

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

DORA KNEZOVIĆ, dr. med.

ULOGA RECEPTORA TLR4 I SIGNALNE MOLEKULE MYD88 U RAZVOJU TUMORA
MOKRAĆNOG MJEHURA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2025.

Doktorska disertacija je izrađena u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te u Nastambi za pokusne životinje Sveučilišta u Splitu.

Istraživanje je provedeno u sklopu projekata „Uloga mikrobiote u razvoju raka mokraćnog mjehura – μ BC“ (šifra projekta IP-2020-02-8921) i „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ (DOK-2021-02), financiranih od Hrvatske zaklade za znanost.

Voditelj projekata i mentor: prof. dr. sc. Janoš Terzić, dr. med.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tumor mokraćnog mjehura	2
1.1.1. Epidemiološke karakteristike	3
1.1.2. Etiologija	3
1.1.3. Patohistološke i molekularne karakteristike	4
1.1.4. Klinička slika	7
1.1.5. Dijagnostika	8
1.1.6. Liječenje	10
1.1.7. Preklinički modeli za istraživanje tumora mokraćnog mjehura	13
1.2. Mikrobiota i tumori	16
1.2.1. Utjecaj mikrobiote na imunološki sustav	19
1.2.2. Stvaranje kancerogenih metabolita	20
1.2.3. Intratumorska mikrobiota	21
1.2.4. Urinarna mikrobiota i tumor mokraćnog mjehura	21
1.2.5. Utjecaj mikrobiote na odgovor tumora mokraćnog mjehura na terapiju	23
1.3. Receptori slični Toll – u (engl. <i>Toll – like receptors</i>, TLR)	24
1.3.1. Građa i signalizacija TLR4 receptora	25
1.3.2. Mijeloidni diferencijacijski faktor 88 (MYD88)	28
2. CILJEVI I HIPOTEZE	33
2.1. Ciljevi	34
2.2. Hipoteza	34
3. MATERIJALI I METODE	35
3.1. Materijali	36
3.1.1. Etičko odobrenje	36
3.1.2. Pokusne životinje	36
3.1.3. Kemikalije korištene u istraživanju	36
3.1.4. Puferske otopine	37
3.1.5. Enzimi i markeri	38
3.1.6. PCR/qPCR početnice	38
3.1.7. Aparatura	39
3.2. Metode	40
3.2.1. N-butil-N-(4 hidroksibutil)-nitrozamin (BBN) model indukcije tumora mokraćnog mjehura	40
3.2.2. Izolacija DNA iz uzoraka tkiva mišjeg repa za potrebe genotipizacije	41

3.2.3. Genotipizacija	42
3.2.4. Uklapanje tkiva u parafin.....	43
3.2.5. Hemalaun-eozin bojenje i analiza.....	43
3.2.6. Imunofluorescencijsko bojenje i analiza.....	44
3.2.7. Izolacija mikrobne DNA iz uzoraka stolice, tzv. fekalnih peleta i sadržaja cekuma	44
3.2.8. 16S metagenomsko sekvenciranje	45
3.2.9. Izolacija ukupne RNA.....	45
3.2.10. Sekvenciranje glasničke RNA (RNA-seq analiza)	45
3.2.11. Izrada komplementarne DNA	46
3.2.12. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR).....	46
3.2.13. Statističke metode	47
4. REZULTATI.....	49
4.1. Potvrda genotipa <i>Tlr4</i> i <i>Myd88</i> knock-out (KO) eksperimentalnih životinja metodom lančane reakcije polimerazom	50
4.2. Usporedba tjelesne mase miševa nakon provedenog akutnog i kroničnog tretmana BBN-om	51
4.3. Usporedba masa mokraćnih mjehura nakon provedenog akutnog i kroničnog tretmana BBN-om	52
4.4. Patohistološka analiza tkiva mokraćnog mjehura nakon izloženosti BBN-u	53
4.5. Promjene u raznolikosti mikrobiote tijekom razvoja tumora mokraćnog mjehura	58
4.6. Razlike u ekspresiji gena između <i>Myd88</i> ^{KO} i miševa divljeg tipa u fiziološkim uvjetima i tijekom razvoja tumora mokraćnog mjehura.....	68
4.7. Analiza proliferacijskog i apoptotskog markera u tumorima mokraćnog mjehura <i>Myd88</i> ^{KO} miševa	76
5. RASPRAVA.....	79
5.1. Utjecaj receptora TLR4 i signalne molekule MYD88 na razvoj tumora mokraćnog mjehura.....	80
5.2. Dinamika promjene raznolikosti crijevne mikrobiote tijekom razvoja tumora mokraćnog mjehura.....	81
5.3. Usporedba genske ekspresije u zdravom i tumorskom tkivu između <i>Myd88</i> ^{KO} i WT skupine miševa.....	83
5.4. Analiza proliferacijskog i apoptotskog profila te markera razgradnje izvanstaničnog matriksa tumora mokraćnog mjehura u <i>Myd88</i> ^{KO} modelu.....	84
5.5. Ograničenja studije.....	85
5.6. Završna razmatranja.....	86
6. ZAKLJUČCI.....	87

7. SAŽETAK.....	89
8. LAIČKI SAŽETAK.....	91
9. SUMMARY	93
10. LAY SUMMARY	96
11. LITERATURA	98
12. KRATKI ŽIVOTOPIS	127
13. DODATAK.....	131

POPIS OZNAKA I KRATICA

TMM – tumor mokraćnog mjehura

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

CIS – karcinom *in situ* (lat. *carcinoma in situ*)

MNIT – mišićno–neinvazivni tumor mokraćnog mjehura

MIT – mišićno–invazivni tumor mokraćnog mjehura

FGFR3 – receptor čimbenika rasta fibroblasta 3

EMT – epitelno–mezenhimska tranzicija

EGFR – receptor epidermalnog čimbenika rasta

CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

TURBT – transuretralna resekcija

RNA – ribonukleinska kiselina

CT – kompjuterizirana tomografija

MR – magnetska rezonanca

ERBT – *en block* resekcija tumora mokraćnog mjehura

BCG – engl. *Bacillus Calmette-Guérin*

RC – radikalna cistektomija

PC – parcijalna cistektomija

TMT – trimodalna terapija

NKT – neoadjuvantna kemoterapija

AKT – adjuvantna kemoterapija

PD1 – protein programirane smrti 1

PDL1 – ligand proteina programirane smrti 1

CTLA4 – protein povezan s citotoksičnim limfocitima T 4

CRISPR – engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

siRNA – mala interferirajuća RNA

BBN – N-butil-N-(4-hidroksilbutil)-nitrozamin

MNU – N-methyl-N-nitrosourea

BCPN – N-butil-N-(3-karboksipropil)nitrozamin

FISH – fluorescentna *in situ* hibridizacija

NGS – sekvenciranje nove generacije (engl. *next generation sequencing*)

rRNA – ribosomska RNA

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom
dPCR – digitalna lančana reakcija polimerazom
OTU – operativne taksonomske jedinice (engl. *operational taxonomic unit*)
ASV – varijante sekvenciranog amplikona (engl. *amplicon sequence variants*)
TLR – receptor sličan Toll-u (engl. *Toll-like receptor*)
NLR – receptor sličan Nod-u (engl. *Nod-like receptor*)
PAMP – molekularni obrasci povezani s patogenom (engl. *pathogen-associated molecular patterns*)
DAMP – molekularni obrasci povezani s oštećenjem (engl. *damage-associated molecular patterns*)
TLR4 – receptor sličan Toll-u 4 (engl. *Toll-like receptor 4*)
LPS – lipopolisaharid
NF- κ B – nuklearni faktor κ B
STAT3 – prenosilac signala i aktivator transkripcije 3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*)
ROS – reaktivni kisikovi spojevi
RNS – reaktivni dušikovi spojevi
ICI – inhibitori imunoloških kontrolnih točaka
FMT – transplantacija fekalne mikrobiote
HMGB1 – engl. *high mobility group box-1*
Hsp – protein toplinskog šoka
TIR – engl. *Toll/interleukin-1 receptor*
MD2 – mijeloidni diferencijacijski protein 2
CD14 – engl. *cluster of differentiation 14*
MYD88 – mijeloidni diferencijacijski faktor 88
TIRAP – engl. *TIR domain-containing adapter protein*
IRAK – engl. *IL1 receptor associated kinase*
TRAF6 – engl. *TNF-receptor-associated factor 6*
TNF – faktor nekroze tumora
TAK – engl. *TGF- β -activated kinase 1*
TAB – engl. *TAK binding protein*
MAPK – protein – kinaza aktivirana mitogenom
JNK – engl. *Jun N-terminal kinase*
ERK – kinaza regulirana izvanstaničnim signalima

IKK – engl. *inhibitor of kappa B kinase*

AP1 – engl. *activator protein 1*

TRIF – engl. *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*

TRAM – engl. *TRIF-related adapter molecule*

TBK1 – engl. *TRAF-family member-associated NF- κ B activator binding kinase 1*

IRF – engl. *interferon regulatory factor*

NSCLC – nesitnostanični karcinom pluća

MDSC – mijeloidne supresorske stanice

DC – dendritičke stanice

NK – stanice prirodne ubojice

Treg – regulatorni T limfociti

KO – engl. *knock-out*

WT – divlji tip (engl. *wild-type*)

SPF – engl. *specific pathogen free*

PBS – fosfatno puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate buffered saline*)

PFA – paraformaldehid

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

NP-40 – engl. *nonyl phenoxypolyethoxylethanol*

TAE – puferirana otopina koja se sastoji od Tris, octene kiseline i EDTA komponenti

TBS – Tris-puferirana fiziološka otopina (engl. *tris buffered saline*)

BSA – albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

dNTP – deoksinukleotid trifosfat (engl. *deoxynucleotide triphosphate*)

EtOH – etanol

bp – parova baza

FC – engl. *fold change*

PCA – analiza glavnih komponenti

KEGG – engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

NI – neinvazivni

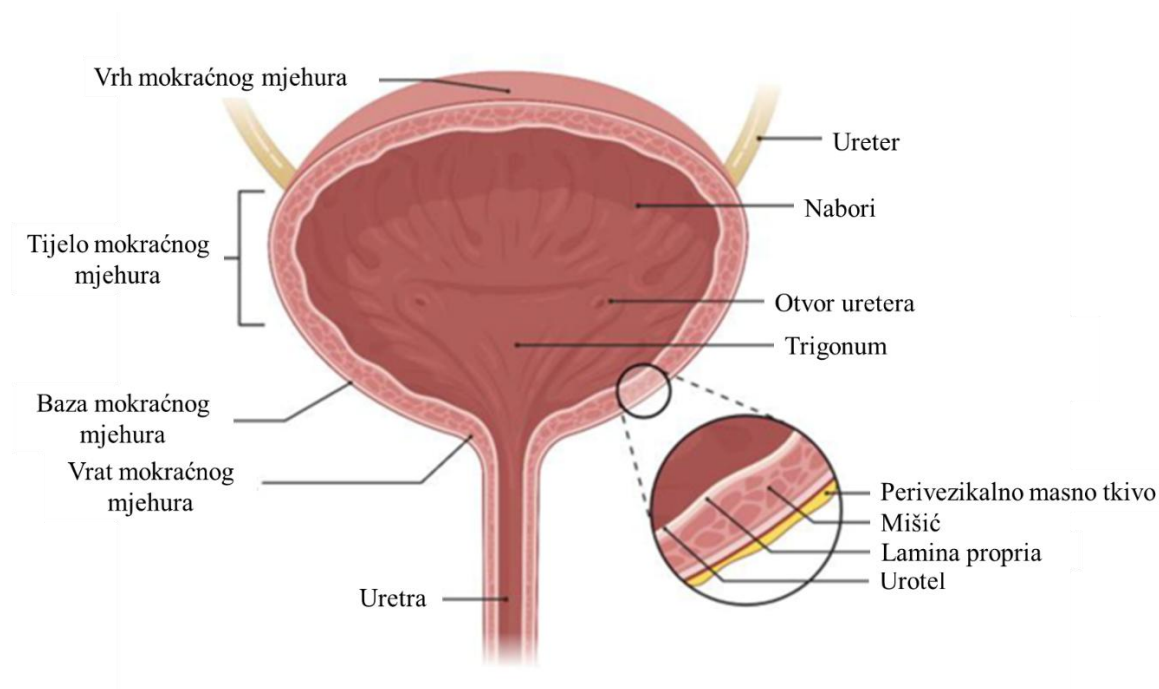
I – invazivni

SCFA – kratkolančana masna kiselina

1. UVOD

1.1. Tumor mokraćnog mjehura

Mokraćni mjehur (lat. *vesica urinaria*) je šuplji organ smješten u maloj zdjelici, čija je unutrašnjost obložena s 5 – 7 slojeva epitelnih stanica prekrivnih „kišobranastim“ (engl. *umbrella*) stanicama (urotel), dok ga izvana prekriva adventicija (1). Središnji sloj stijenke mjehura čine glatke mišićne stanice koje formiraju detruzor, ključni mišić odgovoran za kontraktilnu funkciju mjehura. Mokraćni mjehur se anatomski dijeli na tri glavna dijela: vrh (apeks), tijelo i bazu. Tijelo mjehura je smješteno iznad ureteralnih otvora, dok baza mjehura uključuje trigonum koji ima tri otvora smještena u njegovim kutovima. Dva posterolateralna otvora predstavljaju ulaze uretera u mjehur, dok prednji otvor, u obliku lijevka (vrat mjehura), povezuje mjehur s mokraćnom cijevi (Slika 1) (2–5).



Slika 1. Građa mokraćnog mjehura.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Lucchesi CA, Vasilatis DM, Mantrala S, Chandrasekar T, Mudryj M, Ghosh PM. Pesticides and Bladder Cancer: Mechanisms Leading to Anti-Cancer Drug Chemoresistance and New Chemosensitization Strategies. *Int J Mol Sci.* 2023;24:11395. Licenca: CC BY 4.0.)

Tumor mokraćnog mjehura (TMM) je zloćudna bolest koja najčešće nastaje iz epitela sluznice mjehura (urotela) te predstavlja značajan globalni zdravstveni problem zbog visoke učestalosti i stope recidiva, kao i raznolikih kliničkih i molekularnih obilježja (1).

1.1.1. Epidemiološke karakteristike

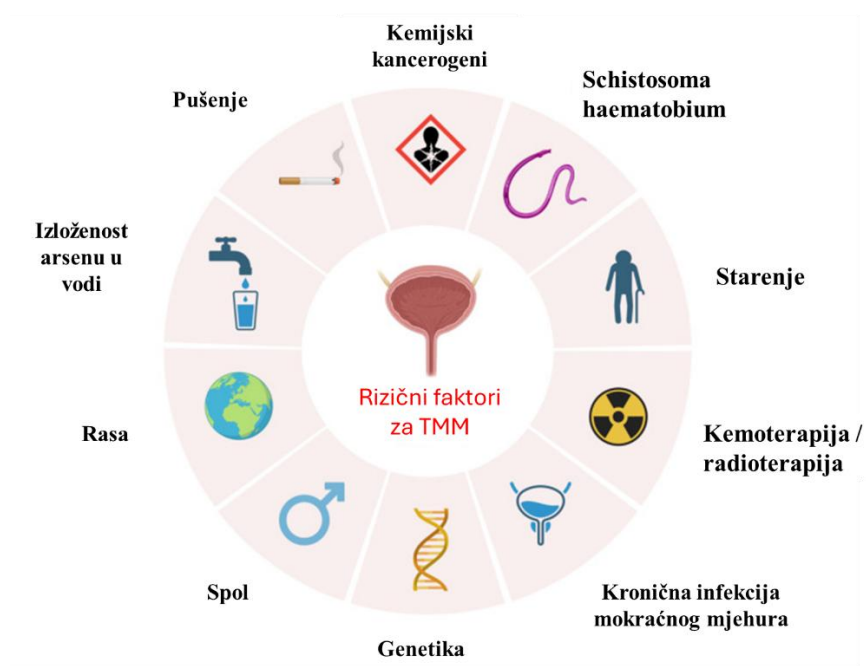
Tumor mokraćnog mjehura jedan je od češćih malignoma, s 614 298 novih slučajeva zabilježenih na globalnoj razini u 2022. godini (6), što predstavlja porast od 7,1 % u usporedbi s 2020. godinom. Time predstavlja značajan javnozdravstveni problem na svjetskoj razini, s više od 1,6 milijuna ljudi koji trenutno žive s ovom bolešću (7). Rizik od razvoja TMM-a kroz život iznosi otprilike 1,1 % kod muškaraca i 0,27 % kod žena (2). Najveći broj slučajeva zabilježen je u Europi i to u južnom dijelu (7), dok je učestalost generalno veća u zapadnim društvima, što se uglavnom pripisuje visokoj životnoj dobi i izloženosti karcinogenima (8). Muškarci imaju četiri puta veću vjerojatnost za razvoj tumora mokraćnog mjehura, dok žene češće razvijaju tumore višeg stupnja i stadija, što posljedično dovodi do većeg rizika od progresije i recidiva (9). U Hrvatskoj je 2022. godine 1118 osoba oboljelo od TMM-a, od čega su muškarci bili pogođeni u 823 slučaja (10).

1.1.2. Etiologija

Starija dob je najveći rizični čimbenik za nastanak tumora mokraćnog mjehura, s prosječnom dobi postavljanja dijagnoze između 70. i 84. godine (11). Veća incidencija u starijoj dobi povezuje se sa smanjenom sposobnošću popravka DNA u kombinaciji s izloženošću karcinogenima. Izloženost duhanskom dimu se, uz starenje, smatra najvećim čimbenikom rizika, uz manje učestalo, profesionalno izlaganje kemikalijama poput benzena i aromatskih amina u kemijskoj te industrijama boja, guma i sl. (Slika 2) (12). Duhanski dim sadrži više od 7000 štetnih tvari, od kojih su brojne kancerogene i povezane s povećanim rizikom razvoja TMM-a (13).

Također, zabilježene su razlike u sastavu urinarne mikrobiote između pacijenata s tumorom mokraćnog mjehura i zdravih ispitanika (14), stoga veliku ulogu u nastanku TMM-a imaju i kronične upalne bolesti, poput bakterijskih infekcija uropatogenom *Escherichia coli* ili infekcija uzrokovanih parazitom *Schistosoma hematobium* (Slika 2) (posebno česte u sjevernoj Africi) (12,15,16).

Uz navedeno, dugotrajna uporaba *Foley* katetera, prethodni kirurški zahvati na mjehuru, zračenje zdjelice (primjerice kod liječenja raka prostate, rektuma ili vrata maternice) i primjena ciklofosfamida, citotoksičnog lijeka iz skupine alkilirajućih kemoterapija, dodatno povećavaju rizik za razvoj tumora mokraćnog mjehura (Slika 2) (17–21).



Slika 2. Rizični faktori koji utječu na razvoj tumora mokraćnog mjehura (TMM).

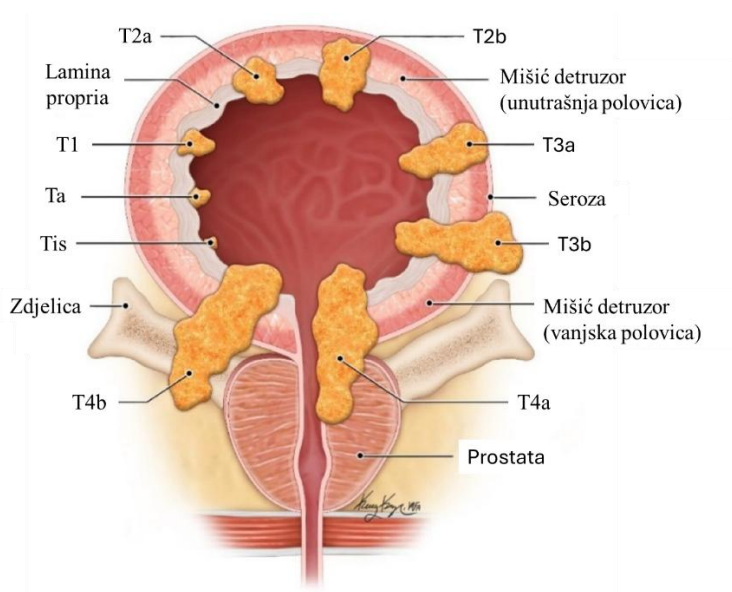
(Preuzeto i prilagođeno prema: Gill E, Perks CM. Mini-Review: Current Bladder Cancer Treatment-The Need for Improvement. Int J Mol Sci. 2024;25:1557. Licenca: CC BY 4.0.)

1.1.3. Patohistološke i molekularne karakteristike

Urotelni karcinomi čine oko 90 % svih TMM-a. Dijelev se na neinvazivne (papilarni utorelni karcinomi niskog i visokog gradusa te *carcinoma in situ* tj. CIS) i invazivne utorelne karcinome. Većina tumora su papilarni karcinomi koji su obično površinski, egzofitični i dobro diferencirani (22). Neutorelni tumori epitelnog podrijetla se također mogu razviti u mokraćnom mjehuru, ali su rijetki u odnosu na urotelne. Mogući su i karcinomi pločastih stanica (5 %), koji se javljaju kod osoba koje imaju parazitsku infekciju mokraćnog mjehura ili kroničnu iritaciju sluznice, te adenokarcinomi (0,5 % - 2 %), koji mogu biti primarni tumori, ali rijetko i posljedica metastaza karcinoma crijeva (23).

Tumori mokraćnog mjehura se prema TNM klasifikaciji dijele u nekoliko stadija (Slika 3). Stadij 0 obuhvaća neinvazivne papilarne tumore (Ta) i ravne tumore ograničene na urotelni

sloj tj. CIS. Stadij 1 (T1) podrazumijeva prodiranje u subepitelno vezivno tkivo tj. laminu propriu. Drugi stadij označava širenje tumora u mišićni sloj i to unutarnju polovicu (T2a) i vanjsku polovicu (T2b). Tumori stadija 3 su karakterizirani invazijom u perivezikalno tkivo, a dijele se na mikroskopsku invaziju (T3a) i makroskopsku invaziju tj ekstrapovezikalnu tvorbu (T3b). T4 stadij TMM označava širenje tumora u okolne organe, najčešće u prostatu, maternicu ili vaginu (T4a) te na trbušni ili zdjelični zid (T4b). Prisutnost metastaza u limfnim čvorovima sistematizirano je kroz N stadije. Prisutnost jednog pozitivnog čvora u maloj zdjelici označava se kao N1, ≥ 2 čvora u maloj zdjelici kao N2, dok N3 stadij predstavlja širenje tumorskih stanica u barem jedan ilijačni limfni čvor. Stadij M označava udaljenje metastaze (22).



Slika 3. TNM klasifikacija tumora mokraćnog mjehura. Ta – neinvazivni papilarni tumor, Tis – ravni tumor ograničen na urotelni sloj, T1 – tumor zahvaća subepitelno vezivno tkivo tj. laminu propriu. T2a – širenje tumora u unutarnju polovicu mišićnog sloja, T2b – širenje tumora u vanjsku polovicu mišićnog sloja. T3a – mikroskopska invazija u perivezikalno tkivo, T3b – ekstrapovezikalna tvorba, T4a – širenje tumora u okolne organe (prostatu, maternicu ili vaginu), T4b – širenje tumora u trbušni ili zdjelični zid.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Gill E, Perks CM. Mini-Review: Current Bladder Cancer Treatment-The Need for Improvement. Int J Mol Sci. 2024;25:1557. Licenca: CC BY 4.0.)

Dok se invazivni TMM patološki definira kao proboj bazalne membrane, TMM se klinički klasificira u dva stadija temeljem stupnja invazije u mišićnu stijenku mjehura (24). U 80 % slučajeva radi se o mišićno-neinvazivnom TMM (MNIT). Prognoza za ovaj stupanj tumora je povoljna s visokim stopama petogodišnjeg preživljenja, međutim ono što je

zabrinjavajuće je činjenica da je stopa recidiva vrlo visoka, te iznosi između 60-70 % (25,26). S druge strane, TMM koji infiltrira mišićni sloj mokraćnog mjehura, tzv. mišićno-invazivni TMM (MIT), je agresivniji te otprilike polovica pacijenata razvije mikrometastaze (26), što zahtijeva radikalniji pristup liječenju poput cistektomije ili trimodalne terapije (12).

Budući da još uvijek ne postoji odobrena ciljana molekularna terapija za TMM, a s obzirom na visoku stopu recidiva, istraživanja usmjerena na molekularnu subklasifikaciju TMM-a ključna su za razvoj novih oblika liječenja (27). Mišićno-neinvazivni TMM podijeljeni su u tri molekularna subtipa (tip I, II i III), dok za mišićno-invazivni TMM postoji 6 različitih molekularnih profila (luminalno-papilarni/uroA, luminalno-nespecifični, luminalni-nestabilni, bogat stromom, bazalno-skvamozni te nalik neuroendokrinom) (28–31).

Delecije na kromosomu 9, koji nosi gen *CDKN2A*, te mutacije u genima *FGFR3*, *PI3K* i promotor gena *TERT*, prepoznate su kao rani molekularni događaji u razvoju urotelnih novotvorina (25).

Molekularni subtip I mišićno-neinvazivnog TMM-a, koji ima luminalne značajke i povezan je s povoljnom prognozom, karakterizira povišena ekspresija ranih regulatora staničnog ciklusa (*CCDN1*) te prisutnost mutacija u genu *FGFR3*. Subtip II, također s luminalnim karakteristikama, obilježen je povišenom ekspresijom kasnih regulatora staničnog ciklusa i transkripcijskih faktora povezanih s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (EMT) i *ERBB2*. Subtip III, s bazalnim obilježjima, povezan je s kraćim ukupnim preživljenjem te predstavlja „uspavano“ tumorsko stanje mišićno-neinvazivnog TMM-a koje je prešlo u bazalni fenotip uz prisutnost mutacija *FGFR3*. Samo su subtipovi II i III povezani s visokim stupnjem bolesti, prisutnošću CIS-a te progresijom u MIT (29).

Mutacije u tumor supresor genima, uključujući *TP53*, *RB1* i *PTEN*, učestale su u MIT-u (32–34). Smatra se da su mutacije gena *TP53*, prisutne u 50 % MIT-a i 10 – 20 % T1 tumora visokog gradusa (27,28,33,35,36), imaju središnju ulogu u nepapilarnom putu progresije tumora. MDM2, negativni regulator TP53, prekomjerno je eksprimiran u 30 % MIT-a i u većini slučajeva se pojavljuje međusobno isključivo s mutacijama *TP53* (27). U određenim tumorima, gubitak funkcije TP53 javlja se zajedno s gubitkom funkcije RB1 (34,37–40). Deregulacija RB1/p16 tumorsupresorskog puta povezana je s MIT-om i povećanim rizikom od progresije (33). U nekim slučajevima, funkcija RB1 može biti inhibirana prekomjernom ekspresijom ciklina D1 (*CCND1*) ili gubitkom *CDKN2A*, što je često u tumorima visokog gradusa (27,35,36,41). Iako je gubitak gena *RB1* prisutan u samo 10 % MIT-a, put RB1 može biti funkcionalno dereguliran u znatno većem broju tumora. Heterogeni mehanizmi koji dovode do sličnih fenotipskih obilježja doprinose rezistenciji na terapiju i nedostatku pouzdanih

biomarkera. Mutacije u genima uključenima u odgovor na oštećenje DNA prisutni su u približno 30 % MIT-a i NMIT-a visokog gradusa, dok su rijetki u NMIT-ima niskog gradusa (42). Najčešći mutirani gen u ovom kontekstu je *ERCC2*, komponenta mehanizma za popravak nukleotidne ekscizije (NER), čije su mutacije prisutne u 17 % T1 tumora visokog gradusa i 20 % MIT-a (35,43). Uz izazivanje genetske nestabilnosti, različite genetske alteracije povezane s MIT-om također reguliraju rast stanica i invaziju. Geni iz *EGFR* obitelji, uključujući *EGFR* i *HER2 (ERBB2)*, često su prekomjerno eksprimirani u CIS-u, MIT-u te, osobito, u metastatskom TMM-a (27,35,44).

Ba/Sq podtip MIT-a (35 %) karakterizira bazalna i skvamozna diferencijacija, a povezan je s aktivacijom *STAT3* i smanjenjem izražaja gena povezanih s urotelnom diferencijacijom (*FOXAI*, *GATA3*, *PPARG*) (34). Luminalni tumori (LumP, LumU, LumNS) imaju papilarnu morfologiju obogaćenu luminalnim markerima i pokazuju ekspresiju *PPARG*, *GATA3* i *FOXAI*, transkripcijskih faktora koji reguliraju urotelnu diferencijaciju (34,45). Stromom-bogati podtip često je infiltriran stromalnim i imunološkim stanicama te je povezan s genetskim profilima za glatke mišiće, endotelne stanice i fibroblaste. Podtip nalik neuroendokrinom tumoru (NE-nalik), rijedak je MIT oblik tumora (3 %). Obogaćen je neuroendokrinim markerima i karakteriziran je visokom aktivnošću staničnih ciklusa te mutacijama u genima *TP53* i *RBI* (34,37,38).

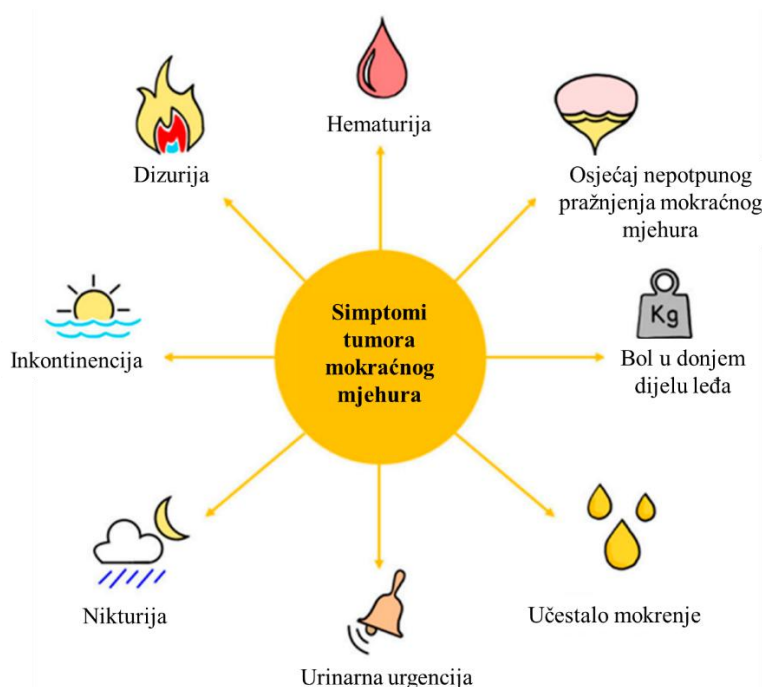
Epigenetske promjene, prvenstveno metilacija DNA, također su prisutne u MIT-u. Hipometilacija je češća u ranim stadijima, dok hipermetilacija dovodi do utišavanja tumor supresorskih gena (npr. *TP53*, *RBI*, *CDKN2A*) i povezana je s agresivnijim oblicima bolesti (37).

1.1.4. Klinička slika

Otprilike 75 % pacijenata s tumorom mokraćnog mjehura pri postavljanju dijagnoze obrađuje se zbog prisutnosti bezbolne, vidljive (makroskopske) hematurije, a trogodišnje pozitivne prediktivne vrijednosti iznose 7,4 % (95 % CI 6,8 – 8,1) u muškaraca i 3,4 % (95 % CI 2,9 – 4,0) u žena (1,46). Hematurija kod žena često se pogrešno povezuje s infekcijama, što može odgoditi dijagnozu tumora mokraćnog mjehura i rezultirati lošijim preživljenjem od raka (12). Pri prvom pregledu, većina pacijenata ima jednu leziju manju od 15 mm (46). Prvi znak TMM-a također može biti i mikroskopska ili „nevidljiva“ hematurija, koja se često otkriva tijekom rutinskih zdravstvenih pregleda, pri čemu je rak mokraćnog mjehura pronađen u 3,3 -

5,2 % tih pacijenata. Pojava mikroskopske hematurije obično je povezana s nižim stadijem bolesti (1). Pacijenti bez hematurije obično imaju dulje vrijeme od početka simptoma (npr. boli, urgencije, dizurije ili ponovljenih urinarnih infekcija) do postavljanja dijagnoze (Slika 4). Na primjer, karcinom *in situ* može izazvati simptome koji podsjećaju na urinarne infekcije ili prostatitis (47).

Opstruktivni simptomi, poput smanjenog ili isprekidanog mlaza urina, naprezanja ili osjećaja nepotpunog pražnjenja mjehura, mogu biti prisutni ako je tumor lokaliziran u blizini vrata mokraćnog mjehura ili uretre (Slika 4). Pacijenti s naprednim stadijem bolesti mogu manifestirati simptome koji upućuju na metastatsku proširenost bolesti. Najčešća mjesta metastaza uključuju limfne čvorove, kosti, pluća, jetru i peritoneum (48).



Slika 4. Klinička prezentacija tumora mokraćnog mjehura.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Godlewski D, Czech S, Bartusik-Aebischer D, Aebischer D. Bladder Cancer Basic Study and Current Clinical Trials. Uro. 2024;4:145-196. Licenca: CC BY 4.0.)

1.1.5. Dijagnostika

Dijagnostički protokol kod bolesnika kod kojih se sumnja na TMM temelji se primarno na cistoskopiji, koja predstavlja zlatni standard u inicijalnoj dijagnostici. Svaka suspektna

promjena, kao što su crvenkaste plosnate, papilarne ili čvrste lezije, zahtijeva patohistološku procjenu, obzirom da upalne i druge benigne promjene mogu oponašati TMM (49). Otkrivanje CIS stadija unaprijeđeno je primjenom fluorescentne cistoskopije ili cistoskopije uz korištenje osvjetljenja uskog raspona spektra. Ove tehnike bolje diferencijaciju tumorsko tkivo od zdravog zahvaljujući pojačanoj metaboličkoj aktivnosti te specifičnoj arhitekturi krvnih žila u tumoru, što rezultira većom specifičnošću u odnosu na standardnu bijelu svjetlost. Fluorescentna cistoskopija u plavom svjetlu podrazumijeva apliciranje heksaminolevulinat hidroklorida u mokraćni mjehur sat vremena prije zahvata, čime se postiže vizualizacija patološkog nakupljanja fluorescentnih porfirinskih produkata u tumorskim stanicama. Opisana tehnika povećava dijagnostičku točnost i smanjuje stopu ranih i kasnih recidiva, međutim povećana je i stopa lažno pozitivnih nalaza (50–54). Patohistološki uzorci mogu se dobiti transuretralnom biopsijom ili resekcijom cijelog zahvaćenog područja (49). Bipolarna elektrokoagulacija predstavlja još jednu suvremenu tehnologiju koja koristi manju energiju i napon u odnosu na standardnu monopolarnu transuretralnu resekciju mokraćnog mjehura (TURBT) (55). Transuretralna resekcija mokraćnog mjehura još uvijek je temelj kliničke dijagnostike TMM-a, s obzirom da omogućuje procjenu histološkog stupnja diferencijacije, podtipa i dubinu invazije tumora. TURBT ima dijagnostičku te u određenim slučajevima i terapijsku ulogu, ovisno o patološkim karakteristikama tumora (56). Manje novotvorine je moguće ukloniti *en bloc* tehnikom korištenjem elektrokoagulatorne petlje resektoskopa, dok se veće promjene resekiraju u više fragmenata (57).

Citološka analiza urina često se koristi kao dodatna dijagnostička metoda, posebno u slučajevima sumnje na karcinome visokog stupnja te se obično kombinira s cistoskopijom (58). Proučavanje RNA i DNA iz urina kao dijagnostičkih biljega za TMM traje već desetljećima, međutim tek su nedavno određeni testovi dobili regulatorno odobrenje, iako njihova primjena u kliničkoj praksi nije značajnije uspostavljena (59). Umjesto pojedinačnih biljega, danas se primjenjuju višekomponentni paneli koji analiziraju ekspresiju gena, mutacije, metilaciju DNA i modifikacije histona, dok je razvoj sekvenciranja nove generacije dodatno unaprijedio detekciju i profiliranje slobodne DNA u urinu. Među varijantama otkrivenima analizom slobodne DNA bolesnika s TMM-om, mutacije promotora gena *TERT* najčešće su i najpouzdanije za ranu i rekurentnu detekciju bolesti te omogućuju otkrivanje tumora i do nekoliko mjeseci ili godina prije nego što se bolest klinički manifestira ili bude otkrivena citološkim analizama. Također, i mutacije gena *FGFR3* pokazuju visoku osjetljivost (60–66).

Uz histopatologiju, koja predstavlja jedan od najpouzdanijih pokazatelja biološkog ponašanja tumora te je ključna za planiranje terapije i stratifikaciju rizika, bitna je i dubina

infiltracije u stijenku mokraćnog mjehura. Kod postavljanja dijagnoze MNIT-a osobitu važnost ima podjela na tumore niskog i visokog stupnja (gradusa), dok dijagnoza MIT-a predstavlja visok stupanj malignosti. U slikovnoj dijagnostici, kompjuterizirana tomografija (CT) i magnetska rezonanca (MR) urotrakta smatraju se metodama izbora, s većom dijagnostičkom točnošću od ultrazvuka. U bolesnika s dijagnosticiranim MIT-om, CT ili MR su nužni radi detaljnog određivanja stadija bolesti te utvrđivanja metastatskog širenja tumora. Za detekciju udaljenih metastaza, FDG PET/CT (pozitronska emisijska tomografija s fluorodeoksiglukozom) pokazuje visoku osjetljivost i specifičnost kod bolesnika s mišićno-invazivnim tumorom mokraćnog mjehura (67–69).

1.1.6. Liječenje

Jedan od ključnih izazova u suvremenim terapijskim pristupima liječenju raka mokraćnog mjehura jest njihov značajan utjecaj na kvalitetu života pacijenata (70). Među svim malignim bolestima, tumor mokraćnog mjehura ubraja se među najskuplje za liječenje, s najvišim troškovima po pacijentu, što je prvenstveno posljedica potrebe za kontinuiranim terapijskim intervencijama i dugotrajnim praćenjem zbog visoke stope recidiva (71).

Standardni pristup liječenju mišićno-neinvazivnog tumora mokraćnog mjehura obuhvaća endoskopsku resekciju tumora, koja se često nadopunjuje intravezikalnom adjuvantnom terapijom ovisno o rizičnosti za pacijenta. Suprotno tome, mišićno-invazivni tumor mokraćnog mjehura zahtijeva agresivnije terapijske strategije, uključujući radikalnu cistektomiju u kombinaciji s neoadjuvantnom ili adjuvantnom sustavnom kemoterapijom. Alternativno, trimodalna terapija, koja uključuje transuretralnu resekciju tumora mokraćnog mjehura, radioterapiju i kemoterapiju, može predstavljati poštenu terapijsku opciju očuvanja mokraćnog mjehura (49).

Transuretralna resekcija tumora mokraćnog mjehura i dalje je zlatni standard u dijagnosticiranju i liječenju neinvazivnog tumora mokraćnog mjehura. Ovaj zahvat omogućuje uklanjanje tumorskog tkiva i precizno određivanje stadija bolesti, međutim, visoka stopa recidiva (35 – 70 %) ukazuje na potrebu za poboljšanjima (72,73). Kako bi se povećala dijagnostička točnost i smanjila stopa recidiva, preporučuje se ponavljanje TURBT-a unutar 4 – 6 tjedana od primarnog zahvata, kao i korištenje fotodinamičke dijagnostike tijekom primarnog zahvata, koja poboljšava detekciju tumorskih lezija i smanjuje rizik od zaostalog tumora (72). Unatoč poštenom pristupu, TURBT ima i određene nedostatke, uključujući

fragmentaciju tumora, što može povećati rizik implantacije tumorskih stanica i otežati histološku analizu. Osim toga, zahvat može uzrokovati perioperativne komplikacije poput perforacije mokraćnog mjehura i akutne urinarne retencije. Kako bi se opisani nedostaci umanjili, sve veći interes privlači *en bloc* resekcija TMM-a (ERBT). Ova tehnika omogućuje uklanjanje tumora u jednom komadu, očuvanje rubova lezije i precizniju patohistološku analizu. Preliminarni rezultati upućuju na niže stope recidiva i manje perioperativnih komplikacija koristeći ERBT metodu, što predstavlja obećavajuću alternativu konvencionalnom TURBT pristupu (74).

Kod bolesnika sa srednjim i visokim rizikom progresije tumora mokraćnog mjehura, adjuvantna intravezikalna imunoterapija predstavlja terapiju izbora (46). Mikroorganizmi ne samo da mogu utjecati na razvoj tumora mokraćnog mjehura, već također predstavljaju ključnu komponentu njegovog liječenja. Zlatni standard u liječenju mišićno-neinvazivnih TMM-a visokog gradusa predstavlja TURBT u kombinaciji s adjuvantnom intravezikalnom instilacijom *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) cjepiva (12). *Bacillus Calmette-Guérin* cjepivo, primarno razvijeno kao cjepivo protiv tuberkuloze, od 1970.-ih godina predstavlja standardnu intravezikalnu imunoterapiju za visokorizični mišićno-neinvazivni tumor mokraćnog mjehura. Njezin terapijski učinak vjerojatno se temelji na aktivaciji lokalnog imunološkog odgovora, čime se smanjuje učestalost recidiva i usporava napredovanje bolesti. Plan terapije podrazumijeva početnu indukcijsku fazu koja traje šest tjedana, nakon koje slijedi dugotrajna terapija održavanja u trajanju do tri godine. Unatoč kliničkoj učinkovitosti, primjena BCG terapije povezana je s nuspojavama poput simptoma sličnih gripi, iritacije mokraćnog mjehura te, u rijetkim slučajevima, sistemskih infekcija koje zahtijevaju primjenu antibiotika. Globalna nestašica BCG cjepiva dodatno je nametnula potrebu za optimizacijom opisane terapije ili razmatranjem alternativnih terapijskih opcija kod pacijenata sa srednjim rizikom progresije bolesti. Unatoč ovim izazovima, BCG ostaje temeljna komponenta liječenja, dok su daljnja istraživanja usmjerena na individualizaciju terapijskih pristupa s ciljem povećanja učinkovitosti i sigurnosti (75,76).

Radikalna cistektomija (RC) koristi se kao terapijska opcija za pacijente kojima BCG terapija nije učinkovita te predstavlja zlatni standard za liječenje mišićno-invazivnog tumora mokraćnog mjehura. Operacijski protokol podrazumijeva uklanjanje cijelog mokraćnog mjehura, pri čemu se kod muškaraca odstranjuje i prostata, dok se kod žena uklanjaju i maternica, jajnici te dio rodnice. Radikalna cistektomija značajno poboljšava preživljenje u usporedbi s izoliranom kemoterapijom ili radioterapijom. Petogodišnja stopa preživljenja iznosi 62 – 80 % za pacijente sa stadijem II te 0 – 36 % za stadij IV bolesti (77). Iako su

perioperativne komplikacije tijekom posljednjih desetljeća smanjene, morbiditet nakon RC-a i dalje je visok, posebice u kontekstu kompleksnih metoda urinarne derivacije. Ishod zahvata uvelike ovisi o iskustvu kirurga i volumenu izvedenih operacija, a najčešće komplikacije uključuju infekcije, krvarenja, tromboembolijske incidente, ozljede crijeva te disfunkciju deriviranog urinarnog sustava. Kako bi se poboljšali rezultati RC-a, sve veći naglasak stavlja se na standardizaciju definicija komplikacija, sustavno praćenje bolesnika te uspostavu opsežnih baza podataka za evaluaciju dugoročnih ishoda (78).

Parcijalna cistektomija (PC) predstavlja alternativu radikalnoj cistektomiji u 5 – 10 % specifičnih slučajeva, osobito onih s jednim jasno ograničenim tumorom bez prisutnosti CIS-a. Ovaj zahvat omogućuje očuvanje dijela mokraćnog mjehura, čime se smanjuju operativni rizici i komplikacije. Međutim, dugoročna efikasnost PC-a još uvijek nije u potpunosti definirana, zbog čega su potrebna daljanja istraživanja kako bi se preciznije utvrdili kriteriji za odabir bolesnika pogodnih za ovaj pristup (79).

Trimodalna terapija (TMT), koja se sastoji od TURBT-a, radioterapije i kemoterapije, pokušava se češće implementirati u liječenje kao alternativa RC-u (80). Prema istraživanju iz 2017. godine, TMT pristup je rezultirao preživljenjem sličnim kao i kod usporedivih bolesnika koji su bili podvrgnuti tehnici RC-a (81). U studiji koja je obuhvatila 722 bolesnika nije utvrđena značajna razlika u specifičnom preživljenju ili ukupnom preživljenju između ova dva terapijska pristupa, pri čemu je petogodišnja stopa preživljenja u skupini TMT-a iznosila 73 % (82). Daljnji napredak u razvoju radioterapijskih tehnika nove generacije, poput intenzitetom modulirane radioterapije, kao i uključivanje imunoterapije, mogli bi dodatno poboljšati ishode ovog terapijskog pristupa (80,83).

Neoadjuvantna kemoterapija (NKT) ključni je element u liječenju mišićno-invazivnog tumora mokraćnog mjehura, a njezina primjena prije provođenja lokalno-regionalnih zahvata, poput RC-a, značajno poboljšava ukupno preživljenje (84). Prema rezultatima meta-analiza, terapijski protokoli bazirani na cisplatini, uključujući MVAC (metotreksat, vinblastin, doksorubicin i cisplatin) i GC (gemcitabin i cisplatin), značajno smanjuju rizik smrtnosti (85,86). Iako su dugoročni rezultati preživljenja nešto povoljniji kod primjene MVAC protokola, razlike u patološkom odgovoru između MVAC i GC protokola nisu bile statistički značajne. U bolesnika u kojih primjena cisplatine nije opcija, koristi se gemcitabin/karboplatin, premda s nešto slabijim učinkom na ukupno preživljenje (85).

Primjena adjuvantne kemoterapije (AKT) nakon kirurške intervencije pokazuje značajna terapijska poboljšanja. Meta-analiza deset randomiziranih kontroliranih studija utvrdila je da AKT dovodi do apsolutnog povećanja petogodišnjeg ukupnog preživljenja za 6

% te smanjenja rizika smrtnosti za 18 %. Također, AKT pridonosi povećanju preživljenja bez povrata bolesti za 11 % te preživljenju bez metastaza za 8 % (87).

Radioterapija također ima važnu ulogu u liječenju TMM-a, bilo s ciljem izlječenja ili u palijativne svrhe (88). Glavna prepreka preciznoj primjeni zračenja predstavlja varijabilnost položaja tumora te pokretljivost mokraćnog mjehura tijekom terapije (89). Razvoj modernih MR-vođenih tehnika, kao što je hibridni *MR-Linac* sustav koji obuhvaća vizualizaciju magnetnom rezonancom uz linearni akcelerator, omogućuje vizualizaciju tumora u stvarnom vremenu, što ima visok potencijal poboljšanja učinkovitosti i sigurnosti liječenja (90).

Sve donedavno nije bilo značajnijeg napretka u liječenju TMM-a. Međutim, ključan korak naprijed obilježilo je odobrenje imunoterapije za mišićno-neinvazivni i uznapredovali TMM, kao i razvoj ciljanih terapija poput erdafitiniba, inhibitora receptora faktora rasta fibroblasta, te konjugiranog protutijela s lijekom enfortumab vedotinom za uznapredovali TMM (37). Uvođenje imunoterapije, posebice inhibitora imunoloških kontrolnih točaka usmjerenih na PD-1/PD-L1 i CTLA-4, revolucionirali su liječenje uznapredovalog TMM-a. Odobreni lijekovi, poput atezolizumaba, nivolumaba, pembrolizumaba i durvalumaba, primjenjuju se adjuvantno, ali i kao prva linija liječenja (91). Imunoterapija inhibitorima PD-1/PD-L1 pokazala je obećavajuću učinkovitost, međutim, stopa odgovora kod uznapredovalog TMM-a iznosi tek oko 20 % (92). Rezultati studije „*CheckMate 274*“ pokazuju kako adjuvantni nivolumab značajno smanjuje rizik od recidiva, osobito u bolesnika s PD-L1-pozitivnim tumorima (93). Nadalje, iako su u TMM-u identificirane ponavljajuće genomske alteracije, za sada je odobren samo lijek erdafitinib, koji donosi ograničeno poboljšanje kliničkih ishoda, bez potpunog izlječenja (37). Također, za selektivno ciljanje tumorskih stanica razvijeni su i lijekovi tipa konjugiranog protutijela s lijekom, kao što je gore spomenuti enfortumab vedotin koji ciljano djeluje na biomarker nectin-4. Enfortumab vedotin je odobren u trećoj liniji liječenja u bolesnika koji su prethodno primili kemoterapiju i imunoterapiju, a studija „*EV-103*“ ukazuje na obećavajuće rezultate i u neoadjuvantnoj primjeni, s 36,4 % odgovora u skupini MIT-a (94,95). Unatoč opisanom potencijalu, razvoj terapijskih rješenja je još uvijek ograničen, pa uznapredovali TMM i dalje uglavnom bude neizlječiv (37).

1.1.7. Preklinički modeli za istraživanje tumora mokraćnog mjehura

Za preklinička istraživanja razvoja tumora mokraćnog mjehura, kao i rezistencije te odgovora na terapiju, koristi se širok spektar eksperimentalnih modela (96). Ovi modeli

uključuju *in vitro* stanične, *in vivo* životinjske te *in silico* računalne modele, pri čemu svaki od navedenih pristupa ima specifične prednosti i ograničenja (96,97).

In vitro modeli, uključujući stanične linije tumora mokraćnog mjehura i organoide, omogućuju kontrolirane uvjete za analizu razvoja i progresije tumora te procjenu terapijskih odgovora (97). Stanične linije, poput T24 (prijelazni karcinom visokog gradusa), 5637 (površinski karcinom), UM-UC-3 (mišićno-invazivni karcinom), RT4 (tumor niskog gradusa), J82 (invazivni karcinom visokog gradusa) i MB49 (mišja stanična linija), široko se primjenjuju u genetskim i farmakološkim studijama zbog mogućnosti precizne molekularne manipulacije. Ove stanične linije ključne su u istraživanjima utišavanja i prekomjerne ekspresije gena (tehnologijama CRISPR i siRNA), probiru lijekova te analizi ključnih onkogenih mutacija, uključujući one u genima *FGFR3*, *TP53* (98). Trodimenzionalni organoidi tumora mokraćnog mjehura predstavljaju napredne *in vitro* modele koji bolje oponašaju fiziološke karakteristike tumora u usporedbi s dvodimenzionalnim kulturama. Organoidi, derivirani iz uzoraka tumora pacijenata ili matičnih stanica, održavaju tumorsku heterogenost i genetsku raznolikost. Imaju važnu ulogu u personaliziranoj medicini, posebice u testiranju lijekova prilagođenih pacijentima i proučavanju terapijske rezistencije (99). Također, omogućuju istraživanja tumorskog mikrokoliša putem ko-kultura s imunim ili stromalnim stanicama, a primjenjuju se i u analizama mehanizama rezistencije na lijekove, evolucije tumora i stanične plastičnosti (100,101).

