičnim gliomima (Butowski i sur., 2009.), rezultati druge studije koja je ispitivala učinak poly-ICLC primijenjenog kao dodatak standardnom liječenju bolesnika s multiformnim glioblastomom (zračenje + temozolomid) pokazali su da je dodatak poly-ICLC povećao učinkovitost standardnog liječenja u bolesnika s novodijagnosticiranim glioblastomom (Rosenfeld i sur., 2010.).

Tablica 4. Novije studije koje ispituju mogućnosti kliničke primjene agonista TLR3 u liječenju tumora (Clinicaltrials.gov, 2018.). Završene studije su označene zvjezdicom (*).

Šifra studije	Vrsta tumora	Ispitivane terapijske kombinacije	Faza
NCT03262103	lokalizirani rak prostate	poly-ICLC	I
NCT02834052	metastatski rak debelog crijeva	poly-ICLC, pembrolizumab	I/II
NCT03162562	rak jajnika stadija III/IV; recidivni rak jajnika	poly-ICLC, oregovomab (monoklonsko protutijelo na CA-125)	I
NCT01188096	gliomi niskog gradusa	poly-ICLC	II
NCT00058123*	recidivni i progresivni anaplastični gliomi	poly-ICLC	II
NCT00262730*	multiformni glioblastom	poly-ICLC, temozolomid, zračenje	II
NCT02834052	metastatski rak debelog crijeva	poly-ICLC, pembrolizumab	I/II
NCT02423863	solidni tumori (melanom, ostali kožni tumori, tumori glave i vrata, sarkomi)	poly-ICLC	II
NCT01976585	limfom B stanica niskog gradusa	poly-ICLC, rhuFlt3L/CDX-301, zračenje	I/II
NCT02061449	kožni T-stanični limfom	poly-ICLC, romidepsin, fokalno zračenje lezije	I
NCT03721679	solidni tumori	poly-ICLC, anti-PD-1 (nivolumab ili pembrolizumab) ili anti-PD-L1 (atezolizumab ili durvalumab)	I/II
NCT03599453	trostruko negativni rak dojke	rintatolimod, celekoksib, rekombinantni interferon alfa-2b	II
NCT03403634	rak debelog crijeva s metastazama u jetri	rintatolimod, celekoksib, rekombinantni interferon alfa-2b	I
NCT03262103	lokalizirani rak prostate	poly-ICLC	I
NCT02834052	metastatski rak debelog crijeva	poly-ICLC, pembrolizumab	I/II

Iz Tablice 4. je vidljivo da brojne studije ispituju djelovanje kombinacije agonista TLR3 s protutijelima na PD-1/PD-L1 (od engl. *programmed death-1/programmed death-ligand 1*). PD-L1 je obično ispoljen na površini stanica koje predočuju antigene, i stupajući u interakciju s PD-1, smještenim na površini citotoksičnih limfocita T, inhibira njihovu prekomjernu aktivaciju. Ispoljavajući PD-L1 na svojoj površini, stanice tumora zloupotrebljavaju ovaj mehanizam i inhibiraju aktivnost citotoksičnih limfocita T (Voutsadakis, 2018.). Zamisao kombiniranja agonista TLR3 s protutijelima na PD-1/PD-L1 zasnovana je na premisi da će aktivacija TLR3 pojačano aktivirati dendritičke stanice i povećati prezentaciju antigena citotoksičnim limfocitima T, dok će protutijela na PD-1/PD-L1 spriječiti njihovu inhibiciju. Nagato i Celis su pokazali da poly(I:C) u kombinaciji s anti-PD-1 protutijelima značajno inhibira razvoj tumora na više modela miševa (Nagato i Celis, 2014.). Osim toga, nedavno je pokazano kako ARNAX, ligand specifičan za TLR3 koji za razliku od poly(I:C) ne dovodi do sistemskog oslobađanja citokina i interferona, u kombinaciji s protutijelom na PD-L1 i antigenom tumora pojačano aktivira citotoksične limfocite T u miševa te dovodi do regresije tumora bez upale (Takeda i sur., 2017.).

Zanimljivo je da zračenje povećava ekspresiju PD-L1 (Chen i sur., 2015.). S obzirom na to, smatra se da bi kombinacija protutijela na PD-1/PD-L1 i zračenja mogla biti valjana terapijska strategija u liječenju brojnih tumora, između ostalog i tumora glave i vrata (Nagasaka i sur., 2016.; Solomon i sur., 2018.). Ako tome pridodamo dokaze o terapijskoj učinkovitosti kombinacije agonista TLR3 i protutijela na PD-1/PD-L1, moguće je da bi kombinacija svo troje imala još bolji antitumorski učinak.

Kombinacija cetuksimaba i agonista TLR3 također bi mogla biti jedna od potencijalnih terapijskih opcija. Yamashita i suradnici su pokazali da je za signalizaciju TLR3 neophodan upravo tirozin-kinazni receptor EGFR. On se, zajedno s tirozin kinazom Src, veže na aktivirani TLR3 i fosforilira dva tirozinska ostatka, Tyr759 i Tyr858, što je neophodno za novačenje adaptora TRIF (Sarkar i sur., 2003.; Yamashita i sur., 2012.). S obzirom na to, logično bi bilo pretpostaviti da kombinacija cetuksimaba, anti-EGFR protutijela, i agonista TLR3 ne bi imala smisla, jer bi se blokadom EGFR onemogućilo novačenje adaptora TRIF u signalizaciji TLR3. Međutim, postoje dokazi da kombinacija cetuksimaba s agonistima TLR3 poboljšava njegov učinak. Naime, pokazano je da je poly-ICLC učinkovit kao adjuvans u pojačavanju citotoksičnosti posredovane cetuksimabom (Ming Lim i sur., 2013.). Uz to, u istom je istraživanju zabilježen i blagi proapoptotski učinak poly-ICLC u kombinaciji s cetuksimabom na stanicama tumora glave i vrata. Sličan učinak nedavno je objavljen i na primjeru

nazofaringealnog karcinoma pozitivnog na EBV(Tan i sur., 2018.). Učinkovitost kombinacije poly(I:C) i cetuksimaba može se objasniti sinergističkim djelovanjem oba agensa na poticanje sazrijevanja dendritičkih stanica. Naime, dokazano je da cetuksimab može aktivirati NK stanice, odnosno pokrenuti mehanizam citotoksičnosti ovisne o protutijelima (Kurai i sur., 2007.). Cetuksimab je protutijelo IgG1, i kao takvo posjeduje regiju Fc koja se veže na receptor FcγRIIIa (od engl. *fragment crystallizable receptor-gamma IIIa)*, koji je izražen na površini NK stanica i makrofaga. Za razliku od EGFR kojeg blokira, cetuksimab aktivira FcγRIIIa te sudjeluje u pokretanju imunološkog odgovora. Aktivacija NK stanica potiče sazrijevanje dendritičkih stanica te prezentaciju antigena citotoksičnim limfocitima T (Srivastava i sur., 2013.).