In vivo modeli, osobito životinjski modeli, omogućuju proučavanje nastanka i progresije tumora mokraćnog mjehura, metastatskog potencijala i odgovora na terapiju unutar fiziološkog konteksta. Kemijski inducirani modeli, poput BBN (N-butil-N-(4-hidroksibutil)nitrozamin) i MNU (N-methyl-N-nitrosourea) modela, često se koriste za istraživanja karcinogeneze i kemoprevencije (97,102). MNU model inducira tumor visokog gradusa intravezikalnom instilacijom, simulirajući mutacije u genima *TP53* i *RBI*, koje su karakteristične za mišićno-invazivni tumor mokraćnog mjehura (102).

Mišji model karcinogeneze mokraćnog mjehura induciran N-butil-N-(4-hidroksibutil)nitrozaminom jedan je od najčešće korištenih prekliničkih modela za istraživanje nastanka i progresije TMM-a (103). BBN, inače prisutan u duhanskom dimu, specifični je karcinogen mokraćnog mjehura koji u miševa izaziva invazivne tumore visokog gradusa (104–107). BBN je indirektni karcinogen, što znači da se konvertira u N-butil-N-(3-karboksipropil)nitrozamin (BCPN) putem alkohol/aldehid dehidrogenaze, što dovodi do alkilacije DNA, akumulacije mutacija i razvoja mišićno-invazivnog TMM-a (108,109). Donedavno se smatralo kako se opisana konverzija događa samo u jetri i mokraćnom mjehuru,

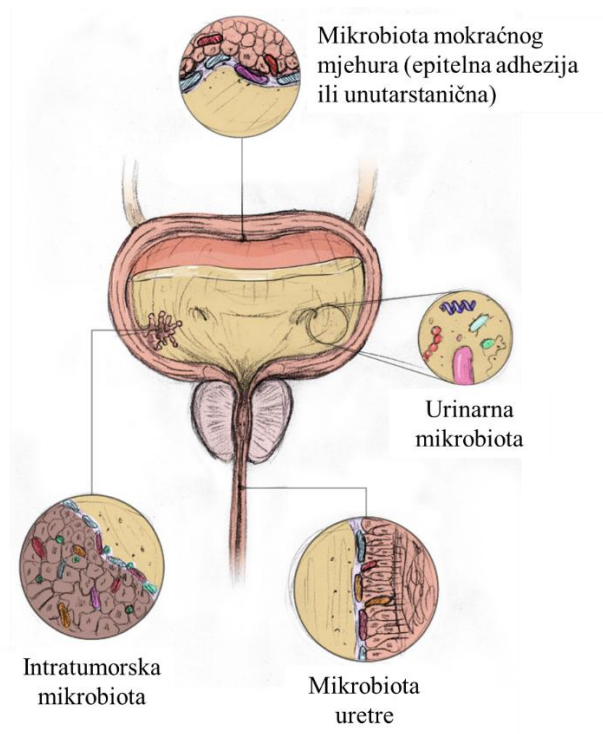
međutim prošlogodišnje istraživanje dokazuje prominentnu ulogu crijevne mikrobiote u metabolizmu karcinogena, točnije pretvorbi BBN-a u BCPN (110). Patohistološka i molekularna obilježja tumora izazvanih BBN-om nalikuju ljudskom mišićno-invazivnom TMM-u, što ovaj model čini iznimno korisnim za translacijska istraživanja (96,107,111). Standardni protokoli uključuju primjenu BBN-a putem vode za piće u koncentracijama od 0,05 – 0,1 % tijekom 12 tjedana, dok se tumori obično razvijaju oko 20 tjedana nakon početka tretmana. Alternativne metode uključuju oralnu aplikaciju putem sonde, tzv. gavaža, ili intravezikalne instilacije, pri čemu prvi pristup može izazvati aspiracijsku pneumoniju, dok je drugi ograničen uglavnom na ženke miševa (103,106,107,112).

Modeli koji se baziraju na ksenograftima omogućuju istraživanje ljudskih stanica tumora mokraćnog mjehura u imunodeficientnim miševima. Potkožni ksenografti, kojima se ljudske stanične linije ubrizgavaju potkožno, omogućuju praćenje rasta tumora, međutim ne odražavaju u potpunosti tumorski mikrokoliš. Ortotopski ksenografti, u kojima se stanice tumora ubrizgavaju izravno u mokraćni mjehur miša, bolje odražavaju tumorsku invaziju i interakcije s imunološkim sustavom, ali zahtijevaju napredne metode snimanja, poput bioluminiscencije. Ksenografti derivirani iz pacijenata temelje se na presađivanju tumorskog tkiva pacijenata u imunodeficientne miševе, čime se održavaju genetske karakteristike izvornog tumora (97,113,114). Modeli genetski modificiranih miševa omogućuju istraživanje specifičnih genetskih promjena povezanih s tumorom mokraćnog mjehura. Mišji modeli bazirani na novoj CRISPR tehnologiji omogućuju izravno uvođenje mutacija detektiranih u pacijenata u urotel miša, čime se postiže veća preciznost u istraživanju onkogenetskih mehanizama i terapijskih intervencija (97,115).

In silico modeli koriste računalne programe koji služe obradi i objedinjavanju rezultata iz područja genomike, transkriptomike i proteomike, u svrhu analize tumora mokraćnog mjehura na sistemskoj razini (116). Bioinformatičke i genomske analize (npr. sekvenciranje cijelog egzoma/genoma) omogućuju identifikaciju ključnih mutacija u tumorima mokraćnog mjehura. RNA sekvenciranje, uz pripadajuću bioinformatičku obradu podataka, omogućuje usporedbu profila ekspresije gena zdravog i maligno alteriranog tkiva, čime se identificiraju novi terapijski ciljevi (117). Nadalje, razvoj umjetne inteligencije i strojnog učenja unaprijedio je istraživanja temeljena na molekularnom „*docking-u*“, ubrzavajući otkriće novih terapijskih spojeva te ciljajući proteine povezane s tumorom mokraćnog mjehura (118,119).

1.2. Mikrobiota i tumori

U novije vrijeme sve više dolazi do izražaja važnost mikrobiote u razvoju različitih vrsta tumora (120). Mikrobiota predstavlja skup živih mikroorganizama prisutnih u određenom okolišu, dok je mikrobiom širi pojam koji se odnosi na cjelokupni genetski materijal tih mikroorganizama, uključujući i strukturne komponente mikrobiote, metaboličke produkte te pripadajuće okolišne uvjete (121). Iako se najčešće veže uz gastrointestinalni trakt, drugi organski sustavi također imaju svoju mikrobiotu, a danas je poznat i utjecaj primjerice gastrointestinalne mikrobiote na udaljene organe, poput mokraćnog mjehura. Time je nastao pojam tzv. osovine, primjerice osovina crijevo-mozak ili osovina mokraćni mjehur-crijevo-mozak (122). Istraživanja pokazuju da mikrobne zajednice mogu djelovati na proces karcinogeneze putem izazivanja upalnih reakcija, modulacije imunološkog odgovora, te metabolizma genotoksičnih spojeva (110,123–126). IARC je do sada kategorizirao 11 mikroorganizama na listu kancerogenih tzv. onkomikroba (127). Radi se o sedam virusa (humani papiloma virus, virusi hepatitisa B i C, humani T-limfotropni virus, *Epstein-Barr* virus, humani herpes virus 8, virus Merkelovih stanica), tri parazita (*Schistosoma haematobium*, *Clonorchis sinensis* i *Clonorchis murus*) te bakteriji *Helicobacter pylori* (128). Posebno je važno istaknuti otkriće da i mokraćni mjehur posjeduje vlastitu mikrobiotu, čime je otvorena nova dimenzija istraživanja patofiziologije nastanka i progresije tumora mokraćnog mjehura (Slika 5) (14).



Slika 5. Različita sijela mikrobiote povezana s onkogenezom tumora mokraćnog mjehura.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Heidar NA, Bhat TA, Shabir U, Hussein AA. The Urinary Microbiome and Bladder Cancer. *Life*. 2023;13:812. Licenca: CC BY 4.0.)

Nove spoznaje omogućio je brz razvoj tehnologija nove generacije koje se temelje na molekularnoj analizi genoma, ali i drugih funkcionalnih domena mikrobioma, pri čemu govorimo o tzv. „omics“ metodama. U istraživanju mikrobioma koristi se niz metoda koje omogućuju identifikaciju, kvantifikaciju i funkcionalnu analizu mikroorganizama (129). Tradicionalne metode kultivacije, iako i dalje korisne za izolaciju živih mikroorganizama i njihovu daljnju fenotipsku i genetsku karakterizaciju, imaju značajna ograničenja jer velik broj mikroba nije kultivabilan standardnim tehnikama. Mikroskopske metode, poput bojenja po Gramu i fluorescencijske *in situ* hibridizacije (FISH), omogućuju vizualizaciju mikroorganizama u uzorcima bez potrebe za uzgojem, pri čemu se FISH oslanja na fluorescentno-obilježene sonde koje se specifično vežu na mikrobnu DNA ili RNA (130–132). Metode temeljene na analizi nukleinskih kiselina, točnije, sekvenciranje nove generacije (NGS, engl. *Next Generation Sequencing*), postalo je zlatni standard u istraživanju mikrobioma. Među NGS metodama, sekvenciranje bakterijskog gena za 16S rRNA je pristupačna i široko korištena metoda određivanja bakterijskih vrsta i arheje, dok cjelogenomsko sekvenciranje (engl. *shotgun sequencing*) podrazumijeva određivanje različitih mikroba prisutnih u uzroku (133). Gen za 16S rRNA kodira 16S ribosomalnu RNA koja je sastavni dio male podjedinice

bakterijskog ribosoma (30S). Ovaj gen je visoko konzerviran zbog svoje esencijalne uloge, no istovremeno sadrži i devet hipervarijabilnih regija koje omogućuju filogenetsku analizu i taksonomsku klasifikaciju bakterija. U većini slučajeva, sekvenciranje jedne ili više takvih regija dostatno je za identifikaciju mikroorganizama do razine roda (134–136). S obzirom da 16S rRNA sekvenciranje nije kvantitativna metoda, nije moguće odrediti apsolutnu količinu nekog taksona u uzorku, međutim taksoni se mogu uspoređivati u relativnim odnosima. Prije su se dobiveni rezultati obično iskazivali u obliku operativnih taksonomskih jedinica (OTU, engl. *operational taxonomic units*), koje predstavljaju skupove sekvenci s visokom razinom sličnosti, međutim danas se sve češće koristi pojam varijante sekvenciranog amplikona (ASV, eng. *amplicon sequencing variant*) koja podrazumijeva da svaka jedinstvena sekvenca, makar se razlikovala od ostalih u samo jednoj bazi, potencijalno predstavlja jedinstveni takson, čime se izbjegava problem različitog klasteriranja koji je prisutan u OTU metodi (137,138). Alternativno, za sveobuhvatniju identifikaciju mikrobioloških zajednica u uzorcima koristi se cjelogenomsko ili *shotgun* metagenomsko sekvenciranje. Za razliku od ciljane amplifikacije gena za 16S rRNA, ova metoda omogućuje analizu kompletne mikrobne DNA i time omogućuje detekciju širokog spektra mikroorganizama, kao i identifikaciju funkcionalnih gena odgovornih za npr. otpornost na antibiotike, virulenciju ili metaboličke funkcije (139). Za razumijevanje funkcionalne aktivnosti mikrobiote sve se više koriste višedimenzionalni tzv. „*omics*“ pristupi. Metatranskriptomika omogućuje uvid u ekspresiju gena i aktivne metaboličke puteve u trenutku uzorkovanja, metaproteomika analizira ukupne proteine koje proizvodi mikrobna zajednica, dok metabolomika ispituje profile metabolita koje proizvodi mikrobiota, uključujući kratkolančane masne kiseline i druge biološki aktivne spojeve (129).

Kompleksni podaci dobiveni ovim metodama analiziraju se pomoću sofisticiranih bioinformatičkih alata, poput QIIME2 platforme, DADA2, Kraken2 i sličnih, koji omogućuju taksonomsku klasifikaciju, procjenu mikrobne raznolikosti, a određeni programi i predikciju funkcionalnih svojstava zajednica (140).

Mikrobiota čovjeka obuhvaća milijarde mikroorganizama koji naseljavaju kožu, probavni sustav, dišne puteve i genitourinarni sustav. Iako se mokraćni mjehur donedavno smatrao sterilnim, suvremene metode kao što su 16S rRNA sekvenciranje otkrile su postojanje raznolike urinarne mikrobiote. Ovo otkriće dovelo je do brojnih istraživanja o njezinoj ulozi u zdravlju i bolestima mokraćnog sustava, uključujući i tumor mokraćnog mjehura (14,141). Razvoj tumora mokraćnog mjehura rezultat je složene interakcije genetskih, okolišnih i imunoloških čimbenika (142). Mikrobiota, kao dinamičan čimbenik, može utjecati na sve faze tumorske biologije – od inicijacije do progresije i terapijskog odgovora (143).

1.2.1. Utjecaj mikrobiote na imunološki sustav

Mikrobiota predstavlja ključan obrambeni element u interakciji između domaćina i okoliša, posebice na mukoznim površinama, gdje sudjeluje u održavanju integriteta epitelne barijere, inhibiciji patogena i regulaciji lokalne imunosti. Narušavanjem tih barijera, bilo oštećenjem epitela, disbalansom mikrobiote i sl., može doći do izaženijeg kontakta mikroorganizama s imunološkim sustavom domaćina, poticanja upalnog procesa i stvaranja okoliša pogodnog za karcinogenezu (127,144). Mikrobiota snažno utječe na funkcioniranje urođenog i stečenog imuniteta, a određeni mikrobi i njihovi produkti mogu potaknuti aktivaciju dendritičkih stanica, limfocita T i stanica prirodnih ubojica, čime dolazi do značajne imunološke aktivacije (144). Jedan od ključnih mehanizama kojim mikroorganizmi pridonose razvoju tumora je poticanje dugotrajne, odnosno kronične upale. Uloga receptora prirođene imunosti, posebice receptora sličnih Toll-u (engl. *Toll-like receptors*, TLR) i receptora sličnih NOD-u (engl. *Nod-like receptors*, NLR), dodatno naglašava povezanost mikrobiote i karcinogeneze (145). TLR-ovi prepoznaju mikrobne molekule tzv. molekularne obrasce povezane s patogenom (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), kao i endogene molekularne obrasce povezane s oštećenjem (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP). Aktivacija TLR-a, osobito receptora TLR4 (receptora za lipopolisaharid ili LPS), pokreće kaskadu signalnih puteva uključujući NF- κ B i STAT3, koji induciraju ekspresiju citokina i antiapoptotskih gena (144,146). Slično tome, NLR receptori, kao što su NOD1 i NOD2, djeluju intracelularno prepoznajući bakterijske peptide. Njihova disfunkcija narušava imunološku homeostazu te potiče upalu i tumorigenezu (147). U tom kontekstu, imunološki sustav reagira pojačanom produkcijom proupalnih citokina poput IL-1, TNF- α , IL-6 i IL-23, što dovodi do aktivacije ključnih transkripcijskih faktora poput NF- κ B, AP-1 i STAT3. Ovi signalni putevi ne samo da održavaju upalni odgovor, već i promiču proliferaciju stanica, angiogenezu te inhibiciju apoptoze, procese koji su ključni za inicijaciju i progresiju tumora. Kronična aktivacija imunološkog sustava posljedično dovodi do stvaranja reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih spojeva (RNS) koji oštećuju DNA stanica domaćina (145).

Značajan primjer karcinogeneze posredovane mikroorganizmima je *Helicobacter pylori*, čija kronična kolonizacija želuca rezultira aktivacijom imunološkog odgovora, epitelnom proliferacijom, stvaranjem ROS-a i kroničnim gastritisom, a to su sve čimbenici koji povećavaju rizik razvoja karcinoma želuca (148). Također, *Fusobacterium nucleatum*, koji je često prisutan u tumorima kolona, potiče ekspresiju proupalnih gena i smanjuje antitumorski imunosni nadzor (149).

1.2.2. Stvaranje kancerogenih metabolita

Mikroorganizmi mogu proizvoditi kancerogene tvari, putem različitih metaboličkih procesa, koje mogu oštetiti DNA domaćina, modulirati signalne putove ili utjecati na imunološki sustav na način koji pogoduje razvoju tumora (150). Među opisanim procesima za istaknuti je metabolizam prehranbenih ili endogenih tvari u spojeve s kancerogenim svojstvima, poput konverzije primarnih žučnih kiselina u sekundarne. Primjerice deoksikolna i litokolna kiselina mogu izazvati oksidativni stres, oštećenje DNA te pospješiti razvoj kolorektalnog i hepatobilijarnog karcinoma (151). Ksenobiotici su tvari koje se ne proizvode u organizmu već dopijevaju u krvotok egzogenim unosom kroz različite organske sustave (152). Bakterije mogu metabolizirati ksenobiotike u štetne spojeve i tako utjecati na razvoj tumora lokalno ili u udaljenim tkivima. Roje i sur. pokazali su kako crijevna mikrobiota može pretvoriti okolišne kancerogene tvari u genotoksične molekule koje putem krvi dolaze do mokraćnog mjehura i tamo potiču razvoj tumora (110). Stoga, promjene u sastavu crijevnih mikrobiota (npr. uslijed prehrane ili uporabe antibiotika) mogu imati sistemski učinak, kako zaštitini tako i primjerice mogu potaknuti karcinogenezu u udaljenim dijelovima (110).

Određene bakterije, prvenstveno u crijevima, pretvaraju nitrite i nitrane iz hrane ili egzogenih kemijskih spojeva u nitrozamine, snažne kancerogene tvari povezane s nastankom raka želuca, jednjaka i mokraćnog mjehura. Također, neki mikroorganizmi izravno proizvode genotoksine, poput kolibaktina kojeg proizvode određeni sojevi *Escherichie coli*, a uzrokuju dvostruke prekide DNA lanca i dovode do genomske nestabilnosti. Slično tome, citoletalni toksin, kojeg proizvode *Campylobacter* i *Helicobacter* vrste, ometa popravak DNA i regulaciju staničnog ciklusa, što može rezultirati malignom transformacijom (153–155). Mikroorganizmi također potiču stvaranje reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, bilo izravno ili stimulacijom imunološkog odgovora, a kronična izloženost tim spojevima dovodi do oštećenja DNA, lipidne peroksidacije i akumulacije mutacija u epitelnim stanicama. Pored toga, mikrobnih metaboliti mogu epigenetski utjecati na ekspresiju gena domaćina inhibicijom histonskih deacetilaza djelovanjem butirata, kao i promjenama u metilaciji DNA koje rezultiraju utišavanjem tumorsupresorskih gena ili aktivacijom onkogenih (127).

1.2.3. Intratumorska mikrobiota

Intratumorska mikrobiota, odnosno mikroorganizmi koji se nalaze unutar tumorskih tkiva, predstavlja relativno novo područje u istraživanjima raka. Cao i sur. ističu kako prisutnost mikroba unutar tumora može utjecati na lokalni imunitet, angiogenezu i otpornost tumora na liječenje (156). Različiti mikroorganizmi, uključujući bakterije, gljive i viruse, mogu biti prisutni unutar različitih tipova tumora, poput kolorektalnog karcinoma, tumora dojke, pluća i gušterače. Ovi mikrobi mogu se nalaziti unutar tumorskih stanica, ali mogu biti i dio tumorskog mikrokoliša (157). Karakteristična tumorska obilježja poput hipoksije, narušenih epitelnih barijera i nekroze mogu pogodovati kolonizaciji i opstanku mikroorganizama. Dok određeni mikrobi moduliraju imunološki odgovor, potičući supresivne populacije stanica poput T regulatornih stanica ili mijeloidnih supresivnih stanica, neki mogu poboljšati prezentaciju antigena i antitumorsku imunost (158). Neki mikroorganizmi mogu deaktivirati kemoterapeutike ili stvoriti uvjete nepovoljne za djelovanje imunoterapije. Bakterijski enzimi mogu razgraditi lijekove, dok disbioza može smanjiti učinkovitost imunoterapijskih protokola (159). Na primjer, *Gammaproteobacteria* unutar tumorskog tkiva može inaktivirati kemoterapeutike poput gemcitabina, smanjujući njihovu učinkovitost (160). Osim toga, intratumorske bakterije mogu ometati prezentaciju tumorskih antigena i time utjecati na djelovanje imunoterapije (159). Mikrobi također mogu utjecati na rast i metastaziranje tumora putem svojih metabolita ili modifikacije onkogenih puteva kao što su Wnt/ β -catenin i NF- κ B signali putevi (161). Razumijevanje intratumorske mikrobiote otvara nove mogućnosti za razvoj biomarkera koji mogu pomoći u razvrstavanju pacijenata prema prognozi ili vjerojatnom odgovoru na terapiju, kao i za razvoj novih terapijskih opcija poput modulacije mikrobiote (156).

1.2.4. Urinarna mikrobiota i tumor mokraćnog mjehura

Sastav i funkcija urinarne mikrobiote sve se više istražuje u kontekstu patogeneze tumora mokraćnog mjehura. Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da smanjenje mikrobiološke raznolikosti i dominacija potencijalno štetnih taksona značajno doprinose razvoju TMM-a (14,162,163). U zdravih osoba „fiziološku“ floru mokraćnog mjehura na taksonomskoj razini koljena (engl. *phylum*) pretežno čine *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* i *Proteobacteria*, pri čemu se na taksonomskoj razini roda (engl. *genus*)

fiziološka flora među spolovima razlikuje, najvjerojatnije zbog anatomske i hormonske čimbenika. Kod žena su više zastupljeni rodovi *Lactobacillus*, *Prevotella* i *Streptococcus*, s tim da je veća zastupljenost i korist roda *Lactobacillus* potvrđena u više studija (164–167). Za razliku od navedenog, u pacijenata s tumorom mokraćnog mjehura primjećuje se značajna promjena u raznolikosti i sastavu mikrobiote, poznato kao disbioza, koja može pogodovati razvoju kronične upale i nastanku tumora, pri čemu se u brojnim studijama dosljedno bilježi pad udjela rodova *Firmicutes*, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, koji su poznati po održavanju integriteta epitelnih barijera i poticanju imunološkog odgovora te značajan porast zastupljenosti koljena *Proteobacteria*. Također, patogeni rodovi poput *Escherichia*, *Shigella*, *Acinetobacter* i *Fusobacterium* češće su prisutni u tumorskim tkivima, što ukazuje na njihovu ulogu u razvoju tumora (14,163,168–171). Navedene promjene mikrobiote mogu poticati tumorigenezu kroz nekoliko prethodno opisanih, međusobno povezanih mehanizama. Primjerice, urinarna mikrobiota ima imunomodulacijski učinak pa tako vrste poput *Lactobacillus* potiču aktivaciju dendritičkih stanica i citotoksičnih limfocita T, dok patogene bakterije mogu suprimirati imunološke funkcije, omogućujući tumorima da izbjegnu imunološko prepoznavanje (172). *Escherichia* proizvodi genotoksin kolibaktin koji oštećuje DNA, *Acinetobacter* se veže uz upalne procese i često se izolira iz urina bolesnika s tumorom, a *Fusobacterium* može aktivirati prokarcinogene putove i olakšati mehanizme imunološkog izbjegavanja. Noviji dokazi također upućuju na ulogu rodova *Enterococcus* i *Klebsiella* u stvaranju mikrookoliša pogodnog za razvoj tumora djelovanjem na upalne signalne putove i stvaranjem biofilma (149,153,163,173).

S kliničkog aspekta, promjene u sastavu i raznolikosti mikrobiote predstavljaju obećavajuće biomarkere za neinvazivnu dijagnostiku i rano otkrivanje TMM-a (174). Primjerice, smanjena zastupljenost roda *Lactobacillus* uz povećanje zastupljenosti koljena *Proteobacteria* mogli bi služiti kao indikator moguće onkogeneze u mokraćnom mjehuru. Razumijevanje dinamike promjena i interakcija između urinarne mikrobiote i staničnih mehanizama otvara nove perspektive za unapređenje prevencije, dijagnostike i liječenja TMM-a. Tehnike poput sekvenciranja gena za 16S rRNA i metagenomskog profiliranja trenutno se pokušavaju implementirati u dijagnostički protokol za otkrivanje TMM-a kako bi se s dovoljnom osjetljivošću i specifičnošću detektirale opisane promjene urinarne mikrobiote (170–172,175).

1.2.5. Utjecaj mikrobiote na odgovor tumora mokraćnog mjehura na terapiju

Nove studije pokazuju da crijevna i urinarna mikrobiota imaju ključnu ulogu u modulaciji učinkovitosti terapija TMM-a, uključujući inhibitore imunoloških kontrolnih točaka (ICI), kemoterapiju i intravezikalnu BCG terapiju. Posebno crijevna mikrobiota utječe na sustavne imunološke odgovore koji su ključni za djelotvornost ICI terapije (176–179). Određene komensalne bakterije poput *Bifidobacterium* i *Parabacteroides distasonis* pokazale su sposobnost osnaživanja antitumorske imunosti aktivacijom dendritičkih stanica, poticanjem citotoksičnih T-stanica i povećanjem izlučivanja Th1 citokina. Studije na životinjama dodatno podupiru ove nalaze, pokazujući da oralna primjena ovih sojeva poboljšava kontrolu tumora i može djelovati sinergijski s blokadom PD-L1 (179,180).

Slično tomu, crijevna mikrobiota utječe i na ishode liječenja neoadjuvantnom kemoterapijom kod pacijenata s MIT-om, ali također i s drugim tumorima. Mikrobiota pacijenata koji reagiraju na terapiju bogatija je rodovima *Ruminococcus* i *Akkermansia*, dok osobe kod kojih terapija nije bila učinkovita pokazuju veću zastupljenost rodova *Bacteroides* i *Clostridium*. Ove razlike povezane su s promjenama u imunološkim signalnim putovima, što sugerira da profiliranje mikrobiote potencijalno može biti pouzdaniji prediktor odgovora na terapiju od tradicionalnih kliničkih markera (181–183).

Sastav urinarne mikrobiote u MNIT-u također utječe na odgovor na BCG terapiju. Veća zastupljenost vrsta unutar roda *Lactobacillus* povezana je s boljim terapijskim ishodima, vjerojatno zbog poboljšanog imunološkog odgovora i produkcije citokina. Suprotno tome, povećana prisutnost koljena *Proteobacteria* i roda *Fusobacterium* povezana je s rezistencijom na BCG terapiju i recidivom bolesti. Preklinički modeli upućuju na snažniji antitumorski učinak pri intravezikalnoj primjeni i probiotičkih sojeva poput *Lactobacillus casei Shirota* u odnosu na samu BCG terapiju (14,184–187).

Strategije koje se trenutno istražuju uključuju primjenu oralnih ili intravezikalnih probiotika, modificiranih bakterijskih vektora za isporuku antigena te transplantaciju fekalne mikrobiote (FMT), koja je predmet istraživanja usmjerenih na poboljšanje odgovora na ICI terapiju. Sveukupno, integracija modulacije mikrobiote u protokole liječenja tumora mokraćnog mjehura predstavlja obećavajuće područje precizne onkologije s potencijalom za poboljšanje terapijskih ishoda, smanjenje nuspojava i prevladavanje mehanizama rezistencije (179,188).

1.3. Receptori slični Toll – u (engl. *Toll – like receptors*, TLR)

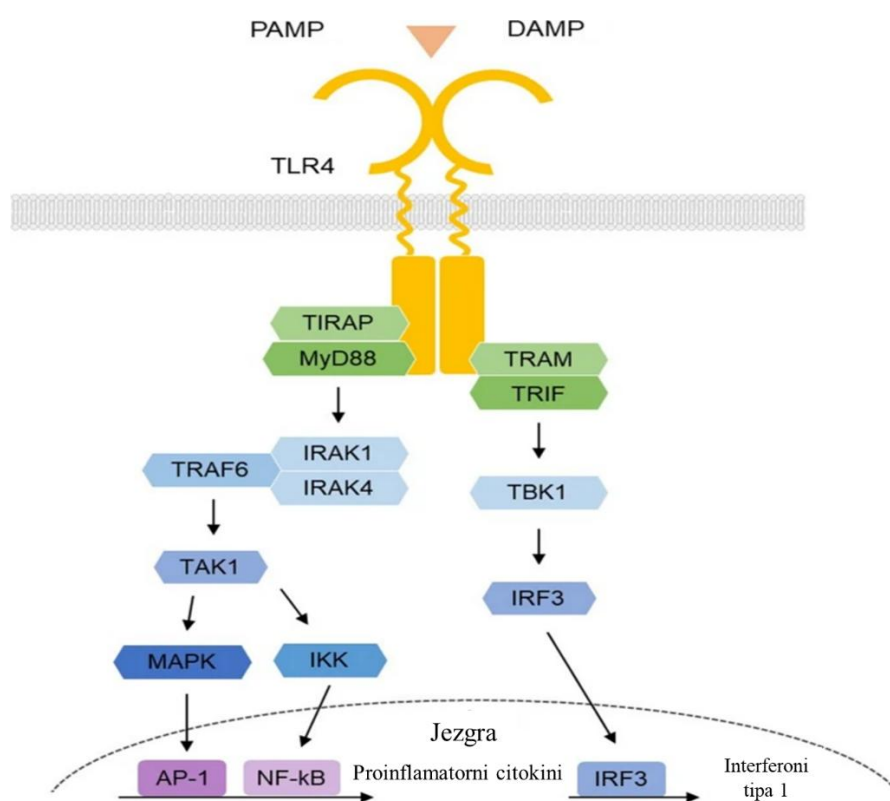
Razvoj metoda sekvenciranja nove generacije (189) omogućio je nova saznanja o mikrobiomu tkiva i urina bolesnika s tumorom mokraćnog mjehura (14,190), čime sve veću važnost dobivaju istraživanja uloge mikrobiote, odnosno TLR-ova i signalnih molekula koje prenose mikrobne signale unutar stanice u razvoju TMM-a (127,191,192).

Receptori slični Toll-u su strukturni receptori za prepoznavanje mikrobnih molekularnih obrazaca (engl. *pattern recognition receptor*), eksprimirani na epitelnim stanicama, dendritičkim stanicama, monocitima, makrofazima, stanicama prirodnim ubojicama, granulocitima, limfocitima T i limfocitima B, te su sposobni za iniciranje prirodnih imunih odgovora (193). TLR-ovi su transmembranski proteini koji prepoznaju širok spektar liganada patogena, poput bakterijskih lipopolisahadida, virusne RNA i DNA, flagelina te različitih liganada domaćina koji nastaju raspadanjem stanica. Vezanjem liganda za odgovarajući TLR, pokreću se kontrolirani signalni putovi koji dovode do odgovora domaćina koji je potreban za eliminaciju patogena, ali potiču i sazrijevanje dendritičkih stanica koje pokreću aktivaciju staničnog imunološkog odgovora. Nekontrolirana i pretjerana aktivnost pojedinih TLR-ova povezuje se s patogeneзом infektivnih, kroničnih upalnih i autoimunih bolesti (194). Receptori slični Toll-u, ovisno o svojoj lokalizaciji i funkciji u stanici domaćina, klasificiraju se na membranske i unutarstanične receptore. Membranski TLR-ovi, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10 te njihovi dimeri TLR1/TLR2, TLR2/TLR6, TLR2/TLR4/5/10, omogućuju prepoznavanje i vezanje s vanjskim ligandima. Unutarstanični TLR-ovi, TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9, nalaze se na membranama unutarstaničnih organela poput endoplazmatskog retikuluma, endosoma i lizosoma. Ovi receptori prepoznaju mikrobne nukleinske kiseline, ključne za imunološku detekciju virusnih i bakterijskih infekcija unutar stanice (195). Svaki član TLR obitelji receptora pokazuje specifičnost za određene ligande te ima funkcionalnu ulogu u inicijaciji urođenog imunološkog odgovora. TLR receptori omogućuju domaćinu prepoznavanje molekularnih obrazaca povezanih s patogenom, tzv. PAMP, koji uključuju raznolike strukture poput lipopolisaharida, bakterijskog flagelina, glikoproteina, virusne DNA i RNA, te drugih mikrobnih komponenti (196). TLR-ovi ne samo da prepoznaju patogene ligande, već reagiraju i na endogene molekularne obrasce povezane s oštećenjem vlastitih stanica, tzv. DAMP, uključujući proteine koji se oslobađaju nakon raspada stanica, kao što su HMGB1, surfaktantni protein A, fibrinogen, te proteini toplinskog šoka (Hsp) poput Hsp60, Hsp70 i Hsp90. Interakcija liganda s odgovarajućim TLR-om određena je visokom razinom molekularne specifičnosti. Aktivacija TLR-a djeluje kao obrambeni

mehanizam domaćina protiv infekcija i oštećenja tkiva, pokrećući signalnu kaskadu koja vodi do sekrecije različitih upalnih citokina i aktivacije imunoloških stanica (197,198).

1.3.1. Građa i signalizacija TLR4 receptora

Gen *TLR4* se nalazi na kratkom kraku kromosoma 9 i kodira sintezu receptora sličnog Toll-u 4 koji je prvi identificirani član obitelji TLR-ova (194). Receptor sličan Toll-u 4 je transmembranski protein sastavljen od tri domene (Slika 6). Izvanstanična domena je građena od ponavljajućih sekvenci bogatih leucinom pri čemu svaka sekvenca sadrži 20 – 29 aminokiselinskih ostataka, koje omogućuju specifična mjesta za interakciju s ligandima (199). Na nju se nadovezuje transmembranska domena, a s citoplazmatske strane se nalazi unutarstanična domena koja je visoko homologna domeni receptora iz obitelji IL1, zbog čega se naziva i TIR domena (engl. *Toll/IL1 receptor domain*). Unutarstanični dio receptora TLR4 je ključan za inicijaciju signalnih kaskada nakon prepoznavanja patogenih elemenata (200).



Slika 6. Signalizacijski put receptora TLR4 ovisan i neovisan o signalnoj molekuli MYD88. (Preuzeto i prilagođeno prema: Kim HJ, Kim H, Lee JH, Hwangbo C. Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging. *Immun Ageing*. 2023;20:67. Licenca: CC BY 4.0.)

TLR4 je ključni član prirođenog imunološkog odgovora te se aktivira raznim ligandima koji se klasificiraju kao PAMP-ovi i DAMP-ovi. TLR4, zajedno sa svoja dva koreceptora, mijeloidnim antigenom diferencijacije (MD2) i proteinom CD14, formira trimerni receptor koji je uključen u prepoznavanje PAMP-ova, primjerice lipopolisaharida Gram-negativnih bakterija. Među ostalim, TLR4 sudjeluje i u imunološkom odgovoru domaćina na pneumolizin, virulencijski čimbenik *Streptococcus pneumoniae*, kao i na strukturne proteine respiratornog sincicijskog virusa (201–203). Među DAMP-ovima, TLR4 prepoznaje endoplasmin, fibrinogen, fibronektin, heparan sulfat, HMGB1, Hsp22, Hsp60, Hsp70, Hsp72, hijaluronan, rezistin, surfaktantni protein A i tenascin-C (197).

Nakon aktivacije TLR4, unutarstanična TIR domena pokreće signalni put ovisan i neovisan o mijeloidnom diferencijacijskom faktoru 88 (MYD88) (Slika 6) (204). Signalna molekula MYD88 služi kao adaptor za daljnju aktivaciju signalnog puta svih TLR-ova, osim TLR3. Dimerizacija TIR domene dovodi do regrutacije proteina MYD88 i TIRAP, čime se potiče signalizacija putem proteina IRAK njihovom fosforilacijom. IRAK pripada skupini serin-treonin kinaza koje se vežu uz IL1 receptor putem TIR domene. U IRAK obitelji ubrajaju se IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4 i IRAK-M. Od navedenih, samo IRAK-1 i IRAK-4 posjeduju očuvani katalitički aspartatni ostatak neophodan za kinaznu aktivnost, dok je on nefunkcionalan u IRAK-2 i IRAK-M, što sugerira da potonji imaju ograničenu ili alternativnu funkciju u signalizaciji. Nakon aktivacije TLR-a, IRAK-4 fosforilira i aktivira IRAK-1, čime djeluje kao ključni regulator u prijenosu signala unutar TLR signalnog puta. Aktivirani IRAK1 veže se na protein TRAF6 koji pripada obitelji čimbenika vezanih za receptor TNF. Nakon aktivacije TLR4 receptora i regrutacije adapterih signalnih molekula, kompleks IRAK-1/TRAF6 se disocira s receptorskog mjesta te stupa u interakciju s kinazom TAK1 i njezinim regulatornim vezujućim proteinima TAB1, TAB2 i TAB3. Aktivacija TAK1 dovodi do fosforilacije nizvodnih efektorskih molekula, uključujući protein-kinazu aktiviranu mitogenom (MAPK), poput JNK, ERK1/2 i p38, kao i I κ B kinaznog (IKK) kompleksa. Posljedična aktivacija ključnih transkripcijskih faktora, kao što su AP-1 i NF- κ B inducira transkripciju proinflamatornih citokina te tako koordinira upalni odgovor (Slika 6) (198,205).

Vezanjem specifičnog liganda za TLR4 može se pokrenuti i put neovisan o MYD88 unutarstaničnoj signalizaciji. Aktivira se povezivanjem TIR domene s adaptorskim molekulama TRIF (engl. *TIR domain containing adaptor protein inducing IFN- β*) i TRAM (engl. *TRIF-related adapter molecule*). TRAM regrutira adaptorsku molekulu TRIF, koja potom putem TRAF3 aktivira kinazu TBK1 (engl. *TRAF-family member-associated NF- κ B activator binding kinase 1*). TBK1 pripada skupini inducibilnih kinaza, koje izravno

fosforiliraju transkripcijske faktore IRF3 i IRF7 (engl. *IFN regulatory factor*). Nakon fosforilacije, IRF3 i IRF7 formiraju homo- i heterodimere, translociraju se u jezgru stanice i potiču sintezu interferona tipa I, ključnog za antivirusni imunološki odgovor (Slika 6). Putem MYD88-neovisnog signalnog puta dolazi i do aktivacije transkripcijskog faktora NF- κ B te posljedične sinteze proinflamatornih citokina, što se odvija posredstvom adaptera TRIF i TRAF6 (206,207).

Iako je prvenstveno izražen na imunološkim stanicama (npr. monocitima, makrofazima, dendritičkim stanicama), TLR4 je također prisutan i na normalnom urotelu, ali i na tumorskim stanicama, primjerice tumora mokraćnog mjehura. Zanimljiva je i činjenica da je to najzastupljeniji TLR u zdravom urotelu (208). Aktivacija TLR4 u tumorskom mikrookruženju ima dvojak učinak, s jedne strane može poticati protutumorski imunološki odgovor i imunološki nadzor, a s druge može doprinijeti napredovanju tumora (209). TLR4 je eksprimiran u različitim vrstama tumora, uključujući hepatocelularni karcinom, glioblastom, karcinom pluća i karcinom dojke (210–213). Unutar tumorskog mikrookruženja, TLR4 ima sposobnost prepoznavanja ekstracelularno otpuštenog proteina toplinskog šoka 70 (Hsp 70), te doprinosi proliferaciji i migraciji tumorskih stanica (214). Hsp70 inducira povećanu ekspresiju nuklearnog NF- κ B i pojačanu proliferaciju H22 stanica hepatocelularnog karcinoma (211). Visoka ekspresija TLR4 u hepatocelularnog karcinoma dodatno je povezana s nepovoljnijom prognozom preživljenja pacijenata (215). Također, Hsp90 pospješuje migraciju glioblastomskih stanica putem aktivacije TLR4-posredovanih signalnih puteva, čime doprinosi invazivnom potencijalu tumorskih stanica (210). Nadalje, više studija ukazuje na povećanu ekspresiju receptora TLR4 u nesitnostaničnom karcinomu pluća (NSCLC), pri čemu je koncentracija njegove topive serumske forme identificirana kao potencijalni biomarker za predviđanje rizika razvoja radijacijske pneumonije kod bolesnika s lokalno uznapredovalim NSCLC-om. Serumski TLR4 predstavlja topivi oblik izvanstanične domene receptora, a pretpostavlja se da se ova domena može oslobađati iz tumorskih stanica tijekom progresije i metastaziranja tumora pa serumski TLR4 može imati ulogu biomarkera za evaluaciju metastatskog potencijala tumora i prognoze bolesti (216,217). Ciljano utišavanje gena *TLR4* putem specifične male interferirajuće RNA u staničnoj liniji MDA-MB-231 humanih stanica karcinoma dojke rezultiralo je supresijom sekrecije proupalnih citokina, uključujući IL6 i IL8, uz istodobno smanjenje proliferacijskog potencijala i preživljenja stanica (218). Nadalje, ekspresija glasničke RNA gena *TLR4* značajno je povišena kod raka dojke s metastazama u usporedbi s onima bez metastaza (213). Ekspresija TLR4 potencijalno korelira i sa stadijem tumora. Primjerice, analiza provedena na 37 pacijenata sa stadijima II i III karcinoma debelog

crijeva pokazala je statistički značajno povećanje ekspresije gena *TLR4* u tumorima uznapredovalog stadija III u odnosu na stadij II (219). Osim što se aktivira endogenim ligandima oslobođenima iz nekrotičnih tumorskih stanica, TLR4 može biti izravno aktiviran i lijekovima kao na primjer paklitakselom, koji se primjenjuje u terapiji različitih neoplazmi. Prema dostupnim istraživanjima, paklitaksel može inducirati izraženu upalnu signalizaciju te potaknuti proliferaciju tumorskih stanica koje eksprimiraju TLR4. Nasuprot tome, takav učinak nije zabilježen u TLR4-negativnim stanicama. Mallick i sur. ukazuju na potencijalnu ulogu TLR4 kao medijatora u međudjelovanju između dvaju citostatika, paklitaksela i irinotekana, budući da paklitaksel modulira ekspresiju ključnih enzima uključenih u metabolizam irinotekana putem mehanizma ovisnog o TLR4 (220). Također, aberantna regulacija ekspresije gena *TLR4* prepoznata je kao mogući molekularni mehanizam koji doprinosi razvoju rezistencije na cisplatinu u planocelularnom karcinomu (221). Opisani pronalasci upućuju na to da signalni putevi ovisni o TLR4 mogu igrati značajnu ulogu u razvoju rezistencije tumorskih stanica na kemoterapeutike (220,221).

1.3.2. Mijeloidni diferencijacijski faktor 88 (MYD88)

Protein MYD88, kao signalna molekula svih TLR receptora, osim TLR3, predstavlja potencijalno jedan od ključnih terapijskih ciljeva modulacije imunološkog odgovora domaćina (222,223). Njezina proteinska struktura sastavljena je od N-terminalne domene smrti i C-terminalne TIR domene, koje su odvojene međudomenom (224). TIR domena MYD88 proteina odgovorna je za vezanje na TIR domenu TLR receptora (225), dok je N-terminalna domena smrti odgovorna za vezanje na IRAK kinazu, što posljedično aktivira nizvodne signalne putove (226). Aktivacija IRAK kinaze zatim dovodi do različitih funkcionalnih učinaka, uključujući aktivaciju MAP kinaze i nuklearnog faktora NF- κ B, čime MYD88 postaje jedna od najznačajnijih molekula u signalnim putevima povezanim s imunomodulacijom (222). Nakon stimulacije, TLR dimerizira i regrutira MYD88, uzrokujući da MYD88 stvara male, nestabilne oligomere. Kako se receptor i dalje aktivira, ti oligomeri nastavljaju rasti. Nakon što dosegnu određeni prag, oligomer MYD88 stvara stabilnu interakciju s IRAK4 i regrutira IRAK1. Zatim dolazi do aktivacije IRAK1 fosforilacijom, čime započinje imunosna signalna kaskada (227). MYD88 ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije brojnih imunomodulatora, uključujući faktor nekroze tumora alfa, interleukin 6, ciklooksigenazu 2, interferone tipa III (IL29 i IL28A) te interleukin 10 (228,229).

Sve veći broj istraživanja naglašava ključnu ulogu upalnog odgovora u patogenezi malignih bolesti, pri čemu upalna signalizacija doprinosi proliferaciji tumorskih stanica te stvaranju imunosupresivnog mikrookoliša (230,231). Prema rezultatima istraživanja, kronična upala doprinosi razvoju približno 20% svih slučajeva raka u svijetu. Rizik od nastanka malignih bolesti raste proporcionalno trajanju upalnog procesa (232). U tom kontekstu, MYD88 se ističe kao centralni signalni posrednik, čija je uključenost potvrđena u progresiji različitih neoplazmi, poput kolorektalnog karcinoma (233), karcinoma želuca (228), hepatocelularnog karcinoma (234), primarnog i metastatskog karcinom dojke (235), karcinoma jajnika (236), limfoma (237), karcinoma pluća (238), melanoma i drugih karcinoma kože, kao i karcinoma gušterače (230). Signalna molekula MYD88 predstavlja ključnu molekularnu vezu između TLR-ova/IL1R te onkogenog Ras signalnog puta. Posljedično, MYD88 sudjeluje u inicijaciji karcinogeneze, proliferacije tumorskih stanica, metastatskog širenja i recidiva bolesti te u oblikovanju kliničke prognoze. Aktivacija signalnog puta TLR2-MYD88 može injicirati NF- κ B i Wnt signalne puteve, što potiče proliferaciju stanica kolorektalnog karcinoma i karcinoma dojke (239). Kod karcinoma dojke, utišavanje ekspresije MYD88 smanjuje proliferaciju i migraciju MCF-7 stanica te povećava njihovu osjetljivost na paklitaksel (240). Ovo dodatno potvrđuje važnost TLR-MYD88 signalizacije u regulaciji proliferacije stanica raka i tumorogeneze. Uloga signalizacije posredovane MYD88 proteinom povezuje se i s poticanjem tumorske invazije i metastatskog potencijala. Youn i sur. su pokazali da protein PAUF (engl. *pancreatic adenocarcinoma upregulated factor*), koji izlučuju tumorske stanice i koji posjeduje protumorska svojstva, djeluje na TLR4 receptor imunoloških stanica, pri čemu aktivira TLR4/MYD88/NF- κ B signalni put te potiče migraciju stanica karcinoma pankreasa (241). Povišena ekspresija MYD88 povezana je s povećanom proliferacijom i metastatskim kapacitetom tumorskih stanica. Wang i sur. proveli su analizu povezanosti kliničko-patoloških karakteristika s razinom ekspresije MYD88 u kolorektalnom karcinomu te su utvrdili da je visoka ekspresija MYD88 značajno povezana s preživljenjem. Na temelju rezultata zaključili su da MYD88 predstavlja prognostički čimbenik lošeg ishoda kod bolesnika s karcinomom debelog crijeva (239,242). U tumorima jajnika, signalizacija putem TLR4-MYD88 čini se aktivnijom kod visokogradusnih tumora te je povezana sa smanjenim preživljenjem, povećanom učestalošću recidiva, malignom transformacijom i metastatskim potencijalom (243). U visokogradusnom seroznom karcinomu jajnika, visoka ekspresija MYD88 povezana je s uznapredovalim stadijem bolesti i umjereno kraćim ukupnim preživljenjem. Međutim, u niskogradusnom seroznom karcinomu jajnika, visoka ekspresija MYD88 povezana je s boljim preživljenjem (236). U pacijentica s karcinomom dojke utvrđena je značajna povezanost

između razine ekspresije MYD88 i kliničkog ishoda. Naime, povišena ekspresija MYD88 u tumorskom tkivu korelirala je s nižim stupnjem diferencijacije tumora te smanjenom stopom preživljenja u usporedbi s pacijenticama koje su imale nisku ekspresiju ovog proteina (240). Osim toga, Xiang i sur. su otkrili da je ekspresija MYD88 značajno povećana u visoko agresivnim, trostruko negativnim stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231 u usporedbi s normalnim stanicama i manje agresivnim stanicama raka dojke. Ovi rezultati upućuju na to da je ekspresija MYD88 povezana s proliferacijom i invazijom stanica raka dojke te da bi mogla poslužiti kao potencijalna ciljana molekula u dijagnostici i liječenju raka dojke (240).

Sve veći broj istraživanja potvrđuje da su imunosupresivne stanice unutar tumorskog imunološkog mikrokoliša ključni posrednici u proliferaciji i invazivnosti malignih stanica. Među tim stanicama ističu se mijeloidne supresorske stanice (MDSC), makrofazi, dendritičke stanice (DC), stanice prirodne ubojice (NK stanice), eozinofili te regulatorni T limfociti (Treg). Najzastupljenije imunološke stanice unutar tumorskog mikrokoliša su mijeloidne supresorske stanice, koje predstavljaju prekursore dendritičkih stanica, makrofaga i granulocita. U tumorskom imunološkom mikrokolišu, inhibicija MYD88 ne samo da izravno inhibira diferencijaciju MDSC, već i neizravno smanjuje njihovu ekspanziju smanjenjem izlučivanja citokina. Molekularne metode usmjerene na blokadu MYD88 signalizacije za inhibiciju MDSC uspješno su ograničile rast tumora pluća i jajnika kod miševa (244). Makrofagi, kao jedne od najdominantnijih imunoloških stanica u tumorskome mikrokolišu, imaju ključnu ulogu u modulaciji tumorske biologije. Njihova polarizacija iz protuupalnog i protutumorskog M1 fenotipa u imunosupresivni M2 fenotip potiče proliferaciju tumorskih stanica i omogućuje imunološki bijeg, što je osobito izraženo u tumorima poput glioma (245) i karcinoma gušterače (246). Signalna molekula MYD88 jedan je od centralnih čimbenika u regulaciji tumorskog mikrokoliša. Njegova ekspresija pozitivno korelira s prisutnošću M2 makrofaga. U studiji Yuana i sur. analiza markera CD206 (karakterističnog za M2) i CD86 (karakterističnog za M1) u tkivu debelog crijeva pokazala je da miševi s utišanim proteinom MYD88 specifično u fibroblastima (Fib-MYD88-KO) imaju veću zastupljenost M1 fenotipa uz smanjenu ekspresiju M2 markera. Istovremeno, farmakološka inhibicija MYD88 rezultirala je usporavanjem napredovanja kolitisa i povezanog karcinoma debelog crijeva, što dodatno potvrđuje njegovu funkcionalnu uključenost u tumorigenezu (247). Polarizacija makrofaga prema imunosupresivnom M2 fenotipu odvija se uz posredovanje signalnog puta TLR4-MYD88-p38-STAT3, koji značajno suprimira proliferaciju CD4⁺ i CD8⁺ T-stanica u *in vitro* uvjetima te potiče tumorski rast *in vivo*, prvenstveno putem indukcije PD-L1 (248). MYD88-ovisni signalni put aktivira NF-κB, što povećava ekspresiju PD-L1 markera na tumorskim stanicama,

omogućujući im time efikasnije izbjegavanje imunološkog nadzora. Nakon oslobađanja HMGB1 iz stanica koje prolaze staničnu smrt, aktivira se TLR4/MYD88 signalni put što rezultira pojačanom produkcijom IFN- β i povećanom ekspresijom PD-L1 u okolnim preživjelim tumorskim stanicama, što doprinosi njihovoj sposobnosti bijega imunološkom nadzoru (249).

Brojni prirodni i sintetski spojevi pokazuju protuupalna i antikancerogena svojstva usmjerena na MYD88. Osim inhibitora koji ciljaju signalne puteve povezane s MYD88, istražuju se i inhibitori specifični za MYD88 kao što su male molekule koje blokiraju homopolimere ili heteropolimere MYD88 (250). Primjerice, tropisetron, antagonist 5-HT3 receptora, odnosno lijek koji se koristi za kontrolu mučnine i povraćanja, pokazuje inhibicijski potencijal u razvoju kolorektalnog karcinoma djelovanjem na smanjenje upale povezane s kolitisom te blokiranjem TLR4/MYD88 signalnog puta (251). Nadalje, kombinacija terapije deprivacije androgena s zoledronske kiselinom i timozinom α 1 inhibirala je rast mišjeg modela alografta uznapredovalih karcinoma prostate inhibiranjem MYD88/NF- κ B signalnog puta u tumorskim stanicama. Istovremeno, terapija koja aktivira MYD88-posredovanu signalizaciju u makrofagima i T stanicama, dovodi do povećane infiltracije citotoksičnih T stanica i intenzivnije upalne reakcije unutar tumorskog mikrokruženja (252). Zbog ključne uloge BB-petlje u međumolekularnim interakcijama MYD88 proteina, prvi inhibitor razvijen za MYD88 bio je kratki peptid (Ac-RDVLP PGT-NH_2) dizajniran prema aminokiselinskom slijedu same BB-petlje (253), ali zbog ograničene oralne bioraspoloživosti i metaboličke nestabilnosti peptida, razvijen je stabilniji peptidni mimetik AS-1. Utvrđeno je da AS-1 učinkovito ometa vezanje MYD88 na IL-1 receptor i smanjuje NF- κ B transkripcijsku aktivnost (254). U daljnjem razvoju specifičnih inhibitora, otkriven je i ST2825 koji sprječava dimerizaciju MYD88, čime učinkovito inhibira aktivaciju NF- κ B signalnog puta. Zbog svog mehanizma djelovanja, ST2825 predstavlja moguću terapijsku opciju za liječenje upalnih bolesti i maligniteta povezanih s disregulacijom signalizacije posredovane MYD88-om. S obzirom da se sve više ispituje njegova primjena u antitumorskoj terapiji, pokazano je da ST2825 inhibira proliferaciju stanica hepatocelularnog karcinoma (255) i djeluje protiv dukalnog adenokarcinoma gušterače (256) te može spriječiti rast stanica limfoma i leukemije, čime nadilazi ograničenja BTK inhibitora ibrutiniba u liječenju limfoma s nemutiranim MYD88 proteinom (257). Identificirana je i skupina malih molekulskih inhibitora poznatih pod oznakom TJ-M2010-X (X = 2, 5, 6), koji ciljano ometaju homodimerizaciju MYD88. Djelovanjem na ovaj ključni korak u signalizaciji, ovi spojevi učinkovito narušavaju aktivaciju MYD88 ovisnih putova, što ih čini potencijalnim kandidatima za terapiju upalnih i neoplastičnih bolesti. TJ-M2010-2

ciljano djeluje na signalne putove MYD88/GSK-3 β i MYD88/NF- κ B, pri čemu inhibira proliferaciju, migraciju i invazivne sposobnosti stanica raka dojke (258). TJ-M2010-5 cilja TIR domenu MYD88, inhibirajući TLR/MYD88 signalni put, što značajno reducira upalne procese i patološke promjene povezane s fibrozom jetre (259), ishemijsko-reperfuzijskim ozljedama organa (260,261), kolitisom induciranim kolorektalnim karcinomom (261), hepatocelularnim karcinomom (262) te alogenim odbacivanjem (263,264). Identificirani su i dodatni spojevi koji djeluju na MYD88, uključujući T6167923 (265), LM9 (266), 4210 (267), LM8 (268), M20 (269) i C17 (270). Njihov mehanizam djelovanja temelji se na inhibiciji oligomerizacije MyD88, što rezultira smanjenjem produkcije upalnih i fibrotičnih čimbenika. Većina ovih inhibitora signalne molekule MYD88 se još uvijek nalazi u prekliničkoj fazi istraživanja, s obzirom da još uvijek postoje brojne mehanističke nepoznanice vezane uz MYD88 i kompleks „myddosome“ koje su i dalje predmet istraživanja u svrhu pronalaženja što boljih terapijskih opcija usmjerenih na njegovu inhibiciju (250).

2. CILJEVI I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi

1. Utvrditi učinak receptora TLR4 na razvoj početnih promjena (upala i degenerativne promjene) pri nastanku tumora mokraćnog mjehura (akutna zbivanja nakon dva tjedna tretmana).
2. Određivanje učinka receptora TLR4 na razvoj zloćudnih tumora mokraćnog mjehura (nakon 20 tjedana tretmana, tzv. kronični model).
3. Utvrđivanje učinka signalne molekule MYD88 na razvoj početnih promjena (upala i degenerativne promjene) pri razvoju tumora mokraćnog mjehura (2. tjedan tretmana, tzv. akutni model).
4. Određivanje učinka signalne molekule MYD88 na razvoj tumora mokraćnog mjehura (20 tjedana tretmana, kronični model).
5. Određivanje razlika u raznolikosti crijevne mikrobiote nakon indukcije tumora mokraćnog mjehura, te utvrđivanje uloge receptora TLR4 i signalne molekule MYD88 u nastanku navedenih razlika.
6. Određivanje razlika u genskoj ekspresiji u tumorima mokraćnog mjehura, uvjetovanih receptorom TLR4 i signalnom molekulom MYD88.

2.2. Hipoteza

Deficit receptora TLR4 i signalne molekule MYD88 smanjit će intenzitet upalnih i degenerativnih zbivanja zbog čega bi trebala postojati barem djelomična zaštita od razvoja tumora mokraćnog mjehura.

Nadalje, pretpostavili smo da će potpuno odsustvo molekula ključnih za prepoznavanje i reakciju na mikroorganizme – receptora TLR4 i signalne molekule MYD88, dovesti do promjena u sastavu mikrobiote crijeva i u izražaju gena u tumorima mokraćnog mjehura.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Etičko odobrenje

Za sve pokuse na životinjama ishodovano je odobrenje Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (525-10/0543-20-3, 18. lipnja 2020.), temeljeno na mišljenju Povjerenstva za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

3.1.2. Pokusne životinje

U provedenom istraživanju korišteni su *Tlr4*^{KO} (engl. *knock-out*) (B6(Cg)-Tlr4tm1.2Karp/J) i *Myd88*^{KO} (B6.129P2(SJL)-Myd88tm1.1Defr/J) mišji (lat. *Mus musculus*) modeli te pripadajući divlji tip B6 WT (engl. *wild-type*) (C57BL/6J) kontrolnih miševa nabavljenih od tvrtke „The Jackson Laboratory”. I *Tlr4*^{KO} i *Myd88*^{KO} miševi nisu imali funkcionalne molekule TLR4 i MYD88. Sve navedene laboratorijske životinje su visokosrođene životinje soja C57BL/6J. Miševi korišteni u pokusima su mužjaci, starosti 6-8 tjedana te raspona tjelesne mase od 22 do 26 grama. Sve životinje su SPF (engl. *specific pathogen free*), što znači da nije dokazana prisutnost patogenih sojeva mikroorganizama što bi moglo utjecati na zdravlje životinja i rezultate eksperimenata. Okolina u kojoj su boravili laboratorijski miševi karakterizirana je temperaturnim rasponom od 20 do 24 °C, vlažnosti od 50 ± 30 %, s 8 - 20 izmjena zraka u prostoriji po satu, ciklusima svijetla i tame po 12 sati, površinom kaveza po mišu od minimalno 39 cm² te certificiranom drvenom steljom steriliziranom γ zračenjem (Mucedola srl, Italija). Miševima su kavezi obogaćeni s materijalom za gniježđenje od komprimirane celuloze te kućicama. Hrana koju su konzumirale životinje je u obliku peleta veličine 8x16 mm, sterilizirana γ zračenjem, a sastoji se od 22,08 % proteina, 4,35 % masti i 4,04 % vlakana (Mucedola srl, Italija). Hrana i voda (autoklavirana) je životinjama bila dostupna *ad libitum*.

3.1.3. Kemikalije korištene u istraživanju

- N-butil-N-(4-hidroksilbutil)-nitrozamin (BBN) (TCI, SAD)
- NaCl (Kemika, Republika Hrvatska)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Republika Hrvatska)
- KH_2PO_4 (Kemika, Republika Hrvatska)
- 4 %-tni paraformaldehid (PFA) (Biognost, Republika Hrvatska)
- Tris (Sigma-Aldrich, SAD)
- KCl (Kemika, Republika Hrvatska)
- Octena kiselina (Kemika, Republika Hrvatska)
- EDTA (Roth, Njemačka)
- NP-40 (Fluka, SAD)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, SAD)
- MgCl_2 (Invitrogen, SAD)
- Agaroza (Roth, Njemačka)
- Etidium bromid (Sigma-Aldrich, SAD)
- Etanol (Biognost, Republika Hrvatska)
- Ksilen (Supelco, Merck, Njemačka)
- Parafin (McCormick Scientific, SAD)
- Hemalaun (Sigma-Aldrich, SAD)
- Eozin (Merck, Njemačka)
- Medij za pokrivanje (Eukitt Quick-hardening mounting medium, Sigma-Aldrich, SAD)
- BSA (GoldBio, SAD)
- DAPI (Sigma-Aldrich, SAD)
- TRIzol reagens (Invitrogen, SAD)
- Kloroform (Sigma-Aldrich, SAD)
- Izopropanol (Supelco, Merck, Njemačka)
- Molekularna voda (oslobođena od nukleaza, Invitrogen, SAD)

3.1.4. Puferske otopine

- 1X PBS (pH = 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mM KH_2PO_4)
- Pufer za lizu mišjih repova (40 mM Tris pH = 8,0, 50 mM KCl, 2,5 mM EDTA, 0,4 % NP-40, 0.4 % tween 20)
- 10X pufer za PCR (PCR Rxn Buffer (- MgCl_2), Invitrogen)

- 1X TAE pufer razrijeđen iz 50X TAE otopine (pH = 8,0, 2M Tris, 5,7 % ledena octena kiselina, 100 mM EDTA)
- EDTA pufer za otkrivanje antigena (pH = 8,0)
- 1X TBS razrijeđen iz 10X TBS otopine (pH 7,5, 500 mM Tris, 1,5 M NaCl)
- Otopina za blokiranje (TBS 1X, 0,025 % Tween 20, BSA 5 %)

3.1.5. Enzimi i markeri

- Proteinaza K (20 mg/mL, Roth, Njemačka)
- Taq polimeraza (Taq DNA Polymerase Recombinant 500 U (5 U/ μ L), 100021276, Invitrogen, SAD)
- dNTP (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- DNA biljeg 100 bp (parova baza) DNA Step Ladder (Promega, SAD)

3.1.6. PCR/qPCR početnice

U Tablici 1 su objedinjene sve početnice korištene za potrebe genotipizacije i qPCR analize. Sve početnice, osim tri ustupljene od tvrtke „*The Jackson Laboratory*“ za genotipizaciju mišjeg gena *Myd88*, su dizajnirane pomoću „NCBI Primer-BLAST“ (NIH, SAD) javno dostupnog alata.

Tablica 1. Popis početnica korištenih za genotipizaciju i qPCR

Gen	Usmjerenje*	DNA slijed
m <i>Tlr4</i> ^{KO}	F	5' AATGACCACCCATATTGCCT 3'
m <i>Tlr4</i> ^{KO}	R	5' CAAAAGGCCCCAGTGAAGACT 3'
m <i>Tlr4</i> WT	F	5' CTAATGGATTTGCTGCCTGAC 3'
m <i>Tlr4</i> WT	R	5' TCCTGGGGAAAACTCTGG 3'
m <i>Myd88</i> ^{KO}	F	5' CCACCCTTGATGACCCCCTA 3'
m <i>Myd88</i> WT	F	5' GTTGTGTGTGTCCGACCGT 3'
m <i>Myd88</i> zajednički	R	5' GTCAGAAACAACCACCACCAT 3'
m <i>Mmp13</i>	F	5' CCACTCCCTAGGTCTGGATCA 3'
m <i>Mmp13</i>	R	5' CTTCATCGCCTGGACCATAA 3'
m <i>Rps23</i>	F	5' AATGCCTTGTGGGTCCTTCC 3'
m <i>Rps23</i>	R	5' CACGACACTTGCCCATCTTG 3'

* F – engl. *forward*; R – engl. *reverse*

m – mišji

KO – engl. *knock-out*

WT – divlji tip

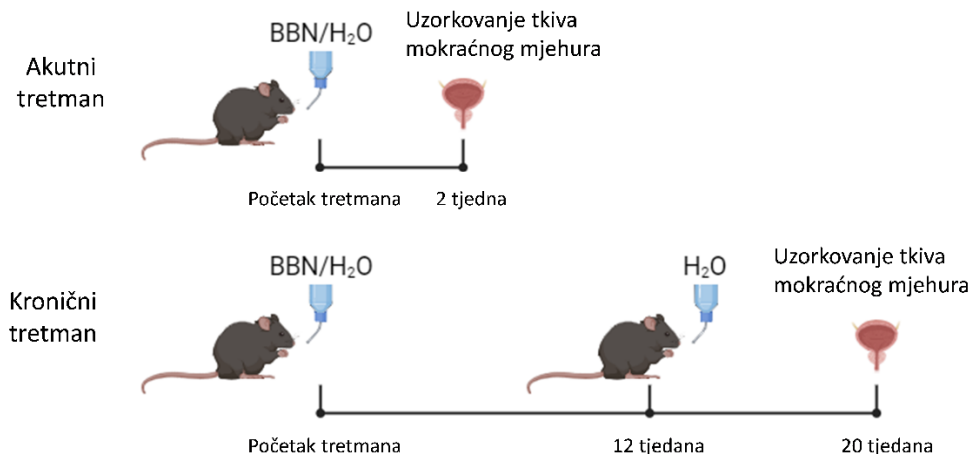
3.1.7. Aparatura

- Termoblok (Termo Shaker Incubator Thriller, Peqlab, UK)
- Centrifuga (Heraus Fresco 17, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Mikrocentrifuga (Galaxy MiniStar, VWR, UK)
- PCR uređaj (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, SAD)
- Mini Sub Cell GT sistem za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad, SAD)
- Uređaj za elektroforezu (PowerPac Basic, Bio-Rad, SAD)
- Inkubator (Nüve, Republika Turska)
- Mikrotomom (Leica RM2125 RTS, Leica Biosystems, SAD)
- Vodena kupelj (GFL, Njemačka)
- Olympus BX43 mikroskop (Olympus, Japan)
- NanoDrop 1000 spektrofotometar (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Minilys homogenizator (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, Francuska)
- Agilent 5400 (Agilent Technologies, SAD)
- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. N-butil-N-(4 hidroksibutil)-nitrozamin (BBN) model indukcije tumora mokraćnog mjehura

Tlr4^{KO} i *Myd88*^{KO} miševi, kao i njihove WT kontrole, tretirane su 0,05%-tnom otopinom kemikalije N-butil-N-(4-hidroksilbutil)-nitrozamin (BBN) u autoklaviranoj vodi za piće prema akutnom i kroničnom tretmanu. Akutni model podrazumijeva dva tjedna izlaganja BBN-u, dok kronični model podrazumijeva izlaganje BBN-u kroz 12 tjedana te naknadno konzumiranje vode kroz 8 tjedana (103,271), čime ukupno trajanje kroničnog eksperimenta iznosi 20 tjedana. Za pokuse je korišten 21 *Tlr4*^{KO} miš za akutni model, 16 *Tlr4*^{KO} miša za kronični model, 13 *Myd88*^{KO} miševa za akutni model, 15 *Myd88*^{KO} miševa za kronični model, te ukupno 76 B6 WT (C57BL/6J) kontrolnih jedinki za obje vrste KO miševa i sve pokuse. Po završetku navedenih tretmana životinje su eutanazirane metodom cervikalne dislokacije te su prikupljeni uzorci za naknadne analize (Slika 7).



Slika 7. Model nastanka reaktivnih promjena epitela i tumora mokraćnog mjehura induciranih kemikalijom N-butil-N-(4-hidroksilbutil)-nitrozamin (BBN) kroz akutni i kronični tretman (izrađeno pomoću BioRender-a). H₂O – autoklavirana voda za piće.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

Nakon žrtvovanja životinjama je izmjerena tjelesna masa te je uzet dio repa za potvrdu genotipa metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Miševima je odstranjen mokraćni mjehur i izmjerena masa cijelog mjehura bez urina. Polovica tkiva mokraćnog mjehura je isprana u PBS - u i odmah fiksirana u 4 %-tnom paraformaldehidu (PFA) za analizu histološkim metodama (hemalaun - eozin i imunofluorescencija), dok je preostala polovica mokraćnog mjehura također isprana u PBS - u i odmah zamrznuta u tekućem dušiku za naknadne analize ribonukleinske kiseline (RNA) i proteina.

Nakon prva dva tjedna tretmana (akutni model) analiziran je akutni upalni odgovor tj. tip upale (fokalna ili difuzna) i stupanj upale (odsustvo upale, oskudno, srednje i gusto izražena upala), prisutnost edema i fibroze te prisutnost degenerativnih promjena urotela (odsustvo degenerativnih promjena, slabo, srednje i vrlo izražene degenerativne promjene). Nakon završetka kroničnog protokola (20 tjedana) analizirane su sve patološke karakteristike tumora, stupanj uznapredovalosti tumorske bolesti (neinvazivni i invazivni tumori mokraćnog mjehura), tip i stupanj upale. Patohistološke karakteristike preparata potvrđene su u suradnji sa specijalistom patologije koji je bio zaslijepljen za pripadnost uzoraka određenoj eksperimentalnoj skupini.

Nadalje, svim skupinama miševa tijekom kroničnog eksperimenta su prikupljeni uzorci stolice, tzv. fekalni peleti, prije početka tretmana, nakon 12 tjedana tretmana BBN – om, te nakon žrtvovanja, a sadržaj cekuma je prikupljen samo nakon žrtvovanja, a za potrebe analize mikrobiote.

Također, za svaki od genotipova, uključujući i divlji tip miševa, formirane su i kontrolne skupine jednake dobi koje nisu primale nikakav tretman, već su konzumirale autoklaviranu vodu 20 tjedana tj. tijekom trajanja kroničnog tretmana eksperimentalnih skupina. Nakon 20 tjedana ove grupe miševa su također žrtvovane te su im prikupljeni uzorci tkiva na jednak, gore opisani način, kao i za eksperimentalne skupine.

3.2.2. Izolacija DNA iz uzoraka tkiva mišjeg repa za potrebe genotipizacije

Tkivo mišjeg repa je inkubirano preko noći na 55 °C u 100 uL pufera za lizu u kojeg je dodana proteinaza K (20 mg/mL) u omjeru 1 : 200. Po završetku inkubacije uzorke je potrebno centrifugirati 30 sekundi na 13 000 g nakon čega slijedi inaktivacija proteinaze K grijanjem na 95 °C 10 minuta. Izolirana DNA se nalazi u supernatantu nakon ponovne centrifuge uzoraka 30 sekundi na 13000 g.

3.2.3. Genotipizacija

Genotipizacija svih životinja napravljena je lančanom reakcijom polimeraze koristeći 1,5 uL DNA izolirane iz uzoraka mišjih repova. U svaki uzorak DNA dodana je reakcijska smjesa koja se sastojala od 9,4 µl molekularne H₂O, 1,5 µl 10x pufera za PCR, 1,7 µl MgCl₂ (50 mM), 0,3 µl dNTP (40 mM), 0,5 µl po *Tlr4* (10 µM) i *Myd88* (10 µM) početnicama i 0,1 µl Taq polimeraze, čineći ukupni volumen reakcijske smjese 15 µl. PCR protokoli korišteni za amplifikaciju navedenih gena prikazani su na slikama 8 i 9. Produkti dobiveni PCR reakcijom vizualizirani su na 1.5 %-tnom agaroznom gelu nakon elektroforeze (90 V, 50 minuta). U svaku jažicu na agaroznom gelu administrirano je 3 µl boje i 15 µl uzorka. Za određivanje veličine dobivenih produkata korišten je DNA biljeg (100 bp). Očekivana veličina produkta za *Tlr4*^{KO} životinje iznosi 427 bp, dok *Tlr4* WT životinje imaju veličinu produkta od 348 bp. Veličina PCR produkta za *Myd88*^{KO} miševe iznosi 520 bp, dok WT miševi pokazuju produkt veličine 266 bp za gen *Myd88*.

a		b	
	<u>Stupnjevi (°C)</u>	<u>Vrijeme</u>	
40x	95	2 min	
	95	30 s	
	53	45 s	
	72	1 min	
	72	10 min	
	<u>Stupnjevi (°C)</u>	<u>Vrijeme</u>	
10x	95	2 min	
	95	30 s	
	62	45 s / -1°C po ciklusu	
25x	72	1 min	
	95	30 s	
	53	45 s	
	72	1 min	
	72	10 min	

Slika 8. PCR protokol za genotipizaciju gena *Tlr4* u a) WT i b) *Tlr4*^{KO} životinja.

min – minuta

s – sekunda

	<u>Stupnjevi (°C)</u>	<u>Vrijeme</u>
	94	2 min
35x	94	30 s
	61,5	35 s
	72	1 min
	72	10 min

Slika 9. PCR protokol za genotipizaciju gena *Myd88* u WT i *Myd88*^{KO} životinja.

min – minuta

s – sekunda

3.2.4. Uklapanje tkiva u parafin

Uzorci tkiva mokraćnog mjehura svih korištenih miševa fiksirani su u 4 %-tnom PFA-u 24 sata na 4 °C i uklopljeni u parafin slijedeći navedeni protokol. Nakon fiksacije tkivo je dehidrirano koristeći seriju rastućih postotaka etanola (svaki po 45 minuta, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, dva puta po 45 minuta 100 %), nakon čega su uzorci isprani tri puta po 30 minuta u ksilenu. Tkivo je dalje pročišćeno od ksilena u parafinu 1 sat, prebačeno u drugi parafin sat vremena i uklopljeno u trećem parafinu. Parafinske kocke su zatim mikrotomom izrezane na 4 µm debele rezove, a rezovi tkiva su korišteni za hemalaun-eozin bojenje i imunofluorescencijsko bojenje.

3.2.5. Hemalaun-eozin bojenje i analiza

Deparafinizacija rezova tkiva mokraćnog mjehura izvršena je ispiranjem u ksilenu dva puta po 15 minuta nakon čega slijedi rehidracija uzoraka padajućim nizom otopina etanola (dva puta 100 % i jedanput 95 % EtOH, svaki 1 minutu). Na uzorke je zatim apliciran hemalaun u trajanju od 10 minuta, nakon čega su rezovi isprani u vodi i tretirani eozin bojom, također 10 minuta. Uzorci su zatim isprani u vodi i dehidrirani rastućim nizom otopine etanola (95 %, 100 %, jednu minutu svaki, dva puta). Tkivo je zatim isprano dva puta po jednu minutu u ksilenu, na uzorke je apliciran medij za pokrivanje i pokrovno stakalce. Uzorci su analizirani u svjetlom polju koristeći Olympus BX43 mikroskop (Olympus, Japan) i NIS-Elements F program (Nikon Corporation, Japan), u suradnji sa specijalistom patologije koji je bio zaslijepljen za identitet uzoraka koje analizira.

3.2.6. Imunofluorescencijsko bojenje i analiza

Deparafinizacija rezova tkiva mokraćnog mjehura izvršena je ispiranjem u ksilenu tri puta po 5 minuta, nakon čega slijedi rehidracija uzoraka padajućim nizom otopina etanola (100 %, 95 % i 70 %, svaki 10 minuta). Uzorci se zatim ispiru u PBS-u pet minuta te je otkrivanje antigena izvršeno kuhanjem u EDTA puferu za otkrivanje antigena (pH = 8.0) u mikrovalnoj pećici 12 minuta. Preparati su zatim ohlađeni na sobnoj temperaturi 20 minuta i isprani u PBS-u dva puta po 5 minuta. Preparate je zatim potrebno ocijediti, pobrisati i zaokružiti voštanom olovkom (Daido Sangyo, Japan) oko rezova tkiva. Na uzorke je zatim aplicirana otopina za blokiranje u trajanju od 30 minuta nakon čega su uzorci inkubirani u otopini primarnih protutijela preko noći u vlažnoj komori na 4 °C. Anti-clCas3 žecje (Asp 175, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) i anti-PCNA mišje (PC-10) (sc56, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) primarno protutijelo je razrijeđeno u otopini za blokiranje u omjeru 1 : 100 za clCas3 i 1 : 200 za PCNA. Nakon prekonoćne inkubacije, preparati su isprani u PBS-u dva puta po 5 minuta te su inkubirani dva sata u otopini sekundarnih protutijela i isprani tri puta po pet minuta u PBS-u. Sekundarna protutijela Alexa fluor 488 (A21206, Invitrogen, Waltham, MA, USA) i Alexa fluor 568 (A11004, Invitrogen, Waltham, MA, USA) razrijeđena su u otopini za blokiranje u omjeru 1 : 1000. Na uzorke se zatim nanosi DAPI (otopljen u PBS-u u omjeru 1 : 1000) u trajanju od jedne minute, nakon čega se uzorci ispiru u PBS-u, nanosi se medij za pokrivanje i pokrovno stakalce. Pripremljeni obojeni rezovi tkiva analizirani su fluorescentnom mikroskopijom koristeći Olympus BX43 mikroskop, NIS-Elements F (Nikon Corporation, Japan) i Fiji (NIH, SAD) programe (272), nakon čega su pohranjeni u mraku na 4 °C.

3.2.7. Izolacija mikrobne DNA iz uzoraka stolice, tzv. fekalnih peleta i sadržaja cekuma

Ukupna DNA izolirana je pomoću komercijalnog kita „DNeasy PowerSoil Pro Kit” (Qiagen, Njemačka) prateći upute proizvođača iz ukupno 84 uzorka fekalnih peleta i sadržaja cekuma, prikupljenih u tri vremenske točke (0, 12 i 20 tjedana tretmana BBN-om) tijekom kroničnih eksperimenata na *Myd88*^{KO}, *Tlr4*^{KO} i WT miševima. NanoDrop 1000 spektrofotometar je korišten za određivanje količine i čistoće izolirane DNA. Minimalni uvjeti koji su morali biti zadovoljeni za sekvenciranje dobivenih DNA uzoraka su podrazumijevali

količinu DNA veću od 200 ng, koncentraciju veću od 10 ng/uL te čistoću od A260/280 između 1,8 i 2.

3.2.8. 16S metagenomsko sekvenciranje

Postupak sekvenciranja uzoraka DNA izoliranih iz fekalnih peleta i sadržaja cekuma proveden je u kompaniji Novogene (Cambridge, UK) gdje je u sklopu pripreme uzoraka provedena dodatna kontrola kvalitete uzoraka DNA, umnažanje bakterijske 16S V4 regije (300 bp) te priprema knjižnice odsječaka. Sami proces sekvencioniranja obavljen je metodom uparenih krajeva (engl. *paired-end sequencing*) koristeći Illumina NovaSeq 6000 platformu (Illumina, SAD) nakon čega je testirana kvaliteta dobivenih sekvenci koje će se bioinformatički analizirati. Dobivene sekvence su pohranjene u repozitoriju naziva „NCBI Sequence Read Archive“ pod brojem PRJNA1119950.

3.2.9. Izolacija ukupne RNA

Ukupna RNA je izolirana iz po tri neinvazivna tumorska uzorka mokraćnog mjehura iz *Myd88*^{KO} i WT skupina te iz njihova tri odgovarajuća uzorka netretiranih kontrola, homogenizacijom uzoraka tkiva mokraćnih mjehura u TRIzol reagensu na Minilys homogenizatoru prema uputama proizvođača. Nakon homogenizacije u uzorke je dodan kloroform (200 uL na 1 mL TRIzol-a) koji dovodi do razdvajanja uzorka u tri faze. Gornja prozirna faza koja sadrži RNA prenesena je u nove tubice te je u uzorke dodan izopropanol koji omogućuje precipitaciju RNA. RNA peleti su zatim isprani u 75 %-tnom alkoholu te otopljeni u željenom volumenu molekularne vode. NanoDrop 1000 spektrofotometar je korišten za određivanje količine i čistoće, a gel elektroforeza i Agilent 5400 (RIN > 8) za određivanje DNA kontaminacije i kvalitete izolirane RNA.

3.2.10. Sekvenciranje glasničke RNA (RNA-seq analiza)

Dio uzoraka RNA iz tkiva mokraćnog mjehura poslan je u kompaniju Novogene (Cambridge, UK) gdje je napravljeno pročišćavanje glasničke RNA, sinteza komplementarne DNA (cDNA), konstrukcija knjižnice odječaka, proces sekvencioniranja metodom uparenih krajeva na Illumina NovaSeq 6000 platformi (Illumina, SAD) i kontrola kvalitete dobivenih

sekvenci koje će se bioinformatički analizirati. Dobivene sekvence su pohranjene u repozitoriju naziva „NCBI Sequence Read Archive“ pod brojem PRJNA1119950.

3.2.11. Izrada komplementarne DNA

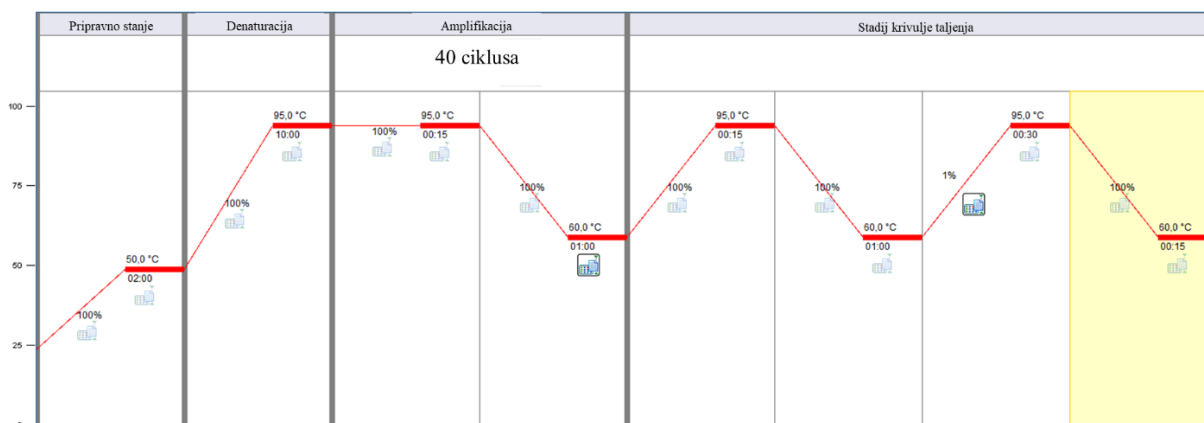
Prema rezultatima RNA sekvenciranja, napravljene su i dodatne analize ekspresije gena za što je prvo potrebno sintetizirati komplementarnu DNA iz uzoraka RNA iz tkiva mokraćnog mjehura. Za tu potrebu korišten je „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits“ (Applied Biosystems, SAD) komercijalni kit prateći upute proizvođača. Slika 10 prikazuje protokol korišten za izradu komplementarne DNA lančanom reakcijom polimeraze.

<u>Stupnjevi (°C)</u>	<u>Vrijeme</u>
25	10 min
37	60 min
37	60 min
85	5 min

Slika 10. PCR protokol za izradu komplementarne DNA.

3.2.12. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)

Sintetizirana cDNA korištena je za analizu ekspresije gena pomoću kvantitativne lančane reakcije polimerazom koristeći pripremljenu reakcijsku smjesu „SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix“ (BioRad, SAD) na „CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System“ uređaju prema uputama proizvođača. Sve reakcije su napravljene u duplikatu, a kao kontrolni referentni gen korišten je ribosomalni protein S23 (gen *Rps23*), izabran nakon uvida u rezultate RNA sekvenciranja i pretraživanja literature. Početnice (Tablica 1) koje su korištene u ovim reakcijama dizajnirane su pomoću „NCBI Primer-BLAST“ (NIH, SAD) javno dostupnog alata. Slika 11 prikazuje qPCR protokol.



Slika 11. Protokol za provođenje kvantitativne lančane reakcije polimerazom u svrhu analize ekspresije gena.

3.2.13. Statističke metode

Vizualizacija rezultata i statistička analiza provedeni su u programskom jeziku R, verzija 4.2.2. (273), i interaktivnom sučelju R programskog jezika pod nazivom RStudio (274). Za usporedbu tjelesne mase miševa kao i uzoraka čitavog mokraćnog mjehura nakon žrtvovanja u akutnom i kroničnom eksperimentu korišten je Man-Whitney U test. Fisherov test je korišten za analizu kvalitativnih ordinalnih varijabli koje uključuju stupanj degenerativnih promjena u akutnom eksperimentu te stupanj invazije tumora nakon kroničnog eksperimenta. Za analizu kvalitativnih ordinalnih varijabli tipa i stupanj upale, u akutnom i kroničnom eksperimentu, korišteni su Hi-kvadrat test i Fisherov test, dok je Hi-kvadrat test korišten i za analizu kvalitativnih ordinalnih varijabli u vidu prisutnosti fibroze i edema nakon akutne izloženosti BBN-u.

Sekvence dobivene 16S sekvenciranjem bioinformatički su obrađene koristeći *Qiime2* platformu (275). Platformi sam pristupila koristeći računalni klaster „Isabella“ (Sveučilište u Zagrebu, Sveučilišni računski centar). Platforma je korištena za provođenje „čišćenja“ sekvenci s *Dada2* programom (276), generiranje ASV tablice značajki, dodjeljivanje taksonomije (Silva 138), provođenje rarefakcije te izračunavanje mjera alfa i beta raznolikosti. U mikrobiomskim istraživanjima, pojmovi alfa i beta raznolikost koriste se za opisivanje strukture i složenosti mikrobni zajednica. Alfa raznolikost odnosi se na raznolikost unutar jednog uzorka ili okoliša, odnosno mjeri koliko je mikrobiota u jednom uzorku bogata (broj različitih vrsta) i koliko su te vrste ravnomjerno raspoređene. S druge strane, beta raznolikost procjenjuje razlike u sastavu mikrobiote između različitih uzoraka, odnosno pomaže u

razumijevanju koliko su dvije (ili više) mikrobnih zajednica slične ili različite (277). Razlike u mjerama alfa raznolikosti (engl. *Observed features*, *Faith_PD*, *Shannon*) testirane su Kruskal-Wallisovim testom, dok su razlike između mjera beta raznolikosti (engl. *Bray-Currtis*, *wighted-UniFrac*) analizirane Permanova testom. Većina dobivenih rezultata vizualizirana je putem platforme *Qiime2 View*, dok su rezultati analize beta raznolikosti vizualizirani koristeći *PCoA Emperor* grafove (278). Za diferencijalnu analizu razlike u zastupljenosti taksona korišten je *ANCOM-BC2* test (279).

Program za poravnavanje *Hisat2* v2.0.5 (280) korišten je za mapiranje sekvenci dobivenih mRNA sekvenciranjem na referentni genom miša (engl. *Genome Assembly* GRCm39 GCA_000001635.9). Kvantifikacija broja odsječaka mapiranih na svaki gen provedena je pomoću algoritma *FeatureCounts* v1.5.0-p3 (281). Razine ekspresije gena su izražene kao FPKM (engl. *fragments per kilobase of transcript sequence per million base pairs sequenced*). *DESeq2* v1.40.2 (282) program korišten je za analizu diferencijalne ekspresije gena koristeći preporučene zadane parametre. Pragovi za definiranje diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) postavljeni su kao P vrijednost $< 0,05$ i $|\log_2 FC$ (engl. *fold change*) > 1 tj $FC > 2$. Program *mMCP-counter* (engl. *The Murine Microenvironment Cell Population counter*) (283), unutar R paketa „*immunedeconv*“ (284), korišten je za procjenu zastupljenosti profila imunoloških stanica u uzorcima *Myd88^{KO}* i WT tumora te u netretiranim kontrolnim uzorcima mokraćnog mjehura.

Kruskal-Wallis test s pripadajućim *post-hoc* Dunn testom korišten je za analizu podataka dobivenih imunofluorescencijom, točnije za usporedbu ekspresije *clCas3* i *PCNA* između *Myd88^{KO}* i WT tumora mokraćnog mjehura, kao i za analizu podataka vezanih uz upalni profil, dobivenih koristeći *mMCP-counter* program.

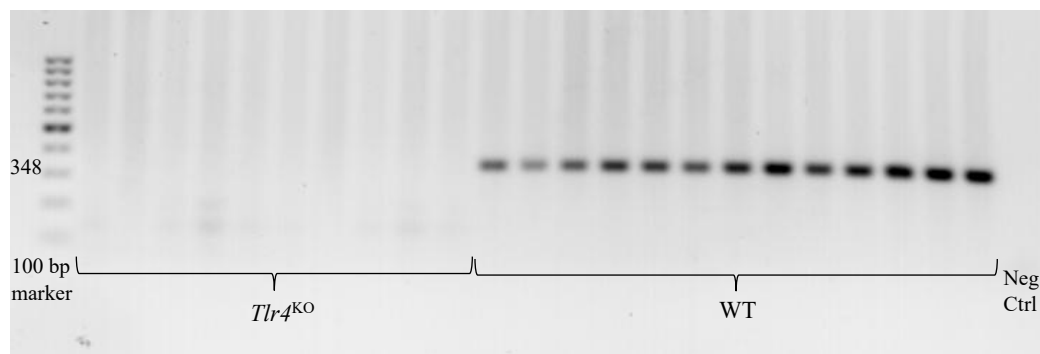
Za potrebe analize qPCR rezultata ekspresije gena *Mmp13* u tumorskim uzorcima korišten je Man-Whitney U test. Različito eksprimiranim genima smatrat će se oni koji imaju značajnost manju od 0,05 te su više od dva puta manje ili više eksprimirani u testnoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu tj. kojima apsolutna vrijednost FC iznosi više od 2.

Statistička značajnost za sve testove je postavljena na $P < 0,05$.

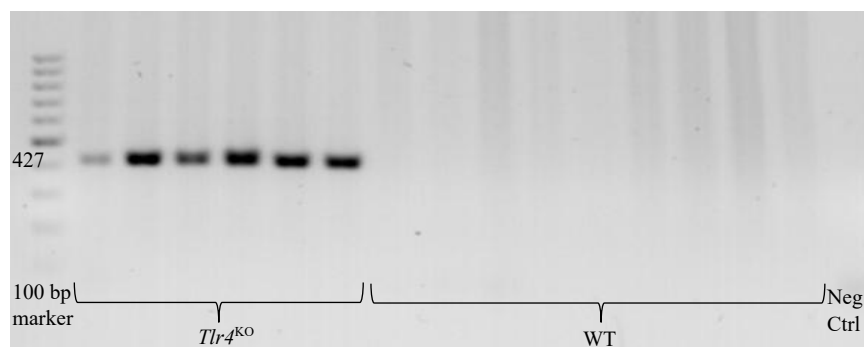
4. REZULTATI

4.1. Potvrda genotipa *Tlr4* i *Myd88* knock-out (KO) eksperimentalnih životinja metodom lančane reakcije polimerazom

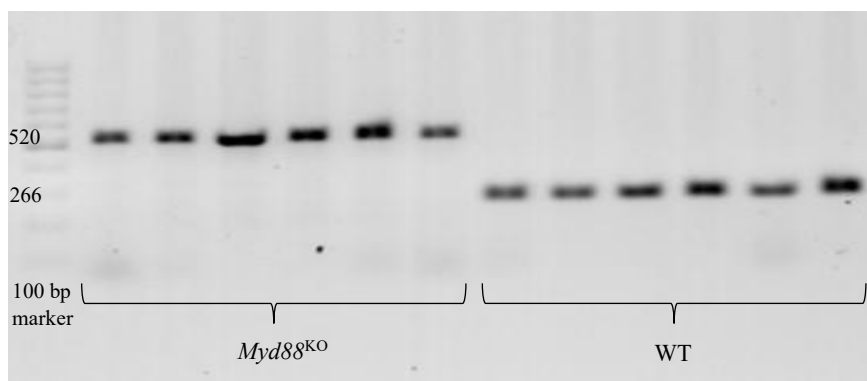
Sve eksperimentalne životinje su potvrdno genotipizirane nakon žrtvovanja metodom lančane reakcije polimerazom. Slike 12, 13 i 14 prikazuju primjere gel elektroforeze produkata genotipizacije za *Tlr4*^{KO}, *Myd88*^{KO} i kontrolne miševe divljeg tipa.



Slika 12. Reprezentativni primjer gel elektroforeze produkata genotipizacije gena *Tlr4* u pokusnih miševa divljeg tipa. Iz uzoraka izolirane DNA WT miševa prikazuju se samo PCR produkti veličine 348 parova baza. *Tlr4*-gen za receptor sličan Toll-u 4; KO – engl. *knock-out*; WT – divlji tip (engl. *wild-type*); bp – parovi baza; Neg Ctrl – negativna kontrola



Slika 13. Reprezentativni primjer gel elektroforeze produkata genotipizacije gena *Tlr4* u pokusnih miševa s nefunkcionalnim genom *Tlr4* (tzv. *knock-out* miševi). Iz uzoraka izolirane DNA *Tlr4*^{KO} miševa prikazuju se samo PCR produkti veličine 427 parova baza. *Tlr4* – gen za receptor sličan Toll-u 4; KO – engl. *knock-out*; WT – divlji tip (engl. *wild-type*); bp – parovi baza; Neg Ctrl – negativna kontrola



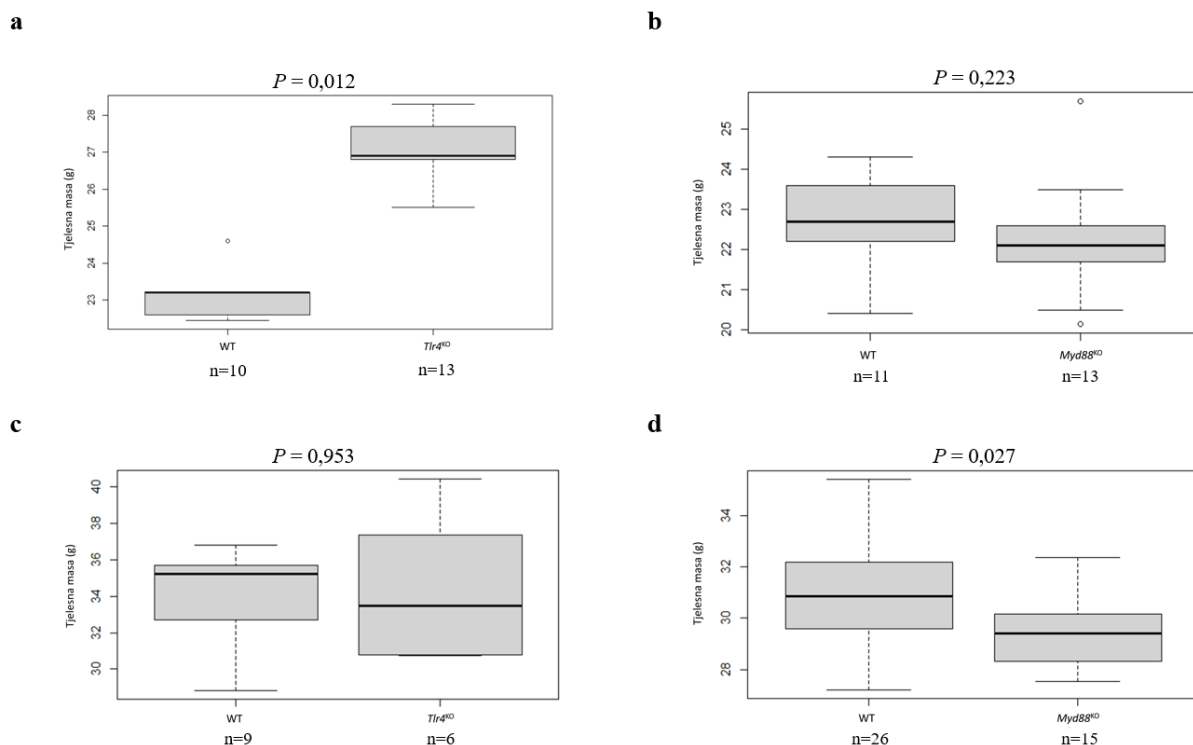
Slika 14. Reprezentativni primjer gel elektroforeze produkata genotipizacije gena *Myd88* u pokusnih miševa divljeg tipa te u onih kod kojih je gen *Myd88* nefunkcionalan (tzv. *knock-out* miševi). Iz uzoraka izolirane DNA *Myd88*^{KO} miševa prikazuju se samo PCR produkti veličine 520 parova baza, dok se za uzorke *Myd88* WT miševa prikazuju samo PCR produkti veličine 266 parova baza. *Myd88* – gen za mijeloidni diferencijacijski faktor 88; KO – engl. *knock-out*; WT – divlji tip (engl. *wild-type*); bp – parovi baza.

4.2. Usporedba tjelesne mase miševa nakon provedenog akutnog i kroničnog tretmana BBN-om

Prilikom žrtvovanja izmjerena je tjelesna masa eksperimentalnim životinjama nakon akutnog i kroničnog eksperimenta BBN-om. Potrebno je istaknuti kako je 13 od 21 *Tlr4*^{KO} miša i 10 od 17 WT kontrola izmjerena tjelesna masa nakon provedenog akutnog tretmana, dok je nakon kroničnog eksperimenta tjelesna masa izmjerena 6 *Tlr4*^{KO} miša te 9 WT kontrola. Svim *Myd88*^{KO} miševima i pripadajućim WT kontrolama je izmjerena tjelesna masa.

Nakon provedenog akutnog eksperimenta masa *Tlr4*^{KO} miševa bila je značajno veća u odnosu na WT miševe (Man-Whitney U test, $P = 0,012$) (Slika 15a), dok se masa *Myd88*^{KO} miševa nije razlikovala u odnosu na kontrolnu skupinu miševa (Man-Whitney U test, $P = 0,223$) (Slika 15b).

Nakon kroničnog eksperimenta masa *Tlr4*^{KO} miševa nije se značajno razlikovala u odnosu na WT miševe (Man-Whitney U test, $P = 0,953$) (Slika 15c), dok je masa WT kontrolnih životinja bila značajno veća u odnosu na *Myd88*^{KO} miševe (Man-Whitney U test, $P = 0,027$) (Slika 15d).

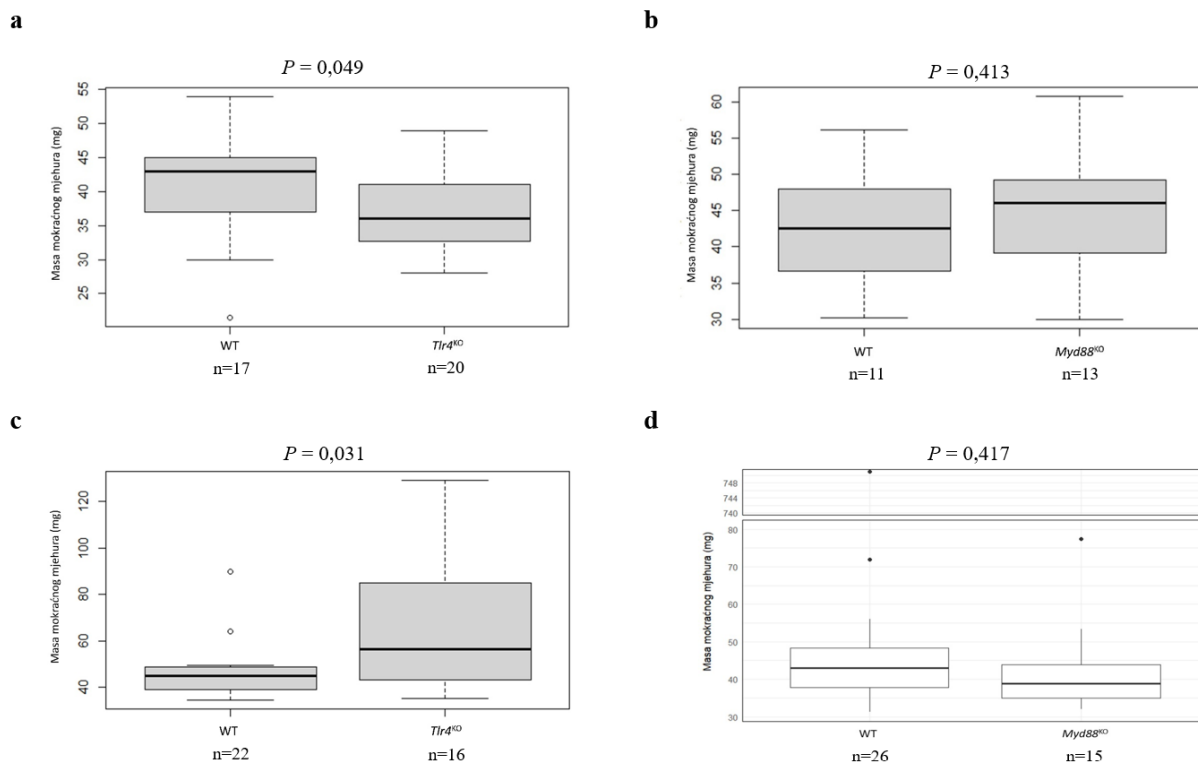


Slika 15. Usporedba tjelesne mase između a) *Tlr4*^{KO} i WT miševa nakon akutnog eksperimenta, b) *Myd88*^{KO} i WT miševa nakon akutnog eksperimenta, c) *Tlr4*^{KO} i WT miševa nakon kroničnog eksperimenta, d) *Myd88*^{KO} i WT miševa nakon kroničnog eksperimenta.

Tlr4 – gen za receptor sličan Toll-u 4; *Myd88* – gen za mijeloidni diferencijacijski faktor 88; KO – engl. *knock-out*; WT – divlji tip (engl. *wild-type*); g – gram.

4.3. Usporedba masa mokraćnih mjehura nakon provedenog akutnog i kroničnog tretmana BBN-om

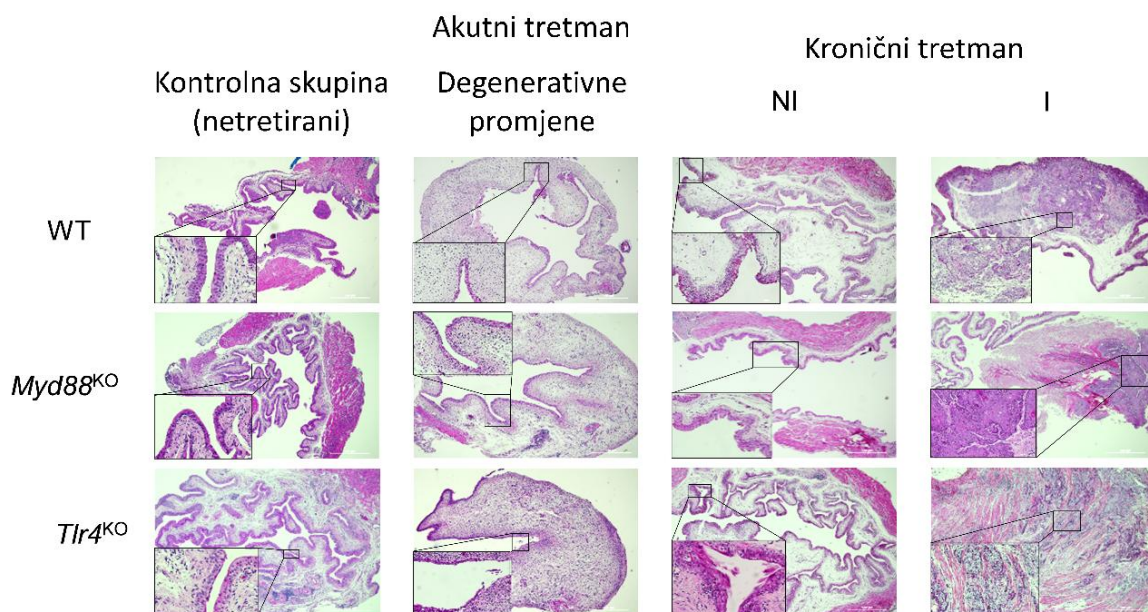
Prilikom žrtvovanja izmjerene su mase odstranjenih cjelovitih mokraćnih mjehura (bez urina) eksperimentalnih životinja nakon akutnog i kroničnog tretmana BBN-om. Razlike u masi mokraćnih mjehura između *Tlr4*^{KO} i WT skupina nakon akutnog eksperimenta nisu uočene (Man-Withney U test, $P = 0,049$) (Slika 16a), kao ni razlike između *Myd88*^{KO} i WT skupina (Man-Withney U test, $P = 0,413$) (Slika 16b). Mase mokraćnih mjehura *Tlr4*^{KO} miševa su bile značajno veće u odnosu na mase mokraćnih mjehura iz WT skupine nakon kroničnog eksperimenta (Man-Withney U test, $P = 0,031$) (Slika 16c), dok se mase mokraćnih mjehura *Myd88*^{KO} miševa nisu razlikovale u odnosu na mase mokraćnih mjehura iz WT skupine, također nakon kroničnog eksperimenta (Man-Withney U test, $P = 0,417$) (Slika 16d).