Jedna od zamisli za terapijsku primjenu poly(I:C) u tumorima koje karakterizira visoka ekspresija EGFR (kao što su tumori glave i vrata) jest fuzija poly(I:C) s vektorom koji se ponaša kao ligand EGFR, što bi omogućilo internalizaciju poly(I:C) direktno u stanice tumora, gdje bi, osim poticanja programirane stanične smrti, također potaknuo i oslobađanje citokina koji bi privukli stanice imunološkog sustava u mikrookoliš tumora (Levitzki, 2012.).

Naši rezultati sugeriraju potencijalnu dobrobit uporabe poly(I:C) u kombinaciji s cisplatinom u liječenju tumora glave i vrata. S jedne strane, kombinacija poly(I:C) i cisplatine čini stanice tumora glave i vrata osjetljivijima na zračenje zaustavljajući ih u G2/M fazi staničnog ciklusa. Djelujući u sinergiji s cisplatinom i zračenjem, poly(I:C) direktno inducira smrt stanica tumora, jednim dijelom putem povećanja aktivosti kaspaza -3 i -7. Osim toga, kombinacija poly(I:C) i cisplatine smanjuje ekspresiju gena inhibitora apoptoze, kao što je *Survivin*.

Međutim, pri razmatranju potencijalne uporabe poly(I:C), odnosno njegovih manje toksičnih modifikacija u kliničkoj primjeni potrebno je imati na umu da aktivacija TLR3 može izazvati i preživljenje, progresiju i metastaziranje tumora, između ostalog putem pojačanog lučenja proupalnih citokina, poticanjem EMT, poticanja migracije stanica tumora, metaboličkim reprogramiranjem (Warburgov efekt) itd. Moguće je da su upravo endogeni ligandi TLR3 koji se oslobađaju nekrozom stanica tumora odgovorni za većinu navedenih protumorskih učinaka.

S obzirom da je ovo pretkliničko istraživanje zasnovano na pokusima na kulturama stanica, potrebne su dodatne *in vitro* i *in vivo* (na životinjama) studije koje bi potvrdile naše rezultate, te uključile i neke druge potencijalno korisne učinke poly(I:C), kao što je doprinos

imunoloških učinaka poly(I:C) u sistemskom antitumorskom odgovoru.

6. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog doktorskog rada istraživana je uloga TLR3 u tumorima glave i vrata, kao i učinci njegovog agonista poly(I:C) u kombinaciji sa standardnim metodama liječenja, odnosno cisplatinom i zračenjem. Između ostalog, zanimalo nas je, može li poly(I:C), u kombinaciji s cisplatinom učiniti radiorezistentne stanice tumora glave i vrata osjetljivijima na zračenje.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. TLR3 se ponaša kao endogeni senzor nekroze, prepoznajući RNA koja se oslobađa nekrozom stanica nakon izazivanja staničnog stresa.
2. Dvolančana RNA oslobođena nekrozom stanica tumora vjerojatno nije jedini ligand TLR3.
3. Poly(I:C) u kombinaciji s cisplatinom sinergistički inhibira rast stanica FaDu i SQ20B, pri čemu su stanice SQ20B osjetljivije na tretman poly(I:C) u koncentraciji od 10 μg/mL, a navedeni učinak ovisan je o aktivaciji TLR3.
4. Poly(I:C) samostalno i u kombinaciji s cisplatinom potiče apoptozu povećavajući aktivnost kaspaza -3 i -7 te količinu ROS u stanicama tumora. Opisani učinak djelomično je ovisan o TLR3.
5. Primjena kombinacije poly(I:C) i cisplatine smanjuje ekspresiju gena koji inhibiraju apoptozu, kao što je *Survivin.*
6. Kombinacija poly(I:C) i cisplatine povećava radiosenzitivnost tumora glave i vrata zaustavljajući stanice tumora u fazi G2/M staničnog ciklusa.

U ovom smo radu pokazali da poly(I:C) u kombinaciji s cisplatinom može biti vrijedna strategija u liječenju tumora glave i vrata. Naime, osim što u sinergiji s cisplatinom i zračenjem inhibira rast stanica i inducira staničnu smrt, poly(I:C) također inhibira ekspresiju gena inhibitora apoptoze, kao što je *Survivin*. S obzirom na to da je ovo pretklinička studija bazirana na pokusima na kulturama stanica, potrebne su dodatne *in vitro* i *in vivo* (na životinjama) studije koje bi potvrdile naše rezultate. Međutim, potreban je i oprez u primjeni aktivacije signalnog puta TLR3 u liječenju tumora budući da se njegovom aktivacijom može izazvati i preživljenje tumora, moguće i putem endogenih liganada.

7. LITERATURA

Adrain C, Creagh EM, Martin SJ (2001) Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. EMBO J. 20: 6627–6636.

Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. 4: 499–511.

Akira S, Yamamoto M, Takeda K (2003) Role of adapters in Toll-like receptor signalling. Biochem. Soc. Trans. 31: 637–642.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat. Med. 3: 917–921.

Ang KK, Berkey B, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L (2002) Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. Cancer Res. 62: 7350–7356.

Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. Nat. Med. 13: 1050–1059.

Aponte PM, Caicedo A (2017) Stemness in cancer: Stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. Stem Cells Int. 2017: 1-17.

Assmann TS, Brondani L de A, Bouças AP, Canani LH, Crispim D (2015) Toll-like receptor 3 (TLR3) and the development of type 1 diabetes mellitus. Arch. Endocrinol. Metab. 59: 4–12.

Ayari C, Besançon M, Bergeron A, LaRue H, Bussières V, Fradet Y (2016) Poly(I:C) potentiates Bacillus Calmette–Guérin immunotherapy for bladder cancer. Cancer Immunol. Immunother. 65: 223–234.

Bell JK, Botos I, Hall PR, Askins J, Shiloach J, Davies DR, Segal DM (2006) The molecular structure of the TLR3 extracellular domain. J. Endotoxin Res. 12: 375–378.

Bell JK, Mullen GED, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. Trends Immunol. 24: 528–533.

Bhattacharyya S, Sekar V, Majumder B, Mehrotra DG, Banerjee S, Bhowmick AK, Alam N, Mandal G, Biswas J, Majumder P, Murmu N (2017) CDKN2A-p53 mediated antitumor effect of Lupeol in head and neck cancer. Cell. Oncol. 40: 145–155.

Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Neilson E, Moses H (2004) TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. Science 303: 848–851.

Bianchi F, Pretto S, Tagliabue E, Balsari A, Sfondrini L (2017) Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis. Cancer Biol. Ther. 18: 747–756.

Bisen PS, Khan Z, Bundela S (2013) Biology of oral cancer: Key apoptotic regulators. 1st edn. CRC Press, Boca Raton.

Bonneau D, Longy M (2000) Mutations of the human PTEN gene. Hum. Mutat. 16: 109–122.

Botos I, Segal DM, Davies DR (2011) The structural biology of Toll-like receptors. Structure 19: 447–459.

Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH (2002) Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. Head Neck 24: 198–206.

Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J (2009) HIF at a glance. J. Cell. Sci. 122: 1055–1057.

Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch M, Forastiere A, Sidransky D (1995) Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N. Engl. J. Med. 332: 712–717.

Brikos C, O'Neil LAJ (2008) Signalling of Toll-like receptors. Handb. Exp. Pharmacol. 83: 21–50.

Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim YM (2007) The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. J. Cell. Biol. 177: 265–275.

Bugge M, Bergstrom B, Eide OK, Solli H, Kjønstad IF, Stenvik J, Espevik T, Nilsen N (2017) Surface Toll-like receptor 3 expression in metastatic intestinal epithelial cells induces inflammatory cytokine production and promotes invasiveness. J. Biol. Chem. 292: 15408-15425.

Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, Fu Y, Auh S (2011) The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. Cancer Res. 71: 2488–2496.

Butowski N, Lamborn KR, Lee BL, Prados MD, Cloughesy T, DeAngelis LM, Abrey L, Fink K, Lieberman F, Mehta M, Robins IH, Junck L, Salazar A, Chang S (2009) A North American brain tumor consortium phase II study of poly-ICLC for adult patients with recurrent anaplastic gliomas. J. Neurooncol. 91: 183-189.

Cai Z, Sanchez A, Shi Z, Zhang T, Liu M, Zhang D (2011) Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. Cancer Res. 71: 2466–2475.

Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam C, Kunkel S (2008) TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. J. Exp. Med. 205: 2609–2621.

Chatterjee S, Crozet L, Damotte D, Iribarren K, Schramm C, Alifano M, Lupo A, Cherfils-Vicini J, Goc J, Katsahian S, Younes M, Dieu-Nosjean M, Fridman W, Sautès-Fridman C, Cremer I (2014) TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. Cancer Res. 74: 5008–5018.

Chawla-Sarkar M, Leaman DW, Jacobs BS, Borden EC (2002) IFN- pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/apo2 ligand-induced apoptosis. J. Immunol. 169(2): 847-855.

Chen AC, Butler EB, Lo SS, Teh BS (2015) Radiotherapy and the abscopal effect: insight from the past, present, and future. J. Radiat. Oncol. 4: 321–330.

Chen H, Wang DL, Liu YL (2016) Poly (I:C) transfection induces mitochondrial-mediated apoptosis in cervical cancer. Mol. Med. Rep. 13: 2689–2695.

Chen X, Cheng H, Pan T, Liu Y, Su Y, Ren C, Huang D, Zha X., Liang C (2015) mTOR regulate EMT through RhoA and Rac1 pathway in prostate cancer. Mol. Carcinog. 54: 1086–1095.

Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W (2016) Survivin and tumorigenesis: Molecular mechanisms and therapeutic strategies. J. Cancer 7: 314–323.

Chuang HC, Huang CC, Chien CY, Chuang JH (2012) Toll-like receptor 3-mediated tumor invasion in head and neck cancer. Oral. Oncol. 48: 226–232.

Chuang JH, Chuang HC, Huang CC, Wu CL, Du YY, Kung ML, Chen C, Chen S, Tai M (2011) Differential Toll-like receptor 3 (TLR3) expression and apoptotic response to TLR3 agonist in human neuroblastoma cells. J. Biomed. Sci. 18: 65.

Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, Wicha M, Prince M (2010) Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. Head Neck 32: 1195–1201.

Clément JF, Meloche S, Servant MJ (2008) The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. Cell. Res. 18: 889–899.

ClinicalTrials.gov. [online] Dostupno na: https://clinicaltrials.gov/ [Pristupljeno 14. travnja 2018.].

Conti L, Lanzardo S, Arigoni M, Antonazzo R, Radaelli E, Cantarella D, Calogero R, Cavallo F (2013) The noninflammatory role of high mobility group box 1/Toll-like receptor 2 axis in the self-renewal of mammary cancer stem cells. FASEB J. 27: 4731–4744.

D'Souza NM, Fang P, Logan J, Yang J, Jiang W, Li J (2016) Combining radiation therapy with immune checkpoint blockade for central nervous system malignancies. Front. Oncol. 6: 212.

Dancea HC, Shareef MM, Ahmed MM (2009) Role of radiation-induced TGF-beta signaling in cancer therapy. Mol. Cell. Pharmacol. 1: 44-56.

David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL (2010) HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. Nature 463: 364–368.

Dayal R, Singh A, Pandey A, Mishra K (2014) Reactive oxygen species as mediator of tumor radiosensitivity. J. Cancer Res. Ther. 10: 811-818.

Demaria S, Kawashima N, Yang AM, Devitt ML, Babb JS, Allison JP, Formenti SC (2005) Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. Clin. Cancer Res. 11: 728–734.

Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, Formenti SC (2004) Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 58(3): 862–870.

Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. Nature 388: 300–304.

Ding L, Ren J, Zhang D, Li Y, Huang X, Ji J, Hu Q, Wang H, Ni Y, Hou Y (2017) The TLR3 agonist inhibit drug efflux and sequentially consolidates low-dose cisplatin-based chemoimmunotherapy while reducing side effects. Mol. Cancer Ther. 16: 1068-1079.

Ding Z, Gau D, Deasy B, Wells A, Roy P (2009) Both actin and polyproline interactions of profilin-1 are required for migration, invasion and capillary morphogenesis of vascular endothelial cells. Exp. Cell. Res. 315: 2963-2973.

Dovedi SJ, Adlard AL, Lipowska-Bhalla G, McKenna C, Jones S, Cheadle EJ, Stratford IJ, Poon E, Morrow M, Stewart R, Jones H, Wilkinson RW, Honeychurch J, Illidge TM (2014) Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. Cancer Res. 74: 5458–5468.

Dowling JK, Mansell A (2016) Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. Clin. Transl. Immunol. 5(5): e85.

Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, Vollmer E, Dalhoff K, Zabel P, Goldmann T (2005) Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. Respir. Res. 6: 1–10.

Duguay D, Mercier F, Stagg J, Martineau D, Bramson J, Servant M, Lin R, Galipeau J, Hiscott J (2002) In vivo interferon regulatory factor 3 tumor suppressor activity in B16 melanoma tumors. Cancer Res. 62: 5148-5152.

Duvvuri U, Myers JN (2009) In Brief. Curr. Probl. Surg. 46: 114–117.

Echizen K, Hirose O, Maeda Y, Oshima M (2016) Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways. Cancer Sci. 107(4): 391–397.

El-Saghire H, Vandevoorde C, Ost P, Monsieurs P, Michaux A, De Meerleer G, Baatout S, Thierens H (2014) Intensity modulated radiotherapy induces pro-inflammatory and pro-survival responses in prostate cancer patients. Int. J. Oncol. 44: 1073–1083.

Erdogan B, Webb DJ (2017) Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. Biochem. Soc. Trans. 45: 229–236.

Facciabene A, Motz GT, Coukos G (2012) T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. Cancer Res. 72: 2162–2171.

Fang D, Chen H, Zhu JY, Wang W, Teng Y, Ding H, Jing Q, Su S, Huang S (2017) Epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells is sustained by Rac1 through simultaneous activation of MEK1/2 and Src signaling pathways. Oncogene 36: 1546–1558.

Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S, Vandenabeele P (2007) RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. Cell Death Differ. 14: 400–410.

Friboulet L, Gourzones C, Tsao SW, Morel Y, Paturel C, Témam S, Uzan C, Busson P (2010) Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells. BMC Cancer 10: 327.