Slika 16. Usporedba masa mokraćnih mjehura (bez urina) između a) *Tlr4*^{KO} i WT miševa nakon akutnog eksperimenta, b) *Myd88*^{KO} i WT miševa nakon akutnog eksperimenta, c) *Tlr4*^{KO} i WT miševa nakon kroničnog eksperimenta, d) *Myd88*^{KO} i WT miševa nakon kroničnog eksperimenta. *Tlr4* – gen za receptor sličan Toll-u 4; *Myd88* – gen za mijeloidni diferencijacijski faktor 88; KO – engl. *knock-out*; WT – divlji tip (engl. *wild-type*); mg – miligram.

4.4. Patohistološka analiza tkiva mokraćnog mjehura nakon izloženosti BBN-u

Patohistološka analiza tkiva mokraćnog mjehura provedena je nakon akutnih i kroničnih tretmana BBN-om na divljem tipu (WT), *Myd88*^{KO} i *Tlr4*^{KO} miševima, kao i na njihovim odgovarajućim kontrolnim skupinama koje nisu bile podvrgnute tretmanu (Slika 7 i Slika 17). Uzorci iz akutnih pokusa analizirani su na prisutnost fibroznih promjena i edema, tipa i stupnja upale te prisutnost degenerativnih promjena epitela (stadiji 0 – 3) ili odsutnost navedenih karakteristika. Na uzorcima tkiva mokraćnih mjehura iz kroničnih tretmana također je analizirana prisutnost, tj. tip i stupanj upale te su tumori izazvani kroničnim tretmanom histološki klasificirani kao invazivni (I) ako su stanice raka pronađene u subepitelnom vezivnom tkivu, s ili bez invazije mišića, ili kao neinvazivni (NI), što znači da maligne stanice nisu prošle kroz bazalnu membranu. Kontrolne skupine koje nisu bile tretirane BBN-om pokazale su normalna histološka svojstva (Slika 17).



Slika 17. Bojenje tkiva mokraćnog mjehura hematoksilinom i eozinom (H&E) u *Tlr4*^{KO}, *Myd88*^{KO} i WT skupinama nakon akutnog i kroničnog tretmana BBN-om. Povećanje histoloških slika iznosi 4×, a povećanje histoloških isječaka 40×. WT – divlji tip (engl. *wild-type*); *Tlr4* – gen za receptor sličan Toll-u 4; *Myd88* – gen za mijeloidni diferencijacijski faktor 88; KO – engl. *knock-out*; NI – neinvazivni TMM; I – invazivni TMM.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

Histološka analiza uzoraka nakon akutnih pokusa nije otkrila razlike u zastupljenosti fibroze, edema te tipa i stupnja upale između *Tlr4*^{KO} (Tablica 2) i *Myd88*^{KO} (Tablica 3) miševa u usporedbi s WT kontrolnom skupinom. Fibroza i edem su bili zastupljeni u svim uzorcima tkiva nakon akutnih tretmana, kao i upala, u većini slučajeva fokalnog tipa, osim u jednom uzorku iz *Myd88*^{KO} skupine. Stupnjevanje upale provedeno je kroz 4 razine, pri čemu je nula označavala odsutnost upale, jedan blagu fokalnu upalu, dva umjerenu fokalnu upalu, a tri izraženu fokalnu upalu.

Tablica 2. Usporedba prisutnosti fibroze, edema, tipa i stupnja upale u uzorcima mokraćnih mjehura između *Tlr4*^{KO} i WT skupine nakon akutnog tretmana BBN-om

Skupina	N	Fibroza		Edem		Tip upale		Stupanj upale			
		DA	NE	DA	NE	Fokalna	Difuzna	0	1	2	3
WT	17	17	0	17	0	17	0	0	10	3	4
<i>Tlr4</i> ^{KO}	21	21	0	21	0	21	0	0	6	11	4
<i>P</i> *		0,516		0,516		0,516		0,076			

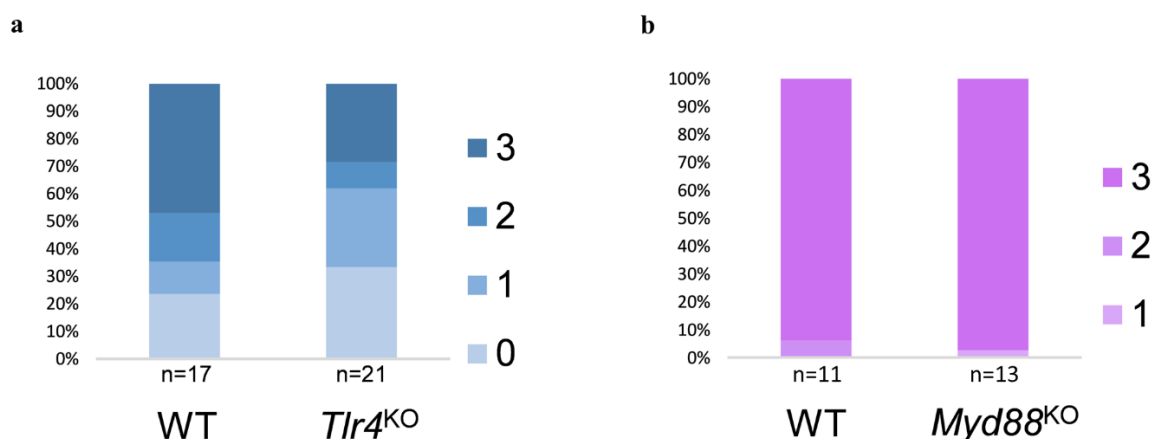
*Hi-kvadrat test korišten je za usporedbu prisutnosti fibroze, edema i tipa upale, a Fisherov test za usporedbu stupnja upale između skupina.

Tablica 3. Usporedba prisutnosti fibroze, edema, tipa i stupnja upale u uzorcima mokraćnih mjehura između *Myd88*^{KO} i WT skupine nakon akutnog tretmana BBN-om

Skupina	N	Fibroza		Edem		Tip upale		Stupanj upale			
		DA	NE	DA	NE	Fokalna	Difuzna	0	1	2	3
WT	11	11	0	11	0	11	0	0	7	3	1
<i>Myd88</i> ^{KO}	13	13	0	13	0	12	1	0	10	3	0
<i>P</i> *		1		1		1		0,805			

*Hi-kvadrat test korišten je za usporedbu prisutnosti fibroze i edema, a Fisherov test za usporedbu tipa i stupnja upale između skupina.

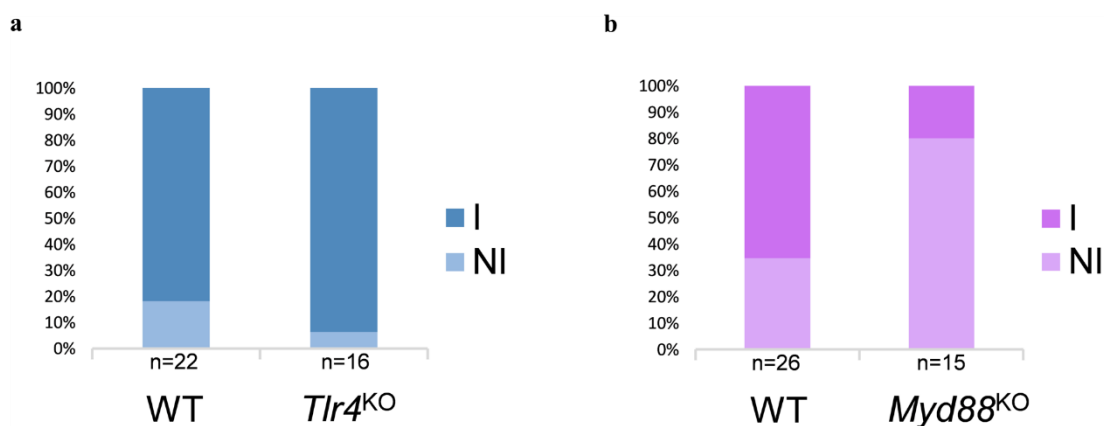
Stupnjevanje degenerativnih promjena epitela također je provedeno kroz 4 razine, pri čemu je nula označavala odsutnost degenerativnih promjena, jedan blago izražene, dva umjereno izražene te tri vrlo izražene degenerativne promjene epitela. Iako su svi miševi iz *Myd88*^{KO} skupine imali degenerativne promjene, uglavnom stadija 3, nije pronađena razlika u stupnju degenerativnih promjena između *Myd88*^{KO} i WT kontrolne skupine (Fisherov test, *P* = 0,717) (Slika 18b), kao ni razlika u stupnju degenerativnih promjena između *Tlr4*^{KO} i WT skupine (Fisherov test, *P* = 0,455) (Slika 18a).



Slika 18. Prevalencija stadija degenerativnih promjena u epitelu mokraćnog mjehura nakon akutnog eksperimenta između a) *Tlr4*^{KO} i b) *Myd88*^{KO} miševa u odnosu na WT kontrolnu skupinu. *Tlr4* – gen za receptor sličan Toll-u 4; *Myd88* – gen za mijeloidni diferencijacijski faktor 88; KO – engl. *knock-out*; WT – divlji tip (engl. *wild-type*); n – broj eksperimentalnih miševa po skupini.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

U uzorcima tkiva mokraćnih mjehura iz kroničnih tretmana BBN-om nisu pronađene razlike između *Tlr4*^{KO} i WT miševa u vidu invazivnosti TMM-a, pri čemu su obje skupine uglavnom razvile invazivne tumore (Fisherov test, $P = 0,374$) (Slika 19a). S druge strane, *Myd88*^{KO} skupina razvila je prvenstveno neinvazivne TMM-a, pretežno karcinom *in situ* (CIS) ($n = 5$) i displaziju ($n = 4$), što je značajno različito od WT skupine (Fisherov test, $P = 0,009$), kod koje su dominantno zastupljeni invazivni tumori (Slika 19b).



Slika 19. Prevalencija razvoja neinvazivnih i invazivnih tumora mokraćnog mjehura nakon kroničnog eksperimenta između a) *Tlr4*^{KO} i b) *Myd88*^{KO} miševa u odnosu na WT kontrolnu skupinu. *Tlr4* – gen za receptor sličan Toll-u 4; *Myd88* – gen za mijeloidni diferencijacijski faktor 88; KO – engl. *knock-out*; WT – divlji tip (engl. *wild-type*); n – broj eksperimentalnih miševa po skupini; NI – neinvazivni TMM; I – invazivni TMM.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

S obzirom na prevladavanje neinvazivnih tumora u *Myd88*^{KO} skupini, provedena je i histološka analiza tipa i stupnja upale uspoređujući KO i WT uzorke. Nisu zabilježene značajne razlike tipa i stupnja upale između *Myd88*^{KO} i WT uzoraka nakon kroničnog tretmana (Tablica 4), kao ni između *Tlr4*^{KO} miševa i WT kontrolne skupine (Tablica 4).

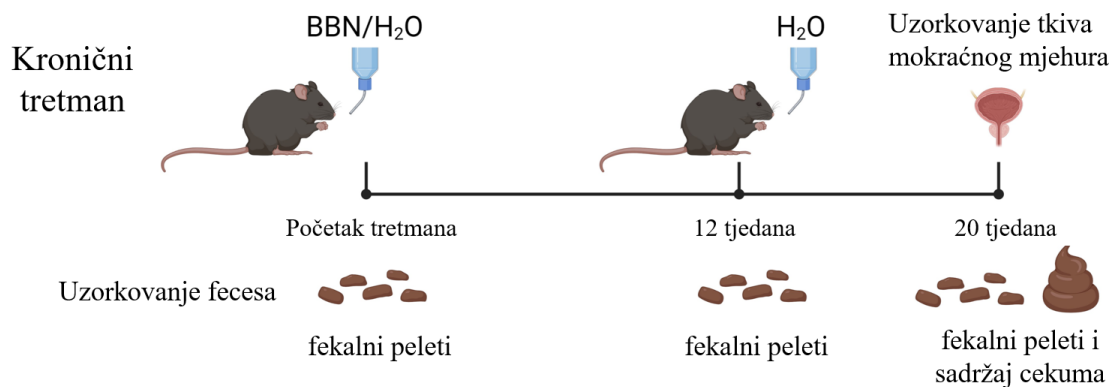
Tablica 4. Usporedba prisutnosti tipa i stupnja upale u uzorcima mokraćnih mjehura između *Tlr4*^{KO} i *Myd88*^{KO} skupina u odnosu na WT skupinu nakon kroničnog tretmana BBN-om

Skupina	N	Tip upale		Stupanj upale			
		Fokalna	Difuzna	0	1	2	3
WT	22	22	0	0	20	2	0
<i>Tlr4</i> ^{KO}	16	15	1	0	11	5	0
<i>P</i> *		0,421		0,421			
WT	26	25	1	0	23	3	0
<i>Myd88</i> ^{KO}	15	15	0	0	15	0	0
<i>P</i> *		1		0,287			

*Fisherov test

4.5. Promjene u raznolikosti mikrobiote tijekom razvoja tumora mokraćnog mjehura

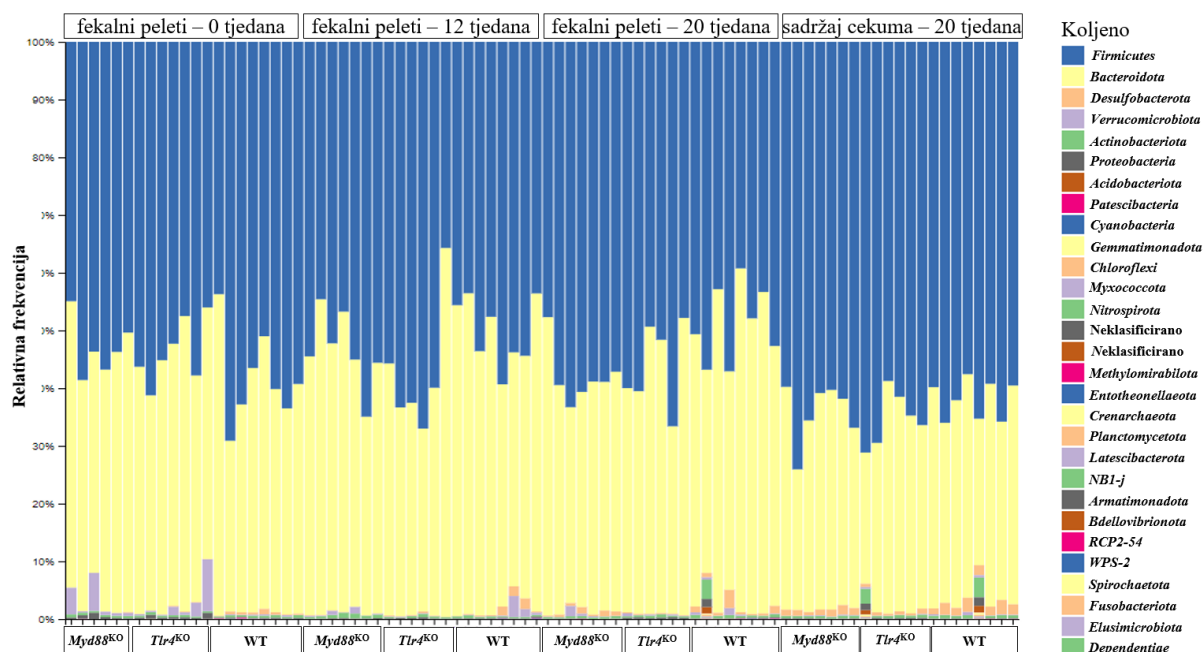
Kako bi se procijenila dinamičnost promjene mikrobiote tijekom razvoja tumora u kroničnom eksperimentu, provedena je 16S metagenomska analiza uzoraka DNA izoliranih iz uzoraka stolice tj. fekalnih peleta miševa iz *Tlr4*^{KO}, *Myd88*^{KO} i WT skupina, prije početka tretmana, nakon 12 tjedana tretmana BBN-om te nakon završetka tretmana od 20 tjedana. Po završetku kroničnog tretmana analizirani su i uzorci fekalnog sadržaja cekuma, uzeti nakon žrtvovanje (Slika 20).



Slika 20. Shematski prikaz uzorkovanja fekalnih peleta i sadržaja cekuma miševa iz *Tlr4*^{KO}, *Myd88*^{KO} i WT skupina tijekom kroničnog eksperimenta (izrađeno pomoću BioRender-a). H₂O – autoklavirana voda za piće.

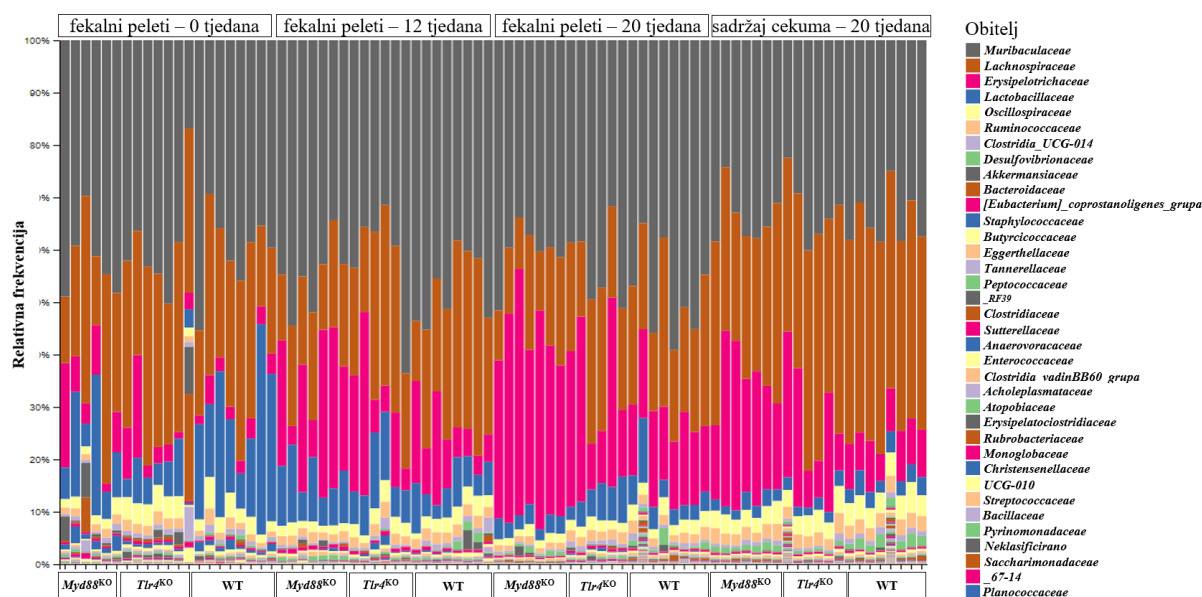
(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

Ukupno 84 uzorka generirala su 6 563 005 fragmenata sekvenci (engl. *tags*), s prosječno 78 131 fragmentom po uzorku. Ti fragmenti sekvenci pripisani su varijantama ampliconskih sekvenci (ASV), točnije njih 2 584. Slike 21 i 22 prikazuju relativnu zastupljenost dominantnih bakterijskih filogenetskih koljena i obitelji. Filogenetska koljena *Firmicutes* i *Bacteroidota* predstavljala su više od 90% zabilježenih koljena po uzorku (Slika 21), dok su *Muribaculaceae*, *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Lactobacillaceae* i *Oscillospiraceae* bile pet najzastupljenijih bakterijskih obitelji u svim uzorcima (Slika 22).



Slika 21. Dinamika relativne zastupljenosti crijevnih dominantnih bakterijskih filogenetskih koljena tijekom kroničnog eksperimenta, u ovisnosti o genotipu i vremenskim točkama prikupljanja uzoraka fecesa (fekalni peleti i sadržaj cekuma).

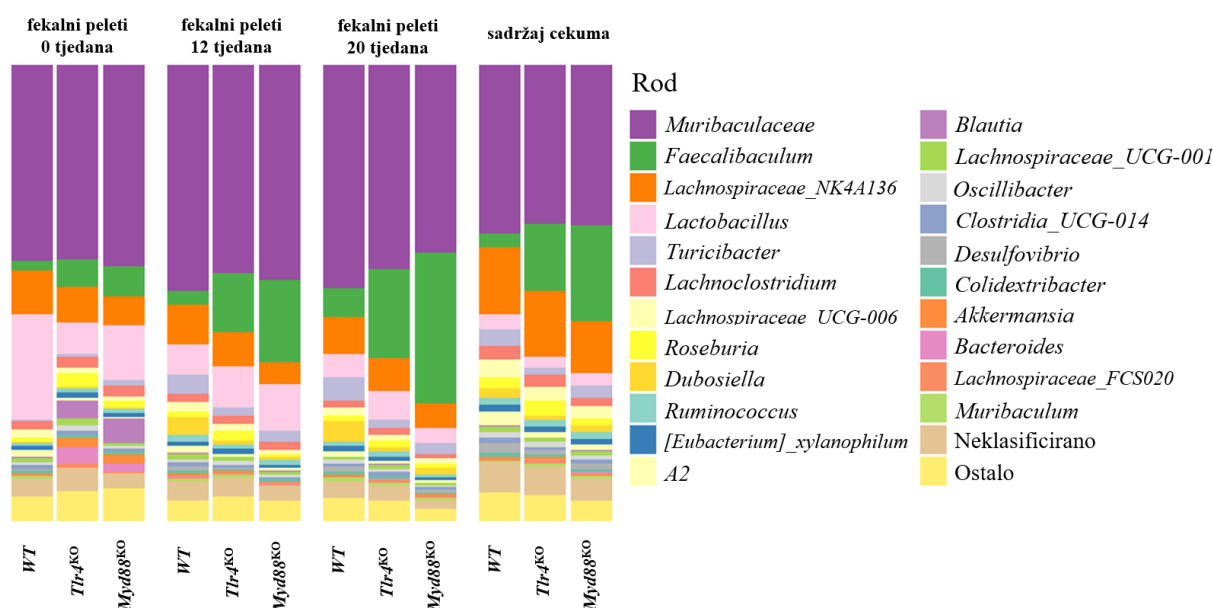
(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)



Slika 22. Dinamika relativne zastupljenosti crijevnih dominantnih bakterijskih filogenetskih obitelji tijekom kroničnog eksperimenta, u ovisnosti o genotipu i vremenskim točkama prikupljanja uzoraka fecesa (fekalni peleti i sadržaj cekuma).

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

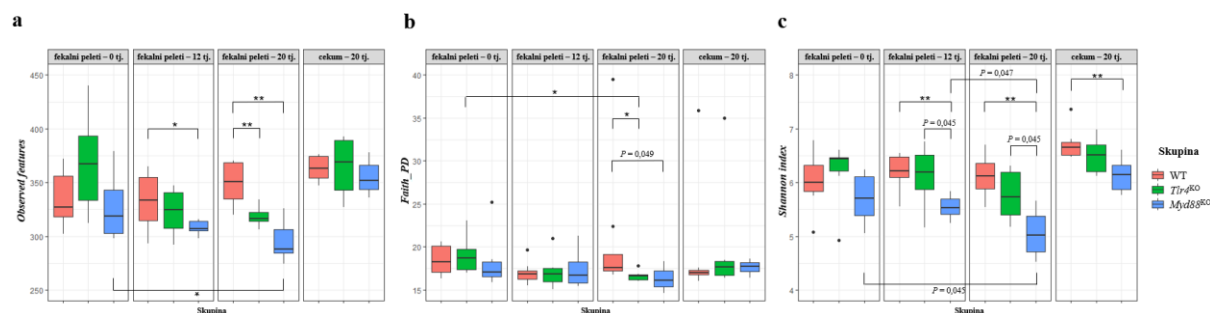
Slika 23 prikazuje relativnu zastupljenost dominantnih bakterijskih rodova, u ovisnosti o genotipu i vremenskim točkama prikupljanja uzoraka fecesa tijekom kroničnog tretmana. Rod *Muribaculaceae* bio je najzastupljeniji, dok je rod *Faecalibaculum* pokazao trend rasta unutar skupine Myd88^{KO} miševa tijekom kroničnog eksperimenta.



Slika 23. Dinamika relativne zastupljenosti crijevnih dominantnih bakterijskih filogenetskih rodova tijekom kroničnog eksperimenta, u ovisnosti o genotipu i vremenskim točkama prikupljanja uzoraka fecesa (fekalni peleti i sadržaj cekuma).

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

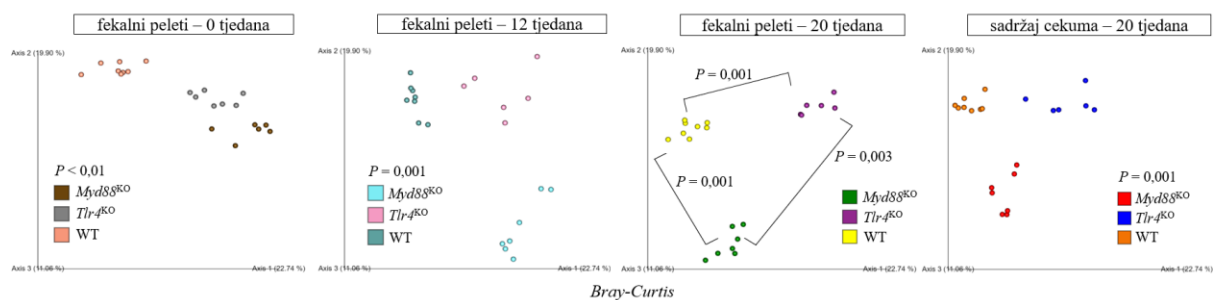
Prije tretmana BBN-om, između ispitivanih genotipskih skupina nije bilo značajnih razlika u mjerama alfa raznolikosti, uzimajući u obzir bogatstvo uzorka (engl. *Observed features*) ($P > 0,074$) (Slika 24a), filogenetsku komponentu (engl. *Faith_PD*) ($P > 0,728$) (Slika 24b) i raznolikost (engl. *Shannon index*) ($P > 0,063$) (Slika 24c), premda je *Myd88*^{KO} skupina imala najnižu vrijednost sve tri mjere alfa raznolikosti. Očekivano, vrijednosti mjera alfa raznolikosti bile su niže nakon 12 tjedana tretmana BBN-om, dok su se nakon sljedećih 8 tjedana, bez tretmana BBN-om, djelomično oporavile ili ostale nepromijenjene. Iako zamijećene, opisane oscilacije nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$). Iznimno, u *Myd88*^{KO} skupini zabilježen je granično značajan pad vrijednosti mjere *Observed features* i Shannonova indeksa ($P = 0,045$) od početka do kraja kroničnog eksperimenta. Također, mjere *Observed features* i *Shannon* indeks su bile značajno niže u *Myd88*^{KO} skupini u odnosu na WT skupinu nakon 20 tjedana tretmana ($P < 0,01$), dok je mjera *Faith_PD* bila granično niža u *Myd88*^{KO} skupini u odnosu na WT skupinu ($P = 0,049$). U uzorcima sadržaja crijeva sakupljenim iz cekuma na kraju eksperimenta, rezultati su pokazali smanjenje *Shannon* indeksa u skupini *Myd88*^{KO} miševa u usporedbi s WT skupinom ($P < 0,01$).



Slika 24. Mjere alfa raznolikosti crijevne mikrobiote u ovisnosti o genotipu i vremenskim točkama prikupljanja uzoraka fecesa (fekalni peleti i sadržaj cekuma): a) *Observed features*, b) *Faith PD*, i c) *Shannon index*. * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, tj. – tjedni.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

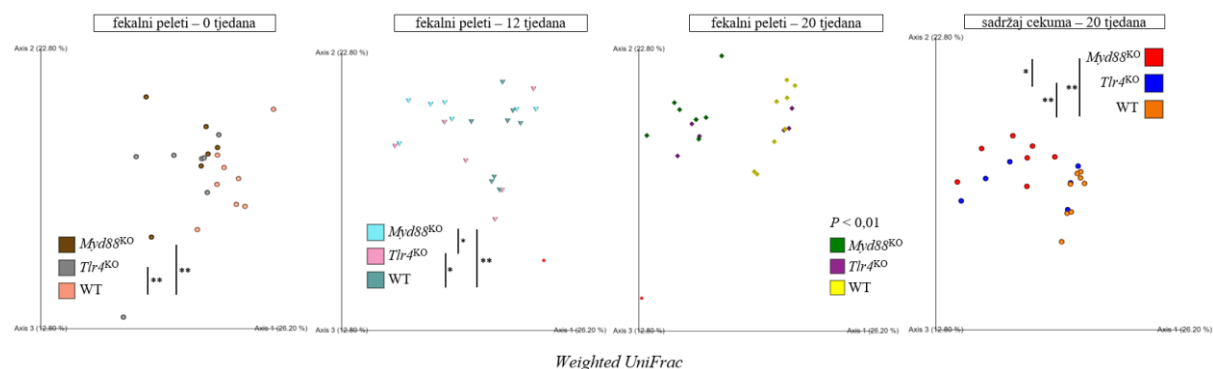
Usporedba mjera beta raznolikosti među skupinama analizirana je pomoću *Bray-Curtis* udaljenosti (Slika 25) i *Weighted UniFrac* metode (Slika 26). *Bray-Curtis* PCoA grafovi pokazuju da se uzorci iz WT, *Tlr4*^{KO} i *Myd88*^{KO} skupina značajno grupiraju unutar skupine, odnosno u svim vremenskim točkama kroničnog eksperimenta su razdvojeni prema razlikama u bogatstvu i raznolikosti koje mjera *Bray-Curtis* analizira. Analizom ove mjere je vidljivo kako *Myd88*^{KO} skupina, kroz cijeli kronični tretman ima značajno najniže vrijednosti (Slika 25).



Slika 25. Bray-Curtis mjera beta raznolikosti crijevne mikrobiote u ovisnosti o genotipu i vremenskim točkama prikupljanja uzoraka fecesa (fekalni peleti i sadržaj cekuma).

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

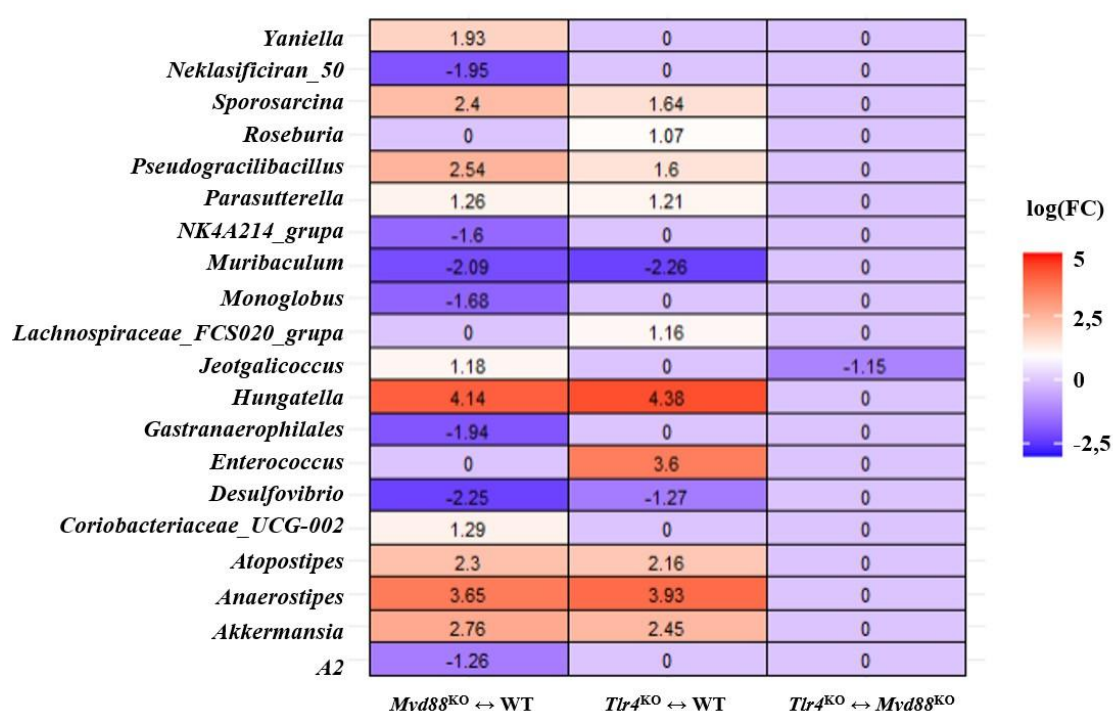
Weighted UniFrac mjera beta raznolikosti, koja uzima u obzir i filogenetsku raznolikost, također je pokazala statistički značajno grupiranje unutar skupina, iako opisane segregacije na PCoA grafovima nisu bile sasvim očite (Slika 26).



Slika 26. Weighted UniFrac mjera beta raznolikosti crijevne mikrobiote u ovisnosti o genotipu i vremenskim točkama prikupljanja uzoraka fecesa (fekalni peleti i sadržaj cekuma). * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

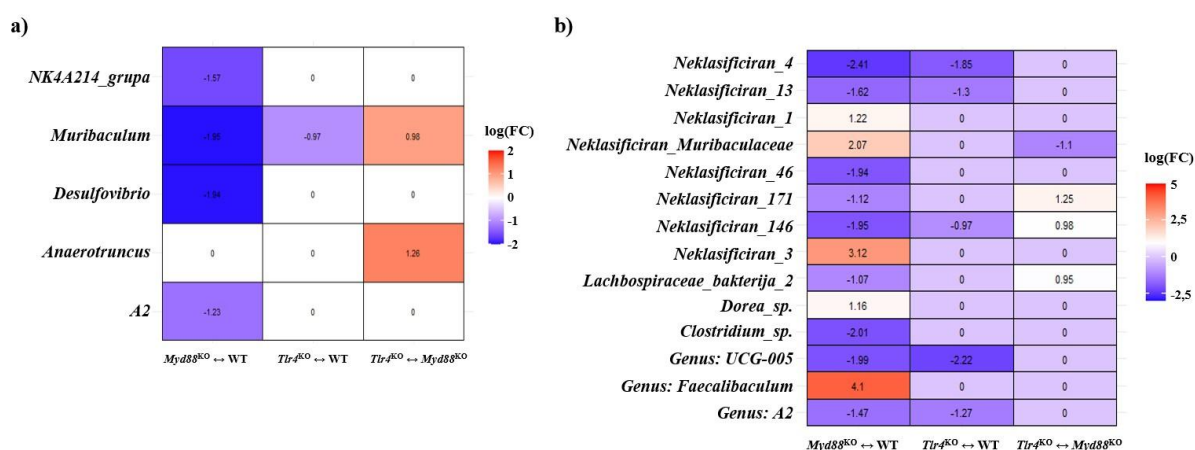
Za analizu razlika u zastupljenosti taksona između skupina u različitim vremenskim točkama kroničnog eksperimenta korišten je *ANCOM-BC2* test. Prije BBN tretmana tj. prije početka eksperimenta, *Myd88*^{KO} skupina je imala više od 17 puta ($P < 0,001$), a *Tlr4*^{KO} skupina više od 20 puta ($P < 0,001$) veću zastupljenost roda *Hungatella* u usporedbi s WT skupinom (Slika 27). Slijede rodovi *Anaerostipes* s povećanjem zastupljenosti više od 12 puta ($P < 0,001$) i *Akkermansia* sa zastupljenošću višom od 5 puta ($P < 0,001$) u KO skupinama u odnosu na WT skupinu. Rodovi *Muribaculum* i *Desulfovibrio* bili su manje zastupljeni u KO skupinama u odnosu na WT miševe za više od četiri puta ($P < 0,001$) (Slika 27).



Slika 27. *ANCOM-BC2* diferencijalna analiza razlika u zastupljenosti bakterijskih rodova između *Myd88*^{KO}, *Tlr4*^{KO} i WT skupina, iz uzoraka fekalnih peleta, prije početka tretmana BBN-om. FC – engl. *fold change*.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

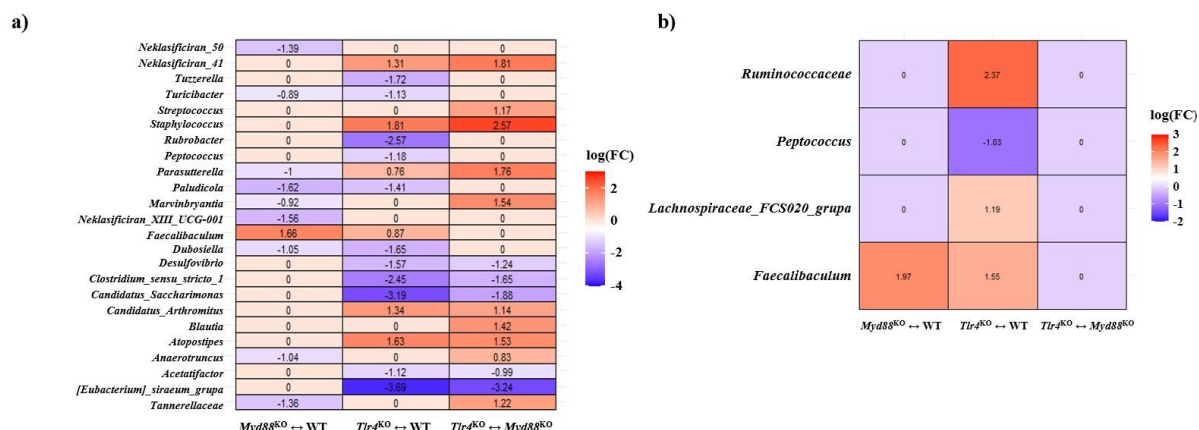
Nakon 12 tjedana tretmana BBN-om, razlike između skupina na razini roda bile su manje izražene i uglavnom prisutne u *Myd88*^{KO} skupini. Rodovi *Muribaculum* i *Desulfovibrio* ostali su manje zastupljeni u KO skupinama, iako su opažene razlike bile manje izražene ($P < 0,001$) (Slika 28a). Na razini vrste, više taksona bilo je manje zastupljeno u *Myd88*^{KO} skupini u odnosu na WT, no većina njih nije do sada kultivirana. Vrste vezane uz rod *Faecalibaculum* bile su 17 puta zastupljenije u *Myd88*^{KO} miševima u usporedbi s WT skupinom ($P < 0,001$) (Slika 28b).



Slika 28. ANCOM-BC2 diferencijalna analiza razlika u zastupljenosti bakterijskih a) rodova i b) vrsta između *Myd88*^{KO}, *Tlr4*^{KO} i WT skupina, iz uzoraka fekalnih peleta, nakon 12-tjednog tretmana BBN-om. FC – engl. fold change.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

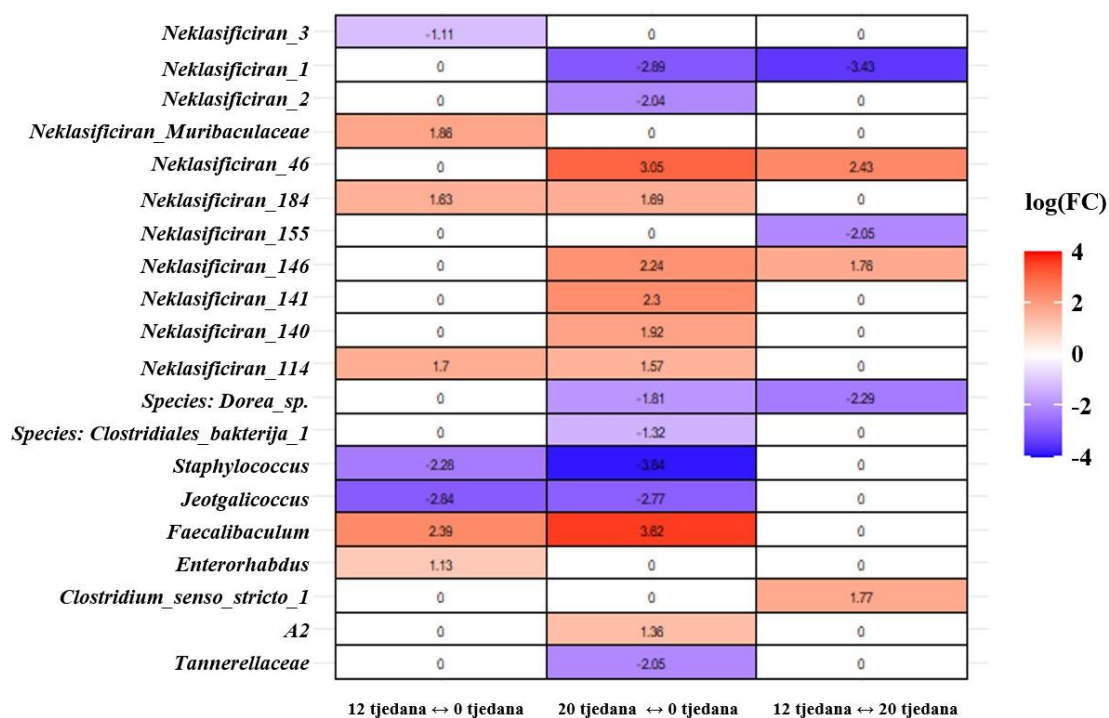
Na kraju eksperimenta tj. nakon 12 tjedana tretmana BBN-om i 8 tjedana tretmana vodom, uzorci fekalnih peleta i fekalnog sadržaja cekuma prikupljeni su i analizirani. Rod *Faecalibaculum* ostao je značajno zastupljeniji u *Myd88*^{KO} skupini u usporedbi s WT miševima, tri puta više u uzorcima fekalnih peleta ($P < 0,001$) (Slika 29a) i gotovo četiri puta više u uzorcima iz cekuma ($P < 0,001$) (Slika 29b).



Slika 29. ANCOM-BC2 diferencijalna analiza razlika u zastupljenosti bakterijskih rodova iz uzoraka a) fekalnih peleta i b) sadržaja cekuma između *Myd88^{KO}*, *Tlr4^{KO}* i WT skupina nakon završetka 20-tjednog kroničnog tretmana BBN-om. FC – engl. *fold change*.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

Daljnja analiza uzoraka fekalnih peleta iz *Myd88^{KO}* skupine tijekom vremenskih točaka pokazala je konzistentan obrazac, sličan prikazu u taksonomskoj distribuciji (Slika 23), potvrđujući ranije uočene promjene u zastupljenosti roda *Faecalibaculum*. Konkretno, ovaj rod postao je 5 puta zastupljeniji u *Myd88^{KO}* skupini nakon 12-tjednog tretmana BBN-om, u usporedbi sa raznolikošću uzoraka iz iste skupine prije tretmana, dok je do kraja 20. tjedna njegova zastupljenost porasla čak 14 puta u usporedbi sa stanjem prije početka tretmana ($P < 0,001$) (Slika 30). Rod *Staphylococcus* pokazao je pad zastupljenosti, gotovo 5 puta nakon tretmana BBN-om ($P < 0,001$) te 14 puta na kraju eksperimenta ($P < 0,001$) u usporedbi sa zastupljenošću ovog roda prije tretmana u *Myd88^{KO}* skupini (Slika 30).

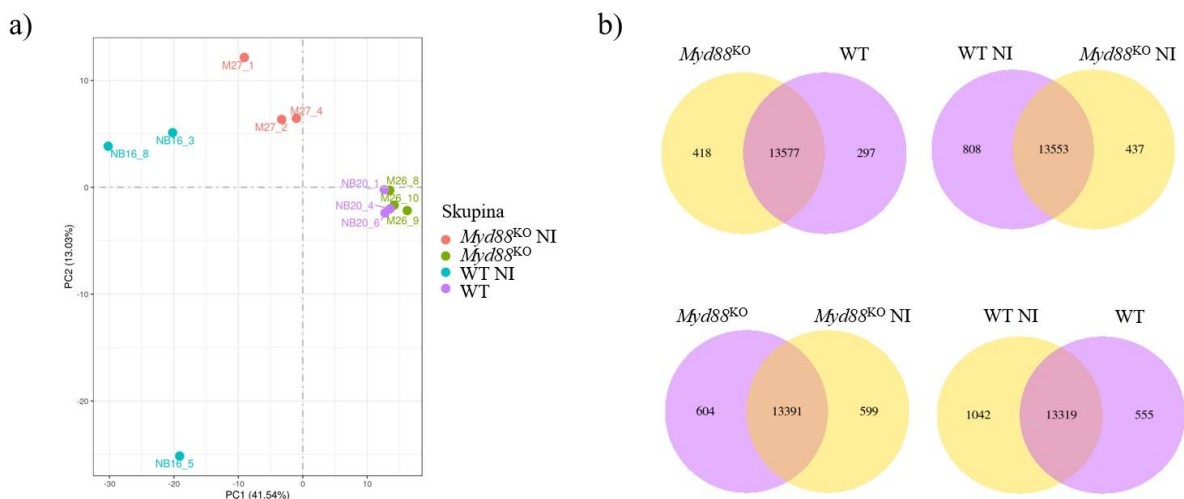


Slika 30. ANCOM-BC2 diferencijalna analiza razlika u zastupljenosti bakterijskih rodova između vremenskih točaka prikupljanja uzoraka fekalnih peleta u kroničnom tretmanu BBN-om u skupini *Myd88*^{KO}. FC – engl. fold change.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

4.6. Razlike u ekspresiji gena između *Myd88*^{KO} i miševa divljeg tipa u fiziološkim uvjetima i tijekom razvoja tumora mokraćnog mjehura

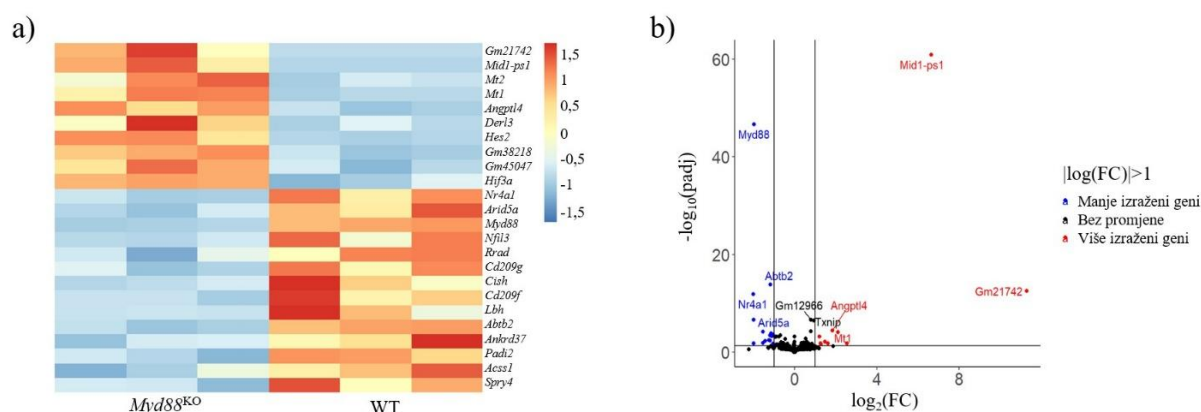
S obzirom na činjenicu da su *Myd88*^{KO} miševi imali manje invazivnih tumora mokraćnog mjehura, bilo je zanimljivo proučiti transkripcijske profile *Myd88*^{KO} i WT neinvazivnih (NI) tumorskih uzoraka, zajedno s njihovim netretiranim (NT) kontrolama. Analiza glavnih komponenti (PCA) (Slika 31a) pokazala je jasno razdvajanje uzoraka NI tumora i NT tkiva mokraćnog mjehura. Dok se NT uzorci tkiva između *Myd88*^{KO} i WT skupina nisu grupirali, uzorci tumorskog tkiva *Myd88*^{KO} i WT skupina su se jasno razdvojili tj. grupirali unutar iste skupine. Također, neinvazivni tumori iz WT skupine su pokazali znakove heterogenosti. Slika 31b prikazuje broj jedinstveno izraženih gena, kao i broj gena eksprimiranih u obje, međusobno uspoređene skupine.



Slika 31. PCA graf (a) prikazuje međusobno grupiranje netretiranih uzoraka *Myd88*^{KO} i WT skupina, kao i međusobno razdvajanje *Myd88*^{KO} NI i WT NI grupa međusobno, ali i u odnosu na netretirane uzorke (*Myd88*^{KO} i WT). Vennovi dijagrami (b) prikazuju broj gena izraženih isključivo u pojedinoj skupini te broj gena koji su izraženi u obje uspoređene skupine. NI – neinvazivni.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

U tkivu mokraćnog mjehura koje nije bilo tretirano BBN-om, samo je 25 gena bilo različito izraženo između testiranih skupina, a više od polovice njih su bili manje izraženi u *Myd88*^{KO} skupini u odnosu na WT (Slika 32a). Geni za metalotionein 1 i 2 (*Mt1* i *Mt2*), koji štite od oksidativnog stresa i karcinogeneze, četiri su ($P < 0,001$), odnosno pet puta ($P = 0,015$) više izraženi u *Myd88*^{KO} skupini u odnosu na WT skupinu (Slika 32 a i b). Gen angiopoietin-like 4 (*Angptl4*), koji sudjeluje u sprječavanju metastaza, također je tri puta više izražen u netretiranim uzorcima mokraćnog mjehura *Myd88*^{KO} miševa ($P < 0,001$) (Slika 32 a i b).

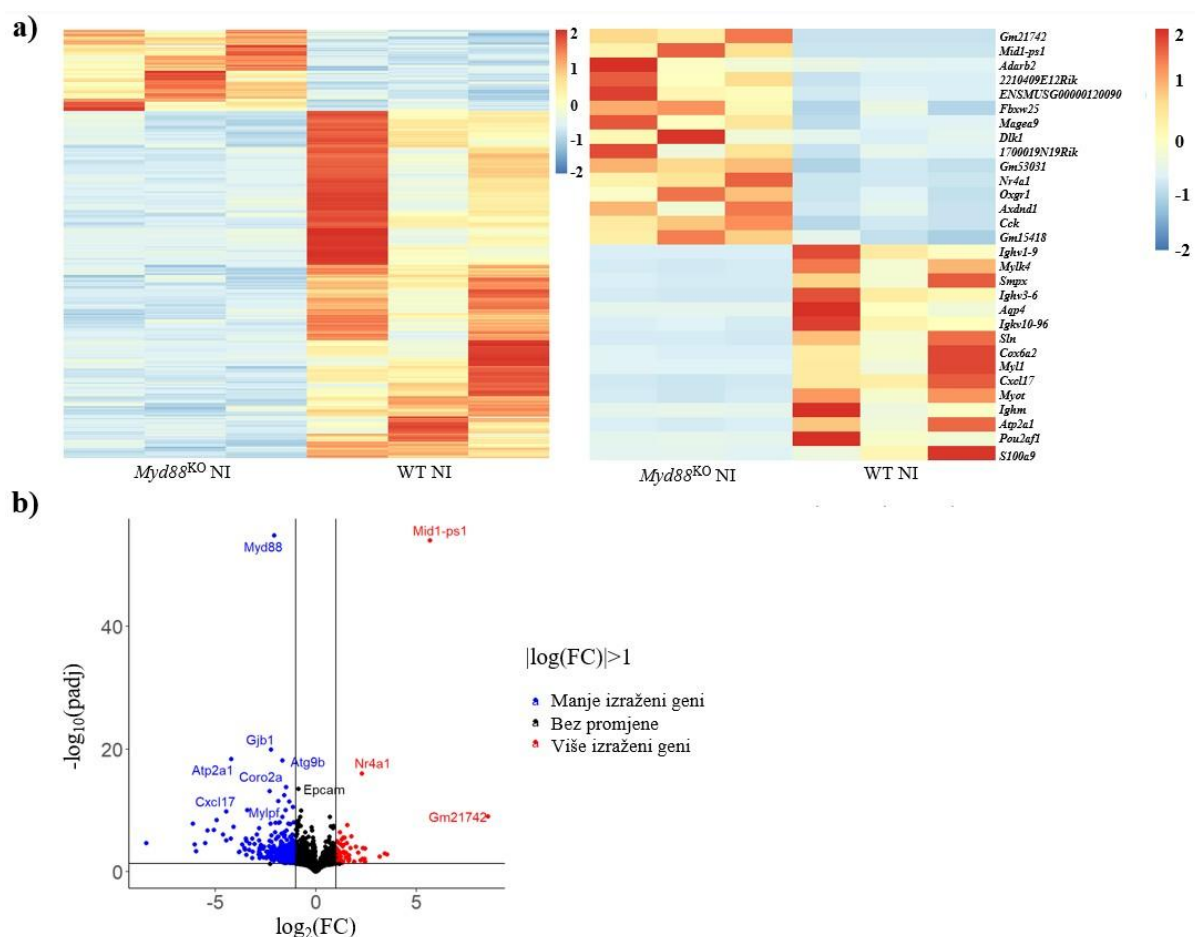


Slika 32. Heatmap graf (a) prikazuje statistički značajno različito eksprimirane gene između netretiranih uzoraka mokraćnih mjehura skupina *Myd88*^{KO} i WT (rangirano prema $\log_2(FC)$ vrijednosti). Volcano graf (b) prikazuje statistički značajno različito eksprimirane gene između netretiranih uzoraka mokraćnih mjehura skupina *Myd88*^{KO} i WT (rangirano prema prilagođenoj *P* vrijednosti). FC – engl. *fold change*, padj – prilagođena *P* vrijednost.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

Prilikom usporedbe *Myd88*^{KO} i WT neinvazivnih tumorskih uzoraka, pronađeno je 454 različito eksprimirana gena, pri čemu je većina njih bila manje izražena u *Myd88*^{KO} skupini (Slika 33a). Za istaknuti je gen nuklearnog receptora subfamilijske 4, grupa A član 1 (*Nr4a1*), koji ima ulogu u induciranju apoptoze te je bio četiri puta manje izražen u *Myd88*^{KO} miševima u usporedbi s WT netretiranim tkivom mokraćnog mjehura ($P < 0,001$) (Slika 33 a i b). Međutim, nakon indukcije tumora tretmanom BBN-om, ovaj gen postaje pet puta više izražen u *Myd88*^{KO} miševima u usporedbi s WT skupinom ($P < 0,001$) (Slika 33 a i b). Uz *Nr4a1*, nekoliko značajno više izraženih gena u *Myd88*^{KO} skupini bili su pseudogeni o kojima se ništa ne zna, što trenutno onemogućava interpretaciju njihove potencijalne uloge u suprimiranju ili poticanju tumorigeneze (Slika 33 a i b). Među genima koji su bili manje izraženi u *Myd88*^{KO} skupini NI tumora, ističe se gen za kemokin C-X-C motiv ligand 17 (*Cxcl17*), koji podržava tumorigenezu poticanjem angiogeneze. Ovaj gen je bio 21 put manje izražen u *Myd88*^{KO} NI tumorskim uzorcima u usporedbi s WT skupinom ($P < 0,001$) (Slika 33 a i b). Drugi izrazito manje eksprimirani geni, poput *Myh1* ($P < 0,001$), *My11* ($P < 0,001$) i *My1pf* ($P < 0,001$), povezani su s procesima kontrakcije mišićna (Slika 33 a i b, Tablica D1). Za istaknuti je kako navedeni geni, koji pridonose mišićnim kontrakcijama te su bili manje izraženi u *Myd88*^{KO} NI

tumorskim uzorcima u odnosu na WT NI tumorske uzorke, kada se uspoređuju tumorski uzorci s netretiranim kontrolama, više su eksprimirani samo u WT tumorskim uzorcima u odnosu na odgovarajuće NT kontrole ($P < 0,001$), dok razlika u njihovoj ekspresiji između *Myd88*^{KO} NI tumorskih i NT kontrolnih uzoraka nije uočena (Tablica D2). Gen za matriks metaloproteinazu 13 (*Mmp13*), odgovoran za razgradnju izvanstaničnog matriksa i invaziju tumorskih stanica, također je tri puta manje izražen u *Myd88*^{KO} NI tumorskoj skupini u usporedbi s WT NI tumorskim uzorcima ($P = 0.005$) (Tablica D1).

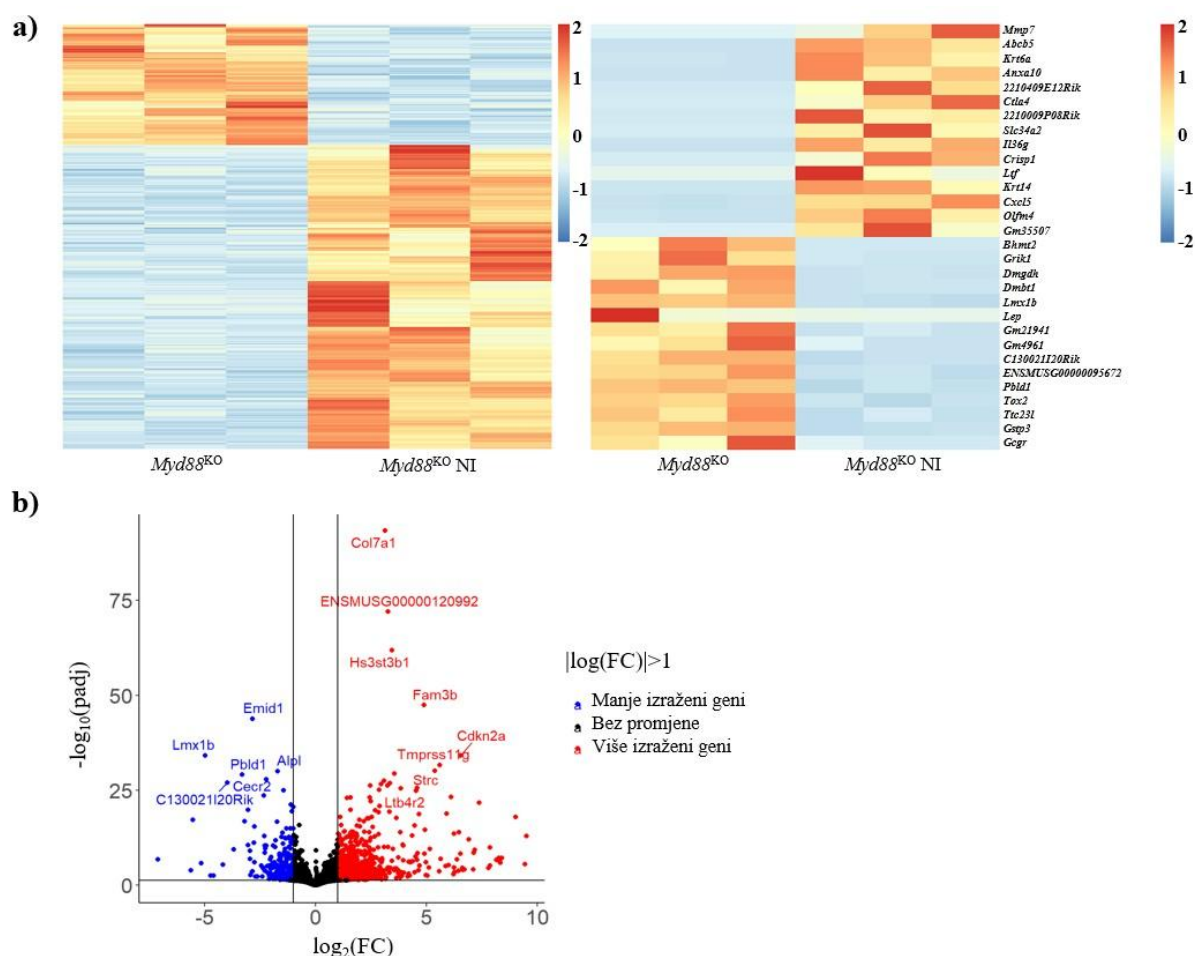


Slika 33. Heatmap graf (a) prikazuje statistički najznačajnije različito eksprimirane gene između neinvazivnih tumora mokraćnih mjehura skupina *Myd88*^{KO} i WT (rangirano prema $\log_2(FC)$ vrijednosti). Volcano graf (b) prikazuje statistički najznačajnije različito eksprimirane gene između neinvazivnih tumora mokraćnih mjehura skupina *Myd88*^{KO} i WT (rangirano prema prilagođenoj *P* vrijednosti). NI – neinvazivni, FC – engl. *fold change*, padj – prilagođena *P* vrijednost.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

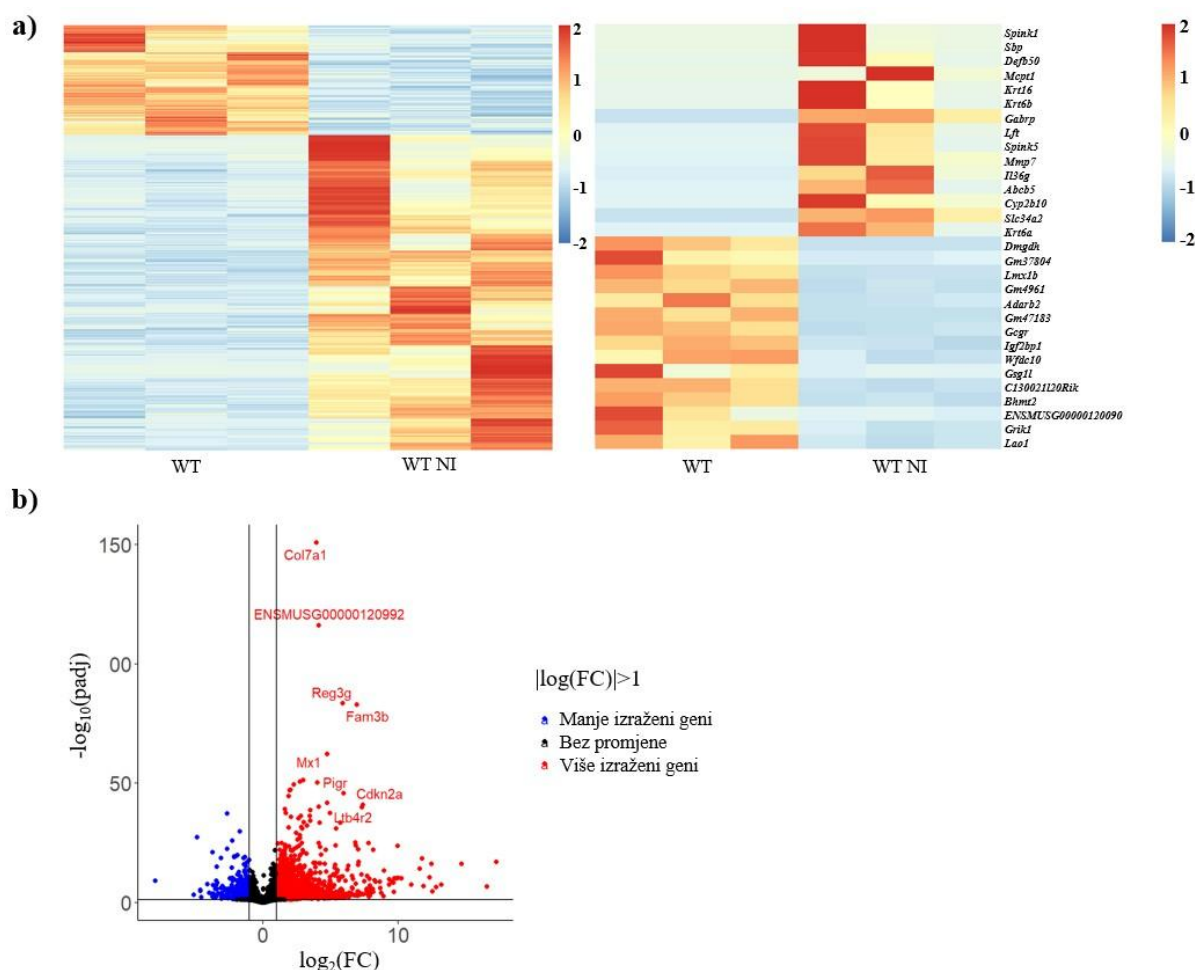
Usporedba NI tumorskog tkiva s netretiranim uzorcima mokraćnog mjehura rezultirala je detekcijom različito izraženih gena, od kojih je većina bila više eksprimirana u *Myd88*^{KO} (Slika 34) i WT (Slika 35) NI tumorskim skupinama u odnosu na pripadajuće netretirane uzorke. Većina različito (više ili manje) eksprimiranih gena bila je prisutna u obje skupine, *Myd88*^{KO} i WT (Slika 34 i 35). Gen za kolagen tip VII alfa 1 lanac (*Col7a1*), poznat po svojoj ulozi u poticanju neoplazije, bio je značajno više eksprimiran, više od 8 puta u *Myd88*^{KO} (Slika 34 a i

b) ($P < 0,001$), odnosno više od 15 puta u WT ($P < 0,001$) tumorskim uzorcima (Slika 35 a i b) u usporedbi s netretiranim kontrolama. S druge strane, gen *Col7a1* bio je dva puta manje izražen u *Myd88*^{KO} NI tumorskim uzorcima u usporedbi s WT NI tumorskim uzorcima, što je statistički bio graničan, odnosno nije statistički značajan rezultat, iako biološki potencijalno ima određenu ulogu.



Slika 34. Heatmap graf (a) prikazuje statistički najznačajnije različito eksprimirane gene između neinvazivnih tumora i netretiranih mokraćnih mjehura u skupini *Myd88*^{KO} miševa (rangirano prema $\log_2(\text{FC})$ vrijednosti). Volcano graf (b) prikazuje statistički najznačajnije različito eksprimirane gene između neinvazivnih tumora i netretiranih mokraćnih mjehura u skupini *Myd88*^{KO} miševa (rangirano prema prilagođenoj P vrijednosti). NI – neinvazivni, FC – engl. *fold change*, padj – prilagođena P vrijednost.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

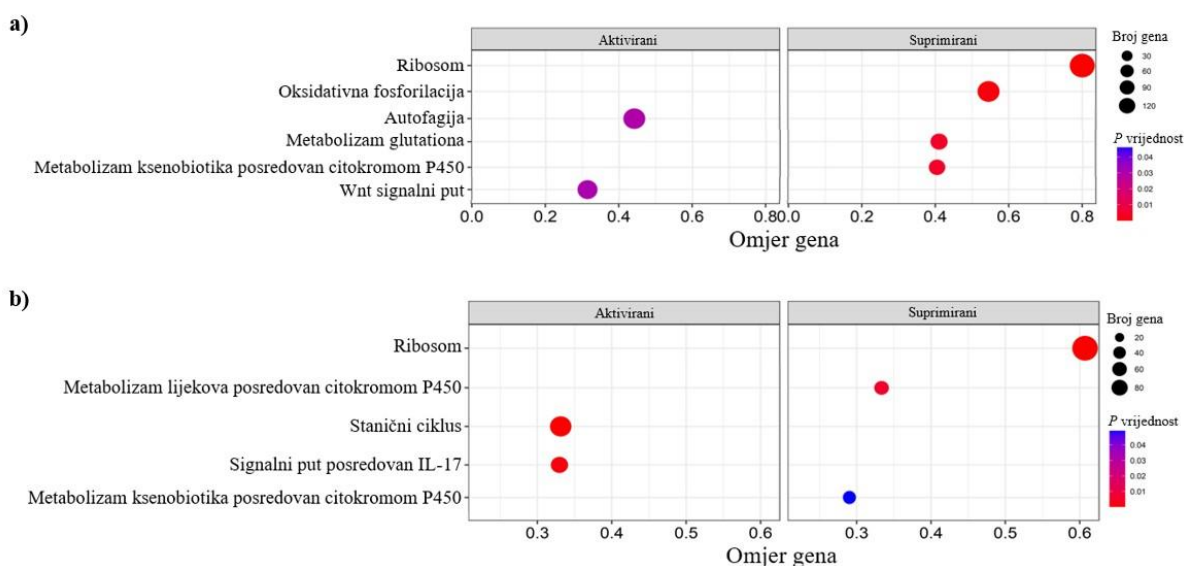


Slika 35. Heatmap graf (a) prikazuje statistički najznačajnije različito eksprimirane gene između neinvazivnih tumora i netretiranih mokraćnih mjehura u skupini WT miševa (rangirano prema $\log_2(FC)$ vrijednosti). Volcano graf (b) prikazuje statistički najznačajnije različito eksprimirane gene između neinvazivnih tumora i netretiranih mokraćnih mjehura u skupini WT miševa (rangirano prema prilagođenoj P vrijednosti). NI – neinvazivni, FC – engl. *fold change*, padj – prilagođena P vrijednost.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

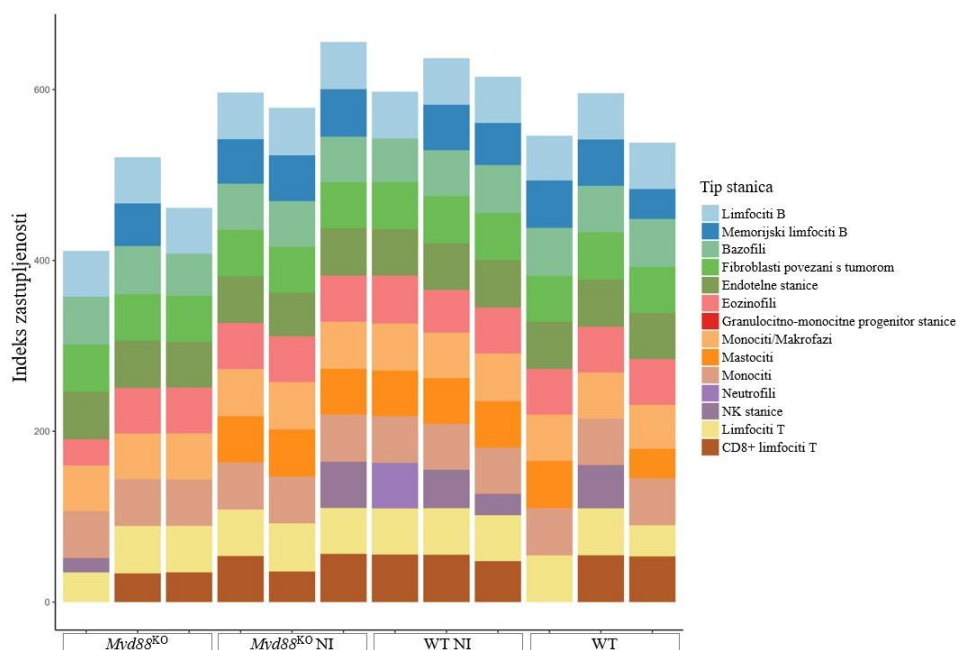
Također, KEGG (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) analiza je pokazala kako su gotovo svi geni povezani sa staničnim procesima objedinjenima kroz tzv. „ribosomskim put” manje izraženi u *Myd88^{KO}* NI tumorskim uzorcima u usporedbi s WT NI tumorima ($P < 0,001$) (Slika 36a) i *Myd88^{KO}* netretiranim kontrolama ($P < 0,001$) (Slika 36b). Iako geni koji kodiraju za ribosomske proteine pojedinačno nisu bili značajno manje

ekspimirani (manje od dva puta) (Tablica D3), ako se analiziraju sveobuhvatno, uzrokuju značajnu promjenu u *Myd88*^{KO} NI tumorima.



Slika 36. Najrelevantniji značajno aktivirani i suprimirani KEGG putevi uspoređujući a) neinvazivne tumore mokraćnih mjehura između *Myd88*^{KO} i WT skupine i b) netretirane uzorke mokraćnih mjehura između *Myd88*^{KO} i WT skupine. Veličina točaka predstavlja broj gena povezanih s određenim KEGG putem, a boja točaka označava razinu značajnosti. (Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

Analizirajući podatke dobivene sekvenciranjem, procijenjen je i upalni odgovor. Program *mMCP-counter*, korišten za analizu indeksa zastupljenosti imunoloških stanica, nije pokazao razlike između tumorskih i netretiranih uzoraka mokraćnog mjehura *Myd88*^{KO} i WT miševa ($P = 0,392$) (Slika 37), što upućuje na to da upalni odgovori u navedenim tkivima nisu bili ključni faktor u različitoj dinamici razvoja invazivnih TMM-a između *Myd88*^{KO} i WT skupina.

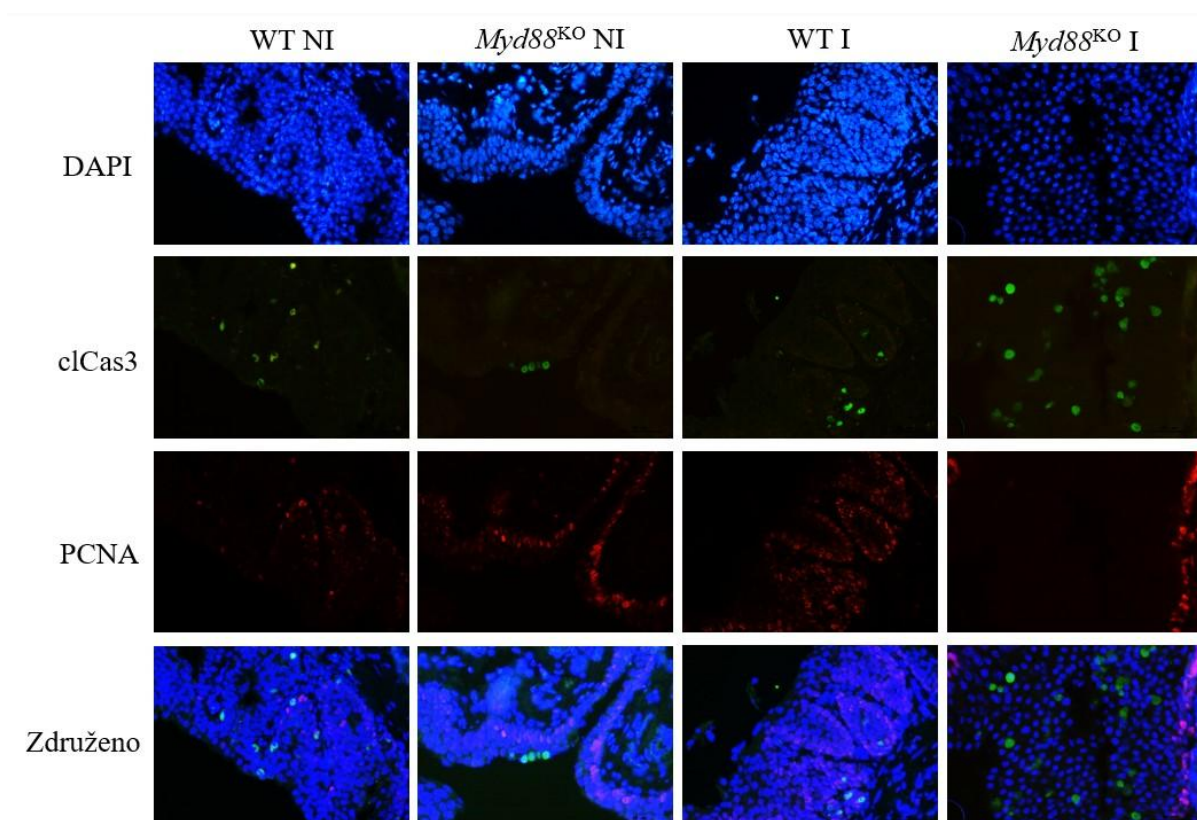


Slika 37. Procjena indeksa zastupljenosti imunoloških stanica između NI tumorskih i netretiranih uzoraka mokraćnog mjehura *Myd88*^{KO} i WT skupina, koristeći *Murine Microenvironment Cell Population counter (mMCP-counter)* program. NI – neinvazivni.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

4.7. Analiza proliferacijskog i apoptotskog markera u tumorima mokraćnog mjehura *Myd88*^{KO} miševa

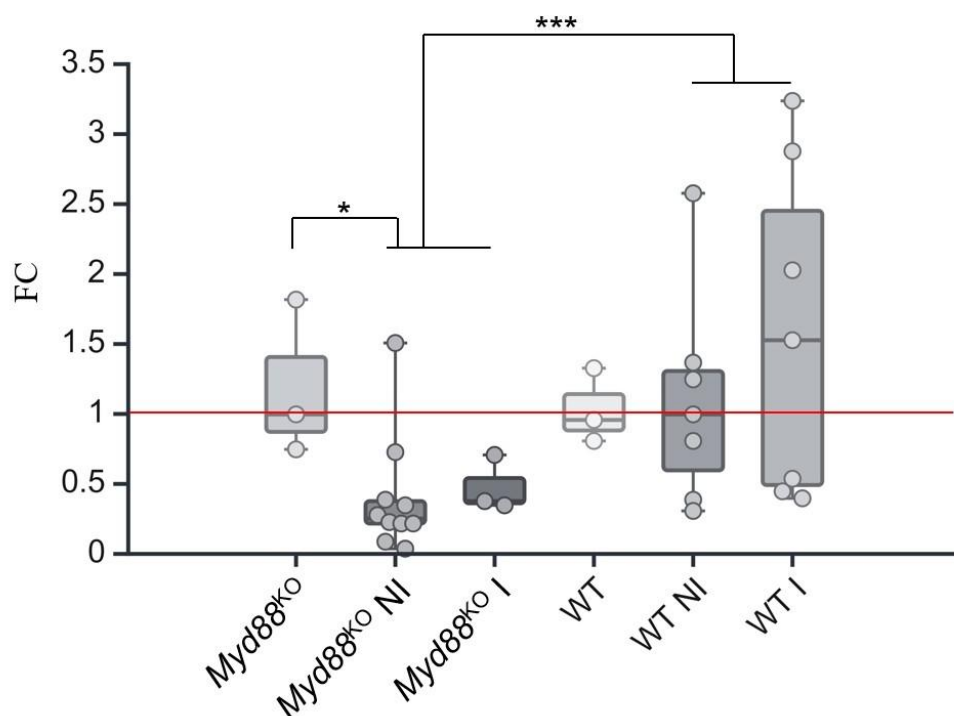
Kako bi se okarakterizirala invazivnost, proliferacija i status apoptoze između *Myd88*^{KO} i WT tumora, korišteni su proliferacijski nuklearni antigen (PCNA) i aktivirana kaspaza 3 (clCas3) kao odgovarajući markeri (Slika 38). Nakon nasumičnog odabira tri vidna polja visokog povećanja (40x) po uzorku, koja predstavljaju neinvazivne (NI) i invazivne (I) tumore, podaci su analizirani kao postotak clCas3 i PCNA pozitivnih stanica u odnosu na prosječni broj stanica epitela. Rezultati su pokazali da nema značajnih razlika između *Myd88*^{KO} i WT skupina u pogledu apoptoze ($P = 0,579$) ni proliferacije ($P = 0,475$).



Slika 38. Ekspresija clCas3 i PCNA u uzorcima tumora *Myd88*^{KO} i WT skupina prikazana imunofluorescencijskih bojenjem (40× povećanje). DAPI - stanične jezgre su obojene plavom bojom; NI - neinvazivni; I – invazivni.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

Zatim smo nastavili istraživati potencijal migracije tumorskih stanica i remodeliranje izvanstaničnog matriksa. U tu svrhu, svi NI i I uzorci iz *Myd88*^{KO} i WT skupina iz kroničnog eksperimenta te njihove tri netretirane kontrole po skupini, testirani su na ekspresiju gena *Mmp13* qPCR metodom (Slika 39). Dobiveni rezultati pokazali su kako je osnovna ekspresija gena *Mmp13* u *Myd88*^{KO} netretiranoj skupini veća u usporedbi s tumorskim uzorcima iz *Myd88*^{KO} skupine ($P = 0,022$). Iako je postojala tendencija da invazivni tumori izražavaju više gena *Mmp13* nego neinvazivni u obje skupine, rezultati nisu bili statistički značajni. Uspoređujući *Myd88*^{KO} i WT miševe, otkrivena je razlika kada su se analizirali NI i I tumori zajedno, pri čemu su WT uzorci pokazali veću ekspresiju gena *Mmp13* ($P < 0,001$).



Slika 39. Ekspresija gena *Mmp13* u uzorcima neinvazivnih i invazivnih tumora iz *Myd88*^{KO} i WT skupina te u odgovarajućim netretiranim kontrolama. Crvena linija označava početnu točku na kojoj nema promjene. FC – engl. *fold change*, NI – neinvazivni, I – invazivni, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

(Preuzeto i prilagođeno prema: Knezović D, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:7176. Licenca: CC BY 4.0.)

5. RASPRAVA

Provedeno istraživanje pokazalo je kako miševi bez funkcionalnog gena *Myd88* razvijaju manje invazivne tumore mokraćnog mjehura. MYD88 je ključni signalni prijenosnik od većine receptora sličnih Toll-u, te je odgovoran za regulaciju staničnog odgovora na mikroorganizme (285). Tradicionalno se smatralo da su mokraćni mjehur i urin sterilni, no otkriće urinarne mikrobiote je to opovrgnulo (286). Od tada je porastao broj istraživanja usmjerenih na razumijevanje uloge mikrobiote u razvoju tumora mokraćnog mjehura (142,190). S obzirom na sve jasniji utjecaj mikrobiote na nastanak tumora mokraćnog mjehura, potrebno je provesti mehanističke studije analizirajući razvoj tumora u kontekstu nefunkcionalnih mikrobioloških receptora i njihovih signalnih prijenosnika, kako bi se razjasnili podležeci mehanizmi i time omogućio razvoj i unaprjeđenje preventivnih, dijagnostičkih i terapijskih opcija. U tom kontekstu, ključnu ulogu imaju receptor TLR4, koji prepoznaje lipopolisaharide Gram-negativnih bakterija, i njegova signalna molekula MYD88 (287). Kako bismo istražili njihov utjecaj na razvoj TMM-a, miševi s nefunkcionalnim TLR4 i MyD88 proteinima (*Tlr4*^{KO} i *Myd88*^{KO}) bili su izloženi BBN-u tj. poznatom karcinogenu mokraćnog mjehura kroz 2 ili 20 tjedana.

5.1. Utjecaj receptora TLR4 i signalne molekule MYD88 na razvoj tumora mokraćnog mjehura

Suprotno očekivanjima, miševi s nefunkcionalnim receptorom TLR4 nisu pokazali značajne razlike u odgovoru na karcinogen BBN u usporedbi s miševima divljeg tipa, i to ni nakon akutne ni kronične izloženosti. Točnije, histološka analiza uzoraka nakon akutnih pokusa nije otkrila razlike u zastupljenosti fibroze, edema te tipa i stupnja upale između *Tlr4*^{KO} i *Myd88*^{KO} miševa u usporedbi s WT kontrolnom skupinom, a nakon kroničnog pokusa također nisu zabilježene razlike u stupnju invazije tumora između *Tlr4*^{KO} i WT miševa, odnosno obje skupine su uglavnom razvile invazivne tumore. Za razliku od toga, miševi s nefunkcionalnom signalnom molekulom MYD88 imali su znatno nižu učestalost razvoja invazivnih tumora mokraćnog mjehura u odnosu na miševe divljeg tipa. Dosadašnja istraživanja već su istaknula važnost gena *Myd88* u razvoju različitih vrsta raka, pri čemu je većina protumorigenih aktivnosti povezana s mutacijama koje intenziviraju njegovu funkciju (285,288–291). Protein MYD88 regulira ključne aspekte progresije tumora, uključujući rast, invaziju, metabolizam i izbjegavanje imunološkog odgovora, a također aktivira i Ras onkogeni put, koji je povezan s razvojem TMM-a (290,292,293). Uloga signalne molekule MYD88 u nastanku tumora mokraćnog mjehura do sada nije izravno istražena, iako su zabilježene mutacije gena *MYD88*

kod oboljelih (294). Sun i sur. su pokazali utjecaj osi circCEP128/miR-145-5p/MYD88 na poticanje progresije TMM-a. Točnije, prekomjerni izražaj circCE28 u TMM-u dovodi do naknadnog smanjenja miR-145-5p i povećanja MYD88 izražaja i signalizacije (295). S obzirom da se MYD88 signalizacija povezuje s progresijom više vrsta tumora, njezino utišavanje bi potencijalno moglo poslužiti kao jedna od opcija u kompleksnim terapijskim protokolima. Utišavanje MYD88 signalne molekule u stanicama SW480 (stanice adenokarcinoma debelog crijeva) i HCT116 (stanice raka debelog crijeva) ometa signalni put MYD88/NF- κ B/AP-1 i značajno inhibira rast i invaziju stanica raka. Ovi rezultati sugeriraju da aktivacija MYD88 ima važnu ulogu u razvoju kolorektalnog karcinoma te bi mogla poslužiti kao novi potencijalni biomarker ili terapijski cilj za ovaj oblik raka (233,296). Osim imunomodulacijskih učinaka, MYD88 sudjeluje i u jačanju otpornosti tumorskih stanica na terapiju. Inhibicija vezanja između CacyBP i MYD88 može smanjiti izlučivanje fraktalkina (CX3CL1), čime se smanjuje regrutacija makrofaga povezanih s tumorom (TAM) u tumorski imunološki mikrookoliš, što čini miševе s hepatocelularnim karcinomom osjetljivijima na terapiju usmjerenu na PD-1 (297). Također, molekularne metode usmjerene na blokadu MYD88 signalizacije za inhibiciju MDSC uspješno su ograničile rast tumora pluća i jajnika kod miševa (244). S obzirom na navedeno, ciljano utišavanje MYD88 signalnog puta sve više se prepoznaje kao vrijedan alat u razvoju personaliziranih antitumorskih strategija. Još uvijek je mnogo studija usmjerenih na inhibiciju MYD88 signalizacije u predkliničkoj fazi, budući da prepreke u razvoju učinkovitih lijekova u smislu bioraspodjelivosti i farmakokinetike i dalje predstavljaju fokus istraživanja (250).

5.2. Dinamika promjene raznolikosti crijevne mikrobiote tijekom razvoja tumora mokraćnog mjehura

Budući da eksperimentalni modeli nisu imali funkcionalni receptor za interakciju s mikrobiotom TLR4 i ključnu signalnu molekulu MYD88, za očekivati su bile promjene u raznolikosti mikrobiote te posljedično utjecaj na razvoj tumora. Sve je više dokaza koji upućuju na to da mikrobiota ima složenu i značajnu ulogu u razvoju tumora mokraćnog mjehura (122). Poremećaji u raznolikosti i zastupljenosti mikrobiote mogu poticati tumorigenezu kroz različite biološke mehanizme, uključujući kroničnu upalu, genotoksičnost, modulaciju imunološkog odgovora te promjene u metabolizmu. Detaljnije razumijevanje interakcija između mikrobiote i domaćina pruža značajan uvid u temeljne mehanizme razvoja tumora mokraćnog mjehura te može pridonijeti razvoju novih metoda ranog otkrivanja, prevencije i liječenja TMM-a

(110,123–126). Osim što može predstavljati izvor potencijalno patogenih čimbenika, mikrobiota može djelovati i kao modulator obrambenih mehanizama unutar različitih tkiva pa tako i mokraćnog mjehura (298,299). U životinja koje nisu imale funkcionalnu signalnu molekulu MYD88 zabilježena je najmanja raznolikost mikrobiote, a taj trend je ostao prisutan i tijekom razvoja tumora. Ova smanjena raznolikost mikrobiote potencijalno je mogla utjecati na gene osjetljive na kolonizaciju, poput *Angptl4*, gena koji ima ulogu u spriječavanju metastaza (300,301), a koji je bio tri puta više zastupljen u zdravom tkivu mokraćnog mjehura *Myd88^{KO}* miševa u odnosu na WT skupinu. Za istaknuti je također povećana prisutnost bakterija iz roda *Faecalibaculum* u *Myd88^{KO}* miševa koja je zabilježena nakon izlaganja karcinogenu te je takav trend nastavljen i tijekom cijelog trajanja kroničnog eksperimenta. Ovaj rod sadrži bakterije koje proizvode butirat, kratkolančanu masnu kiselinu (SCFA) s antitumorskim svojstvima, koja se prvenstveno stvara u debelom crijevu kroz mikrobnu fermentaciju prehrambenih vlakana (302,303). Biokemijski, butirat služi kao glavni izvor energije za kolonocite putem mitohondrijske β -oksidacije, podržavajući integritet sluznice i funkciju barijere, te djeluje sustavno nakon apsorpcije (304). Već je poznat po svojoj ulozi u inhibiciji razvoja raka debelog crijeva (305), dojke (306) i mokraćnog mjehura (307), gdje djeluje kao inhibitor histonske deacetilaze, potiče apoptozu te smanjuje proliferaciju i migraciju stanica raka (308). Ovi epigenetski učinci potiču zaustavljanje staničnog ciklusa u G₀/G₁ fazi, inducirajući p21 te suprimirajući cikline i CDK-ove, a također induciraju i apoptozu kroz unutarnje (generiranje mitohondrijskih reaktivnih kisikovih spojeva, poremećaj ravnoteže Bax/Bcl-2, oslobađanje citokroma c, aktivacija kaspaze 9 i 3) i vanjske puteve (povećana ekspresija receptora smrti/Fas-TRAIL). Butirat također ometa više onkogenih signalnih kaskada, uključujući NF- κ B, STAT3, HIF-1 α , VEGF i ERK/MAPK, čime suprimira angiogenezu, invaziju i metastaze (309–312). S imunološkog aspekta, butirat potiče diferencijaciju regulatornih limfocita T i sekreciju IL10, smanjuje broj mijeloidnih supresorskih stanica te pojačava aktivnost citotoksičnih CD8⁺ limfocita T i stanica prirodnih ubojica, uključujući signalizaciju ovisnu o ID2 i IL12, čime se oblikuje antitumorski mikrookoliš (313–315). Njegov utjecaj na tumor mokraćnog mjehura do sada je pokazan na staničnim linijama i mišjim modelima (307,308,316,317). Natrijev butirat smanjuje migraciju humanih stanica tumora mokraćnog mjehura, inducira apoptozu posredovanu reaktivnim kisikovim spojevima te potiče AMPK-mTOR ovisnu autofagiju putem povećanog izražaja miR-139-5p i supresije Bmi-1 (308,316). Povećava kemosenzitivnost humanih stanica tumora mokraćnog mjehura na agense poput cisplatine, mitomicina C i adriamicina putem smanjenja ekspresije Bcl-2 i aktivacije kaspaze 3 (316,317). Probiotički proizvođač butirata,

Butyricicoccus pullicaecorum, potiče ekspresiju receptora za SCFA GPR43 i GPR109B, transportera masnih kiselina FABP4 te tumorskih supresora poput BLCAP u urotelima stanicama, što dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze u *in vitro* i *in vivo* modelima (317).

5.3. Usporedba genske ekspresije u zdravom i tumorskom tkivu između *Myd88*^{KO} i WT skupine miševa

U netretiranom mokraćnom mjehuru *Myd88*^{KO} miševa uočen je porast ekspresije gena *Mt1* i *Mt2* koji su poznati po svojoj ulozi u neutralizaciji slobodnih radikala, detoksifikaciji teških metala i prevenciji oksidativnog oštećenja DNA. Ovi nalazi podupiru njihovu ulogu u prevenciji karcinogeneze, kako je opisano u ranijim radovima koji ukazuju da je gubitak funkcije metalotioneina povezan s povećanom osjetljivošću na karcinogene (318). Također, gen *Angptl4*, koji se povezuje sa sposobnosti da spriječi metastatsko širenje tumora regulacijom vaskularne propusnosti i integriteta epitelne barijere, bio je značajno više eksprimiran u *Myd88*^{KO} netretiranim uzorcima, što je potencijalno moglo utjecati na manju invazivnost tumora u ovoj skupini (319–322). S druge strane, gen *Nr4a1*, koji posreduje proapoptotske signale i često djeluje kao tumor supresor, u netretiranim uzorcima bio je četiri puta manje izražen u *Myd88*^{KO} skupini u odnosu na WT. Međutim, nakon indukcije tumora BBN-om, ekspresija *Nr4a1* znatno se povećala u *Myd88*^{KO} miševa. Ulogu gena *Nr4a1* u induciranju apoptoze i inhibiciji tumorske progresije potvrdile su studije u različitim tumorima, uključujući i u tumoru mokraćnog mjehura (323,324). Nadalje, gen *Cxcl17*, poznat po svojim angiogenim i imunomodulatornim svojstvima, bio je čak 21 put manje eksprimiran u tumorskim uzorcima *Myd88*^{KO} miševa u usporedbi s WT skupinom. CXCL17, osim što potiče angiogenezu, također može pridonijeti stvaranju imunosupresivnog mikrookruženja, čime se promiče rast tumora. Njegova inhibicija sve se češće istražuje kao potencijalna antitumorska strategija (325–328). Za izdvojiti je i gen *Mmp13*, koji sudjeluje u razgradnji izvanstaničnog matriksa i time omogućuje invaziju tumorskih stanica, čija je ekspresija bila značajno smanjena u tumorskim uzorcima *Myd88*^{KO} skupine, a što je u korelaciji s nalazima o smanjenoj invazivnosti ovih tumora (329). Uloga gena *Mmp13* u patogenezi tumora je detaljno opisana u idućem odjeljku poglavlja rasprave. Također, geni poput *Myh1*, *My11* i *My1pf*, koji su povezani s mišićnom kontraktilnošću i često se pojavljuju u visoko invazivnim fenotipovima tumorara (330,331), pokazali su smanjenu ekspresiju u *Myd88*^{KO} tumorima, što dodatno potvrđuje antitumorski učinak izostanka MYD88 signalizacije. Još jedan gen čija je ekspresija upola niža u *Myd88*^{KO}

skupini u odnosu na WT tumore je *Col7a1*, a povezan je s remodeliranjem izvanstaničnog matriksa i poticanjem razvoja neoplazija (332–335).

Zaključno, ovi podaci upućuju na to da izostanak MYD88 signalizacije dovodi do smanjene ekspresije gena povezanih s invazijom, angiogenezom i translacijom. Zaštitni profil nižeg genskog izražaja gena *Mt1*, *Mt2*, *Cxcl17*, *Mmp13*, *Myh1*, *My11* i *Col7a1* te višeg izražaja gena *Angptl4* i *Nr4a*, primijećen u *Myd88^{KO}* miševa, mogao bi sinergijski djelovati u suzbijanju razvoja i progresije tumora mokraćnog mjehura. MYD88 bi se, u tom smislu, mogao razmatrati kao terapijska meta, posebno u kombinaciji s imunoterapijom, dok bi neki od navedenih gena potencijalno mogli služiti kao biomarkeri invazivnosti i prediktivni pokazatelji odgovora na liječenje.

5.4. Analiza proliferacijskog i apoptotskog profila te markera razgradnje izvanstaničnog matriksa tumora mokraćnog mjehura u *Myd88^{KO}* modelu

Budući da u *Myd88^{KO}* skupini, koja je razvila manje invazivne tumore, nisu uočene razlike u ekspresiji proliferacijskog markera PCNA i apoptotičkog markera *clCas3* u odnosu na WT skupinu, analiziran je i potencijal migracije tj invazivnosti stanica TMM -a putem ispitivanja markera razgradnje izvanstaničnog matriksa. Rezultati RNA sekvenciranja pokazali su smanjenu ekspresiju gena *Mmp13* u neinvazivnim tumorima *Myd88^{KO}* miševa u usporedbi s divljim tipom. Dodatne qPCR analize potvrdile su višu ekspresiju gena *Mmp13* u tumorima WT miševa kada se neinvazivni i invazivni tumori analiziraju kao jedna skupina. Veća osjetljivost RNA sekvenciranja u odnosu na qPCR metodu (336,337) i moguće manji broj uzoraka od optimalnog za provođenje qPCR analize mogli bi biti razlozi manjim razlikama u dobivenim rezultatima između ove dvije metode. Ovaj gen kodira kolagenazu tj. matriks metaloproteinazu 13 koja je odgovorna za proteolitičku razgradnju sastavnica izvanstaničnog matriksa. MMP13 pokazuje izraženu aktivnost prema kolagenu tipa II, ali također može razgrađivati i kolagen tipa I i III, kao i druge komponente izvanstaničnog matriksa. Ova kolagenaza ima ključnu fiziološku ulogu u procesima kao što su razvoj skeleta, zacjeljivanje rana, resorpcija kosti te dinamičko remodeliranje tkiva. Međutim, disregulacija ekspresije gena *MMP13* može doprinijeti razvoju različitih patoloških stanja, pri čemu se osobito ističu maligni tumori i degenerativne bolesti zglobova (338). Svojim proteolitičkim djelovanjem na bazalnu membranu i stromu, MMP13 omogućuje invaziju tumorskih stanica u okolno tkivo te njihovo širenje putem krvnih i limfnih žila, čime aktivno sudjeluje u procesima metastaziranja i progresije bolesti (329). Prekomjerna ekspresija gena *MMP13* je opažena u različitim vrstama

tumora, kao što su karcinom dojke, pluća, kože i kolorektalni karcinom, uključujući i TMM, gdje potiče progresiju tumora, migraciju i metastaziranje (329,339). Smanjena ekspresija gena *Mmp13* u neinvazivnim tumorima *Myd88^{KO}* miševa može biti posljedica činjenice da je njegova protumorigena aktivnost posredovana signalnim putem MYD88/ERK/NF- κ B (340–342). Ekspresija i aktivnost MMP13 dodatno su potaknute pro-upalnim citokinima, poput TNF- α i IL-1 β , kao i aktivacijom signalnih puteva uključujući NF- κ B, MAPK i Wnt/ β -katenin. Ovi putevi omogućuju prijenos vanjskih podražaja u jezgru stanice te potiču transkripciju gena povezanih s invazivnim i agresivnim ponašanjem tumorskih stanica (343, 344).

5.5. Ograničenja studije

Unatoč značajnim uvidima koje pruža ova studija o ulozi TLR4 i MYD88 signalne kaskade u razvoju tumora mokraćnog mjehura, važno je istaknuti i nekoliko ograničenja studije. Istraživanje je provedeno na ograničenom broju KO miševa, što može umanjiti mogućnost uvida u sve potencijalne biološke učinke TLR4 i MYD88 deficijencije na proces karcinogeneze. Ipak, broj životinja korišten u eksperimentima pažljivo je odabran u skladu s etičkim smjernicama i načelima 3R (engl. *replacement, reduction, refinement*), koji nalažu smanjenje broja eksperimentalnih životinja bez kompromitiranja znanstvene valjanosti studije. Nadalje, u ovoj studiji tumor mokraćnog mjehura je induciran primjenom BBN-a, kemijskog karcinogena široko korištenog u eksperimentalnim modelima TMM-a, zbog njegove selektivnosti za urotel i sposobnosti da inducira tumore koji histopatološki i molekularno oponašaju tumor mokraćnog mjehura kod ljudi (96,103,110). Iako bi detaljnije ispitivanje utjecaja mikrobiote na razvoj tumora mokraćnog mjehura bilo moguće kroz inokulaciju specifičnih mikroorganizama izravno u mokraćni mjehur sterilnih ili mikrobiološki kontroliranih životinja, provedba takvih eksperimenata zahtijeva poznavanje i dostupnost definiranih potencijalnih uropatogena, kao i laboratorije koji imaju zadovoljene biosigurnosne uvjete te su osposobljeni za rad s patogenim mikroorganizmima. Također, iako novi dokazi upućuju na važnost urinarne mikrobiote na razvoj TMM-a, u ovoj studiji je analizirana crijevna mikrobiota. Ova odluka bila je rezultat tehničkih ograničenja povezanih s uzorkovanjem urina u miševa, točnije, volumen dobivenog urina je vrlo mali te često nije dostatan za pouzdane i reproducibilne metagenomske analize. S druge strane, crijevna mikrobiota koja je lako dostupna uzorkovanju, iako nije izravno prisutna u urinarnom traktu, ima važan sistemski utjecaj na imunološke i metaboličke odgovore te može služiti kao rezervoar potencijalnih uropatogena koji može bitno utječu na razvoj tumora mokraćnog mjehura (122). Iako opisana

ograničenja treba uzeti u obzir, rezultati ove studije pružaju iznimno vrijedan doprinos razumijevanju važnosti i uloge TLR4 i MYD88 signalizacije u karcinogenezi mokraćnog mjehura, što do sada nije značajnije istraženo, te pružaju temelj za buduća istraživanja translacijskih aspekata ove složene biološke interakcije.

5.6. Završna razmatranja

Otkrićem da miševi s nefunkcionalnom MYD88 signalizacijom razvijaju manje invazivne tumore mokraćnog mjehura i imaju promjenjeni profil mikrobiote te različitu ekspresiju određenih gena u odnosu na kontrolno stanje, naglašava se važnost MYD88 signalnog puta i mikrobiote u razvoju ove bolesti. Utišavanje signalizacije posredovane proteinom MYD88 predstavlja obećavajući terapijski pristup u liječenju malignih bolesti, osobito onih u kojima kronična upala doprinosi tumorskoj progresiji. Inhibitori MYD88 signalne molekule pokazali su potencijal u smanjenju ekspresije citokina poput TNF- α i IL-6, blokiranju aktivacije NF- κ B i MAPK puteva te sprječavanju regrutacije imunosupresivnih stanica, čime se smanjuje imunološka tolerancija tumora (233,244,250,296,297). Osim protuupalnog djelovanja, inhibicija MYD88 može oslabiti mehanizme otpornosti tumorskih stanica na kemoterapiju i imunoterapiju, čime se otvara mogućnost za njezine primjene u kombiniranim protokolima liječenja (297). Stoga se ciljano utišavanje MYD88 signalnog puta, ali i modulacija sastava mikrobiote u kliničkim uvjetima sve više prepoznaje kao vrijedan alat u razvoju personaliziranih antitumorskih strategija (156, 250).