Friboulet L, Pioche-Durieu C, Rodriguez S, Valent A, Souquère S, Ripoche H, Khabir A, Tsao S, Bosq J, Lo K, Busson P (2008) Recurrent overexpression of c-IAP2 in EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: critical role in resistance to Toll-like receptor 3– mediated apoptosis. Neoplasia 10: 1183–1194.

Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, Macfarlane GT (2005) Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. Immunology 115: 565–574.

Garg H, Suri P, Gupta JC, Talwar GP, Dubey S (2016) Survivin: a unique target for tumor therapy. Cancer Cell Int. 16:1-14.

Gatta G, Botta L, Sánchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L (2015) Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EUROCARE-5 population-based study. Eur. J. Cancer 51: 2130–2143.

Gillison M (2004) Human papillomavirus–associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. Semin. Oncol. 31: 744-754.

Guinn Z, Brown DM, Petro TM (2017) Activation of IRF3 contributes to IFN-γ and ISG54 expression during the immune responses to B16F10 tumor growth. Int. Immunopharmacol. 50: 121-129.

Guinn ZP, Petro TM (2018) IFN-γ synergism with poly I:C reduces growth of murine and human cancer cells with simultaneous changes in cell cycle and immune checkpoint proteins. Cancer Lett. 438: 1-9.

Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee E, Weiss H, O'Connor K, Gao T, Evers B (2011) mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. Cancer Res. 71: 3246–3256.

Han S, Xu W, Wang Z, Qi X, Wang Y, Ni Y, Shen H, Hu Q, Han W (2016) Crosstalk between the HIF-1 and Toll-like receptor/nuclear factor-κB pathways in the oral squamous cell carcinoma microenvironment. Oncotarget 7: 37773-37789.

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. Cell 100: 57–70.

Harashima N, Minami T, Uemura H, Harada M (2014) Transfection of poly(I:C) can induce reactive oxygen species-triggered apoptosis and interferon-β-mediated growth arrest in human renal cell carcinoma cells via innate adjuvant receptors and the 2-5A system. Mol. Cancer 13: 217.

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado M, Maso L, Daudt A, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes R, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lence J, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean M, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan A, Purdue M, Rudnai P, Schwartz S, Smith E, Sturgis E, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn D, Shangina O, Pilarska A, Zhang Z, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P (2009) Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 18: 541–550.

Hassan F, Islam S, Tumurkhuu G, Naiki Y, Koide N, Mori I, Yoshida T, Yokochi T (2006) Intracellular expression of Toll-like receptor 4 in neuroblastoma cells and their unresponsiveness to lipopolysaccharide. BMC Cancer 6: 281.

He Z, Deng R, Huang X, Ni Y, Yang X, Wang Z, Hu Q (2015) Lipopolysaccharide enhances OSCC migration by promoting epithelial-mesenchymal transition. J. Oral Pathol. Med. 44: 685–692.

He Z, Huang X, Ni Y, Shi P, Wang Z, Han W, Hu Q (2014) Functional Toll-like receptor 3 expressed by oral squamous cell carcinoma induced cell apoptosis and decreased migration. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. 118: 92–100.

Heinz S, Haehnel V, Karaghiosoff M, Schwarzfischer L, Müller M, Krause SW, Rehli M (2003) Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. J. Biol. Chem. 278(24). 21502–21509.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 408: 740–745.

Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF (2016) Damage-associated molecular patterns in cancer: A double-edged sword. Oncogene 35: 5931-5941.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske (2018) Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Bilten 40.

Huang SM, Bock JM, Harari PM (1999) Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res. 59: 1935–1940.

Ilvesaro JM, Merrell MA, Swain TM, Davidson J, Zayzafoon M, Harris KW, Selander K (2007) Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. Prostate 67: 774–781.

Ishimura MN, Aito SN, Nishimura M, Naito S (2005) Tissue-specific mRNA expression profiles of human Toll-like receptors and related genes. Biol. Pharm. Bull. 28: 886–892.

Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps G, Pellat-Deceunynck C (2006) Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. Leukaemia 20: 1130–1137.

Jelinek I, Leonard JN, Price GE, Brown KN, Meyer-Manlapat A, Goldsmith PK, Wang Y, Venzon D, Epstein SL, Segal DM (2011) TLR3-specific double-stranded RNA oligonucleotide adjuvants induce dendritic cell cross-presentation, CTL responses, and antiviral protection. J. Immunol. 186: 2422–2429.

Jia D, Yang W, Li L, Liu H, Tan Y, Ooi S, Chi L, Filion LG, Figeys D, Wang L (2015) β-Catenin and NF-κB co-activation triggered by TLR3 stimulation facilitates stem cell-like phenotypes in breast cancer. Cell Death Differ. 22: 298–310.

Jiang Q, Wei H, Tian Z (2008) Poly(I:C) enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. BMC Cancer 8: 12.

Juang SH, Wei SJ, Hung YM, Hsu CY, Yang DM, Liu KJ, Chen WS, Yang WK (2004) IFN-β induces caspase-mediated apoptosis by disrupting mitochondria in human advanced stage colon cancer cell lines. J. Interf. Cytokine Res. 24: 231-243.

Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95: 4997–5002.

Kachikwu EL, Iwamoto KS, Liao YP, Demarco JJ, Agazaryan N, Economou JS, McBride WH, Schaue D (2011) Radiation enhances regulatory T cell representation. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 81: 1128–1135.

Kalbasi A, June CH, Haas N, Vapiwala N (2013) Radiation and immunotherapy: A synergistic combination. J. Clin. Invest. 123: 2756–2763.

Kalyankrishna S, Grandis JR (2006) Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. J. Clin. Oncol. 24: 2666–2672.

Kang SJ, Tak JH, Cho JH, Lee HJ, Jung YJ (2010) Stimulation of the endosomal TLR pathway enhances autophagy-induced cell death in radiotherapy of breast cancer. Genes Genom. 32: 599–606.

Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D (2004) mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. J. Biol. Chem. 279: 12542–12550.

Kauppila JH, Korvala J, Siirilä K, Manni M, Mäkinen LK, Hagström J, Atula T, Haglund C, Selander KS, Saarnio J, Karttunen TJ, Lehenkari PP, Salo T (2015) Toll-like receptor 9 mediates invasion and predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the mobile tongue. J. Oral. Pathol. Med. 44: 571–577.

Kauppila JH, Mattila AE, Karttunen TJ, Salo T (2013) Toll-like receptor 5 (TLR5) expression is a novel predictive marker for recurrence and survival in squamous cell carcinoma of the tongue. Br. J. Cancer 108: 638–643.

Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM (2010) CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. Adv. Cancer Res. 106: 91–111.

Kelly KM, Zhuang H, Nacionales DC, Scumpia PO, Lyons R, Akaogi J, Lee P, Williams B, Yamamoto M, Akira S, Satoh M, Reeves WH (2006a) „Endogenous adjuvant“ activity of the RNA components of lupus auto antigens Sm/RNP and Ro 60. Arthritis Rheum. 54: 1557–1567.

Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, Visintin I, Rutherford T, Mor G (2006b) TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. Cancer Res. 66: 3859–3868.