6. ZAKLJUČCI

1. Deficit funkcije receptora TLR4 nije imao utjecaja na razvoj početnih histoloških promjena (fibroza, edem, upala i degenerativne promjene epitela) tijekom nastanka tumora mokraćnog mjehura induciranog karcinogenom BBN-om.
2. Manjak funkcionalnog receptora TLR4 nije imao utjecaja na razvoj tumora mokraćnog mjehura induciranog karcinogenom BBN-om.
3. Deficit funkcije signalne molekule MYD88 nije imao utjecaja na razvoj početnih histoloških promjena (fibroza, edem, upala i degenerativne promjene epitela) tijekom nastanka tumora mokraćnog mjehura induciranog karcinogenom BBN-om.
4. Miševi bez funkcionalne signalne molekule MYD88 razvili su manje invazivne tumore mokraćnog mjehura nakon indukcije tumora karcinogenom BBN-om.
5. Miševi bez funkcionalne MYD88 signalne molekule imali su značajno niže mjere alfa raznolikosti crijevne mikrobiote u odnosu na raznolikost unutar iste skupine prije indukcije tumora kao i u usporedbi s divljim tipom miševa nakon indukcije tumora mokraćnog mjehura.
6. Rod *Faecalibaculum* koji proizvodi kratkolančanu masnu kiselinu butirat, poznatu po svojim antitumorskim svojstvima, bio je zastupljeniji u *Myd88*^{KO} skupini miševa nakon tretmana BBN-om. Također, skupina *Myd88*^{KO} je pokazala rastući trend zastupljenosti roda *Faecalibaculum* tijekom kroničkog tretmana BBN-om.
7. Izostanak MYD88 signalizacije dovodi do smanjene ekspresije gena povezanih s invazijom, angiogenezom i translacijom. Među zaštitne obrasce spada niži izražaj gena *Mt1*, *Mt2*, *Cxcl17*, *Mmp13*, *Myh1*, *Myll* i *Col7a1* te viši izražaj gena *Angptl4* i *Nr4a*, primijećen u *Myd88*^{KO} miševa.
8. U neinvazivnim tumorima mokraćnog mjehura *Myd88*^{KO} miševa utvrđen je smanjen izražaj gena *Mmp13*, koji je važan za invazivnost i metastaziranje tumora.

7. SAŽETAK

Uvod: Od tumora mokraćnog mjehura (TMM) u svijetu godišnje oboli više od pola milijuna ljudi, a karakterizira ga zahtjevno liječenje i sklonost recidivima. Glavni rizični čimbenici su visoka životna dob i pušenje, ali i infestacija parazitom *Schistosomom haematobium* te kronične uroinfekcije mogu dovesti do razvoja TMM. Ne samo da mikrobiota može utjecati na razvoj TMM, već se koristi i za njihovo liječenje, tj. bakterije *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) se instiliraju u mokraćni mjehur oboljelih gdje ostvaruje svoje terapijske učinke. Navedeno ukazuje na važnost proučavanja interakcije domaćina i mikrobiote pri nastanku i tijekom liječenja TMM. Ključnu ulogu u toj interakciji imaju receptori prirođene imunosti, osobito TLR4, koji prepoznaje bakterijski lipopolisaharid i aktivira stanični odgovor putem signalne molekule MYD88. Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi ulogu receptora TLR4 kao i signalne molekule MYD88 u nastanku TMM-a.

Materijali i metode: Provedeni su akutni (2 tjedna) i kronični (20 tjedana) tretmani urotelnim karcinogenom N-butyl-N-(4-hydroxylbutyl)-nitrosaminom (BBN) u svrhu indukcije TMM-a u miševa divljeg tipa, te onih s nefunkcionalnim receptorom TLR4 (*Tlr4*^{KO}) i MYD88 (*Myd88*^{KO}). Napravljena je patohistološka analiza tkiva mokraćnog mjehura u svrhu određivanja značajki fibroze, edema, upale i degenerativnih promjena epitela nakon akutnog eksperimenta te upale i stupnja invazije tumora nakon kroničnog eksperimenta. Također je analizirana i razlika u cijelokupnoj genskoj ekspresiji između KO i WT skupina. Tijekom kroničnog eksperimenta prikupljeni su uzorci stolice te na kraju pokusa i sadržaj cekuma radi određivanja dinamike mikrobiološke raznolikosti tijekom tretmana BBN-om. Svi podatci su statistički i bioinformatički analizirani koristeći R programski jezik i Qiime2 platformu. Statistička značajnost je postavljena na $P < 0,05$.

Rezultati: Nakon akutnog tretmana BBN-om, histološki nisu zabilježene značajne razlike između KO i WT skupina. Međutim, nakon kroničnog tretmana BBN-om, utvrđeno je kako su *Myd88*^{KO} miševi uglavnom razvijali neinvazivne tumore mokraćnog mjehura u usporedni s WT skupinom ($P = 0,009$). Analiza mikrobiote otkrila je značajno veću zastupljenost roda *Faecalibaculum* u uzorcima fekalnih peleta i sadržaju cekuma *Myd88*^{KO} miševa u usporedbi s WT skupinom nakon kroničnog tretmana BBN-om ($P < 0,001$). Usporedbom genske ekspresije neinvazivnih tumora utvrđen je profil nižeg genskog izražaja gena *Mt1*, *Mt2*, *Cxcl17*, *Mmp13*, *Myh1*, *Myll* i *Col7a1* te višeg izražaja gena *Angptl4* i *Nr4a* u *Myd88*^{KO} skupini u odnosu na WT skupinu ($P < 0,001$).

Zaključak: Rezultati ove studije upućuju na važnu ulogu aktivacije stanica putem MYD88 signalnog puta u razvoju TMM-a. Za pretpostaviti je da bi modulacijom tog puta mogli djelovati na suzbijanje razvoja i progresije tumora mokraćnog mjehura.

8. LAIČKI SAŽETAK

Uvod: Tumor mokraćnog mjehura (TMM) značajno utječe na kvalitetu života te unatoč istraživanjima i novim terapijskim opcijama, stopa preživljenja nije se značajnije popravila posljednjih četrdesetak godina, sve do primjene moderne imunoterapije. Infekcija sa *Schistosomom haematobium* može uzrokovati TMM, dok je infekcija s bakterijom *Bacillus Calmette-Guérin* standardni lijek za ove tumore. Navedeno, kao i nedavna spoznaja da urin zdravih osoba sadrži brojne mikroorganizme, od kojih neki mogu utjecati na nastanak TMM-a, dovela je proučavanje međuodnosa mikrobiote i TMM-a u žarište najnovijih istraživanja. U tim je istraživanjima od ključne važnosti proučavati ulogu receptora kojima prepoznavamo bakterije, te molekula koje informaciju o bakteriji prenose unutar stanice, zbog čega smo pručavali jedan od najvažnijih receptora – TLR4 te središnju signalnu molekulu – MYD88.

Materijali i metode: S ciljem saznavanja uloge bakterijskog receptora TLR4 i molekule koja prenosi signale u stanicu MYD88, gledali smo kako nastaju tumori u miševa koji nemaju te molekule, tzv. *knock-out* miševi. Tumori su izazvani kemikalijom N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosaminom (BBN), koja je prisutna i u duhanskom dimu. Proučavali smo što se događa na početku razvoja tumora (akutni eksperiment) i nakon dugotrajne izloženosti (kronični model). Tijekom proučavanja gledali smo kakve se promjene događaju u tkivu mjehura, kako se mijenja aktivnost svih gena te kako se mijenja raznolikost bakterija crijeva.

Rezultati: U početnim (akutnim) fazama razvoja tumora nisu uočeni učinci nedostatka bilo receptora TLR4 bilo signalne molekule MYD88. Međutim, nakon dugotrajnog (kroničnog) izlaganja karcinogenu pokazalo se da odustvo molekule MYD88 ima zaštitnu ulogu, jer su ti miševi razvili manje invazivnih tumora ($P = 0,009$), dok manjak funkcionalnog receptora TLR4 nije imao značajan učinak. Manja invazivnost tumora u *Myd88^{KO}* skupini bila je popraćena povećanom zastupljenošću bakterijskog roda *Faecalibaculum* ($P < 0,001$), koji proizvodi butirat, tvar sa zaštitnim učinkom. Ti su miševi također imali zaštitni profil aktivnosti gena: *Mt1*, *Mt2*, *Angptl4*, *Nr4a1*, *Cxcl17*, *Mmp13*, *Myh1*, *Myll* i *Col7a1* ($P < 0,001$).

Zaključak: Rezultati studije upućuju na značajnu ulogu signalne molekule MYD88 u razvoju TMM-a. MYD88 učinke vjerojatno ostvaruje mijenjajući aktivnost gena i sastav bakterijske mikrobiote crijeva. Ti bi nalazi mogli usmjeriti traženje novih lijekova, dijagnostičkih testova ili preventivnih postupaka.

9. SUMMARY

The role of the TLR4 receptor and MYD88 signaling molecule in bladder cancer development

Introduction: Bladder cancer (BC) affects more than half a million people worldwide each year and is characterized by demanding treatment and a high recurrence rate. The main risk factors are advanced age and smoking, while infestation with the parasite *Schistosoma haematobium* and chronic urinary tract infections may also contribute to BC development. Not only can the microbiota influence BC development, but it is also used in treatment. Specifically, *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) bacteria are instilled into the bladder of affected patients, where they exert their therapeutic effects. This highlights the importance of studying host–microbiota interactions in the development and treatment of BC. A key role in this interaction is played by innate immune receptors, particularly TLR4, which recognizes bacterial lipopolysaccharide and activates the cellular response via the signaling molecule MYD88. The aim of this study was to determine the role of the TLR4 receptor and the signaling molecule MYD88 in the development of BC.

Materials and Methods: Acute (2-week) and a chronic (20-week) treatments with the urothelial carcinogen N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) were conducted to induce BC in wild-type mice and in those with non-functional TLR4 receptors (*Tlr4*^{KO}) and myeloid differentiation factor 88 (*Myd88*^{KO}). Histopathological analysis of the bladder tissue was performed to determine features such as fibrosis, edema, inflammation, and epithelial degeneration after the acute experiment, as well as inflammation and tumor invasion after the chronic experiment. Additionally, differences in overall gene expression between the KO and WT groups were analyzed. Furthermore, stool samples and, at the endpoint, cecal content were collected during the chronic experiment to determine the dynamics of microbial diversity during BBN treatment. All data were statistically and bioinformatically analyzed using the R programming language and the Qiime2 platform. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results: After the acute BBN treatment, no significant histological differences were observed between KO and WT groups. However, following the chronic BBN treatment, *Myd88*^{KO} mice predominantly developed non-invasive bladder tumors compared to the WT group ($P = 0.009$). Microbiota analysis revealed a significantly higher abundance of the *Faecalibaculum* genus in fecal pellets and cecal content of *Myd88*^{KO} mice compared with the WT group after chronic BBN treatment ($P < 0.001$). Comparison of gene expression profiles in non-invasive tumors showed lower expression of *Mt1*, *Mt2*, *Cxcl17*, *Mmp13*, *Myh1*, *My11*, and *Col7a1* genes, and higher expression of *Angptl4* and *Nr4a* genes in *Myd88*^{KO} group compared with WT group ($P < 0.001$).

Conclusion: The results of this study suggest an important role of cell activation via the MYD88 signaling pathway in the development of bladder cancer. It may be assumed that modulation of this pathway could help suppress the development and progression of bladder cancer.

10. LAY SUMMARY

Introduction: Bladder cancer (BC) significantly affects quality of life and, despite research and new therapeutic options, survival rates have not improved substantially over the past forty years, until the introduction of modern immunotherapy. Infection with *Schistosoma haematobium* can cause BC, while infection with the bacterium *Bacillus Calmette-Guérin* is a standard treatment for these tumors. This, together with the recent discovery that the urine of healthy individuals contains numerous microorganisms, some of which may influence the development of BC, has brought the study of the relationship between the microbiota and BC into the focus of current research. In such studies, it is crucial to examine the role of receptors that recognize bacteria, as well as the molecules that transmit bacterial signals inside the cell. For this reason, we studied one of the most important receptors, TLR4, and the central signaling molecule, MYD88.

Materials and Methods: To investigate the role of the bacterial receptor TLR4 and the intracellular signaling molecule MYD88, we observed tumor development in mice lacking these molecules (knock-out mice). Tumors were induced using the chemical N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN), which is also present in tobacco smoke. We examined changes occurring at the onset of tumor development (acute experiment) and after prolonged exposure (chronic model). During the study, we analyzed alterations in bladder tissue, changes in gene expression, and shifts in the composition of gut bacteria.

Results: In the early (acute) stages of tumor development, no effects were observed from the absence of either the TLR4 receptor or the MYD88 signaling molecule. However, after prolonged (chronic) exposure to the carcinogen, the absence of MYD88 was shown to have a protective role, as these mice developed fewer invasive tumors ($P = 0,009$), whereas the lack of a functional TLR4 receptor had no significant effect. The reduced invasiveness of tumors in the *Myd88*^{KO} group was accompanied by an increased abundance of the bacterial genus *Faecalibaculum* ($P < 0,001$), which produces butyrate, a substance with protective effects. These mice also exhibited a protective gene expression profile: *Mt1*, *Mt2*, *Angptl4*, *Nr4a1*, *Cxcl17*, *Mmp13*, *Myh1*, *My11*, and *Col7a1* ($P < 0,001$).

Conclusion: The results of this study indicate a significant role of the signaling molecule MYD88 in the development of BC. MYD88 likely exerts its effects by altering gene activity and the composition of the gut microbiota. These findings may guide the development of new drugs, diagnostic tests, or preventive strategies.

11. LITERATURA

1. Dyrskjøl L, Hansel DE, Efsthathiou JA, Knowles MA, Galsky MD, Teoh J i sur. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2023;9:58.
2. Richters A, Aben KKH, Kiemeny LALM. The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World J Urol*. 2020;38:1895–904.
3. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. Epidemiology of Bladder Cancer. *Medical Sciences*. 2020;8:15.
4. Andersson KE, Arner A. Urinary Bladder Contraction and Relaxation: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2004;84:935–86.
5. Ajalloucian F, Lemon G, Hilborn J, Chronakis IS, Fossum M. Bladder biomechanics and the use of scaffolds for regenerative medicine in the urinary bladder. *Nat Rev Urol*. 2018;15:155–74.
6. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L i sur. 2024. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, Francuska: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>.
7. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A i sur. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71:209–49.
8. Cumberbatch MGK JIBP. Epidemiology of bladder cancer: a systematic review and contemporary update of risk factors in 2018. *Eur Urol*. 2018;74:784–95.
9. Doshi B, Athans SR, Woloszyńska A. Biological differences underlying sex and gender disparities in bladder cancer: current synopsis and future directions. *Oncogenesis*. 2023;12:44.
10. Odjel za maligne bolesti. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. 2022. Podaci Registra za rak za 2022. godinu.
11. Shariat SF, Sfakianos JP, Droller MJ, Karakiewicz PI, Meryn S, Bochner BH. The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *BJU Int*. 2010;105:300–8.
12. Lenis AT, Lec PM, Chamie K, MSHS M. Bladder Cancer. *JAMA* [Internet]. 2020;324:1980. Dostupno na: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2772966>
13. Benjamin RM. Exposure to tobacco smoke causes immediate damage: A report of the surgeon general. *Public Health Rep*. 2011;126:158–9.
14. Bučević Popović V, Šitum M, Chow CET, Chan LS, Roje B, Terzić J. The urinary microbiome associated with bladder cancer. *Sci Rep*. 2018;8:12157.

15. Chagneau C V., Massip C, Bossuet-Greif N, Fremez C, Motta JP, Shima A i sur. Uropathogenic *E. coli* induces DNA damage in the bladder. *PLoS Pathog.* 2021;17:e1009310.
16. Abd-El-Raouf R, Ouf SA, Gabr MM, Zakaria MM, El-Yasergy KF, Ali-El-Dein B. *Escherichia coli* foster bladder cancer cell line progression via epithelial mesenchymal transition, stemness and metabolic reprogramming. *Sci Rep.* 2020;10:18024.
17. Hird AE, Saskin R, Liu Y, Lee Y, Ajib K, Matta R i sur. Association between chronic bladder catheterisation and bladder cancer incidence and mortality: a population-based retrospective cohort study in Ontario, Canada. *BMJ Open.* 2021;11:e050728.
18. Wallis CJD, Mahar AL, Choo R, Herschorn S, Kodama RT, Shah PS i sur. Second malignancies after radiotherapy for prostate cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2016;i851.
19. Knight A, Askling J, Granath F, Sparen P, Ekblom A. Urinary bladder cancer in Wegener's granulomatosis: risks and relation to cyclophosphamide. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:1307–11.
20. Warschkow R, Güller U, Cerny T, Schmied BM, Plasswilm L, Putora PM. Secondary malignancies after rectal cancer resection with and without radiation therapy: A propensity-adjusted, population-based SEER analysis. *Radiotherapy and Oncology.* 2017;123:139–46.
21. Chaturvedi AK, Engels EA, Gilbert ES, Chen BE, Storm H, Lynch CF i sur. Second Cancers Among 104760 Survivors of Cervical Cancer: Evaluation of Long-Term Risk. *JNCI Journal of the National Cancer Institute.* 2007;99:1634–43.
22. International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours: Urinary and Male Genital Tumours . 5th ed. Sv. 8. Lyon, France: IARC Press; 2022.
23. Yu E mi, Belay S, Li W, Aragon-Ching JB. Non-urothelial and urothelial variants of bladder cancer. *Cancer Treat Res Commun.* 2022;33:100661.
24. Compérat E, Varinot J, Moroch J, Eymerit-Morin C, Brimo F. A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat Rev Urol.* 2018;15:143–54.
25. Tran L, Xiao JF, Agarwal N, Duex JE, Theodorescu D. Advances in bladder cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer [Internet].* 2021.;21:104–21. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41568-020-00313-1>
26. Patel VG, Oh WK, Galsky MD. Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70:404–23.

27. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014;507:315–22.
28. Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Høyer S, Ulhøi BP i sur. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell*. 2016;30:27–42.
29. Minoli M, Kiener M, Thalmann GN, Kruithof-de Julio M, Seiler R. Evolution of Urothelial Bladder Cancer in the Context of Molecular Classifications. *Int J Mol Sci*. 2020;21:5670.
30. McConkey DJ, Choi W. Molecular Subtypes of Bladder Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2018;20:77.
31. Lerner SP, McConkey DJ, Hoadley KA. Bladder Cancer Molecular Taxonomy: Summary from a Consensus Meeting. *Bladder Cancer*. 2016;2:37–47.
32. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*. 2015;15:25–41.
33. Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J, Kim J, Ayala GE, Benedict WF i sur. p53, p21, pRB, and p16 Expression Predict Clinical Outcome in Cystectomy With Bladder Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22:1014–24.
34. Kamoun A, de Reyniès A, Allory Y, Sjödaahl G, Robertson AG, Seiler R i sur. A Consensus Molecular Classification of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2020;77:420-433
35. Pietzak EJ, Bagrodia A, Cha EK, Drill EN, Iyer G, Isharwal S i sur. Next-generation Sequencing of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Reveals Potential Biomarkers and Rational Therapeutic Targets. *Eur Urol*. 2017;72:952–9.
36. Ross JS, Wang K, Al-Rohil RN, Nazeer T, Sheehan CE, Otto GA i sur. Advanced urothelial carcinoma: next-generation sequencing reveals diverse genomic alterations and targets of therapy. *Modern Pathology*. 2014;27:271–80.
37. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD i sur. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* [Internet]. 2018;174:1033. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418309644>
38. Sjödaahl G, Eriksson P, Liedberg F, Höglund M. Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. *J Pathol*. 2017;242:113–25.

39. Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, Drobnjak M, Charytonowicz E, Hu SX i sur. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res.* 1997;57:1217–21.
40. Grossman HB, Liebert M, Antelo M, Dinney CP, Hu SX, Palmer JL i sur. p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 1998;4:829–34.
41. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002;2:103–12.
42. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2008;358:1148–59.
43. Hurst CD, Alder O, Platt FM, Droop A, Stead LF, Burns JE i sur. Genomic Subtypes of Non-invasive Bladder Cancer with Distinct Metabolic Profile and Female Gender Bias in KDM6A Mutation Frequency. *Cancer Cell.* 2017;32:701-715.e7.
44. Carlsson J, Wester K, De La Torre M, Malmström PU, Gårdmark T. EGFR-expression in primary urinary bladder cancer and corresponding metastases and the relation to HER2-expression. On the possibility to target these receptors with radionuclides. *Radiol Oncol.* 2015;49:50–8.
45. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J i sur. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell.* 2014;25:152–65.
46. Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström PU, Choi W i sur. Bladder cancer. *The Lancet.* 2016;388:2796–810.
47. van der Meijden APM. Fortnightly review: Bladder cancer. *BMJ.* 1998;317:1366–9.
48. DeGeorge KC, Holt HR, Hodges SC. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician.* 2017;96:507–14.
49. Lopez-Beltran A, Cookson MS, Guercio BJ, Cheng L. Advances in diagnosis and treatment of bladder cancer. *BMJ.* 2024;e076743.
50. Witjes JA, Douglass J. The role of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy in bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol.* 2007;4:542–9.
51. Stenzl A, Burger M, Fradet Y, Mynderse LA, Soloway MS, Witjes JA i sur. Hexaminolevulinate guided fluorescence cystoscopy reduces recurrence in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol.* 2010;184:1907–13.
52. Jichlinski P, Leisinger HJ. Fluorescence cystoscopy in the management of bladder cancer: a help for the urologist! 2005;74:97–101.

53. Lai LY, Tafuri SM, Ginier EC, Herrel LA, Dahm P, Maisch P i sur. Narrow band imaging versus white light cystoscopy alone for transurethral resection of non-muscle invasive bladder cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2022;4:CD014887.
54. Ye Z, Hu J, Song X, Li F, Zhao X, Chen S i sur. A comparison of NBI and WLI cystoscopy in detecting non-muscle-invasive bladder cancer: A prospective, randomized and multi-center study. *Sci Rep*. 2015;5:10905.
55. Wang DS, Bird VG, Leonard VY, Plumb SJ, Konety B, Williams RD i sur. Use of bipolar energy for transurethral resection of bladder tumors: pathologic considerations. *J Endourol*. 2004;18:578–82.
56. Sun S, Wang H, Zhang X, Chen G. Transurethral Resection of Bladder Tumor: Novel Techniques in a New Era. *Bladder (San Franc)*. 2023;10:e21200009.
57. Teoh JYC, Cheng CH, Tsang CF, Kai-Man Li J, Kwun-Chung Cheng B, Hoi-Chak Chan W i sur. Transurethral En Bloc Resection Versus Standard Resection of Bladder Tumour: A Randomised, Multicentre, Phase 3 Trial. *Eur Urol*. 2024;86:103–11.
58. Xing J, Reynolds JP, Liu X, Pantanowitz L. Urine cytology: Updates and challenges in reporting systems, ancillary studies, and artificial intelligence. *Human Pathology Reports*. 2024;35:300733.
59. Santoni G, Morelli MB, Amantini C, Battelli N. Urinary Markers in Bladder Cancer: An Update. *Front Oncol*. 2018;8:362.
60. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F i sur. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*. 1991;252:706–9.
61. Miyamoto DT, Mouw KW, Feng FY, Shipley WU, Efstathiou JA. Molecular biomarkers in bladder preservation therapy for muscle-invasive bladder cancer. *Lancet Oncol*. 2018;19:e683–95.
62. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y i sur. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem*. 2000;46:1078–84.
63. Togneri FS, Ward DG, Foster JM, Devall AJ, Wojtowicz P, Alyas S i sur. Genomic complexity of urothelial bladder cancer revealed in urinary cfDNA. *Eur J Hum Genet*. 2016;24:1167–74.
64. Kinde I, Munari E, Faraj SF, Hruban RH, Schoenberg M, Bivalacqua T i sur. TERT promoter mutations occur early in urothelial neoplasia and are biomarkers of early disease and disease recurrence in urine. *Cancer Res*. 2013;73:7162–7.

65. Hosen MI, Sheikh M, Zvereva M, Scelo G, Forey N, Durand G i sur. Urinary TERT promoter mutations are detectable up to 10 years prior to clinical diagnosis of bladder cancer: Evidence from the Golestan Cohort Study. *EBioMedicine*. 2020;53:102643.
66. Springer SU, Chen CH, Rodriguez Pena MDC, Li L, Douville C, Wang Y i sur. Non-invasive detection of urothelial cancer through the analysis of driver gene mutations and aneuploidy. *Elife*. 2018;7:e32143.
67. Wong VK, Ganeshan D, Jensen CT, Devine CE. Imaging and Management of Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13:1396.
68. Caglic I, Panebianco V, Vargas HA, Bura V, Woo S, Pecoraro M i sur. MRI of Bladder Cancer: Local and Nodal Staging. *J Magn Reson Imaging*. 2020;52:649–67.
69. Omorphos NP, Ghose A, Hayes JDB, Kandala A, Dasgupta P, Sharma A i sur. The increasing indications of FDG-PET/CT in the staging and management of Invasive Bladder Cancer. *Urol Oncol*. 2022;40:434–41.
70. Gill E, Perks CM. Mini-Review: Current Bladder Cancer Treatment-The Need for Improvement. *Int J Mol Sci*. 2024;25:1557.
71. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003;21:1315–30.
72. Richterstetter M, Wullich B, Amann K, Haeberle L, Engehausen DG, Goebell PJ i sur. The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer. *BJU Int*. 2012;110:E76-9.
73. Teoh JYC, Kamat AM, Black PC, Grivas P, Shariat SF, Babjuk M. Recurrence mechanisms of non-muscle-invasive bladder cancer - a clinical perspective. *Nat Rev Urol*. 2022;19:280–94.
74. Kim LHC, Patel MI. Transurethral resection of bladder tumour (TURBT). *Transl Androl Urol*. 2020;9:3056–72.
75. Guallar-Garrido S, Julián E. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Therapy for Bladder Cancer: An Update. *Immunotargets Ther*. 2020;9:1–11.
76. Pérez-Jacoiste Asín MA, Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Lumbreras C, Tejido Á, San Juan R i sur. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) infection following intravesical BCG administration as adjunctive therapy for bladder cancer: incidence, risk factors, and outcome in a single-institution series and review of the literature. *Medicine*. 2014;93:236–54.

77. Gore JL, Litwin MS, Lai J, Yano EM, Madison R, Setodji C i sur. Use of radical cystectomy for patients with invasive bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:802–11.
78. Lawrentschuk N, Colombo R, Hakenberg OW, Lerner SP, Månsson W, Sagalowsky A i sur. Prevention and management of complications following radical cystectomy for bladder cancer. *Eur Urol.* 2010;57:983–1001.
79. Peak TC, Hemal A. Partial cystectomy for muscle-invasive bladder cancer: a review of the literature. *Transl Androl Urol.* 2020;9:2938–45.
80. Jiang DM, Chung P, Kulkarni GS, Sridhar SS. Trimodality Therapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: Recent Advances and Unanswered Questions. *Curr Oncol Rep.* 2020;22:14.
81. Kulkarni GS, Hermanns T, Wei Y, Bhindi B, Satkunasivam R, Athanasopoulos P i sur. Propensity Score Analysis of Radical Cystectomy Versus Bladder-Sparing Trimodal Therapy in the Setting of a Multidisciplinary Bladder Cancer Clinic. *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35:2299–305.
82. Zlotta AR, Ballas LK, Niemierko A, Lajkosz K, Kuk C, Miranda G i sur. Radical cystectomy versus trimodality therapy for muscle-invasive bladder cancer: a multi-institutional propensity score matched and weighted analysis. *Lancet Oncol.* 2023;24:669–81.
83. Sherry AD, Stewart A, Luo G, Kirschner AN. Intensity-Modulated Radiotherapy is Superior to Three-Dimensional Conformal Radiotherapy in the Trimodality Management of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Daily Cone Beam Computed Tomography Optimization. *J Radiat Oncol.* 2019;8:395–403.
84. Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL i sur. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med.* 2003;349:859–66.
85. Yin M, Joshi M, Meijer RP, Glantz M, Holder S, Harvey HA i sur. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. *Oncologist.* 2016;21:708–15.
86. Advanced Bladder Cancer Meta-analysis Collaboration. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2003;361:1927–34.
87. Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaborators Group. Adjuvant Chemotherapy for Muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-

- analysis of Individual Participant Data from Randomised Controlled Trials. *Eur Urol*. 2022;81:50–61.
88. Comp  rat E, Amin MB, Cathomas R, Choudhury A, De Santis M, Kamat A i sur. Current best practice for bladder cancer: a narrative review of diagnostics and treatments. *Lancet*. 2022;400:1712–21.
 89. Riou O, Hennequin C, Khalifa J, Sargos P. News and prospects on radiotherapy for bladder cancer: Is trimodal therapy becoming the gold standard? *Cancer Radiother*. 2024;28:623–7.
 90. Hijab A, Tocco B, Hanson I, Meijer H, Nyborg CJ, Bertelsen AS i sur. MR-Guided Adaptive Radiotherapy for Bladder Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:637591.
 91. Rhea LP, Mendez-Marti S, Kim D, Aragon-Ching JB. Role of immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Treat Res Commun*. 2021;26:100296.
 92. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L i sur. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2017;376:1015–26.
 93. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J i sur. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18:312–22.
 94. Powles T, Rosenberg JE, Sonpavde GP, Loriot Y, Durán I, Lee JL i sur. Enfortumab Vedotin in Previously Treated Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 2021;384:1125–35.
 95. Flaig TW, Rosenberg JE, Hoimes CJ, O'Donnell PH, Mar N, Gourdin TS i sur. Study EV-103: Neoadjuvant treatment with enfortumab vedotin monotherapy in cisplatin-ineligible patients (pts) with muscle invasive bladder cancer (MIBC): Updated results for Cohort H. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41:4595–4595.
 96. Matye D, Leak J, Woolbright BL, Taylor JA. Preclinical models of bladder cancer: BBN and beyond. *Nat Rev Urol*. 2024;21:723–34.
 97. Zhu S, Zhu Z, Ma AH, Sonpavde GP, Cheng F, Pan CX. Preclinical Models for Bladder Cancer Research. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2021;35:613–32.
 98. Zuiverloon TCM, de Jong FC, Costello JC, Theodorescu D. Systematic Review: Characteristics and Preclinical Uses of Bladder Cancer Cell Lines. *Bladder Cancer*. 2018;4:169–83.

99. Minoli M, Cantore T, Hanhart D, Kiener M, Fedrizzi T, La Manna F i sur. Bladder cancer organoids as a functional system to model different disease stages and therapy response. *Nat Commun.* 2023;14:2214.
100. Lee SH, Hu W, Matulay JT, Silva M V., Owczarek TB, Kim K i sur. Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell.* 2018;173:515-528.e17.
101. Magré L, Verstegen MMA, Buschow S, van der Laan LJW, Peppelenbosch M, Desai J. Emerging organoid-immune co-culture models for cancer research: from oncoimmunology to personalized immunotherapies. *J Immunother Cancer.* 2023;11:e006290.
102. John BA, Said N. Insights from animal models of bladder cancer: recent advances, challenges, and opportunities. *Oncotarget.* 2017;8:57766–81.
103. Korac-Prlic J, Degoricija M, Vilović K, Vujević S, Terzić J. BBN-driven urinary bladder cancer mouse model. *Methods Cell Biol.* 2021;163:77-92.
104. Irving CC, Murphy WM, Daniel DS. Comparative carcinogenicity of N-butyl-N-(3-carboxypropyl)-nitrosamine and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine for the urinary bladder of (C57BL/6 X DBA/2)F1 mice. *J Natl Cancer Inst.* 1984;73:753–6.
105. Ohtani M, Kakizoe T, Nishio Y, Sato S, Sugimura T, Fukushima S i sur. Sequential changes of mouse bladder epithelium during induction of invasive carcinomas by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer Res.* 1986;46:2001–4.
106. Oliveira PA, Vasconcelos-Nóbrega C, Gil da Costa RM, Arantes-Rodrigues R. The N-butyl-N-4-hydroxybutyl Nitrosamine Mouse Urinary Bladder Cancer Model. *Methods Mol Biol.* 2018;1655:155–67.
107. Vasconcelos-Nóbrega C, Colaço A, Lopes C, Oliveira PA. Review: BBN as an urothelial carcinogen. *In Vivo.* 2012;26:727–39.
108. Bonfanti M, Magagnotti C, Bonati M, Fanelli R, Airoidi L. Pharmacokinetic profile and metabolism of N-nitrosobutyl-(4-hydroxybutyl)amine in rats. *Cancer Res.* 1988;48:3666–9.
109. He Z, Kosinska W, Zhao ZL, Wu XR, Guttenplan JB. Tissue-specific mutagenesis by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine as the basis for urothelial carcinogenesis. *Mutat Res.* 2012;742:92–5.
110. Roje B, Zhang B, Mastroianni E, Kovačić A, Sušak L, Ljubenkov I i sur. Gut microbiota carcinogen metabolism causes distal tissue tumours. *Nature.* 2024;632:1137–44.

111. Fantini D, Glaser AP, Rimar KJ, Wang Y, Schipma M, Varghese N i sur. A Carcinogen-induced mouse model recapitulates the molecular alterations of human muscle invasive bladder cancer. *Oncogene*. 2018;37:1911–25.
112. Oliveira P, Pires MJ, Vasconcelos-Nóbrega C, Arantes-Rodrigues R, Calado AM, Rocha MJ i sur. Technical Report: Technique of Bladder Catheterization in Female Mice and Rats for Intravesical Instillation in Models of Bladder Cancer. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*. 2009;36:5–9.
113. Cai EY, Garcia J, Liu Y, Vakar-Lopez F, Arora S, Nguyen HM i sur. A bladder cancer patient-derived xenograft displays aggressive growth dynamics in vivo and in organoid culture. *Sci Rep*. 2021;11:4609.
114. Mokkapati S, Manyam G, Steinmetz AR, Tholomier C, Martini A, Choi W i sur. Molecular profiling of bladder cancer xenografts defines relevant molecular subtypes and provides a resource for biomarker discovery. *Transl Oncol*. 2025;52:102269.
115. Kobayashi T, Owczarek TB, McKiernan JM, Abate-Shen C. Modelling bladder cancer in mice: Opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15:42–54.
116. Chu G, Ji X, Wang Y, Niu H. Integrated multiomics analysis and machine learning refine molecular subtypes and prognosis for muscle-invasive urothelial cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2023;33:110–26.
117. Krentel F, Singer F, Rosano-Gonzalez ML, Gibb EA, Liu Y, Davicioni E i sur. A showcase study on personalized in silico drug response prediction based on the genetic landscape of muscle invasive bladder cancer. *Sci Rep*. 2021;11:5849.
118. Siddiqui AJ, Khan MF, Hamadou WS, Goyal M, Jahan S, Jamal A i sur. Molecular Docking and Dynamics Simulation Revealed Ivermectin as Potential Drug against Schistosoma-Associated Bladder Cancer Targeting Protein Signaling: Computational Drug Repositioning Approach. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57:1058.
119. Torres PHM, Sodero ACR, Jofily P, Silva-Jr FP. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci*. 2019;20:4574.
120. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C i sur. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7:135.
121. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T i sur. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020;8:103.
122. Yang HJ, Kim DS, Lee KW, Kim YH. The Urinary Microbiome; Axis Crosstalk and Short-Chain Fatty Acid. *Diagnostics* [Internet]. 2022;12:3119. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2075-4418/12/12/3119>

123. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 2012;489:231–41.
124. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90:859–904.
125. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjöberg J, Amir E i sur. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol*. 2010;11:76–83.
126. Golemis EA, Scheet P, Beck TN, Scolnick EM, Hunter DJ, Hawk E i sur. Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States. *Genes Dev*. 2018;32:868–902.
127. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science* (1979). 2015;348:80–6.
128. Ma Y, Chen T, Sun T, Dilimulati D, Xiao Y. The oncomicrobiome: New insights into microorganisms in cancer. *Microb Pathog*. 2024;197:107091.
129. Jansson JK, Baker ES. A multi-omic future for microbiome studies. *Nat Microbiol*. 2016;1:16049.
130. Kapinusova G, Lopez Marin MA, Uhlik O. Reaching unreachables: Obstacles and successes of microbial cultivation and their reasons. *Front Microbiol*. 2023;14:1089630.
131. Tripathi N, Zubair M, Sapra A. Gram Staining. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2025.
132. Zwirgmaier K. Fluorescence in situ hybridisation (FISH)--the next generation. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;246:151–8.
133. Bharti R, Grimm DG. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Brief Bioinform*. 2021;22:178–93.
134. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:908–34.
135. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2761–4.
136. Yu Z, García-González R, Schanbacher FL, Morrison M. Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:889–93.
137. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J*. 2017;11:2639–43.

138. Fasolo A, Deb S, Stevanato P, Concheri G, Squartini A. ASV vs OTUs clustering: Effects on alpha, beta, and gamma diversities in microbiome metabarcoding studies. *PLoS One*. 2024;19:e0309065.
139. Durazzi F, Sala C, Castellani G, Manfreda G, Remondini D, De Cesare A. Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Sci Rep*. 2021;11:3030.
140. Odom AR, Faits T, Castro-Nallar E, Crandall KA, Johnson WE. Metagenomic profiling pipelines improve taxonomic classification for 16S amplicon sequencing data. *Sci Rep*. 2023;13:13957.
141. Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nat Rev Urol*. 2015;12:81–90.
142. Lou K, Chi J, Wu J, Ma J, Liu S, Cui Y. Research progress on the microbiota in bladder cancer tumors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14:1374944.
143. Ivleva EA, Grivennikov SI. Microbiota-driven mechanisms at different stages of cancer development. *Neoplasia*. 2022;32:100829.
144. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:800–12.
145. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357:539–45.
146. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118:229–41.
147. Saxena M, Yeretssian G. NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Front Immunol*. 2014;5:327.
148. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420:860–7.
149. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M *i sur*. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*. 2013;14:207–15.
150. Gagnaire A, Nadel B, Raoult D, Neefjes J, Gorvel JP. Collateral damage: insights into bacterial mechanisms that predispose host cells to cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15:109–28.
151. Ajouz H, Mukherji D, Shamseddine A. Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World J Surg Oncol*. 2014;12:164.
152. Croom E. Metabolism of xenobiotics of human environments. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;112:31–88.

153. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:11537–42.
154. Bezine E, Malaisé Y, Loeuillet A, Chevalier M, Boutet-Robinet E, Salles B i sur. Cell resistance to the Cytolethal Distending Toxin involves an association of DNA repair mechanisms. *Sci Rep*. 2016;6:36022.
155. Guerra L, Cortes-Bratti X, Guidi R, Frisan T. The Biology of the Cytolethal Distending Toxins. *Toxins (Basel)*. 2011;3:172–90.
156. Cao Y, Xia H, Tan X, Shi C, Ma Y, Meng D i sur. Intratumoural microbiota: a new frontier in cancer development and therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9:15.
157. Nejman D, Livyatan I, Fuks G, Gavert N, Zwang Y, Geller LT i sur. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science*. 2020;368:973–80.
158. Yang L, Li A, Wang Y, Zhang Y. Intratumoral microbiota: roles in cancer initiation, development and therapeutic efficacy. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8:35.
159. Lombardo C, Fazio R, Sinagra M, Gattuso G, Longo F, Lombardo C i sur. Intratumoral Microbiota: Insights from Anatomical, Molecular, and Clinical Perspectives. *J Pers Med*. 2024;14:1083.
160. Sayin S, Rosener B, Li CG, Ho B, Ponomarova O, Ward D V i sur. Evolved bacterial resistance to the chemotherapy gemcitabine modulates its efficacy in co-cultured cancer cells. *Elife*. 2023;12:e83140.
161. Zhang L, Duan X, Zhao Y, Zhang D, Zhang Y. Implications of intratumoral microbiota in tumor metastasis: a special perspective of microorganisms in tumorigenesis and clinical therapeutics. *Front Immunol*. 2025;16:1526589.
162. Wu C, Wei X, Huang Z, Zheng Z, Zhang W, Chen J i sur. Urinary microbiome dysbiosis is associated with an inflammatory environment and perturbed fatty acids metabolism in the pathogenesis of bladder cancer. *J Transl Med*. 2024;22:628.
163. Uzelac M, Xin R, Chen T, John D, Li WT, Rajasekaran M i sur. Urinary Microbiome Dysbiosis and Immune Dysregulations as Potential Diagnostic Indicators of Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*. 2024;16:394.
164. Lewis DA, Brown R, Williams J, White P, Jacobson SK, Marchesi JR i sur. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:41.

165. Siddiqui H, Nederbragt AJ, Lagesen K, Jeansson SL, Jakobsen KS. Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *BMC Microbiol.* 2011;11:244.
166. Fouts DE, Pieper R, Szpakowski S, Pohl H, Knoblach S, Suh MJ i sur. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *J Transl Med.* 2012;10:174.
167. Modena BD, Milam R, Harrison F, Cheeseman JA, Abecassis MM, Friedewald JJ i sur. Changes in Urinary Microbiome Populations Correlate in Kidney Transplants With Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy Documented in Early Surveillance Biopsies. *Am J Transplant.* 2017;17:712–23.
168. Oresta B, Braga D, Lazzeri M, Frego N, Saita A, Faccani C i sur. The Microbiome of Catheter Collected Urine in Males with Bladder Cancer According to Disease Stage. *Journal of Urology.* 2021;205:86–93.
169. Liu F, Liu A, Lu X, Zhang Z, Xue Y, Xu J i sur. Dysbiosis signatures of the microbial profile in tissue from bladder cancer. *Cancer Med.* 2019;8:6904–14.
170. Boban T, Milić Roje B, Knezović D, Jerončić A, Šošić H, Šitum M i sur. Urinary microbiota changes among NMIBC patients during BCG therapy: comparing BCG responders and non-responders. *Front Cell Infect Microbiol.* 2025;15:1479795.
171. Mai G, Chen L, Li R, Liu Q, Zhang H, Ma Y. Common Core Bacterial Biomarkers of Bladder Cancer Based on Multiple Datasets. *Biomed Res Int.* 2019.;2019:4824909.
172. Friedrich V, Choi HW. The Urinary Microbiome: Role in Bladder Cancer and Treatment. *Diagnostics.* 2022;12:2068.
173. Pederzoli F, Ferrarese R, Amato V, Locatelli I, Alchera E, Lucianò R i sur. Sex-specific Alterations in the Urinary and Tissue Microbiome in Therapy-naïve Urothelial Bladder Cancer Patients. *Eur Urol Oncol.* 2020;3:784–8.
174. Wu P, Zhang G, Zhao J, Chen J, Chen Y, Huang W i sur. Profiling the Urinary Microbiota in Male Patients With Bladder Cancer in China. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:167.
175. Bi H, Tian Y, Song C, Li J, Liu T, Chen Z i sur. Urinary microbiota - a potential biomarker and therapeutic target for bladder cancer. *J Med Microbiol.* 2019;68:1471–8.
176. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C i sur. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science (1979).* 2015;350:1079–84.

177. Tomasi M, Dalsass M, Beghini F, Zanella I, Caproni E, Fantappiè L i sur. Commensal *Bifidobacterium* Strains Enhance the Efficacy of Neo-Epitope Based Cancer Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2021;9:1356.
178. Tojjari A, Abushukair H, Saeed A. The Crosstalk between Microbiome and Immunotherapeutics: Myth or Reality. *Cancers (Basel)*. 2022;14:4641.
179. Wang B, Qiu Y, Xie M, Huang P, Yu Y, Sun Q i sur. Gut microbiota *Parabacteroides distasonis* enhances the efficacy of immunotherapy for bladder cancer by activating anti-tumor immune responses. *BMC Microbiol*. 2024;24:237.
180. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM i sur. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science (1979)*. 2015;350:1084–9.
181. Bukavina L, Ginwala R, Eltoukhi M, Sindhani M, Prunty M, Geynisman DM i sur. Role of Gut Microbiome in Neoadjuvant Chemotherapy Response in Urothelial Carcinoma: A Multi-institutional Prospective Cohort Evaluation. *Cancer research communications*. 2024;4:1505–16.
182. Li T, Qi T, Wu K. The impact and mechanisms of gut microbiota on the efficacy of neoadjuvant therapy in patients with MIBC. *Journal of Clinical Oncology*. 2024;42:669–669.
183. Li Y, Dong B, Wu W, Wang J, Jin H, Chen K i sur. Metagenomic Analyses Reveal Distinct Gut Microbiota Signature for Predicting the Neoadjuvant Chemotherapy Responsiveness in Breast Cancer Patients. *Front Oncol*. 2022;12:865121.
184. Hoesl CE, Altwein JE. The probiotic approach: an alternative treatment option in urology. *Eur Urol*. 2005;47:288–96.
185. Seow SW, Rahmat JNB, Mohamed AAK, Mahendran R, Lee YK, Bay BH. *Lactobacillus* species is more cytotoxic to human bladder cancer cells than *Mycobacterium Bovis* (bacillus Calmette-Guerin). *J Urol*. 2002;168:2236–9.
186. Aso Y, Akazan H. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. BLP Study Group. *Urol Int*. 1992;49:125–9.
187. Sánchez-Pellicer P, Boix-Rodríguez C, Hernández-Belmonte A, Encarnación-Castellano C de la, Mendiola-López A, Núñez-Delegido E i sur. Bladder Cancer and Probiotics: What Do We Know So Far? *Cancers (Basel)*. 2023;15:5551.
188. Sun J, Song S, Liu J, Chen F, Li X, Wu G. Gut microbiota as a new target for anticancer therapy: from mechanism to means of regulation. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2025;11:43.

189. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M i sur. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:e1–e1.
190. Zhang W, Yang F, Mao S, Wang R, Chen H, Ran Y i sur. Bladder cancer-associated microbiota: Recent advances and future perspectives. *Heliyon.* 2023;9:e13012.
191. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2006;13:816–25.
192. Barrett M, Hand CK, Shanahan F, Murphy T, O’Toole PW. Mutagenesis by Microbe: the Role of the Microbiota in Shaping the Cancer Genome. *Trends Cancer.* 2020;6:277–87.
193. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent.* 2019;43:187.
194. Behzadi P, García-Perdomo HA, Karpiński TM. Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology. *J Immunol Res.* 2021;2021:1–21.
195. Sameer AS, Nissar S. Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. *Biomed Res Int.* 2021;2021:1157023.
196. Zhang Y, Liang C. Innate recognition of microbial-derived signals in immunity and inflammation. *Sci China Life Sci.* 2016;59:1210–7.
197. Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med.* 2010;14:2592–603.
198. Kim HJ, Kim H, Lee JH, Hwangbo C. Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging. *Immunity & Ageing.* 2023;20:67.
199. Batkhishig D, Enkhbayar P, Kretsinger RH, Matsushima N. A strong correlation between consensus sequences and unique super secondary structures in leucine rich repeats. *Proteins.* 2020;88:840–52.
200. Toshchakov VY, Neuwald AF. A survey of TIR domain sequence and structure divergence. *Immunogenetics.* 2020;72:181–203.
201. Murad S. Toll-Like Receptor 4 in Inflammation and Angiogenesis: A Double-Edged Sword. *Front Immunol.* 2014;5:313.
202. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM i sur. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:1966–71.
203. Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate Recognition of Viruses. *Immunity.* 2007;27:370–83.

204. Guven-Maiorov E, Keskin O, Gursay A, VanWaes C, Chen Z, Tsai CJ i sur. The Architecture of the TIR Domain Signalosome in the Toll-like Receptor-4 Signaling Pathway. *Sci Rep.* 21. 2015;5:13128.
205. Valkov E, Stamp A, Dimaio F, Baker D, Verstak B, Roversi P i sur. Crystal structure of Toll-like receptor adaptor MAL/TIRAP reveals the molecular basis for signal transduction and disease protection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:14879–84.
206. Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K i sur. Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:19908–13.
207. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM i sur. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell.* 11. 2011;147:868–80.
208. Ayari C, Bergeron A, LaRue H, Ménard C, Fradet Y. Toll-Like Receptors in Normal and Malignant Human Bladders. *Journal of Urology.* 2011;185:1915–21.
209. Li J, Yang F, Wei F, Ren X. The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment. *Oncotarget.* 2017;8:66656–67.
210. Thuringer D, Hammann A, Benikhlef N, Fourmaux E, Bouchot A, Wettstein G i sur. Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor by Heat Shock Protein 90 via Toll-like Receptor 4 Contributes to the Migration of Glioblastoma Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2011;286:3418–28.
211. GONG W, WANG ZY, CHEN GX, LIU YQ, GU XY, LIU WW. Invasion potential of H22 hepatocarcinoma cells is increased by HMGB1-induced tumor NF- κ B signaling via initiation of HSP70. *Oncol Rep.* 2013;30:1249–56.
212. Wang C, Fei G, Liu Z, Li Q, Xu Z, Ren T. HMGB1 was a pivotal synergistic effecor for CpG oligonucleotide to enhance the progression of human lung cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 27. 2012;13:727–36.
213. Yang H, Wang B, Wang T, Xu L, He C, Wen H i sur. Toll-Like Receptor 4 Prompts Human Breast Cancer Cells Invasiveness via Lipopolysaccharide Stimulation and Is Overexpressed in Patients with Lymph Node Metastasis. *PLoS One.* 2014;9:e109980.
214. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol.* 2000;12:1539–46.
215. Liu WT, Jing YY, Yu G feng, Han Z peng, Yu D dan, Fan QM i sur. Toll like receptor 4 facilitates invasion and migration as a cancer stem cell marker in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2015;358:136–43.

216. Fu H ying, Li C, Yang W, Gai X dong, Jia T, Lei Y ming i sur. FOXP3 and TLR4 protein expression are correlated in non-small cell lung cancer: Implications for tumor progression and escape. *Acta Histochem.* 2013;115:151–7.
217. Lan F, Yue X, Ren G, Wang Y, Xia T. Serum toll-like receptors are potential biomarkers of radiation pneumonia in locally advanced NSCLC. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7:8087–95.
218. Yang H, Zhou H, Feng P, Zhou X, Wen H, Xie X i sur. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2010;29:92.
219. Sussman DA, Santaolalla R, Bejarano PA, Garcia-Buitrago MT, Perez MT, Abreu MT i sur. In silico and Ex vivo approaches identify a role for toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2014;33:45.
220. Mallick P, Basu S, Moorthy B, Ghose R. Role of Toll-like receptor 4 in drug-drug interaction between paclitaxel and irinotecan in vitro. *Toxicology in Vitro.* 2017;41:75–82.
221. Sun Z, Luo Q, Ye D, Chen W, Chen F. Role of toll-like receptor 4 on the immune escape of human oral squamous cell carcinoma and resistance of cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cancer.* 2012;11:33.
222. Saikh KU. MyD88 and beyond: a perspective on MyD88-targeted therapeutic approach for modulation of host immunity. *Immunol Res.* 2021;69:117–28.
223. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-Like Receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335–76.
224. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S i sur. MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways. *Mol Cell.* 1998;2:253–8.
225. Hardiman G, Rock FL, Balasubramanian S, Kastelein RA, Bazan JF. Molecular characterization and modular analysis of human MyD88. *Oncogene.* 1996;13:2467–75.
226. Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of Interleukin 1 Receptor/Toll-like Receptor Signaling through the Alternatively Spliced, Short Form of MyD88 Is Due to Its Failure to Recruit IRAK-4. *J Exp Med.* 2003;197:263–8.
227. Gay NJ, Gangloff M, O'Neill LAJ. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol.* 2011;32:104–9.

228. Echizen K, Hirose O, Maeda Y, Oshima M. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E₂ and Toll-like receptor/MyD88 pathways. *Cancer Sci.* 2016;107:391–7.
229. Meissner F, Scheltema RA, Mollenkopf HJ, Mann M. Direct Proteomic Quantification of the Secretome of Activated Immune Cells. *Science* (1979). 2013;340:475–8.
230. Kfoury A, Virard F, Renno T, Coste I. Dual function of MyD88 in inflammation and oncogenesis. *Curr Opin Oncol.* 2014;26:86–91.
231. Chen L, Zheng L, Chen P, Liang G. Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88 (MyD88): The Central Hub of TLR/IL-1R Signaling. *J Med Chem.* 2020;63:13316–29.
232. Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park).* 2002;16:217–26.
233. Zhu G, Cheng Z, Huang Y, Zheng W, Yang S, Lin C i sur. MyD88 mediates colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via NF- κ B/AP-1 signaling pathway. *Int J Mol Med.* 2020;45:131-140.
234. Yuan G, Chen B, Meng Y, Lu J, Shi X, Hu A i sur. Role of the CXCR3-mediated TLRs/MyD88 signaling pathway in promoting the development of hepatitis B into cirrhosis and liver cancer. *Mol Med Rep.* 2021;24:738.
235. Szekeley B, Bossuyt V, Li X, Wali VB, Patwardhan GA, Frederick C i sur. Immunological differences between primary and metastatic breast cancer. *Annals of Oncology.* 2018;29:2232–9.
236. Block MS, Vierkant RA, Rambau PF, Winham SJ, Wagner P, Traficante N i sur. MyD88 and TLR4 Expression in Epithelial Ovarian Cancer. *Mayo Clin Proc.* 2018;93:307–20.
237. Dubois S, Viailly PJ, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, Marchand V i sur. Biological and Clinical Relevance of Associated Genomic Alterations in MYD88 L265P and non-L265P–Mutated Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Analysis of 361 Cases. *Clinical Cancer Research.* 2017;23:2232–44.
238. Xu L, Zheng Y, Wang J, Xu Y, Xie Y, Yang ZP. IL33 activates CD8⁺T and NK cells through MyD88 pathway to suppress the lung cancer cell growth in mice. *Biotechnol Lett.* 2020;42:1113–21.
239. Wang L, Yu K, Zhang X, Yu S. Dual functional roles of the MyD88 signaling in colorectal cancer development. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018;107:177–84.

240. Xiang F, Ni Z, Zhan Y, Kong Q, Xu J, Jiang J i sur. Increased expression of MyD88 and association with paclitaxel resistance in breast cancer. *Tumor Biology*. 2016;37:6017–25.
241. Youn SE, Jiang F, Won HY, Hong DE, Kang TH, Park YY i sur. PAUF Induces Migration of Human Pancreatic Cancer Cells Exclusively via the TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. 2022;23:11414.
242. Wang EL, Qian ZR, Nakasono M, Tanahashi T, Yoshimoto K, Bando Y i sur. High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2010;102:908–15.
243. Lupi LA, Cuciello MS, Silveira HS, Gaiotte LB, Cesário RC, Seiva FRF i sur. The role of Toll-like receptor 4 signaling pathway in ovarian, cervical, and endometrial cancers. *Life Sci*. 2020;247:117435.
244. Wang L, Hu D, Xie B, Xie L. Blockade of Myd88 signaling by a novel MyD88 inhibitor prevents colitis-associated colorectal cancer development by impairing myeloid-derived suppressor cells. *Invest New Drugs*. 2022;40:506–18.
245. Guo Q, Xiao X, Zhang J. MYD88 Is a Potential Prognostic Gene and Immune Signature of Tumor Microenvironment for Gliomas. *Front Oncol*. 2021;11:654388.
246. Lin L, Du Y, Hao J, Wu R, Du L. UTMD inhibits pancreatic cancer growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;160:114322.
247. Yuan Q, Gu J, Zhang J, Liu S, Wang Q, Tian T i sur. MyD88 in myofibroblasts enhances colitis-associated tumorigenesis via promoting macrophage M2 polarization. *Cell Rep*. 2021;34:108724.
248. Wen ZF, Liu H, Gao R, Zhou M, Ma J, Zhang Y i sur. Tumor cell-released autophagosomes (TRAPs) promote immunosuppression through induction of M2-like macrophages with increased expression of PD-L1. *J Immunother Cancer*. 2018;6:151.
249. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A i sur. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13:1050–9.
250. Song J, Li Y, Wu K, Hu Y, Fang L. MyD88 and Its Inhibitors in Cancer: Prospects and Challenges. *Biomolecules*. 2024;14:562.
251. Amini-Khoei H, Momeny M, Abdollahi A, Dehpour AR, Amiri S, Haj-Mirzaian A i sur. Tropisetron suppresses colitis-associated cancer in a mouse model in the remission stage. *Int Immunopharmacol*. 2016;36:9–16.

252. Wang S, Huang M, Chen M, Sun Z, Jiao Y, Ye G i sur. Zoledronic acid and thymosin α 1 elicit antitumor immunity against prostate cancer by enhancing tumor inflammation and cytotoxic T cells. *J Immunother Cancer*. 2023;11:e006381.
253. Fantò N, Gallo G, Ciacchi A, Semproni M, Vignola D, Quaglia M i sur. Design, Synthesis, and In Vitro Activity of Peptidomimetic Inhibitors of Myeloid Differentiation Factor 88. *J Med Chem*. 2008;51:1189–202.
254. Cao Z, Hu Y, Wu W, Ha T, Kelley J, Deng C i sur. The TIR/BB-loop mimetic AS-1 protects the myocardium from ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2009;84:442–51.
255. Deng Y, Sun J, Zhang LD. Effect of ST2825 on the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Genetics and Molecular Research*. 2016;15:15016826.
256. Lu S, He T, Zhang Y, Zhou B, Zhang Q, Yan S. The MyD88 inhibitor, ST2825, induces cell cycle arrest and apoptosis by suppressing the activation of the NF- κ B/AKT1/p21 pathway in pancreatic cancer. *Oncol Rep*. 2023;50:148.
257. Shiratori E, Itoh M, Tohda S. MYD88 Inhibitor ST2825 Suppresses the Growth of Lymphoma and Leukaemia Cells. *Anticancer Res*. 2017;37:6203–9.
258. Liu JH, Chen C, Li ZY, Zou ZM, Gao DC, Zhang X i sur. The MyD88 inhibitor TJ-M2010-2 suppresses proliferation, migration and invasion of breast cancer cells by regulating MyD88/GSK-3 β and MyD88/NF- κ B signalling pathways. *Exp Cell Res*. 2020;394:112157.
259. Xie Y, Du D, Zhang L, Yang Y, Zou Z, Li Z i sur. TJ-M2010-5, A self-developed MyD88 inhibitor, attenuates liver fibrosis by inhibiting the NF- κ B pathway. *Chem Biol Interact*. 2022;354:109839.
260. Yang H, Zhou P, Li Q, Zhou X, Li J, Wang J i sur. TJ-M2010-5 Attenuates Severe Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Heart Transplantation by Inhibiting MyD88 Homodimerization In Vivo. *J Cardiovasc Transl Res*. 2022;15:1366–76.
261. Xie L, Jiang FC, Zhang LM, He WT, Liu JH, Li MQ i sur. Targeting of MyD88 Homodimerization by Novel Synthetic Inhibitor TJ-M2010-5 in Preventing Colitis-Associated Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108:djv364.
262. Liu J, Zhang X, Wang H, Zhang M, Peng Y, Li M i sur. Implication of myeloid differentiation factor 88 inhibitor TJ-M2010-5 for therapeutic intervention of hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*. 2019;49:1182–94.

263. Yang M, Chen G, Zhang X, Ding Z, Miao Y, Yang Y i sur. A novel MyD88 inhibitor attenuates allograft rejection after heterotopic tracheal transplantation in mice. *Transpl Immunol.* 2019;53:1–6.
264. Li C, Zhang LM, Zhang X, Huang X, Liu Y, Li MQ i sur. Short-term Pharmacological Inhibition of MyD88 Homodimerization by a Novel Inhibitor Promotes Robust Allograft Tolerance in Mouse Cardiac and Skin Transplantation. *Transplantation.* 2017;101:284–93.
265. Olson MA, Lee MS, Kissner TL, Alam S, Waugh DS, Saikh KU. Discovery of small molecule inhibitors of MyD88-dependent signaling pathways using a computational screen. *Sci Rep.* 2015;5:14246.
266. Zheng X yong, Sun C chu, Liu Q, Lu X yao, Fu L li, Liang G i sur. Compound LM9, a novel MyD88 inhibitor, efficiently mitigates inflammatory responses and fibrosis in obesity-induced cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin.* 2020;41:1093–101.
267. Alam S, Javor S, Degardin M, Ajami D, Rebek M, Kissner TL i sur. Structure-Based Design and Synthesis of a Small Molecule that Exhibits Anti-inflammatory Activity by Inhibition of MyD88-mediated Signaling to Bacterial Toxin Exposure. *Chem Biol Drug Des.* 2015;86:200–9.
268. Liu H, Jia W, Tang Y, Zhang W, Qi J, Yan J i sur. Inhibition of MyD88 by LM8 Attenuates Obesity-Induced Cardiac Injury. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2020;76:63–70.
269. Song J, Chen D, Pan Y, Shi X, Liu Q, Lu X i sur. Discovery of a Novel MyD88 Inhibitor M20 and Its Protection Against Sepsis-Mediated Acute Lung Injury. *Front Pharmacol.* 2021;12:775117.
270. Chen P, Zhou Y, Li X, Yang J, Zheng Z, Zou Y i sur. Design, Synthesis, and Bioevaluation of Novel MyD88 Inhibitor c17 against Acute Lung Injury Derived from the Virtual Screen. *J Med Chem.* 2023;66:6938–58.
271. Degoricija M, Korac-Prlic J, Vilovic K, Ivanisevic T, Haupt B, Palada V i sur. The dynamics of the inflammatory response during BBN-induced bladder carcinogenesis in mice. *J Transl Med.* 2019;17:394.
272. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T i sur. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9:676–82.
273. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2023 [citirano 23. lipanj 2025.]. Dostupno na: <https://www.R-project.org/>

274. Posit team. RStudio: Integrated Development Environment for R [Internet]. Boston, MA: Posit Software, PBC; 2025 [citirano 23. lipanj 2025.]. Dostupno na: <http://www.posit.co/>
275. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA i sur. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019;37:852–7.
276. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016;13:581–3.
277. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J i sur. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16:410–22.
278. Vázquez-Baeza Y, Gonzalez A, Smarr L, McDonald D, Morton JT, Navas-Molina JA i sur. Bringing the Dynamic Microbiome to Life with Animations. *Cell Host Microbe.* 2017;21:7–10.
279. Lin H, Peddada S Das. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun.* 2020;11:3514.
280. Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol.* 2019;37:907–15.
281. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30:923–30.
282. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15:550.
283. Petitprez F, Levy S, Sun CM, Meylan M, Linhard C, Becht E i sur. The murine Microenvironment Cell Population counter method to estimate abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations in murine samples using gene expression. *Genome Med.* 2020;12:86.
284. Merotto L, Sturm G, Dietrich A, List M, Finotello F. Making mouse transcriptomics deconvolution accessible with immunedeconv. *Bioinformatics Advances.* 2024;4:vbae032.
285. Xie B, Wang B, Shang R, Wang L, Huang X, Xie L. Blocking MyD88 signaling with MyD88 inhibitor prevents colitis-associated colorectal cancer development by maintaining colonic microbiota homeostasis. *Sci Rep.* 2023;13:22552.

286. Hilt EE, McKinley K, Pearce MM, Rosenfeld AB, Zilliox MJ, Mueller ER i sur. Urine Is Not Sterile: Use of Enhanced Urine Culture Techniques To Detect Resident Bacterial Flora in the Adult Female Bladder. *J Clin Microbiol.* 2014;52:871–6.
287. Marongiu L, Gornati L, Artuso I, Zanoni I, Granucci F. Below the surface: The inner lives of TLR4 and TLR9. *J Leukoc Biol.* 2019;106:147–60.
288. Salcedo R, Cataisson C, Hasan U, Yuspa SH, Trinchieri G. MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis. *Trends Immunol.* 2013;34:379–89.
289. Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front Immunol.* 2014;5:367.
290. Tanimura A, Nakazato A, Tanaka N. MYD88 signals induce tumour-initiating cell generation through the NF- κ B-HIF-1 α activation cascade. *Sci Rep.* 2021;11:3991.
291. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH i sur. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 2011;470:115-9.
292. Coste I, Le Corf K, Kfoury A, Hmitou I, Druillennec S, Hainaut P i sur. Dual function of MyD88 in RAS signaling and inflammation, leading to mouse and human cell transformation. *Journal of Clinical Investigation.* 2010;120:3663–7.
293. Vageli D, Kiaris H, Delakas D, Anezinis P, Cranidis A, Spandidos DA. Transcriptional activation of H-ras, K-ras and N-ras proto-oncogenes in human bladder tumors. *Cancer Lett.* 1996;107:241–7.
294. de Queiroz NMGP, Mambelli F, Silva BM, Oliveira SC. Mutations in genes encoding innate immune molecules identified in bladder cancer samples as potential biomarkers for immunotherapy with BCG and agonists. *Frontiers in Urology.* 2023;3:984967.
295. Sun M, Zhao W, Chen Z, Li M, Li S, Wu B i sur. Circular RNA CEP128 promotes bladder cancer progression by regulating Mir-145-5p/ *Myd88* via MAPK signaling pathway. *Int J Cancer.* 2019;145:2170-81.
296. ZHU G, CHENG Z, LIN C, HOFFMAN RM, HUANG Y, SINGH SR i sur. MyD88 Regulates LPS-induced NF- κ B/MAPK Cytokines and Promotes Inflammation and Malignancy in Colorectal Cancer Cells. *Cancer Genomics - Proteomics.* 2019;16:409–19.
297. Wang J, Zhang X, Ma X, Chen D, Cai M, Xiao L i sur. Blockage of CacyBP inhibits macrophage recruitment and improves anti-PD-1 therapy in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2023;42:303.

298. Salazar AM, Neugent ML, De Nisco NJ, Mysorekar IU. Gut-bladder axis enters the stage: Implication for recurrent urinary tract infections. *Cell Host Microbe*. 2022;30:1066–9.
299. Worby CJ, Olson BS, Dodson KW, Earl AM, Hultgren SJ. Establishing the role of the gut microbiota in susceptibility to recurrent urinary tract infections. *Journal of Clinical Investigation*. 2022;132:e158497.
300. Galaup A, Cazes A, Le Jan S, Philippe J, Connault E, Le Coz E i sur. Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103:18721–6.
301. Hsieh HY, Jou YC, Tung CL, Tsai YS, Wang YH, Chi CL i sur. Epigenetic silencing of the dual-role signal mediator, ANGPTL4 in tumor tissues and its overexpression in the urothelial carcinoma microenvironment. *Oncogene*. 2018;37:673–86.
302. Hodgkinson K, El Abbar F, Dobranowski P, Manoogian J, Butcher J, Figeys D i sur. Butyrate’s role in human health and the current progress towards its clinical application to treat gastrointestinal disease. *Clinical Nutrition*. 2023;42:61–75.
303. Dart A. Microbial defence against cancer. *Nat Rev Cancer*. 2020;20:200–200.
304. Ramos Meyers G, Samouda H, Bohn T. Short Chain Fatty Acid Metabolism in Relation to Gut Microbiota and Genetic Variability. *Nutrients*. 2022;14:5361.
305. Zagato E, Pozzi C, Bertocchi A, Schioppa T, Saccheri F, Guglietta S i sur. Endogenous murine microbiota member *Faecalibaculum rodentium* and its human homologue protect from intestinal tumour growth. *Nat Microbiol*. 2020;5:511–24.
306. Salimi V, Shahsavari Z, Safizadeh B, Hosseini A, Khademian N, Tavakoli-Yaraki M. Sodium butyrate promotes apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial impairment. *Lipids Health Dis*. 2017;16:208.
307. Canes D, Chiang GJ, Billmeyer BR, Austin CA, Kosakowski M, Rieger-Christ KM i sur. Histone deacetylase inhibitors upregulate plakoglobin expression in bladder carcinoma cells and display antineoplastic activity in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2005;113:841–8.
308. Wang F, Wu H, Fan M, Yu R, Zhang Y, Liu J i sur. Sodium butyrate inhibits migration and induces AMPK-mTOR pathway-dependent autophagy and ROS-mediated apoptosis via the miR-139-5p/Bmi-1 axis in human bladder cancer cells. *The FASEB Journal*. 2020;34:4266–82.

309. Tirandaz H, Mohammadi E. Efficient tumor targeting by anaerobic butyrate-producing bacteria. *Med Hypotheses*. 2013;80:675–8.
310. Bose P, Dai Y, Grant S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: Emerging insights. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2014;143:323–36. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725814000928>
311. Sun J, Chen S, Zang D, Sun H, Sun Y, Chen J. Butyrate as a promising therapeutic target in cancer: From pathogenesis to clinic (Review). *Int J Oncol*. 2024;64:44.
312. Cao M, Zhang Z, Han S, Lu X. Butyrate inhibits the proliferation and induces the apoptosis of colorectal cancer HCT116 cells via the deactivation of mTOR/S6K1 signaling mediated partly by SIRT1 downregulation. *Mol Med Rep*. 2019;19:3941–47.
313. Du Y, He C, An Y, Huang Y, Zhang H, Fu W i sur. The Role of Short Chain Fatty Acids in Inflammation and Body Health. *Int J Mol Sci*. 2024;25:7379.
314. Danne C, Sokol H. Butyrate, a new microbiota-dependent player in CD8+ T cells immunity and cancer therapy? *Cell Rep Med*. 2021;2:100328.
315. Magliocca G, Mone P, Di Iorio BR, Heidland A, Marzocco S. Short-Chain Fatty Acids in Chronic Kidney Disease: Focus on Inflammation and Oxidative Stress Regulation. *Int J Mol Sci*. 2022;23:5354.
316. Wang D, Wang Z, Tian B, Li X, Li S, Tian Y. Two hour exposure to sodium butyrate sensitizes bladder cancer to anticancer drugs. *International Journal of Urology* [Internet]. 2008;15:435–41. Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1442-2042.2008.02025.x>
317. Wang YC, Ku WC, Liu CY, Cheng YC, Chien CC, Chang KW i sur. Supplementation of Probiotic *Butyricicoccus pullicaecorum* Mediates Anticancer Effect on Bladder Urothelial Cells by Regulating Butyrate-Responsive Molecular Signatures. *Diagnostics*. 2021;11:2270.
318. Krizkova S, Kepinska M, Emri G, Eckschlager T, Stiborova M, Pokorna P i sur. An insight into the complex roles of metallothioneins in malignant diseases with emphasis on (sub)isoforms/isoforms and epigenetics phenomena. *Pharmacol Ther*. 2018;183:90–117.
319. Okochi-Takada E, Hattori N, Tsukamoto T, Miyamoto K, Ando T, Ito S i sur. ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. *Oncogene*. 2014;33:2273–8.
320. Younis OM, Dhaydel AS, Alghwyeen WF, Abu Hantash NR, Allan LM, Qasem IM i sur. The role of ANGPTL4 in cancer: A meta-analysis of observational studies and multi-omics investigation. *PLoS One*. 2025;20:e0320343.

321. Cai YC, Yang H, Wang KF, Chen TH, Jiang WQ, Shi YX. ANGPTL4 overexpression inhibits tumor cell adhesion and migration and predicts favorable prognosis of triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2020;20:878.
322. Lin S, Miao Y, Zheng X, Dong Y, Yang Q, Yang Q i sur. ANGPTL4 negatively regulates the progression of osteosarcoma by remodeling branched-chain amino acid metabolism. *Cell Death Discov*. 2022;8:225.
323. Mohan HM, Aherne CM, Rogers AC, Baird AW, Winter DC, Murphy EP. Molecular Pathways: The Role of NR4A Orphan Nuclear Receptors in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012;18:3223–8.
324. Lee SO, Li X, Khan S, Safe S. Targeting NR4A1 (TR3) in cancer cells and tumors. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15:195–206.
325. Wang L, Li H, Zhen Z, Ma X, Yu W, Zeng H i sur. CXCL17 promotes cell metastasis and inhibits autophagy via the LKB1-AMPK pathway in hepatocellular carcinoma. *Gene*. 2019;690:129–36.
326. Sun X, Chen Q, Zhang L, Chen J, Zhang X. Exploration of prognostic biomarkers and therapeutic targets in the microenvironment of bladder cancer based on CXC chemokines. *Mathematical Biosciences and Engineering*. 2021;18:6262–87.
327. Matsui A, Yokoo H, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Chun NAL, Kadouchi I i sur. CXCL17 Expression by Tumor Cells Recruits CD11b+Gr1highF4/80– Cells and Promotes Tumor Progression. *PLoS One*. 2012;7:e44080.
328. Li L, Yan J, Xu J, Liu CQ, Zhen ZJ, Chen HW i sur. CXCL17 Expression Predicts Poor Prognosis and Correlates with Adverse Immune Infiltration in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2014;9:e110064.
329. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J*. 2011;278:16–27.
330. Kozole SL, Beningo KA. Myosin Light Chains in the Progression of Cancer. *Cells*. 2024;13:2081.
331. Li C, Guan R, Li W, Wei D, Cao S, Chang F i sur. Analysis of myosin genes in HNSCC and identify MYL1 as a specific poor prognostic biomarker, promotes tumor metastasis and correlates with tumor immune infiltration in HNSCC. *BMC Cancer*. 2023;23:840.
332. Ma Y, Zhang Y, Chen F, Liu S, Wang D, Lu Z i sur. The COL7A1/PI3K/AKT axis regulates the progression of cholangiocarcinoma. *Heliyon*. 2024;10:e37361.

333. Zhang J, Zi R, Hu P, Jiang Z, Lv Y, Zhang H i sur. COL7A1 indicates crucial potential as a basal membrane-related prognostic biomarker and therapeutic target in lung adenocarcinoma. *Front Pharmacol.* 2025;16:1543193.
334. Oh SE, Oh MY, An JY, Lee JH, Sohn TS, Bae JM i sur. Prognostic Value of Highly Expressed Type VII Collagen (COL7A1) in Patients With Gastric Cancer. *Pathology and Oncology Research.* 2021;27:1609860.
335. Chernov A V, Baranovskaya S, Golubkov VS, Wakeman DR, Snyder EY, Williams R i sur. Microarray-based transcriptional and epigenetic profiling of matrix metalloproteinases, collagens, and related genes in cancer. *J Biol Chem.* 2010;285:19647–59.
336. Nonis A, De Nardi B, Nonis A. Choosing between RT-qPCR and RNA-seq: a back-of-the-envelope estimate towards the definition of the break-even-point. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406:3533-6
337. Costa C, Giménez-Capitán A, Karachaliou N, Rosell R. Comprehensive molecular screening: from the RT-PCR to the RNA-seq. *Transl Lung Cancer Res.* 2013;2:87–91.
338. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000;14:2123–33.
339. Li S, Pritchard DM, Yu LG. Regulation and Function of Matrix Metalloproteinase-13 in Cancer Progression and Metastasis. *Cancers (Basel).* 2022;14:3263.
340. Zhao H, Bo Q, Wang W, Wang R, Li Y, Chen S i sur. CCL17-CCR4 axis promotes metastasis via ERK/MMP13 pathway in bladder cancer. *J Cell Biochem.* 2019;120:1979–89.
341. Nagumo Y, Kandori S, Tanuma K, Nitta S, Chihara I, Shiga M i sur. PLD1 promotes tumor invasion by regulation of MMP-13 expression via NF-κB signaling in bladder cancer. *Cancer Lett.* 2021;511:15–25.
342. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 14. 2017;2:17023.
343. Liacini A. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-α is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-κB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res.* 2003;288:208–17.
344. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:161–74.

12. KRATKI ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Dora Knezović

Mjesto i datum rođenja: Split, 27. ožujka 1997.

Državljanstvo: hrvatsko

Obrazovanje:

1. III. gimnazija Split (2011. - 2015.)
2. Medicina, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu (2015. – 2021.)
3. Poslijediplomski sveučilišni doktorski studij Klinička medicina utemeljena na dokazima, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu (2021. – 2025.)

Radno iskustvo:

1. Doktorand na HRZZ projektu „Uloga mikrobiote u razvoju raka mokraćnog mjehura“, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu (2021. – 2024.)
2. Specijalizant medicinske genetike, Klinika za dječje bolesti, Klinički bolnički centar Split (2024. – trenutno)

Profesionalno usavršavanje:

1. Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, LabAnim B kategorija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (2021.)
2. Edukacija iz područja protočne citometrije „From First Principles to Polychromatic Application“, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu (2022.)
3. Polaznik (2022.) i pozvani instruktor (2023.) ljetne škole „MedILS Summer School in Bioinformartics“ na Mediteranskom institutu za istraživanje života
4. Mikrokvalifikacijski tečaj „Academic Writing and Presentation in the Digital Space“, Sveučilište u Kiel-u (2023.)
5. Polaznik EMBL-EBI tečaja „Cancer genomics and transcriptomics“ (2024.)

Članstva:

1. Hrvatska liječnička komora
2. Hrvatski liječnički zbor
3. Hrvatsko društvo za humanu genetiku
4. Europsko društvo za humanu genetiku
5. Hrvatsko onkološko društvo

6. Hrvatsko društvo za istraživanje raka
7. Europsko društvo za istraživanje raka
8. Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju

Znanstveni radovi:

1. **Knezović D**, Milić Roje B, Vilović K, Franković L, Korac-Prlic J, Terzić J. MyD88 Signaling Accompanied by Microbiota Changes Supports Urinary Bladder Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2024;25:7176. doi: 10.3390/ijms25137176.
2. Karabatić Knezović S, **Knezović D**, Matana A, Puizina Ivić N, Drmić Hofman I. Strong association of TLR2 and TLR3 polymorphisms with keratoacanthoma and common warts: a case-control study. *Croat Med J*. 2024;65:232-8. doi: 10.3325/cmj.2024.65.232.
3. Boban T, Milić Roje B, **Knezović D**, Jerončić A, Šošić H, Šitum M, Terzić J. Urinary microbiota changes among NMIBC patients during BCG therapy: comparing BCG responders and non-responders. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15:1479795. doi: 10.3389/fcimb.2025.1479795.
4. Karabatić Knezović S, **Knezović D**, Ban J, Matana A, Puizina Ivić N, Glavina Durdov M, Merćep M, Drmić Hofman I. Immunological Landscape of Non-Melanoma Skin Neoplasms: Role of CTLA4+IFN- γ + Lymphocytes in Tumor Microenvironment Suppression. *Medicina (Kaunas)*. 2025;61:330. doi: 10.3390/medicina61020330.

Sažetci sa skupova:

1. **Dora Knezović**, Blanka Roje, Katarina Vilović, Lucija Franković, Jelena Korać Prlić, Janoš Terzić. The Contribution of TLR4 And MYD88 to Bladder Cancer Development. ST14. HDIR-6: Targeting cancer. 2022; https://stari.hdir.hr/docs/HDIR6_BoA.pdf.
2. **Dora Knezović**, Blanka Milić Roje, Katarina Vilović, Lucija Franković, Jelena Korac-Prlic, Janoš Terzić. THE MyD88 SIGNALING ACCOMPANIED BY MICROBIOTA CHANGES SUPPORTS URINARY BLADDER CARCINOGENESIS. P30. FEBS3+ Meeting: Exploring molecular frontiers. 2024; <https://hdbmb.hr/wp-content/uploads/2024/10/FEBS3-Abstract-Book-1.pdf>.
3. **Dora Knezović**, Marin Ogorevc, Tomislav Smoljo, Maja Buljubašić Šoda, Bernarda Lozić. Jedinstveni kompleksni genetički poremećaj: SRY - pozitivan 46,XX testikularni DSD i mozaični oblik trisomije 21. PRILOG II: Quo vadis hrvatska pedijatrija 2025.? Radovi specijalizanata i mladih pedijatara. RIJETKE BOLESTI – od dijagnoze do liječenja. 11. NIP. 2025. <https://www.pedijatrija.hr/media/attachments/2025/03/04/quo-vadis.pdf>.

4. Tomislav Smoljo, **Dora Knezović**, Marin Ogorevc, Bernarda Lozić. Genetički uzroci kardioloških bolesti: unicentrično istraživanje. PRILOG II: Quo vadis hrvatska pedijatrija 2025.? Radovi specijalizanata i mladih pedijatar. RIJETKE BOLESTI – od dijagnoze do liječenja. 11. NIP. 2025. <https://www.pedijatrija.hr/media/attachments/2025/03/04/quo-vadis.pdf>.

Projekti:

1. HRZZ projekt „Uloga mikrobiote u razvoju raka mokraćnog mjehura“ voditelja prof. dr. sc. Janoša Terzića (2021. - 2025.)

13. DODATAK

Tablica D1. Različito izraženi geni između NI TMM-a *Myd88*^{KO} i WT skupina

Gen	log2(FC)	P vrijednost	Izražaj gena	Gen	log2(FC)	P vrijednost	Izražaj gena
<i>Gm21742</i>	8.560511277	9.80944E-10	Više	<i>Hotair</i>	1.087259016	0.018832137	Više
<i>Mid1-ps1</i>	5.66930125	9.34827E-55	Više	<i>Pde7b</i>	1.071161198	1.05914E-05	Više
<i>Adarb2</i>	3.539181965	0.001529553	Više	<i>Gm18609</i>	1.06578561	0.022671201	Više
<i>2210409E12Rik</i>	3.427606138	0.001196634	Više	<i>Pcdhga2</i>	1.058644971	0.004223758	Više
<i>ENSMUSG00000120090</i>	3.170396533	0.003484848	Više	<i>Gm16159</i>	1.057489816	0.019420905	Više
<i>Fbxw25</i>	2.463691445	0.024694648	Više	<i>Spin4</i>	1.055191183	0.001912381	Više
<i>Magea9</i>	2.446477463	0.000178987	Više	<i>Fam107a</i>	1.051146688	0.000884467	Više
<i>Dlk1</i>	2.436915878	0.008810515	Više	<i>Plxna4</i>	1.047835894	0.000184789	Više
<i>1700019N19Rik</i>	2.33048319	0.000147092	Više	<i>Gm45512</i>	1.045486299	0.004594393	Više
<i>Gm53031</i>	2.327450176	0.008546112	Više	<i>Soga1</i>	1.031587422	0.003299277	Više
<i>Nr4a1</i>	2.304427109	9.14023E-17	Više	<i>9330158H04Rik</i>	1.031290423	0.014358173	Više
<i>Oxgr1</i>	2.291341214	0.010804975	Više	<i>A930017M01Rik</i>	1.030529735	0.047133805	Više
<i>Axdnd1</i>	2.224752435	0.014316154	Više	<i>Scepl0s</i>	1.028314336	0.040967523	Više
<i>Cck</i>	2.104432497	0.000806995	Više	<i>Cacna1h</i>	1.022141718	0.000522033	Više
<i>Gm15418</i>	2.004491745	8.16704E-05	Više	<i>Gm43273</i>	1.020909608	0.026075318	Više
<i>Prss23os</i>	1.914145466	0.023478612	Više	<i>Gm39323</i>	1.019114352	0.026054058	Više
<i>Gm8237</i>	1.900063287	0.02180957	Više	<i>Zdbf2</i>	1.01508332	0.011189543	Više
<i>Fos</i>	1.781262277	1.63476E-06	Više	<i>Gm33467</i>	1.014052922	0.028567002	Više
<i>Gm22009</i>	1.7305395	0.000147092	Više	<i>Stum</i>	1.009359483	0.002487611	Više
<i>D830030K20Rik</i>	1.668957107	0.008989743	Više	<i>Cpne7</i>	1.007062425	0.00047412	Više
<i>Gm47765</i>	1.651731116	0.010237675	Više	<i>Ksr2</i>	1.00199117	0.005037076	Više
<i>Myo7b</i>	1.648614295	0.002084885	Više	<i>Clca1</i>	-1.001208203	0.002233939	Manje
<i>Has1</i>	1.641947502	0.015669704	Više	<i>Gm31805</i>	-1.002779488	0.048866386	Manje
<i>Apold1</i>	1.58774277	0.004109478	Više	<i>Il1rl1</i>	-1.004323774	0.005061684	Manje
<i>Flrt3</i>	1.564155851	2.31192E-08	Više	<i>Gpr34</i>	-1.005331309	0.009616243	Manje
<i>Gpr17</i>	1.543829836	2.11001E-05	Više	<i>Ifi209</i>	-1.007130162	0.01232049	Manje
<i>Gm15684</i>	1.50403738	0.00518274	Više	<i>Limd2</i>	-1.007245575	9.11162E-06	Manje
<i>Dlgap2</i>	1.500035876	0.000801313	Više	<i>Cd48</i>	-1.008570081	0.012520365	Manje
<i>Gm41293</i>	1.422431023	0.001079047	Više	<i>Anxa8</i>	-1.009112607	0.000127864	Manje
<i>Cdh6</i>	1.421351234	2.85952E-06	Više	<i>Tnfrsf9</i>	-1.013855445	0.039879131	Manje
<i>Cebpd</i>	1.393856837	4.42963E-05	Više	<i>Gja4</i>	-1.016478099	0.009734561	Manje
<i>Tent5b</i>	1.39132678	0.000569877	Više	<i>Ifi47</i>	-1.016885846	0.008256287	Manje
<i>Errfi1</i>	1.373747815	2.84521E-06	Više	<i>Ret</i>	-1.021100967	0.016150141	Manje
<i>7SK</i>	1.373532559	0.018713612	Više	<i>Ass1</i>	-1.023109685	4.05383E-05	Manje
<i>Hspa1a</i>	1.350743657	7.85776E-05	Više	<i>P2rx2</i>	-1.024779245	0.031092003	Manje
<i>Dnah9</i>	1.344196205	0.020018665	Više	<i>ENSMUSG00000120223</i>	-1.02665339	0.048394258	Manje
<i>Fosb</i>	1.324588452	0.03604823	Više	<i>Pclaf</i>	-1.027809577	0.006890209	Manje
<i>Myh15</i>	1.300613157	0.037774444	Više	<i>Myo1g</i>	-1.030589208	0.001052433	Manje
<i>Mir343</i>	1.298636838	0.030901272	Više	<i>Plch1</i>	-1.031622049	0.00639914	Manje
<i>Zim1</i>	1.291756021	0.030544013	Više	<i>Napsa</i>	-1.03313837	0.03368247	Manje
<i>Arl4d</i>	1.286418875	6.007E-06	Više	<i>Agtr1a</i>	-1.034727324	0.013482868	Manje
<i>Dusp8</i>	1.256530903	0.027601247	Više	<i>Rasal1</i>	-1.039203697	0.019401018	Manje
<i>Dusp1</i>	1.254005563	0.012599213	Više	<i>Cd40</i>	-1.039538951	0.013368803	Manje
<i>Trpc4</i>	1.246281578	0.003701457	Više	<i>Rspo1</i>	-1.040063268	0.00303488	Manje
<i>Tshb</i>	1.224078838	0.021316744	Više	<i>Pik3ap1</i>	-1.040242143	0.001402639	Manje
<i>Tacr2</i>	1.223141163	3.21993E-05	Više	<i>Tmem273</i>	-1.041051457	0.005263564	Manje
<i>Gm10734</i>	1.217087125	0.00098432	Više	<i>Adra2a</i>	-1.041681622	0.000454002	Manje
<i>Gm43150</i>	1.206590299	0.041314774	Više	<i>Slamf9</i>	-1.042763184	0.010176882	Manje
<i>Slc1a1</i>	1.201945229	0.022348961	Više	<i>Sox7</i>	-1.044581588	0.00234668	Manje
<i>Chrm2</i>	1.198759876	3.69227E-07	Više	<i>E2f2</i>	-1.047493343	0.02132126	Manje
<i>4933406I18Rik</i>	1.196183756	0.009702697	Više	<i>Epsti1</i>	-1.048840186	0.000176943	Manje
<i>Gm9869</i>	1.182116521	0.011386415	Više	<i>Selplg</i>	-1.050984194	0.006074875	Manje
<i>Gm47898</i>	1.170696537	0.020419901	Više	<i>Gmfg</i>	-1.052621509	0.000956737	Manje
<i>Alkal1</i>	1.169054671	0.047267297	Više	<i>Trarg1</i>	-1.052924012	0.007862588	Manje
<i>Hspa1b</i>	1.161106667	0.000603378	Više	<i>Scg5</i>	-1.057349185	0.022771756	Manje
<i>Gm12208</i>	1.1559613	0.049340564	Više	<i>Fkbp11</i>	-1.06096986	0.009285058	Manje
<i>ENSMUSG00000120079</i>	1.15174268	0.000763679	Više	<i>Cpa3</i>	-1.064459953	0.041890844	Manje
<i>Asb15</i>	1.142326257	0.048164268	Više	<i>Cracr2b</i>	-1.071287051	2.4185E-05	Manje
<i>Dnah11</i>	1.132502865	0.023029723	Više	<i>Slfn4</i>	-1.076388016	0.029487262	Manje
<i>ENSMUSG00000120534</i>	1.12936741	0.000422621	Više	<i>Mefv</i>	-1.080564185	0.034627556	Manje
<i>Sv2b</i>	1.111593708	0.003477482	Više	<i>Grem1</i>	-1.080576212	0.040452287	Manje
<i>Cdkl1</i>	1.105979104	1.93529E-05	Više	<i>NVšer1</i>	-1.080592854	0.003299277	Manje
<i>Lrp2</i>	1.103305331	0.039375085	Više	<i>Eya2</i>	-1.080605752	9.8304E-09	Manje
<i>Spsb1</i>	1.102132408	0.000450259	Više	<i>Il18rap</i>	-1.080814505	2.07121E-05	Manje

Gen	log2(FC)	P vrijednost	Izražaj gena	Gen	log2(FC)	P vrijednost	Izražaj gena
<i>Gm42778</i>	1.1018839	0.001092169	Više	<i>Plbd1</i>	-1.08126116	0.005838724	Manje
<i>Derl3</i>	-1.08274946	0.017282357	Manje	<i>Stra6</i>	-1.230819949	0.006687558	Manje
<i>Cyp4f18</i>	-1.083215821	0.002836467	Manje	<i>Chgb</i>	-1.232701048	0.030966772	Manje
<i>Ntrk1</i>	-1.088742931	0.00113729	Manje	<i>Ucn2</i>	-1.234197295	0.001879885	Manje
<i>Zc3h12d</i>	-1.092272907	0.034894799	Manje	<i>Ccr5</i>	-1.239655083	0.014247734	Manje
<i>Tgtp1</i>	-1.099520196	0.017223738	Manje	<i>Itgal</i>	-1.2441615	0.020018665	Manje
<i>Acap1</i>	-1.099575031	0.030084893	Manje	<i>Rnase6</i>	-1.244535255	0.015983758	Manje
<i>Lck</i>	-1.100195903	0.03031559	Manje	<i>Lair1</i>	-1.246419087	0.01012467	Manje
<i>Tnfsf10</i>	-1.101271523	0.005964146	Manje	<i>Ccl22</i>	-1.246539607	0.015539905	Manje
<i>Slc34a2</i>	-1.10639089	0.029822676	Manje	<i>Snap25</i>	-1.246721465	0.011386415	Manje
<i>AI504432</i>	-1.107506194	0.022961498	Manje	<i>Trbc1</i>	-1.25288627	0.033187971	Manje
<i>Stap1</i>	-1.10839572	0.022671201	Manje	<i>Lcp2</i>	-1.255296516	0.004361169	Manje
<i>Colca2</i>	-1.10981857	0.000102199	Manje	<i>Myb</i>	-1.259052327	0.04126986	Manje
<i>Phf11b</i>	-1.115336597	0.00307775	Manje	<i>Tibk1</i>	-1.264329082	0.034638541	Manje
<i>Slain1</i>	-1.116286968	0.021391765	Manje	<i>Sgpp2</i>	-1.2645975	0.010252654	Manje
<i>Ipcfl</i>	-1.116686987	0.010347898	Manje	<i>Slc16a11</i>	-1.265185255	1.85697E-08	Manje
<i>Cadps</i>	-1.118716303	0.006201054	Manje	<i>Tagln3</i>	-1.265316193	0.000793998	Manje
<i>Slc44a4</i>	-1.129217576	2.96274E-11	Manje	<i>Irf7</i>	-1.265414782	0.000261901	Manje
<i>Itgb2</i>	-1.130448978	0.000466688	Manje	<i>Cd2</i>	-1.26569248	0.037476547	Manje
<i>Car12</i>	-1.132125173	0.000193153	Manje	<i>Vsig8</i>	-1.26584753	0.002489393	Manje
<i>Bcl2a1d</i>	-1.135730032	0.024022435	Manje	<i>Ccl7</i>	-1.26631086	0.011726116	Manje
<i>Ccl8</i>	-1.138964162	0.010835932	Manje	<i>Atp2c2</i>	-1.267133017	2.16584E-06	Manje
<i>Gm13166</i>	-1.13960283	0.028720289	Manje	<i>Ctss</i>	-1.268077675	4.94883E-05	Manje
<i>Ms4a7</i>	-1.142326262	0.002205552	Manje	<i>Il1b</i>	-1.274197355	0.004128673	Manje
<i>Sfrp4</i>	-1.142493112	0.01849552	Manje	<i>Coro1a</i>	-1.275645551	0.001491922	Manje
<i>Mir703</i>	-1.143285351	0.013195553	Manje	<i>Clec2i</i>	-1.277722136	0.031120367	Manje
<i>Casp1</i>	-1.143724769	0.000450259	Manje	<i>Tspan32</i>	-1.281146215	0.022917961	Manje
<i>Xcr1</i>	-1.144943944	0.040939237	Manje	<i>Clec7a</i>	-1.28240034	0.004606635	Manje
<i>Oasl1</i>	-1.147976359	0.001543135	Manje	<i>Lat</i>	-1.283501691	0.015420981	Manje
<i>Dtnbos</i>	-1.149693856	0.025510781	Manje	<i>Ddah1</i>	-1.288526866	0.000956737	Manje
<i>Nefm</i>	-1.150060423	0.009130425	Manje	<i>Cxcr6</i>	-1.294026402	0.015420981	Manje
<i>Cldn3</i>	-1.150631387	0.039090033	Manje	<i>Ptpn22</i>	-1.295780957	0.003931457	Manje
<i>Kcnj10</i>	-1.152371922	0.007004955	Manje	<i>Tmem121</i>	-1.296020813	0.030519079	Manje
<i>5830428M24Rik</i>	-1.152811445	0.003851009	Manje	<i>Gpr55</i>	-1.299493842	0.021260608	Manje
<i>Scg3</i>	-1.154891003	0.040243536	Manje	<i>Rhoh</i>	-1.30824923	0.016305868	Manje
<i>Serpinh1a</i>	-1.156685565	0.003701457	Manje	<i>Tbcl1d10c</i>	-1.309749585	0.024393069	Manje
<i>Il21r</i>	-1.161082317	0.019455853	Manje	<i>Ucp3</i>	-1.310975835	0.030301441	Manje
<i>Slfn2</i>	-1.161416568	9.07544E-07	Manje	<i>Cacna2d4</i>	-1.318385269	0.00017937	Manje
<i>Klhl6</i>	-1.16231077	0.001217716	Manje	<i>Cxxc4</i>	-1.321416095	0.006484723	Manje
<i>Ache</i>	-1.175290152	0.020637419	Manje	<i>Wfdc2</i>	-1.321972003	3.97967E-12	Manje
<i>Clec4a2</i>	-1.178658834	0.000450259	Manje	<i>Mir142hg</i>	-1.325177548	0.015539905	Manje
<i>Csf2rb</i>	-1.17876008	0.000256384	Manje	<i>Tifab</i>	-1.325320119	3.37024E-05	Manje
<i>Emb</i>	-1.182789318	4.85247E-06	Manje	<i>Serpina3i</i>	-1.328135378	0.032451702	Manje
<i>Rab44</i>	-1.183960028	0.010698503	Manje	<i>Pgam2</i>	-1.332226923	0.001717428	Manje
<i>1700066B19Rik</i>	-1.186649909	0.012401735	Manje	<i>Rac2</i>	-1.332784795	0.005969771	Manje
<i>Hvcn1</i>	-1.186922996	0.011959428	Manje	<i>Clec5a</i>	-1.335558209	0.011908684	Manje
<i>Zbp1</i>	-1.188457012	0.004128673	Manje	<i>Slc6a2</i>	-1.344623821	0.001747256	Manje
<i>Clec4n</i>	-1.190205913	0.000279247	Manje	<i>H2-M2</i>	-1.346237971	0.004128673	Manje
<i>Hells</i>	-1.192600662	1.29297E-05	Manje	<i>Cxcr3</i>	-1.349866344	0.02988126	Manje
<i>Lipm</i>	-1.197020317	0.024453863	Manje	<i>Kcnq1</i>	-1.367539887	1.52175E-08	Manje
<i>1830077J02Rik</i>	-1.197970593	0.014811309	Manje	<i>Rnf186</i>	-1.370469796	0.004044187	Manje
<i>Myom3</i>	-1.19988069	0.026808425	Manje	<i>Lor</i>	-1.371187252	0.022906115	Manje
<i>Traf1</i>	-1.199922833	0.002268107	Manje	<i>Tnfp3</i>	-1.373076088	0.009668958	Manje
<i>Lst1</i>	-1.207855744	0.008757582	Manje	<i>2010007H06Rik</i>	-1.376145913	0.000158023	Manje
<i>Krt10</i>	-1.210164894	0.026075318	Manje	<i>Sema4f</i>	-1.384073349	0.002403358	Manje
<i>Zcchc18</i>	-1.210668936	0.015748842	Manje	<i>Gm44985</i>	-1.384545373	0.000454002	Manje
<i>Hck</i>	-1.21229236	0.000776409	Manje	<i>Cd37</i>	-1.387669502	0.030812729	Manje
<i>Scimp</i>	-1.212960632	0.014525151	Manje	<i>Olfm4</i>	-1.391350445	0.009024038	Manje
<i>Alpk3</i>	-1.215734557	0.011136504	Manje	<i>ENSMUSG00000117901</i>	-1.395087174	0.003016603	Manje
<i>Stmn2</i>	-1.217140031	0.002042571	Manje	<i>Trac</i>	-1.397296018	0.024022435	Manje
<i>Ripply3</i>	-1.217981193	0.002191758	Manje	<i>Ccr2</i>	-1.403940055	0.000158023	Manje
<i>Cda</i>	-1.218657425	0.001024626	Manje	<i>Ankk1</i>	-1.405006803	0.011615232	Manje
<i>Guca2a</i>	-1.222142193	0.007410022	Manje	<i>Mcpt4</i>	-1.406842807	0.010694364	Manje
<i>Ebi3</i>	-1.225494831	0.022215961	Manje	<i>Crmp1</i>	-1.40734883	0.001402639	Manje