Khattar E, Kumar P, Liu CY, Can Akincilar S, Raju A, Lakshmanan M, Maury JJ, Qiang, Y, Li S, Tan EY, Hui KM, Shi M, Loh YH, Tergaonkar V (2016) Telomerase reverse transcriptase promotes cancer cell proliferation by augmenting tRNA expression. J. Clin. Invest. 126: 4045–4060.

Kim WY, Lee JW, Choi JJ, Choi CH, Kim TJ, Kim BG, Song SY, Bae DS (2008) Increased expression of Toll-like receptor 5 during progression of cervical neoplasia. Int. J. Gynecol. Cancer 18: 300–305.

Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL (2008) UNC93B1 delivers nucleotide-sensing Toll-like receptors to endolysosomes. Nature 452: 234–238.

Kozaki KI, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H, Omura K, Inazawa J (2006) PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. Cancer Sci. 97: 1351–1358.

Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L (2013) Immunogenic cell death in cancer therapy. Annu. Rev. Immunol. 31: 51–72.

Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P (2012) Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. Nat. Rev. Cancer 12: 860–875.

Kundu JK, Surh YJ (2008) Inflammation: Gearing the journey to cancer. Mutat. Res. 659: 15–30.

Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Yamaguchi K, Yamasaki A, Sako T, Touge H, Makino H, Takata M, Miyata M, Nakamoto M, Burioka N, Shimizu E (2007) Cetuximab against lung cancer cell lines antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. Clin. Cancer Res. 13: 1552-1561.

Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA (2014) Review article chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. J. Immunol. Res. 2014: 14918.

Lee JW, Choi JJ, Seo ES, Kim MJ, Kim WY, Choi CH, Kim TJ, Kim BG, Song SY, Bae DS (2007) Increased Toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. Mol. Carcinog. 46: 941–947.

Lee Y, Auh SL, Wang Y, Burnette B, Wang Y, Meng Y, Beckett M, Sharma R, Chin R, Tu T, Weichselbaum RR, Fu YX (2009) Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8 + T cells: Changing strategies for cancer treatment. Blood 114: 589–595.

Levitzki A (2012) Targeting the immune system to fight cancer using chemical receptor homing vectors carrying Polyinosine/Cytosine (PolyIC). Front. Oncol. 2: 4.

Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK (2003) IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. J. Immunol. 170: 3369–3376.

Li X, Jiang S, Tapping RI (2010) Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. Cytokine 49: 1–9.

Li Z, Duan Y, Cheng S, Chen Y, Hu Y, Zhang L, He J, Liao Q, Yang L, Sun LQ (2015) EBV-encoded RNA via TLR3 induces inflammation in nasopharyngeal carcinoma. Oncotarget 6: 24291–24303.

Lim JYH, Gerber SA, Murphy SP, Lord EM (2014) Type I interferons induced by radiation therapy mediate recruitment and effector function of CD8(+) T cells. Cancer Immunol. Immunother. 63: 259–271.

Maalouf M, Alphonse G, Colliaux A, Beuve M, Trajkovic-Bodennec S, Battiston-Montagne P, Testard I, Chapet O, Bajard M, Taucher-Scholz G, Fournier C, Rodriguez-Lafrasse C (2009) Different mechanisms of cell death in radiosensitive and radioresistant p53 mutated head and neck squamous cell carcinoma cell lines exposed to carbon ions and x-rays. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 74: 200-209.

MacManus MP, Harte RJ, Stranex S (1994) Spontaneous regression of metastatic renal cell carcinoma following palliative irradiation of the primary tumour. Ir. J. Med. Sci. 163: 461–463.

Mäkinen LK, Atula T, Häyry V, Jouhi L, Datta N, Lehtonen S, Ahmed A, Mäkitie AA, Haglund C, Hagström J (2015) Predictive role of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in oral tongue squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 51: 96–102.

Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA (2010) HPV-associated head and neck cancer: A virus-related cancer epidemic. Lancet Oncol. 11: 781–789.

Mastorci K, Muraro E, Pasini E, Furlan C, Sigalotti L, Cinco M, Fratta E (2016) Toll-like receptor 1/2 and 5 ligands enhance the expression of cyclin D1 and D3 and induce proliferation in mantle cell lymphoma. PLoS One. 11: e0153823.

Matijević Glavan T, Čipak Gašparović A, Vérillaud B, Busson P, Pavelić J (2017) Toll-like receptor 3 stimulation triggers metabolic reprogramming in pharyngeal cancer cell line through Myc, MAPK, and HIF. Mol. Carcinog. 56: 1214–1226.

Matijević Glavan T, Mikulandra M (2017) The in vitro effect of poly(I:C) on cell morphology of a metastatic pharyngeal cell line. Biologia 72: 954–960.

Matijević T, Marjanović M, Pavelić J (2009) Functionally active Toll-like receptor 3 on human primary and metastatic cancer cells. Scand. J. Immunol. 70: 18–24.

Matijević T, Pavelić J (2011) The dual role of TLR3 in metastatic cell line. Clin. Exp. Metastasis 28: 701–712.

Matijević T, Pavelić J (2012) Poly(I:C) treatment influences the expression of calreticulin and profilin-1 in a human HNSCC cell line: a proteomic study. Tumour Biol. 33: 1201–1208.

Matijević T, Kirinec G, Pavelić J (2011) Antitumor activity from the combined application of poly(I:C) and chemotherapeutics in human metastatic pharyngeal cell lines. Chemotherapy 57: 460–467.

Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T (2002) Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293: 1364–1369.

McCormick KD, Ghosh A, Trivedi S, Wang L, Coyne CB, Ferris RL, Sarkar SN (2016) Innate immune signaling through differential RIPK1 expression promote tumor progression in head and neck squamous cell carcinoma. Carcinogenesis 37: 522–529.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388: 394–397.

Merrell MA, Ilvesaro JM, Lehtonen N, Sorsa T, Gehrs B, Rosenthal E, Chen D, Shackley B, Harris KW, Selander KS (2006) Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. Mol. Cancer. Res. 4: 437–447.

Meylan E, Tschopp J (2006) Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. Molecular Cell. 22: 561-569.

Mikulandra M, Kobeščak A, Vérillaud B, Busson P, Matijević Glavan T (2018) Radio-sensitization of head and neck cancer cells by a combination of poly(I:C) and cisplatin through downregulation of survivin and c-IAP2. Cell. Oncol. 42: 29-40.

Mikulandra M, Pavelić J, Matijević Glavan T (2017) Recent findings on the application of Toll-like receptors agonists in cancer therapy. Curr. Med. Chem. 24: 2011-2032.

Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K (2012) c-Myc and cancer metabolism. Clin. Cancer Res. 18: 5546–5553.

Ming Lim C, Stephenson R, Salazar AM, Ferris RL (2013) TLR3 agonists improve the immunostimulatory potential of cetuximab against EGFR+ head and neck cancer cells. Oncoimmunology 2: 1–10.

Misiukiewicz K, Dang RP, Parides M, Camille N, Uczkowski H, Sarlis NJ, Posner M (2016) Endothelial growth factor receptor inhibitors in recurrent metastatic cancer of the head and neck. Head Neck 38: E2221–E2228.

Miyake K (2007) Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. Semin. Immunol. 19: 3–10.

Mole RH (1953) Whole body irradiation; radiobiology or medicine? Br. J. Radiol. 26: 234–241.

Molteni M, Marabella D, Orlandi C, Rossetti C (2006) Melanoma cell lines are responsive in vitro to lipopolysaccharide and express TLR-4. Cancer Lett. 235: 75–83.

Moon SY, Zheng Y (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. Trends Cell Biol. 13: 13–22.

Moreira D, Zhang Q, Hossain DS, Nechaev S, Jones J, Pal SK, Kortylewski M (2015) TLR9 signaling through NF-κB / RELA and STAT3 promotes tumor-propagating potential of prostate cancer cells. Oncotarget 6: 17302–17313.

Morikawa T, Sugiyama A, Kume H, Ota S, Kashima T, Tomita K, Kitamura T, Kodama T, Fukayama M, Aburatani H (2007) Identification of Toll-like receptor 3 as a potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma. Clin. Cancer Res. 13: 5703–5709.

Morrison BH, Tang Z, Jacobs BS, Bauer JA, Lindner DJ (2005) Apo2L/TRAIL induction and nuclear translocation of inositol hexakisphosphate kinase 2 during IFN-β-induced apoptosis in ovarian carcinoma. Biochem. J. 385: 595-603.

Murray LA, Knight DA, McAlonan L, Argentieri R, Joshi A, Shaheen F, Cunningham M, Alexopolou L, Flavell RA, Sarisky RT, Hogaboam CM (2008) Deleterious role of TLR3 during hyperoxia-induced acute lung injury. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 178: 1227–1237.

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco, L.P., Allavena, P. i Mantovani, A. (2000). Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. J. Immunol. 164: 5998–6004.

Nagasaka M, Zaki M, Kim H, Raza SN, Yoo G, Lin HS, Sukari A (2016) PD1/PD-L1 inhibition as a potential radiosensitizer in head and neck squamous cell carcinoma: a case report. J. Immunother. Cancer 4: 83.

Nagato T, Celis E (2014) A novel combinatorial cancer immunotherapy: Poly-IC and blockade of the PD-1/PD-L1 pathway. Oncoimmunology 3: e28440.

Ni YH, Ding L, Zhang DY, Hou YY, Huang X, Hu Q (2015) Distinct expression patterns of Toll-like receptor 7 in tumour cells and fibroblast-like cells in oral squamous cell carcinoma. Histopathology 67: 730–739.

Nichols AC, Yoo J, Palma DA, Fung K, Franklin JH, Koropatnick J, Mymryk JS, Batada NN, Barrett JW (2012) Frequent mutations in TP53 and CDKN2A found by next-generation

sequencing of head and neck cancer cell lines. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 138: 732-739.

Niedobitek G (2000) Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. Mol. Pathol. 53: 248–254.

Ning S, Pagano J, Barber G (2011) IRF7: activation, regulation, modification and function. Genes Immun. 12: 399–414.

Nobler MP (1969) The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation. Radiology 93: 410–412.

Nomi N, Kodama S, Suzuki M (2010) Toll-like receptor 3 signaling induces apoptosis in human head and neck cancer via survivin associated pathway. Oncol. Rep. 24: 225–231.

O'Neill LA, Bowie AG (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. 7: 353–364.

Okahira S, Nishikawa F, Nishikawa S, Akazawa T, Seya T, Matsumoto M (2005) Interferon-β induction through Toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. DNA Cell Biol. 24: 614-623.

Okuma K, Yamashita H, Niibe Y, Hayakawa K, Nakagawa K (2011) Abscopal effect of radiation on lung metastases of hepatocellular carcinoma: a case report. J. Med. Case Rep. 5: 111.

Paez J, Sellers WR (2003) PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. Cancer Treat. Res. 115: 145–167.

Paone A, Galli R, Gabellini C, Lukashev D, Starace D, Gorlach A, De Cesaris P, Ziparo E, Del Bufalo D, Sitkovsky MV, Filippini A, Riccioli A (2010) Toll-like receptor 3 regulates angiogenesis and apoptosis in prostate cancer cell lines through hypoxia-inducible factor 1α. Neoplasia 12: 539–549.

Paone, A., Starace, D., Galli, R., Padula, F., De Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E. i Riccioli, A. (2008). Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism. Carcinogenesis 29: 1334–1342.

Papadimitraki ED, Tzardi M, Bertsias G, Sotsiou E, Boumpas DT (2009) Glomerular expression of Toll-like receptor-9 in lupus nephritis but not in normal kidneys: implications for the amplification of the inflammatory response. Lupus 18: 831–835.

Park JH, Jeon DI, Yoon HE, Kwon SM, Kim SA, Ahn SG, Yoon JH (2012) Poly(I:C) inhibits cell proliferation and enhances the growth inhibitory effect of paclitaxel in oral sqaumous cell carcinoma. Acta. Odontol. Scand. 70(3): 241–245.

Pawlik TM, Keyomarsi K (2004) Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 59(4). 928-942.

Perrot I, Deauvieau F, Massacrier C, Hughes N, Garrone P, Durand I, Demaria O, Viaud N, Gauthier L, Blery M, Bonnefoy-Berard N, Morel Y, Tschopp J, Alexopoulou L, Trinchieri G, Paturel C, Caux C (2010) TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. J. Immunol. 185: 2080–2088.

Philip D, Noronha V, Joshi A, Patil V, Ramaswamy A, Chougule A (2016) Molecular biology of head and neck cancers. J. Head Neck Physicians Surg. 4: 16-22.

Pisani LP, Estadella D, Ribeiro DA (2017) The role of toll like receptors (TLRs) in oral carcinogenesis. Anticancer Res. 37: 5389–5394.

Pries R, Hogrefe L, Xie L, Frenzel H, Brocks C, Ditz C, Wollenberg B (2008) Induction of c-Myc-dependent cell proliferation through Toll-like receptor 3 in head and neck cancer. Int. J. Mol. Med. 21: 209–215.

Radisky ES, Radisky DC (2010) Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 15: 201–212.

Rakoff-Nahoum S i Medzhitov R (2009) Toll-like receptors and cancer. Nature 9: 57–63.

Rathore R, McCallum JE, Varghese E, Florea AM, Büsselberg D (2017) Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). Apoptosis 22: 898–919.

Rees GJG, Ross CMD (1983) Abscopal regression following radiotherapy for adenocarcinoma. Br. J. Radiol. 56: 63–66.

Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, Camphausen K, Luiten RM, de Ru AH, Neijssen J, Griekspoor A, Mesman E, Verreck FA, Spits H, Schlom J, van Veelen P, Neefjes JJ (2006) Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. J. Exp. Med. 203: 1259–1271.

Reynders K, Illidge T, Siva S, Chang JY, De Ruysscher D (2015) The abscopal effect of local radiotherapy: Using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. Cancer Treat Rev. 41: 503–510.

Riddell JR, Wang XY, Minderman H, Gollnick SO (2010) Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. J. Immunol. 184: 1022–1030.

Robinson RA, DeVita VT, Levy HB, Baron S, Hubbard SP, Levine AS (1976) A phase I-II trial of multiple-dose polyriboinosic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. J. Natl. Cancer Inst. 57: 599–602.

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 588–593.

Rosenfeld MR, Chamberlain MC, Grossman SA, Peereboom DM, Lesser GJ, Batchelor TT, Desideri S, Salazar AM, Ye X (2010) A multi-institution phase II study of poly-ICLC and radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide in adults with newly diagnosed glioblastoma. Neuro. Oncol. 12: 1071–1077.

Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T (2006) TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. J. Immunol. 176: 4894–4901.

Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P (2007a) Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? Clin. Cancer Res. 13: 4565–4574.

Salaun B, Romero P, Lebecque S (2007b) Toll-like receptor's two-edged sword: When immunity meets apoptosis. Eur. J. Immunol. 37: 3311–3318.

Sarkar SN, Smith HL, Rowe TM, Sen GC (2003) Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. J. Biol. Chem. 278: 4393-4396.

Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T (2001) Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. Cancer 92: 271–278.

Schmaußer B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Müller-Hermelink HK, Eck M (2004) Expression and subcellular distribution of Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in Helicobacter pylori infection. Clin. Exp. Immunol. 136: 521–526.

Schmidt KN, Leung B, Kwong M, Zarember KA, Satyal S, Navas TA, Wang F, Godowski PJ (2004) APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. J. Immunol. 172: 138–143.

Schölch S, Rauber C, Weitz J, Koch M, Huber PE (2015) TLR activation and ionizing radiation induce strong immune responses against multiple tumor entities. Oncoimmunology 4: e1042201.

Sen GC, Sarkar SN (2005) Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. Cytokine Growth Factor Rev. 16: 1–14.

Shaloam D, Tchounwou PB (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur. J. Pharmacol. 740: 364–378.

Sharabi AB, Lim M, DeWeese TL, Drake CG (2015) Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: Radiosensitisation and potential mechanisms of synergy. Lancet Oncol. 16: e498–509.

Sharma PK, Bhardwaj R, Dwarakanath BS, Varshney R (2010) Metabolic oxidative stress induced by a combination of 2-DG and 6-AN enhances radiation damage selectively in malignant cells via non-coordinated expression of antioxidant enzymes. Cancer Lett. 295: 154-166.

Sica A, Allavena P, Mantovani A (2008) Cancer related inflammation: The macrophage connection. Cancer Lett. 267: 204–215.

Sioud M (2006) Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors. Trends Mol. Med. 12: 167-176.

Skvortsov S, Dudás J, Eichberger P, Witsch-Baumgartner M, Loeffler-Ragg J, Pritz C, Schartinger VH, Maier H, Hall J, Debbage P, Riechelmann H, Lukas P, Skvortsova I; EORTC PathoBiology Group (2014) Rac1 as a potential therapeutic target for chemo-radioresistant head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). Br. J. Cancer 110: 2677–2687.

Slone HB, Peters LJ, Milas L (1979) Effect of host immune capability on radiocurability and subsequent transplantability of a murine fibrosarcoma. J. Natl. Cancer Inst. 63: 1229–1235.

Solomon B, Young RJ, Rischin D (2018) Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. Semin. Cancer Biol. 52: 228-240.

Song EJ, Kang MJ, Kim YS, Kim SM, Lee SE, Kim CH, Kim DJ, Park JH (2011) Flagellin promotes the proliferation of gastric cancer cells via the Toll-like receptor 5. Int. J. Mol. Med. 28: 115–119.

Srivastava RM, Lee SC, Andrade Filho PA, Lord CA, Jie HB, Davidson HC, López-Albaitero A, Gibson SP, Gooding WE, Ferrone S, Ferris RL (2013) Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. Clin. Cancer Res. 19: 1858-1872.

Suh HS, Brosnan CF, Lee SC (2009) Toll-like receptors in CNS viral infections. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 336: 63–81.

Sun R, Zhang Y, Lv Q, Liu B, Jin M, Zhang W, He Q, Deng M, Liu X, Li G, Li Y, Zhou G, Xie P, Xie X, Hu J, Duan Z (2011) Toll-like receptor 3 (TLR3) induces apoptosis via death receptors and mitochondria by up-regulating the transactivating p63 isoform α (TAP63α). J. Biol. Chem. 286: 15918-15928.

Szczepanski M, Stelmachowska M, Stryczynski L, Golusinski W, Samara H, Mozer-Lisewska I, Zeromski J (2007) Assessment of expression of Toll-like receptors 2, 3 and 4 in laryngeal carcinoma. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 264: 525–530.

Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Harasymczuk M, Boyiadzis M, Kruk-Zagajewska A, Szyfter W, Zeromski J, Whiteside TL (2009) Triggering of Toll-like receptor 4 expressed

on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. Cancer Res. 69: 3105–3113.

Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T (2003) Integration of interferon-α/β signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. Nature 424: 516-523.

Takeda Y, Kataoka K, Yamagishi J, Ogawa S, Seya T, Matsumoto M (2017) A TLR3-specific adjuvant relieves innate resistance to PD-L1 blockade without cytokine toxicity in tumor vaccine immunotherapy. Cell Rep. 19: 1874–1887.

Takemura N, Kawasaki T, Kunisawa J, Sato S, Lamichhane A, Kobiyama K, Aoshi T, Ito J, Mizuguchi K, Karuppuchamy T, Matsunaga K, Miyatake S, Mori N, Tsujimura T, Satoh T, Kumagai Y, Kawai T, Standley DM, Ishii KJ, Kiyono H, Akira S, Uematsu S (2014) Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. Nat. Commun. 5: 3492.

Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuuring E, Litvinov SV, Hermans J, Van Krieken JH (1998) Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. Anticancer Res. 18(6B): 4793–4800.

Tan LSY, Wong B, Gangodu NR, Lee AZE, Kian Fong Liou A, Loh KS, Li H, Yann Lim M, Salazar AM, Lim CM (2018) Enhancing the immune stimulatory effects of cetuximab therapy through TLR3 signalling in Epstein-Barr virus (EBV) positive nasopharyngeal carcinoma. Oncoimmunology 7(11): e1500109.

Tang C, Wang X, Soh H, Seyedin S, Cortez MA, Krishnan S, Massarelli E, Hong D, Naing A, Diab A, Gomez D, Ye H, Heymach J, Komaki R, Allison JP, Sharma P, Welsh JW (2014) Combining radiation and immunotherapy: a new systemic therapy for solid tumors? Cancer Immunol. Res. 2: 831–838.

Taura M, Fukuda R, Suico MA, Eguma A, Koga T, Shuto T, Sato T, Morino-Koga S., Kai H (2010) TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly I:C-induced tumor cell apoptosis. Cancer Sci. 101: 1610–1617.

Tian M, Neil J, Schiemann W (2011) Transforming growth factor-β and the hallmarks of cancer. Cell. Signal. 23: 951–962.

Tsai CS, Chen FH, Wang CC, Huang HL, Jung SM, Wu CJ, Lee CC, McBride WH, Chiang CS, Hong JH (2007) Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 68: 499–507.

Umemura N, Zhu J, Mburu YK, Forero A, Hsieh PN, Muthuswamy R, Kalinski P, Ferris RL, Sarkar SN (2012) Defective NF-κB signaling in metastatic head and neck cancer cells leads to enhanced apoptosis by double-stranded RNA. Cancer Res. 72(1): 45–55.

Van DN, Roberts CF, Marion JD, Lépine S, Harikumar KB, Schreiter J, Dumur CI, Fang X, Spiegel S, Bell JK (2012) Innate immune agonist, dsRNA, induces apoptosis in ovarian cancer cells and enhances the potency of cytotoxic chemotherapeutics. FASEB J. 26: 3188–3198.

Vander Heiden M, Cantley L, Thompson C (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science 324: 1029–1033.

Vávrová J, Rezáčová M (2014) Importance of proapoptotic protein PUMA in cell radioresistance. Folia Biol. (Praha) 60: 53-56.

Vérillaud B, Gressette M, Morel Y, Paturel C, Herman P, Lo KW, Tsao SW, Wassef M, Jimenez-Pailhes AS, Busson P (2012) Toll-like receptor 3 in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinomas: consistent expression and cytotoxic effects of its synthetic ligand poly(A:U) combined to a Smac-mimetic. Infect. Agent. Cancer 7: 36.

Veyrat M, Durand S, Classe M, Glavan TM, Oker N, Kapetanakis NI, Jiang X, Gelin A, Herman P, Casiraghi O, Zagzag D, Enot D, Busson P, Vérillaud B (2016) Stimulation of the Toll-like receptor 3 promotes metabolic reprogramming in head and neck carcinoma cells. Oncotarget 7: 82580–82593.

Voutsadakis IA (2018) Expression and function of immune ligand-receptor pairs in NK cells and cancer stem cells: therapeutic implications. Cell. Oncol. 41: 107-121.

Wang H, Zhou M, Brand J, Huang L (2009) Inflammation and taste disorders: mechanisms in taste buds. Ann. NY. Acad. Sci. 1170: 596–603.

Wang Y, Liu L, Davies DR, Segal DM (2010) Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding. J. Biol. Chem. 285: 36836–36841.

Weber A, Kirejczyk Z, Besch R, Potthoff S, Leverkus M, Häcker G (2010) Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells. Cell Death Differ. 17: 942-951.

West XZ, Malinin NL, Merkulova AA, Tischenko M, Kerr BA, Borden EC, Podrez EA, Salomon RG, Byzova TV (2010) Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. Nature 467: 972–976.

Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH (2001) Regulatory CD4(+) CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. Cancer Res. 61: 4766–4772.

Yamashita M, Chattopadhyay S, Fensterl V, Saikia P, Wetzel JL, Sen GC (2012) EGFR is essential for TLR3 signaling. Sci. Signal. 5: ra50.

Yanai H, Ban T, Taniguchi T (2012) High-mobility group box family of proteins: ligand and sensor for innate immunity. Trends Immunol. 33(12): 633-640.

Yang H, Brackett CM, Morales-Tirado VM, Li Z, Zhang Q, Wilson MW, Benjamin C, Harris W, Waller EK, Gudkov AV, Burdelya LG, Grossniklaus HE (2015) The Toll-like receptor 5 agonist entolimod suppresses hepatic metastases in a murine model of ocular melanoma via an NK cell-dependent mechanism. Oncotarget 7: 1–15.

Yang XD, Sun SC (2015) Targeting signaling factors for degradation, an emerging mechanism for TRAF functions. Immunol. Rev. 266: 56–71.

Yoshida S, Shime H, Takeda Y, Nam JM, Takashima K, Matsumoto M, Shirato H, Kasahara M, Seya T (2018) Toll-like receptor 3 signal augments radiation-induced tumor growth retardation in a murine model. Cancer Sci. 109: 956–965.

Yu L, Chen S (2008) Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy. Cancer Immunol. Immunother. 57: 1271–1278.

Yu L, Wang L, Chen S (2010) Endogenous Toll-like receptor ligands and their biological significance. J. Cell. Mol. Med. 14: 2592–2603.

Yu LX, Yan L, Yang W, Wu FQ, Ling Y, Chen SZ, Tang L, Tan YX, Cao D, Wu MC, Yan HX, Wang HY (2014) Platelets promote tumour metastasis via interaction between TLR4 and tumour cell-released high-mobility group box1 protein. Nat. Commun. 5: 5256.

Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L (2003) PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 1931-1936.

Zarember KA, Godowski PJ (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. J. Immunol. 168: 554–561.

Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, Mantovani A, Rothe M, Muzio M, Arditi M (1999) Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-κB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. J. Biol. Chem. 274: 7611-7614.

Zhou H, Chen J, Hu J, Luo Y, Li F, Xiao L, Zhong MZ (2014) High expression of Toll-like receptor 5 correlates with better prognosis in non-small-cell lung cancer: an anti-tumor effect of TLR5 signaling in non-small cell lung cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 140: 633–643.

Zhou ZJ, Dai Z, Zhou SL, Fu XT, Zhao YM, Shi YH, Zhou J, Fan J (2013) Overexpression of HnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. Int. J, Cancer 132: 1080–1089.

Zigrino P, Kuhn I, Bäuerle T, Zamek J, Fox JW, Neumann S, Licht A, Schorpp-Kistner M, Angel P, Mauch C (2009) Stromal expression of MMP-13 is required for melanoma invasion and metastasis. J. Invest. Dermatol. 129: 2686–2693.

Zimmermann M, Zouhair A, Azria D, Ozsahin M (2006) The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. Radiat. Oncol. 1: 11.

8. ŽIVOTOPIS

Martina Mikulandra rođena je 14. lipnja 1986. godine u Šibeniku gdje je s odličnim uspjehom završila osnovnu školu i opću gimnaziju. 21. srpnja 2011. godine diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s odličnim uspjehom. U razdoblju od 2011.-2012. godine odradila je pripravnički staž pri KBC Zagreb te je 24. listopada 2012. položila državni ispit i stekla odobrenje Hrvatske liječničke komore za samostalan rad. Kao liječnik opće medicine od 13. svibnja do 31. kolovoza 2013. godine radila je pri Domu zdravlja Šibenik, a od 1. rujna 2013. do 13. svibnja 2014. pri Zavodu za hitnu medicinu Šibensko-kninske županije. U razdoblju od 19. svibnja 2014.-19. rujna 2019. provodila je specijalističko usavršavanje iz onkologije i radioterapije pri Klinici za tumore KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu. Poslijediplomski doktorski studij Biologije upisala je u studenom 2014. godine. Kao doktorandica provodila je znanstveni rad pri Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr.sc. Tanje Matijević Glavan tijekom kojeg je objavila tri znanstvena rada u časopisima indeksiranim u bazi Current Contents. Tijekom specijalizacije i doktorskog studija aktivno je sudjelovala na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima te je objavila dva pregledna članka u domaćem časopisu *Libri Oncologici*. Članica je Europskog društva za medicinsku onkologiju (ESMO), Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za humanu genetiku te Hrvatskog društva za onkologiju i radioterapiju. Pohađala je tri tečaja u organizaciji ESMO-a.: *ESMO Preceptorship on Prostate Cancer* (listopad 2014., Lugano, Švicarska), *ESMO Preceptorship on Colorectal Cancer* (listopad 2015, Beč, Austrija) te *ESMO Preceptorship on Lung Cancer* (veljača 2016., Manchester, UK). Aktivno govori engleski te pasivno talijanski jezik.