Gen	log2(FC)	P vrijednost	Izražaj gena	Gen	log2(FC)	P vrijednost	Izražaj gena
<i>Ccr7</i>	-1.228660403	0.008457592	Manje	<i>Snx20</i>	-1.410283735	0.000298899	Manje
<i>Acp5</i>	-1.229204305	1.61181E-06	Manje	<i>Misp</i>	-1.411997407	0.009450309	Manje
<i>Pinlyp</i>	-1.413131155	0.010804975	Manje	<i>Clec2e</i>	-1.665865433	0.027546085	Manje
<i>Nccrp1</i>	-1.415481147	0.000176943	Manje	<i>Agr2</i>	-1.666129234	0.012231517	Manje
<i>Col6a5</i>	-1.41637356	0.000763679	Manje	<i>Mifl</i>	-1.667886903	0.008457592	Manje
<i>Gm50105</i>	-1.424216336	0.005122587	Manje	<i>Cd180</i>	-1.668979634	0.004361169	Manje
<i>Ccdc88b</i>	-1.430246172	6.63627E-06	Manje	<i>Csprs</i>	-1.674094116	0.010804975	Manje
<i>AW112010</i>	-1.439670385	0.000157967	Manje	<i>Gap43</i>	-1.688048121	0.006234001	Manje
<i>Apol9a</i>	-1.452052998	0.003477482	Manje	<i>Mmp13</i>	-1.697896862	0.005115644	Manje
<i>Fam3b</i>	-1.453396395	1.99846E-07	Manje	<i>Rab3c</i>	-1.702157833	0.000857065	Manje
<i>Aif1</i>	-1.462749892	0.000918834	Manje	<i>Traf3ip3</i>	-1.703157502	0.000781116	Manje
<i>Cd7</i>	-1.462831331	0.024453863	Manje	<i>Sncg</i>	-1.704695502	6.7606E-07	Manje
<i>Samsn1</i>	-1.464702722	0.003986739	Manje	<i>Cxcl5</i>	-1.708900357	1.77871E-05	Manje
<i>Itgb7</i>	-1.465613105	5.07608E-05	Manje	<i>Il2rg</i>	-1.713835859	0.000711602	Manje
<i>Togaram2</i>	-1.472638653	0.000137064	Manje	<i>Neb</i>	-1.716687939	1.04626E-05	Manje
<i>B230377A18Rik</i>	-1.476460327	0.017374885	Manje	<i>Gm15883</i>	-1.721769349	0.001468463	Manje
<i>Coro2a</i>	-1.478694958	1.5963E-14	Manje	<i>Aqp9</i>	-1.728556	2.98398E-05	Manje
<i>Gabrp</i>	-1.480526593	0.037476547	Manje	<i>ENSMUSG00000095672</i>	-1.761012064	0.007273934	Manje
<i>Muc20</i>	-1.489921952	0.010477138	Manje	<i>Rassf10</i>	-1.765270109	0.000302634	Manje
<i>Irx5</i>	-1.492745576	0.002084885	Manje	<i>Phf11a</i>	-1.774006032	0.000309088	Manje
<i>Dmkn</i>	-1.493154382	9.6779E-11	Manje	<i>Calhm6</i>	-1.775302422	0.007708113	Manje
<i>Gm41307</i>	-1.496068317	0.009528445	Manje	<i>E330020D12Rik</i>	-1.795387539	0.00229089	Manje
<i>Gstp3</i>	-1.496779075	0.002746539	Manje	<i>Cysrt1</i>	-1.796008196	9.8304E-09	Manje
<i>Klra2</i>	-1.502399176	0.010231297	Manje	<i>Slpi</i>	-1.798363141	0.000127864	Manje
<i>Trbc2</i>	-1.51007109	0.023433534	Manje	<i>Vgf</i>	-1.800713021	0.014811309	Manje
<i>Snca</i>	-1.512200214	0.00672409	Manje	<i>Syngn3</i>	-1.809473579	0.006240229	Manje
<i>Mir200b</i>	-1.51762367	0.016897546	Manje	<i>Cd300lf</i>	-1.810777988	0.001779258	Manje
<i>Cd52</i>	-1.519610787	0.000510598	Manje	<i>Sectm1b</i>	-1.813092891	0.017223738	Manje
<i>Cd72</i>	-1.519654446	0.001579003	Manje	<i>Card11</i>	-1.823823975	0.000202986	Manje
<i>Sv2c</i>	-1.525091436	0.008259172	Manje	<i>Actn3</i>	-1.834994158	0.002665224	Manje
<i>Cd247</i>	-1.52515011	0.014295266	Manje	<i>Prom1</i>	-1.835222772	1.16486E-08	Manje
<i>Ngfr</i>	-1.525275811	0.013082075	Manje	<i>Lrrc2</i>	-1.837101178	0.01285131	Manje
<i>2210009P08Rik</i>	-1.536315721	0.003299277	Manje	<i>P2ry13</i>	-1.838373175	0.00265476	Manje
<i>Cwh43</i>	-1.546249938	9.65679E-07	Manje	<i>Phox2b</i>	-1.854296628	0.007833871	Manje
<i>Tgm5</i>	-1.548355516	0.014225312	Manje	<i>Mxl</i>	-1.854879221	3.05845E-12	Manje
<i>Tnfrsf13b</i>	-1.551498764	0.011039515	Manje	<i>Agt</i>	-1.855442131	0.004506911	Manje
<i>Rtn1</i>	-1.556210358	0.00166901	Manje	<i>Lrat</i>	-1.864869211	0.000718572	Manje
<i>Rec8</i>	-1.556809664	2.13075E-06	Manje	<i>Fgfbp1</i>	-1.865743095	0.010384317	Manje
<i>Btla</i>	-1.558974405	0.015288788	Manje	<i>Tubb3</i>	-1.867381586	0.012873679	Manje
<i>Sult1e1</i>	-1.560359404	0.000265923	Manje	<i>Cyp2j2</i>	-1.870850142	2.13075E-06	Manje
<i>Pdcd1lg2</i>	-1.560823687	0.04020482	Manje	<i>Pglyrp1</i>	-1.875653694	2.07624E-06	Manje
<i>Tmprss4</i>	-1.564379498	3.1694E-13	Manje	<i>Gm10238</i>	-1.894941593	0.008667836	Manje
<i>Ltb4r1</i>	-1.568284781	3.69227E-07	Manje	<i>Nos1</i>	-1.918706648	0.002954537	Manje
<i>Slc39a4</i>	-1.570845141	0.005159531	Manje	<i>Dnase1l3</i>	-1.922101799	0.00032187	Manje
<i>Pou2f2</i>	-1.572906619	0.00446026	Manje	<i>Syt4</i>	-1.929468608	0.006192823	Manje
<i>Cx3cr1</i>	-1.578846374	8.37642E-05	Manje	<i>Fcgbp</i>	-1.98322529	4.84624E-06	Manje
<i>Ttc36</i>	-1.582344978	0.000525186	Manje	<i>Bcl2a1a</i>	-1.984922435	0.000950605	Manje
<i>Slc34a1</i>	-1.590777174	0.002954537	Manje	<i>Lrrc26</i>	-1.987007668	1.03528E-08	Manje
<i>A530040E14Rik</i>	-1.593948406	0.005540697	Manje	<i>Tspan1</i>	-1.990881391	0.004893658	Manje
<i>Gvin3</i>	-1.594416747	0.011521263	Manje	<i>Sh2d1b1</i>	-1.996795534	0.000195467	Manje
<i>Ptpn7</i>	-1.59630647	0.000603378	Manje	<i>Gm7592</i>	-2.023741907	0.003351371	Manje
<i>Bcl2a1b</i>	-1.615602711	0.014587314	Manje	<i>Prss32</i>	-2.027166396	3.69227E-07	Manje
<i>Bex2</i>	-1.617186596	0.00924921	Manje	<i>Mcemp1</i>	-2.029318292	0.006501841	Manje
<i>Hp</i>	-1.617434197	0.001195051	Manje	<i>Ly6c2</i>	-2.058427122	0.013755454	Manje
<i>Gm29695</i>	-1.621941666	0.000763679	Manje	<i>Chil1</i>	-2.066561265	0.009300948	Manje
<i>Abcd2</i>	-1.623975306	0.002470736	Manje	<i>Myd88</i>	-2.068054833	1.48424E-55	Manje
<i>Cd300c2</i>	-1.627482778	0.00012342	Manje	<i>Tmem182</i>	-2.076934747	0.009465596	Manje
<i>Spns3</i>	-1.627834507	0.003790946	Manje	<i>Ifit1b1l</i>	-2.078605478	6.13009E-05	Manje
<i>Apol9b</i>	-1.6346164	0.001964513	Manje	<i>Phox2a</i>	-2.092129989	0.015916301	Manje
<i>Tgm1</i>	-1.634862254	0.018909123	Manje	<i>Scn4a</i>	-2.094170282	0.011446856	Manje
<i>Chrm1</i>	-1.644507715	0.002433693	Manje	<i>Pkib</i>	-2.137757479	0.000567645	Manje
<i>Tlrl</i>	-1.645057019	0.001324307	Manje	<i>Myom2</i>	-2.166035145	0.000950605	Manje
<i>Ms4a4c</i>	-1.645084324	0.005418849	Manje	<i>I110002E22Rik</i>	-2.193853621	0.000267291	Manje
<i>Atg9b</i>	-1.653176284	7.25653E-19	Manje	<i>Slamf6</i>	-2.202967156	0.009757026	Manje

Gen	log2(FC)	P vrijednost	Izražaj gena	Gen	log2(FC)	P vrijednost	Izražaj gena
<i>Evi2a</i>	-1.65451567	2.27949E-05	Manje	<i>Sln</i>	-5.066408898	1.65378E-07	Manje
<i>Mapk8ip2</i>	-1.661206885	0.006415073	Manje	<i>Igkv10-96</i>	-5.379636049	1.92194E-07	Manje
<i>Ltb4r2</i>	-1.663057908	1.08457E-09	Manje	<i>Aqp4</i>	-5.491214486	2.15196E-05	Manje
<i>Gm15433</i>	-2.203270771	0.000159708	Manje	<i>Ighv3-6</i>	-5.944702124	0.00050212	Manje
<i>Tnf</i>	-2.206605323	0.00102558	Manje	<i>Smpx</i>	-6.013849405	3.77913E-05	Manje
<i>Tlr12</i>	-2.208824887	1.24863E-05	Manje	<i>Mylk4</i>	-6.101695348	1.52175E-08	Manje
<i>Lemd1</i>	-2.210264194	0.003225727	Manje	<i>Ighv1-9</i>	-8.426777797	2.11001E-05	Manje
<i>Ryr1</i>	-2.21099811	1.22246E-06	Manje				
<i>Tmem179</i>	-2.224379489	0.002582892	Manje				
<i>Gjb1</i>	-2.227960169	1.32838E-20	Manje				
<i>Ptprn2</i>	-2.238784656	1.46088E-08	Manje				
<i>Pirt</i>	-2.239150468	0.002792487	Manje				
<i>Hpcal4</i>	-2.247256734	0.000609976	Manje				
<i>Cd3d</i>	-2.260585326	0.000480197	Manje				
<i>Reg3g</i>	-2.292225669	7.36736E-14	Manje				
<i>Klhl41</i>	-2.298524716	9.16192E-06	Manje				
<i>Fmo3</i>	-2.30607857	0.000598484	Manje				
<i>Slc5a7</i>	-2.310118233	0.001360644	Manje				
<i>Sbk2</i>	-2.317743645	7.85776E-05	Manje				
<i>Tnr</i>	-2.329950318	0.001364362	Manje				
<i>Slc10a4</i>	-2.368771315	0.004088636	Manje				
<i>AA467197</i>	-2.40772863	0.000549472	Manje				
<i>Cxcl2</i>	-2.420068213	0.0035264	Manje				
<i>Tmem130</i>	-2.446433279	0.000539274	Manje				
<i>Hrc</i>	-2.449904579	0.000569877	Manje				
<i>Gm52955</i>	-2.450645373	0.005964146	Manje				
<i>Htr3b</i>	-2.569085047	8.46937E-05	Manje				
<i>Igfals</i>	-2.586179922	0.005344844	Manje				
<i>Smyd1</i>	-2.620376973	0.000161978	Manje				
<i>Ces1d</i>	-2.718543691	4.04829E-05	Manje				
<i>Cd22</i>	-2.735709922	0.001455126	Manje				
<i>Slc24a2</i>	-2.740219659	0.002337649	Manje				
<i>Cox8b</i>	-2.774927966	0.001125323	Manje				
<i>Sfpd</i>	-2.793048754	0.005763833	Manje				
<i>Rpl3l</i>	-2.793348986	0.000149276	Manje				
<i>Rit2</i>	-2.794470583	0.000267291	Manje				
<i>Arg1</i>	-2.802428934	0.000525186	Manje				
<i>Tbx15</i>	-2.806248514	8.17207E-06	Manje				
<i>Lypd8l</i>	-2.817527351	7.66128E-08	Manje				
<i>Pcsk1</i>	-2.8416636	0.001495479	Manje				
<i>Obecn</i>	-2.922601751	9.10245E-07	Manje				
<i>Nrap</i>	-3.041389937	2.98398E-05	Manje				
<i>Cacng1</i>	-3.141515618	0.000525186	Manje				
<i>Dmbt1</i>	-3.154706443	0.006540752	Manje				
<i>Muc1l</i>	-3.162514796	4.4177E-06	Manje				
<i>Mybpc1</i>	-3.286140452	2.46539E-05	Manje				
<i>Ky</i>	-3.303531729	0.000283367	Manje				
<i>Mylpf</i>	-3.401839495	9.6779E-11	Manje				
<i>Ttn</i>	-3.449372882	1.01681E-05	Manje				
<i>Dhrs7c</i>	-3.452984448	0.001760849	Manje				
<i>Tlx2</i>	-3.47125853	4.10264E-06	Manje				
<i>Art1</i>	-3.507733252	0.000259741	Manje				
<i>Ppp1r1b</i>	-3.54411233	0.000155765	Manje				
<i>Myh1</i>	-3.648456431	3.79075E-05	Manje				
<i>Lypd2</i>	-3.779148985	0.000552842	Manje				
<i>Sl00a9</i>	-3.819755058	0.000692958	Manje				
<i>Pou2af1</i>	-4.087882229	5.21773E-08	Manje				
<i>Atp2a1</i>	-4.194066639	4.19821E-19	Manje				
<i>Ighm</i>	-4.22311792	4.24831E-06	Manje				
<i>Myot</i>	-4.437372809	8.46058E-06	Manje				
<i>Cxcl17</i>	-4.453451903	1.61211E-10	Manje				
<i>Myl1</i>	-4.611527927	9.02849E-07	Manje				
<i>Cox6a2</i>	-4.921786046	4.08053E-09	Manje				

FC – engl. fold change

Tablica D2. Više izraženi geni u NI TMM u odnosu na NT uzorke unutar WT skupine

Gen	log2(FC)*	P vrijednost	Gen	log2(FC)*	P vrijednost
<i>Hmnr</i>	1.901905792	0.000153926	<i>Dhx58</i>	1.977037	4.2726E-17
<i>Il2rg</i>	1.903033118	4.18965E-05	<i>Gimap1os</i>	1.977384	0.00897065
<i>Phf11b</i>	1.905021851	1.13184E-07	<i>Ephx3</i>	1.978558	1.8839E-10
<i>Mybpc1</i>	1.905583005	0.004348633	<i>Kif4</i>	1.981862	2.9966E-08
<i>Slamf1</i>	1.906498362	0.029817344	<i>Lockd</i>	1.983596	1.3042E-05
<i>Pkib</i>	1.908972177	0.000671121	<i>Clec4n</i>	1.984243	8.2928E-11
<i>Icos</i>	1.912506011	0.000915497	<i>Gm26555</i>	1.984476	0.02063078
<i>Rad51ap1</i>	1.915669167	1.32324E-07	<i>Spdef</i>	1.985504	0.00018109
<i>Neb</i>	1.917205892	1.22793E-07	<i>Slc22a4</i>	1.988184	2.3594E-10
<i>Tgtp2</i>	1.920221474	0.00031474	<i>Haspin</i>	1.992579	1.6706E-06
<i>Traf1</i>	1.920278355	1.68626E-07	<i>Sh2d1b1</i>	1.993061	7.0042E-05
<i>Zfp831</i>	1.921494203	0.018580563	<i>Ccl8</i>	1.994529	3.3942E-06
<i>Cbr2</i>	1.921697039	3.17005E-32	<i>Ilf1209</i>	1.99472	4.5875E-07
<i>Uhrf1</i>	1.925954689	2.32324E-09	<i>Fmo3</i>	1.997811	0.00091774
<i>Fpr2</i>	1.926758674	0.012821385	<i>Trp73os</i>	1.998612	0.04639776
<i>Ankdd1b</i>	1.928547499	3.16765E-06	<i>Gm11832</i>	2.001154	0.0365317
<i>Ccna2</i>	1.929101109	1.54976E-07	<i>Upp1</i>	2.002415	1.4883E-10
<i>Anxa1</i>	1.933295999	4.37292E-13	<i>Gpr171</i>	2.003097	0.00412588
<i>Ablim3</i>	1.935099259	1.0682E-14	<i>Trpv6</i>	2.004399	0.01041922
<i>Alox15</i>	1.935705399	0.004694548	<i>Cd53</i>	2.004665	2.5813E-08
<i>Il20ra</i>	1.937929952	0.00969927	<i>Ano5</i>	2.008161	0.02710433
<i>Galnt12</i>	1.938856534	2.56293E-24	<i>Ccdc88b</i>	2.009828	8.9534E-12
<i>Carmil2</i>	1.939559588	8.98697E-05	<i>Clspn</i>	2.010374	6.1194E-05
<i>Aif1</i>	1.940834829	1.93783E-06	<i>Samsn1</i>	2.010529	2.9057E-05
<i>Ern2</i>	1.940926506	6.33023E-06	<i>Sfrp4</i>	2.012367	2.9405E-05
<i>Prlr</i>	1.941593053	0.00652516	<i>Olfr56</i>	2.013029	0.00757068
<i>Cenpi</i>	1.943005613	0.000242408	<i>Srd5a2</i>	2.013212	0.02326432
<i>Slc5a9</i>	1.953661788	7.5254E-12	<i>Trbc2</i>	2.01486	0.00239151
<i>Ifit3b</i>	1.953945593	1.42544E-05	<i>Nexmif</i>	2.016084	2.1481E-08
<i>Tacr1</i>	1.956619811	4.1586E-09	<i>Irx3</i>	2.017496	4.8142E-08
<i>Gm38099</i>	1.957106309	0.007581577	<i>Rac3</i>	2.020552	3.676E-13
<i>Gda</i>	1.958237366	2.48063E-16	<i>B430306N03Rik</i>	2.021122	0.0015541
<i>Shcbp1</i>	1.958513026	3.96387E-05	<i>A930028O11Rik</i>	2.021763	0.04765322
<i>Ly6e</i>	1.961351378	1.00582E-47	<i>Cd96</i>	2.02251	0.00515751
<i>Ccr1</i>	1.963256987	5.07205E-05	<i>Trim2</i>	2.031927	5.007E-48
<i>Mis18bp1</i>	1.965584592	1.67616E-06	<i>Stx19</i>	2.032119	2.4528E-06
<i>A830019P07Rik</i>	1.968339854	0.032543233	<i>Sox2</i>	2.032222	2.8231E-08
<i>Myh1</i>	1.968517467	0.008473069	<i>Gm17130</i>	2.033452	0.01729267
<i>Igll1</i>	1.968767343	0.020050118	<i>Sit1</i>	2.036032	0.00968694
<i>Serpina3n</i>	1.969212822	2.7207E-15	<i>Tnfrsf23</i>	2.036208	3.7327E-10
<i>Car2</i>	1.969270548	7.00776E-14	<i>Havcr2</i>	2.043804	4.634E-11
<i>Igll1</i>	1.970046743	0.025882019	<i>Ms4a8a</i>	2.050528	0.00175033
<i>Cd72</i>	1.973774197	1.15117E-05	<i>Ilf1204</i>	2.051037	3.2144E-13
<i>Colec10</i>	1.974040788	0.00043173	<i>Il7r</i>	2.051067961	0.000192975
<i>Cdk1</i>	1.974821	2.8824E-06	<i>Php2</i>	2.051254195	0.004694548

Gen	log2(FC)*	P vrijednost	Gen	log2(FC)*	P vrijednost
<i>Slc39a8</i>	2.053840356	4.09312E-09	<i>Arl14</i>	2.149702	1.042E-09
<i>Akr1c13</i>	2.055080011	9.94688E-10	<i>Gm11545</i>	2.150651	0.01164765
<i>E330020D12Rik</i>	2.056006627	0.00022058	<i>Cxcl1</i>	2.152584	0.004035
<i>Rptn</i>	2.05617711	3.94365E-06	<i>Gprc5a</i>	2.164178	0.0001038
<i>Ripk3</i>	2.058231915	2.56879E-10	<i>Hrob</i>	2.165959	0.00146823
<i>Ifi211</i>	2.064871593	1.3844E-17	<i>Plscr1</i>	2.171696	1.6646E-22
<i>Crocc2</i>	2.066125227	0.005130049	<i>Kn1l</i>	2.172373	9.71E-06
<i>C3</i>	2.067360536	2.81357E-20	<i>Scimp</i>	2.172593	3.0087E-05
<i>Kif22</i>	2.071327281	6.84979E-11	<i>Kynu</i>	2.173995	0.00276275
<i>Agt</i>	2.073868674	0.000745908	<i>Sp5</i>	2.178051	0.02674377
<i>Ly6a</i>	2.078112596	1.39481E-36	<i>Gm13822</i>	2.182811	0.00690098
<i>Cdc20</i>	2.080016516	2.63371E-08	<i>Pmaip1</i>	2.184961	2.3643E-12
<i>Phf11a</i>	2.085150402	1.0447E-05	<i>Dscaml1</i>	2.186559	3.2675E-05
<i>Pbk</i>	2.087711045	0.000376436	<i>Gm4951</i>	2.193355	2.0245E-06
<i>Gcnt3</i>	2.088509628	1.17707E-22	<i>Cst7</i>	2.197036	0.00595351
<i>Gm41611</i>	2.08857921	0.031334497	<i>Mc4r</i>	2.201129	0.00694766
<i>Trp73</i>	2.088980284	7.83957E-05	<i>Ceacam1</i>	2.20181	2.5647E-18
<i>Gm13546</i>	2.094800787	0.022190096	<i>2010007H06Rik</i>	2.203533	5.0091E-11
<i>Cd80</i>	2.097128457	6.85527E-19	<i>Grk1</i>	2.206102	0.0387405
<i>Epsti1</i>	2.11358009	2.86824E-16	<i>Cep55</i>	2.220891	4.907E-12
<i>Slc12a2</i>	2.114470342	6.12727E-15	<i>Tpsb2</i>	2.227406	1.1594E-06
<i>Mx2</i>	2.116602686	1.02035E-11	<i>Gm15883</i>	2.229047	9.6519E-06
<i>Melk</i>	2.11769	7.21495E-07	<i>Colca2</i>	2.231077	8.8255E-17
<i>Fitm1</i>	2.118448158	0.020687533	<i>Cdc25c</i>	2.239622	0.00177024
<i>Ampd1</i>	2.123222145	0.022406592	<i>Gm8369</i>	2.240454	0.00509882
<i>Krt1</i>	2.127588275	0.000316354	<i>Il1b</i>	2.242023	3.3678E-07
<i>Bmp15</i>	2.130759528	0.005484576	<i>Crabp2</i>	2.24254	0.00055133
<i>Slc34a1</i>	2.133115726	2.54146E-05	<i>Aspm</i>	2.245147	6.8354E-07
<i>Gm44274</i>	2.133334266	0.047594231	<i>F830208F22Rik</i>	2.245579	0.01342645
<i>Cx3cr1</i>	2.13433798	9.4711E-09	<i>E2f8</i>	2.24656	1.9954E-05
<i>Naip1</i>	2.135513751	0.013426453	<i>Peg10</i>	2.24739	1.1744E-13
<i>Gm37145</i>	2.137183087	2.39503E-05	<i>Gimap7</i>	2.251385	0.0098642
<i>Fam83e</i>	2.137617182	1.10851E-13	<i>Gm48007</i>	2.260677	0.02260768
<i>Btla</i>	2.139207733	0.000637434	<i>Gm32633</i>	2.262039	0.03315249
<i>Trpm6</i>	2.139310295	5.34295E-06	<i>Plekhs1</i>	2.264615	1.2595E-08
<i>Foxp3</i>	2.140748464	3.79611E-06	<i>Slc35f3</i>	2.265602	4.7594E-05
<i>Ckap2l</i>	2.1416113	3.91206E-14	<i>Mcpt4</i>	2.265865	2.8145E-05
<i>Proc</i>	2.142390201	0.019658067	<i>Gm49891</i>	2.2681	0.0089485
<i>Ltb</i>	2.143819687	0.006431437	<i>Ces1d</i>	2.271466	0.00015603
<i>Gm11695</i>	2.145513006	0.033536459	<i>B4galnt1</i>	2.271789217	2.83996E-50
<i>Runx2</i>	2.146565821	1.67669E-16	<i>Ms4a4c</i>	2.272102612	6.52643E-05
<i>Cma1</i>	2.147148532	5.13045E-05	<i>Ces2c</i>	2.279994269	0.000759164
<i>Rab38</i>	2.14747	3.4704E-09	<i>Smim45</i>	2.282704235	0.021143978
<i>Rab44</i>	2.147788	1.9061E-06	<i>Olfr143</i>	2.285895398	0.018515679
<i>Dnajb13</i>	2.148598	9.3745E-12	<i>Ptpn22</i>	2.287502505	9.35127E-08
<i>Plkl1</i>	2.149514	8.1155E-11	<i>Gm5431</i>	2.289075215	7.98333E-06
<i>Serpina3m</i>	2.149615	4.3919E-07	<i>Kcne3</i>	2.289149245	8.06569E-16

Gen	log2(FC)*	P vrijednost	Gen	log2(FC)*	P vrijednost
<i>Mkx2os</i>	2.289675514	3.31643E-05	<i>Sec14l4</i>	2.292383	0.00610158
<i>Pglyrp1</i>	2.289838957	6.75391E-10	<i>Spag5</i>	2.293718	5.0334E-08
<i>Ddx60</i>	2.289848575	6.95579E-12	<i>Six1</i>	2.29701	2.0627E-18
<i>Gm12250</i>	2.291215811	0.000280928	<i>Sult1e1</i>	2.297509	6.7941E-09
<i>Cyp2f2</i>	2.29153577	3.20436E-10	<i>Vmn1r43</i>	2.298059	0.00158259
<i>Traf3ip3</i>	2.291850895	1.51525E-06	<i>Il2ra</i>	2.299345	9.3967E-06
<i>Sec14l4</i>	2.292383224	0.006101578	<i>Gbp2b</i>	2.299605	0.01754512
<i>Spag5</i>	2.293717924	5.03335E-08	<i>Crif1</i>	2.301045	2.8368E-05
<i>Six1</i>	2.297009569	2.0627E-18	<i>Tgtp1</i>	2.303918	7.3401E-07
<i>Sult1e1</i>	2.29750866	6.79413E-09	<i>Pif1</i>	2.306331	0.00102697
<i>Vmn1r43</i>	2.298058596	0.001582588	<i>Gm31300</i>	2.30775	0.02961505
<i>Il2ra</i>	2.299344969	9.39669E-06	<i>Rpl3l</i>	2.312241	0.00043836
<i>Gbp2b</i>	2.299604921	0.017545121	<i>Rec8</i>	2.312782	5.4159E-14
<i>Crif1</i>	2.301044601	2.83675E-05	<i>Kctd14</i>	2.318326	3.2615E-08
<i>Tgtp1</i>	2.303918164	7.3401E-07	<i>Apobr</i>	2.3215	2.4714E-23
<i>Pif1</i>	2.306330933	0.001026965	<i>F830016B08Rik</i>	2.325807	0.00037121
<i>Gm31300</i>	2.307749693	0.029615055	<i>Gm53</i>	2.328244	0.0019161
<i>Rpl3l</i>	2.312240594	0.000438363	<i>Lipk</i>	2.328273	3.3962E-06
<i>Rec8</i>	2.312782432	5.41591E-14	<i>Cd4</i>	2.328637	4.9772E-06
<i>Kctd14</i>	2.318326125	3.26147E-08	<i>Gsdmc12</i>	2.32865	0.00052302
<i>Apobr</i>	2.321499983	2.47142E-23	<i>Aqp9</i>	2.330995	1.5455E-09
<i>F830016B08Rik</i>	2.325807019	0.000371211	<i>Gm47687</i>	2.33444	0.01460445
<i>Gm53</i>	2.3282441	0.001916101	<i>Gm11771</i>	2.336427	0.01164765
<i>Lipk</i>	2.328273362	3.39617E-06	<i>Pkp1</i>	2.343207	2.4941E-20
<i>Cd4</i>	2.328636648	4.97724E-06	<i>Aqp2</i>	2.345274	0.03709391
<i>Gsdmc12</i>	2.328649885	0.000523018	<i>Gm18820</i>	2.346334	0.0151271
<i>Aqp9</i>	2.330995082	1.54553E-09	<i>Slc15a3</i>	2.346985	4.35E-12
<i>Gm47687</i>	2.334440128	0.014604448	<i>Trim59</i>	2.347998	2.5049E-18
<i>Gm11771</i>	2.336427007	0.01164765	<i>Top2a</i>	2.35182	2.6522E-14
<i>Pkp1</i>	2.343206793	2.49405E-20	<i>5830428M24Rik</i>	2.352363	1.8712E-09
<i>Aqp2</i>	2.34527378	0.037093908	<i>Ces1e</i>	2.356034	0.0134971
<i>Gm18820</i>	2.346334193	0.015127096	<i>Card11</i>	2.357811	2.978E-07
<i>Slc15a3</i>	2.346985481	4.35002E-12	<i>Neil3</i>	2.362508	4.4282E-06
<i>Trim59</i>	2.347998343	2.50488E-18	<i>Bub1</i>	2.368459677	7.05781E-08
<i>Top2a</i>	2.351820119	2.65222E-14	<i>4933421A08Rik</i>	2.374073415	0.004162935
<i>5830428M24Rik</i>	2.352362528	1.87122E-09	<i>Gm16505</i>	2.37460556	1.17937E-06
<i>Smim45</i>	2.282704	0.02114398	<i>Padi1</i>	2.37641706	1.54446E-05
<i>Olfr143</i>	2.285895	0.01851568	<i>Gm50321</i>	2.377522461	1.10844E-07
<i>Ptpn22</i>	2.287503	9.3513E-08	<i>Bhlhe22</i>	2.379570444	0.00649825
<i>Gm5431</i>	2.289075	7.9833E-06	<i>Pgam2</i>	2.379936304	2.91034E-09
<i>Kcne3</i>	2.289149	8.0657E-16	<i>Cpa3</i>	2.380269279	9.34295E-05
<i>Mkx2os</i>	2.289676	3.3164E-05	<i>Gm5547</i>	2.382346448	0.005089692
<i>Pglyrp1</i>	2.289839	6.7539E-10	<i>Mmp25</i>	2.386832832	6.38461E-07
<i>Ddx60</i>	2.289849	6.9558E-12	<i>Gpr65</i>	2.388951802	2.74293E-05
<i>Gm12250</i>	2.291216	0.00028093	<i>Wnt10a</i>	2.390361654	1.92131E-14
<i>Cyp2f2</i>	2.291536	3.2044E-10	<i>Timp1</i>	2.390675522	3.80668E-08
<i>Traf3ip3</i>	2.291851	1.5152E-06	<i>D5Erd605e</i>	2.391738419	0.020134471

Gen	log2(FC)*	P vrijednost	Gen	log2(FC)*	P vrijednost
<i>Slc6a2</i>	2.398976312	2.08003E-09	<i>Hrc</i>	2.560979	8.7776E-05
<i>Ifi205</i>	2.414332849	7.9188E-09	<i>Gm26634</i>	2.563282	0.03129005
<i>Chdh</i>	2.416893232	1.00278E-06	<i>Ramp3</i>	2.568961	1.7652E-05
<i>Gjb4</i>	2.420369238	0.000399981	<i>A530040E14Rik</i>	2.576855	5.9301E-06
<i>Cd2</i>	2.421294247	0.000419544	<i>A730090N16Rik</i>	2.578808	0.01658949
<i>Gm44985</i>	2.425422472	5.16312E-11	<i>Defb1</i>	2.582704	8.6163E-16
<i>Lmod2</i>	2.429150172	0.008615576	<i>Rbp2</i>	2.583524	0.00695265
<i>Nek2</i>	2.430775006	2.13233E-10	<i>Gm19345</i>	2.584624	0.01540672
<i>Ccnb1</i>	2.432647313	3.23886E-08	<i>1110002E22Rik</i>	2.604753	4.3086E-06
<i>Xcl1</i>	2.433874308	0.012159682	<i>Eci3</i>	2.60943	0.01353915
<i>Ryr1</i>	2.435618448	1.1946E-08	<i>Btn2a2</i>	2.610628	0.03616021
<i>Cenpf</i>	2.443932232	9.37276E-11	<i>Birc5</i>	2.610839	6.4994E-09
<i>Ska1</i>	2.446946446	0.00140064	<i>Gm4610</i>	2.620106	8.1147E-19
<i>Mki67</i>	2.447200878	1.92413E-11	<i>Fcer1a</i>	2.620477	0.0139113
<i>Cdh17</i>	2.449631273	0.000173434	<i>D5Ert615e</i>	2.622937	0.00483364
<i>Slco1a5</i>	2.449717574	0.025834189	<i>Cd69</i>	2.626361	0.00091723
<i>Gm42765</i>	2.46702602	0.014414718	<i>Slc16a11</i>	2.626977	5.9636E-36
<i>Slfn2</i>	2.467235817	6.13705E-30	<i>Mrgprb2</i>	2.6414	6.1386E-05
<i>Mir196a-1</i>	2.469080225	0.000396978	<i>Chil1</i>	2.643273	0.00066555
<i>Col6a5</i>	2.471154004	2.35936E-10	<i>A630023P12Rik</i>	2.646113	0.00872183
<i>Gm9242</i>	2.472552315	0.025797363	<i>Dlx5</i>	2.648393	0.02244653
<i>Tnfrsf13c</i>	2.474003909	0.020943905	<i>Gm15650</i>	2.650696	0.01726808
<i>Gm47662</i>	2.475102624	0.039685593	<i>Slc17a8</i>	2.651486	0.00016647
<i>Ccnb2</i>	2.481001835	1.14329E-08	<i>Cd3d</i>	2.664463	9.7736E-06
<i>Xlr</i>	2.482473216	0.003713391	<i>Tmprss11e</i>	2.665783	2.3007E-08
<i>Art2b</i>	2.484241267	0.002062183	<i>Atp6v0d2</i>	2.667104	4.8433E-05
<i>Tnfrsf9</i>	2.497682768	1.20794E-05	<i>Slfn1</i>	2.667701	8.4587E-05
<i>Snord17</i>	2.498004507	0.034746094	<i>Clu</i>	2.676373779	1.92599E-24
<i>Gpx2</i>	2.502763975	6.78654E-24	<i>Ifit1</i>	2.678613287	4.59868E-13
<i>Ndc80</i>	2.506851125	1.51568E-07	<i>Cxcr2</i>	2.680706029	0.000575001
<i>Klrc1</i>	2.507133	0.00578777	<i>Gm50186</i>	2.681076503	0.005574227
<i>Trac</i>	2.518318	9.343E-05	<i>Olfr895</i>	2.687888886	0.00704617
<i>Pax8</i>	2.518635	0.00044812	<i>Glt1d1</i>	2.700788972	5.44898E-07
<i>BC049987</i>	2.523392	0.00458643	<i>Slc28a3</i>	2.710889346	1.35268E-08
<i>4930546K05Rik</i>	2.523669	6.5018E-08	<i>Tnfrsf8</i>	2.719961982	4.30859E-06
<i>Gm47725</i>	2.525007	0.00842572	<i>Irx5</i>	2.72010027	4.81423E-08
<i>Scel</i>	2.525232	1.7906E-09	<i>Fbxo40</i>	2.723300784	0.006445699
<i>Cenpe</i>	2.530002	1.3906E-09	<i>Dapl1</i>	2.723369911	1.90188E-12
<i>Gm13868</i>	2.532434	0.00359456	<i>Klra2</i>	2.723617399	5.72143E-06
<i>Barx2</i>	2.534093	2.7847E-14	<i>ENSMUSG00000121016</i>	2.728482318	0.001009302
<i>Tmigd1</i>	2.535437	0.00068615	<i>Il18rap</i>	2.733313934	7.98026E-29
<i>Pclaf</i>	2.537645	6.8593E-12	<i>Il33</i>	2.73645232	8.80637E-28
<i>Il1rn</i>	2.548766	3.7256E-27	<i>Atg9b</i>	2.73730056	2.38117E-51
<i>Bcl2a1d</i>	2.550872	1.2751E-06	<i>Cwh43</i>	2.74052289	2.57613E-20
<i>Gm12610</i>	2.556353	7.6106E-07	<i>Wnt3a</i>	2.740663558	4.76088E-10
<i>Slfn4</i>	2.55823	1.1258E-06	<i>Gm10238</i>	2.754289816	8.04876E-05
<i>Gm36500</i>	2.559029	0.02994332	<i>Nupr1</i>	2.755542217	1.9886E-16

Gen	log2(FC)*	P vrijednost	Gen	log2(FC)*	P vrijednost
<i>Trpa1</i>	2.756667125	0.008833798	<i>BB123696</i>	3.00604	0.00855666
<i>Ticrr</i>	2.756814527	2.24131E-05	<i>Klf2c</i>	3.007548	2.4191E-08
<i>Gm35572</i>	2.769905059	0.01461608	<i>Mme</i>	3.011093	0.00034657
<i>Ly6c2</i>	2.774503616	0.00071864	<i>Aim2</i>	3.013222	2.4168E-34
<i>Bcl11b</i>	2.777111125	8.00455E-21	<i>Irf7</i>	3.013915	6.7327E-22
<i>Tbx15</i>	2.777553073	2.83216E-06	<i>Ephx4</i>	3.021181	8.6403E-07
<i>Gm15947</i>	2.794418247	2.67053E-07	<i>Cxcl2</i>	3.031315	0.00027249
<i>Ccl22</i>	2.796372001	5.19575E-08	<i>Apol7c</i>	3.03875	4.3112E-05
<i>Gm15318</i>	2.797050668	0.018782923	<i>Nebl</i>	3.046922	1.4963E-15
<i>Apol9b</i>	2.802991865	2.1147E-08	<i>Gm3336</i>	3.064881	1.0707E-08
<i>H19</i>	2.804657592	1.66111E-07	<i>Gm15987</i>	3.070538	1.3527E-11
<i>Adam8</i>	2.822455534	4.83618E-37	<i>Bcl2a1b</i>	3.075753	7.1284E-06
<i>Ly6g6c</i>	2.828895753	6.88021E-06	<i>Spp1</i>	3.079109	1.1705E-05
<i>Igkv6-15</i>	2.833443681	0.005295548	<i>Oas2</i>	3.085962	1.6653E-08
<i>Fabp2</i>	2.837464377	4.39308E-06	<i>Mmp3</i>	3.094479	4.9075E-08
<i>Areg</i>	2.838804333	7.27402E-15	<i>Plch1</i>	3.097725	3.5592E-16
<i>Lhfp11</i>	2.840515026	7.52734E-06	<i>2310069B03Rik</i>	3.104518	1.2426E-06
<i>Gm36107</i>	2.842755295	0.000679293	<i>Cps1</i>	3.10844	0.00649303
<i>Lor</i>	2.843803563	1.07838E-05	<i>Exo1</i>	3.110518	2.2327E-08
<i>Zbp1</i>	2.846297907	2.23313E-13	<i>Alox12b</i>	3.115779	0.00885825
<i>Gm7609</i>	2.848539244	0.005946531	<i>Drd2</i>	3.121384	0.01270717
<i>Vtcn1</i>	2.853612548	2.23747E-32	<i>Olr1</i>	3.129206102	0.002193376
<i>1700066B19Rik</i>	2.855074619	1.46486E-07	<i>B3galt5</i>	3.142737662	1.66378E-08
<i>Sntg1</i>	2.861649097	1.53422E-07	<i>Fpr1</i>	3.156480681	0.004714056
<i>Rtp4</i>	2.866368	1.015E-25	<i>Bcl2l15</i>	3.163800959	0.000992212
<i>A1463229</i>	2.873548	0.01547782	<i>Cxcr5</i>	3.164609762	0.00198269
<i>Ffar4</i>	2.884159	6.4168E-13	<i>Mxd3</i>	3.173538481	4.03683E-08
<i>Slamf6</i>	2.884463	0.00053484	<i>Reg1</i>	3.178122441	1.19773E-05
<i>Vnn1</i>	2.885416	1.5347E-11	<i>1810046K07Rik</i>	3.183916817	0.005257545
<i>Gsdmc4</i>	2.887547	1.1972E-05	<i>Ocstamp</i>	3.199959098	0.000149079
<i>Ube2c</i>	2.897766	2.2315E-08	<i>H2-M2</i>	3.201056724	1.7289E-11
<i>Oasl2</i>	2.899964	8.884E-32	<i>Mall</i>	3.216823907	7.3492E-10
<i>Rnf186</i>	2.913999	3.3588E-10	<i>Slc7a11</i>	3.232749659	3.6645E-21
<i>Dnase1l3</i>	2.922233	5.1788E-09	<i>Lypd2</i>	3.247701687	0.000711279
<i>Tm4sf5</i>	2.92269	0.01040919	<i>Smyd1</i>	3.252257024	1.95024E-06
<i>Ncapg</i>	2.927026	9.0895E-14	<i>Car12</i>	3.262353894	6.38567E-33
<i>Slco4c1</i>	2.938942	7.7808E-06	<i>Gm35154</i>	3.26703192	0.006894307
<i>Ltb4r1</i>	2.942326	1.1477E-22	<i>Gpr55</i>	3.27145408	1.19875E-07
<i>Fcgr4</i>	2.95985	1.3664E-08	<i>Cd79b</i>	3.273237997	0.001244861
<i>Ifi44</i>	2.970429	4.0877E-13	<i>Ccr3</i>	3.279227977	0.011453613
<i>Sh2d5</i>	2.972157	3.0101E-10	<i>Cxcl9</i>	3.291897379	0.000350414
<i>Gm50323</i>	2.974535	7.075E-05	<i>Gm33055</i>	3.298817769	0.002527799
<i>Hs3st3b1</i>	2.976319	4.2044E-52	<i>Grip1</i>	3.29978018	2.36722E-10
<i>Muc15</i>	2.978779	4.1345E-06	<i>Ly6g2</i>	3.315601691	0.000321734
<i>Gm4675</i>	2.984682	0.00385243	<i>Gm12860</i>	3.315899666	0.011380119
<i>Dtl</i>	2.990033	4.5746E-12	<i>Hoxb9</i>	3.317246234	0.000211288
<i>Bcl2a1a</i>	2.996646	3.1799E-07	<i>Lrat</i>	3.31771342	1.05569E-09

Gen	log2(FC)*	P vrijednost	Gen	log2(FC)*	P vrijednost
<i>Isg15</i>	3.329892702	2.57543E-08	<i>Alb</i>	3.635288	0.01804185
<i>Acnat1</i>	3.330961263	0.000842443	<i>Gpr31c</i>	3.636455	0.0095502
<i>Derl3</i>	3.347830112	1.11038E-12	<i>Tmem212</i>	3.645433	0.00469455
<i>Dhrs7c</i>	3.352922484	0.001051047	<i>Fcrla</i>	3.659739	0.00020557
<i>Cxcl10</i>	3.355211731	4.55003E-10	<i>Pax9</i>	3.67456	2.3007E-08
<i>Gm35019</i>	3.359964578	0.01217408	<i>Gm20442</i>	3.693357	0.00040264
<i>Hsh2d</i>	3.377418157	3.33812E-05	<i>Alox12e</i>	3.720851	0.00245095
<i>Obscn</i>	3.385803696	1.79595E-09	<i>Abcc8</i>	3.732409	3.0101E-10
<i>Gpr174</i>	3.398646889	0.0014062	<i>Gdpd2</i>	3.738432	2.3381E-17
<i>Tgm1</i>	3.409867591	1.52323E-06	<i>Clec2g</i>	3.746406	0.00037203
<i>Hsd17b6</i>	3.413127488	6.18773E-07	<i>Cd22</i>	3.748888	4.7677E-06
<i>SI00a9</i>	3.418130336	0.000699042	<i>Gm43085</i>	3.754949	0.00054588
<i>Lipm</i>	3.422542711	2.34615E-09	<i>Cxcl15</i>	3.767614	1.2953E-07
<i>Pdzk1</i>	3.423083699	0.009027543	<i>Wfdc8</i>	3.81853	0.00579018
<i>Calhm6</i>	3.423997564	1.07406E-06	<i>Myoz3</i>	3.823324	0.00015161
<i>Ido1</i>	3.435419295	2.04099E-07	<i>Phgr1</i>	3.823551292	0.003951954
<i>Ky</i>	3.437479434	6.4976E-05	<i>Gm4841</i>	3.826249066	1.31897E-05
<i>Serpina3i</i>	3.438403271	4.91301E-06	<i>Cacna1s</i>	3.832124531	0.002114117
<i>Ppp2r2c</i>	3.443683	5.3942E-13	<i>Cox8b</i>	3.843773631	4.75231E-06
<i>Celsr1</i>	3.450721	5.2896E-37	<i>Slc39a4</i>	3.870220509	2.21848E-13
<i>Tigit</i>	3.453521	0.00025933	<i>Rnf183</i>	3.871099387	3.21374E-06
<i>Gm31583</i>	3.460595	0.00439918	<i>Apol9a</i>	3.871141447	1.47359E-15
<i>Yipf7</i>	3.467177	0.01618071	<i>Myb</i>	3.881251407	9.50067E-06
<i>Epgn</i>	3.46813	0.00194803	<i>Iglic2</i>	3.882992211	7.36403E-05
<i>Gm39556</i>	3.489697	2.6905E-11	<i>Cbx3-ps8</i>	3.884073421	3.25629E-10
<i>Sell</i>	3.501759	0.00018996	<i>Clic6</i>	3.891188838	1.9478E-17
<i>Pdcd1</i>	3.502676	1.1087E-06	<i>Lrrc31</i>	3.907253608	0.00619089
<i>Ccr7</i>	3.503411	3.6717E-14	<i>Igfv2</i>	3.908261158	6.33751E-05
<i>Ccl17</i>	3.504756	0.00039171	<i>Ccl20</i>	3.911093284	0.004886482
<i>Il18</i>	3.506484	1.9775E-39	<i>Igkv1-117</i>	3.925809655	0.002323621
<i>Gm30571</i>	3.510083	6.5261E-35	<i>Gm33929</i>	3.945687298	0.003132669
<i>Apof</i>	3.532375	0.00152571	<i>Col7a1</i>	3.94638814	1.8404E-151
<i>Gm8616</i>	3.556763	0.00587801	<i>Tinag</i>	3.955216045	1.86988E-05
<i>Padi3</i>	3.563251	2.0858E-08	<i>Sectm1a</i>	3.968523502	0.000635793
<i>Spib</i>	3.568758	0.00348835	<i>Tnfrsf4</i>	3.972475574	0.000754017
<i>Ccr8</i>	3.579037	0.00100389	<i>Ighv3-6</i>	3.99357548	0.001104815
<i>Trem12</i>	3.582854	0.00113917	<i>Gm6329</i>	4.0078526	4.59644E-05
<i>Fgf23</i>	3.585105	0.01527962	<i>Ptgr</i>	4.023587121	4.76269E-51
<i>Elapor1</i>	3.587076	0.00052899	<i>Fgfbp1</i>	4.040099338	5.12298E-08
<i>AA467197</i>	3.588244	1.0077E-07	<i>Gm50048</i>	4.100103243	0.031162235
<i>Syt6</i>	3.60444	0.01259348	<i>Cd79a</i>	4.107460065	0.000382051
<i>Gm6069</i>	3.611267	0.00108984	<i>ENSMUSG00000120992</i>	4.117523895	5.7695E-117
<i>Irx1</i>	3.614465	0.01977163	<i>Skint3</i>	4.123087643	1.12302E-06
<i>Casp14</i>	3.622557	1.6384E-06	<i>Gm6445</i>	4.125003474	0.003843881
<i>Mylpf</i>	3.626413	5.4521E-13	<i>Oas1a</i>	4.125016809	6.65055E-41
<i>Ptpn5</i>	3.62674	3.0968E-07	<i>Sox21</i>	4.128231741	1.06089E-25
<i>Agr2</i>	3.633797	3.0192E-08	<i>C2cd4a</i>	4.131992671	0.000397127

Gen	log2(FC)*	P vrijednost	Gen	log2(FC)*	P vrijednost
<i>Cxcl11</i>	4.13511272	0.006207345	<i>Mx1</i>	4.737259	5.154E-63
<i>Art1</i>	4.135274186	5.4318E-05	<i>Igkv10-96</i>	4.756491	3.177E-07
<i>Gm49087</i>	4.135557665	0.004224878	<i>Emx2</i>	4.759586	0.00148942
<i>Spink8</i>	4.145151253	0.000137029	<i>Nccrp1</i>	4.766877	1.3969E-42
<i>Muc11</i>	4.158690041	2.40648E-09	<i>Gm13715</i>	4.783861	0.0116709
<i>Ifit1bl1</i>	4.16145831	2.92077E-17	<i>Lemd1</i>	4.80772	1.21E-06
<i>Il12b</i>	4.164706968	7.81733E-07	<i>Ly6m</i>	4.81199	1.8181E-05
<i>Gm15433</i>	4.165125221	2.58836E-10	<i>2310002L09Rik</i>	4.845693	0.01587354
<i>Ighm</i>	4.167698318	9.1768E-07	<i>Fcer2a</i>	4.853537	0.00024484
<i>Calm13</i>	4.170607772	1.84616E-05	<i>Lypd5</i>	4.859617	0.00015062
<i>Ceacam16</i>	4.177041933	0.002787407	<i>Smpx</i>	4.866892847	1.36743E-05
<i>AU018091</i>	4.187458115	1.90315E-05	<i>Wincrl</i>	4.872528131	1.47342E-07
<i>Slc22a29</i>	4.195014	0.00453112	<i>Gpr15</i>	4.900223384	0.00365797
<i>Gm32461</i>	4.198909	0.00074587	<i>Gm38409</i>	4.910594454	0.005295548
<i>Hjv</i>	4.203654	0.00037333	<i>ENSMUSG00000120165</i>	4.919884726	0.017731317
<i>Oasl1</i>	4.210512	4.1705E-34	<i>Ankk1</i>	4.93326783	6.13392E-09
<i>Gm20234</i>	4.212431	3.7372E-06	<i>Igkc3</i>	4.941917663	5.4391E-05
<i>Cacna2d4</i>	4.218306	3.8902E-24	<i>Jchain</i>	4.949836309	1.00272E-07
<i>Ucn2</i>	4.221322	3.1941E-17	<i>Sp8</i>	4.962917968	3.87024E-10
<i>Klrg1</i>	4.227793	9.4821E-06	<i>Prss32</i>	4.963454778	3.6196E-38
<i>Muc20</i>	4.234293	2.7229E-09	<i>Pinlyp</i>	4.965356306	1.51078E-11
<i>Nlrp10</i>	4.2412	2.8397E-13	<i>Cacng1</i>	4.982150133	3.09315E-06
<i>Mrgprb9-ps</i>	4.262259	0.00012313	<i>Csprs</i>	4.987258219	3.09556E-09
<i>Gm7592</i>	4.274412	4.8181E-09	<i>Afp</i>	5.001849731	3.99591E-05
<i>Serpina3f</i>	4.280712	4.415E-06	<i>Igkc</i>	5.025937454	1.25895E-06
<i>H2-Eb2</i>	4.284052	0.00020494	<i>Gm43189</i>	5.033384305	0.001147649
<i>Atp2a1</i>	4.298419	7.7555E-21	<i>Csta1</i>	5.068872879	1.08945E-07
<i>Stfa3</i>	4.309645	0.00039244	<i>Ceacam-ps1</i>	5.078667974	0.004886482
<i>Mroh4</i>	4.352931	1.2089E-08	<i>Calcb</i>	5.086602035	1.38796E-07
<i>Gm26685</i>	4.356409	0.00870768	<i>Ighv6-3</i>	5.114134397	0.000240159
<i>Arg1</i>	4.401602	2.2272E-08	<i>Vsnl1</i>	5.174251267	9.3919E-05
<i>Krt75</i>	4.40819	3.3495E-06	<i>Tmprss11b</i>	5.191825888	2.74403E-07
<i>Fcrl1</i>	4.411178	0.00013516	<i>Tm</i>	5.207377471	1.75618E-12
<i>Vmn1r42</i>	4.418967	0.00500408	<i>D030018L15Rik</i>	5.227502336	0.008562026
<i>Lrtm1</i>	4.418998	0.00039698	<i>Tjff1</i>	5.25081965	0.005234095
<i>Igkv19-93</i>	4.514039	0.0039861	<i>Atp6v1c2</i>	5.260124836	0.001354448
<i>Oas3</i>	4.533732	4.0404E-08	<i>Csrp3</i>	5.261200484	0.001286601
<i>Tarm1</i>	4.53646	0.01967188	<i>Ctla4</i>	5.290962645	5.6936E-08
<i>Nrap</i>	4.541016	1.5671E-09	<i>Tspan1</i>	5.296523589	2.74589E-15
<i>Pdcd1lg2</i>	4.571076	0.00017293	<i>Pou2af1</i>	5.311236469	3.48347E-12
<i>Gm29695</i>	4.575605	5.6976E-17	<i>Izumo1r</i>	5.349325442	8.54364E-05
<i>H2-Q10</i>	4.635596	2.9949E-05	<i>Mab21l4</i>	5.354400775	1.38832E-16
<i>Oas1g</i>	4.641641	6.4863E-23	<i>Serpina1e</i>	5.355528856	0.004932039
<i>Bnc1</i>	4.695269	9.7294E-14	<i>Cd19</i>	5.365018637	0.000961698
<i>Cxcl3</i>	4.711564	0.00099868	<i>Clec2f</i>	5.366961679	1.01814E-24
<i>Fam240b</i>	4.729541	0.0042946	<i>Strc</i>	5.401656738	7.6055E-32

Gen	log ₂ (FC)*	P vrijednost
<i>Sprr2j-ps</i>	5.412210265	0.014646451
<i>Ighd</i>	5.417109969	3.3575E-05
<i>9430018G01Rik</i>	5.479821258	9.43392E-05
<i>Mmp13</i>	5.486836583	1.33718E-13
<i>Igkv16-104</i>	5.498065732	0.00578577
<i>Ubd</i>	5.501316849	2.29438E-14
<i>Gm16025</i>	5.532343133	0.001282436
<i>Gm47050</i>	5.538858607	0.00180969
<i>Gm5155</i>	5.579292	2.6506E-11
<i>Sftpd</i>	5.601026	0.00014096
<i>Gm12648</i>	5.608355	0.00199937
<i>Tnfrsf18</i>	5.610849	2.1567E-05
<i>Wnt16</i>	5.61353	0.00130879
<i>Myl1</i>	5.636135	3.9398E-10
<i>Olfir753-ps1</i>	5.642789	0.00113048
<i>Gm2619</i>	5.654773	0.00353735
<i>Igkv1-110</i>	5.668624	0.00026833
<i>Cd300lf</i>	5.675007	2.1782E-11
<i>Oas1h</i>	5.68891	0.00147887
<i>Gbp10</i>	5.695077	0.00011146

FC – engl. *fold change*

* – log₂(FC): 1,9 – 5,7

Tablica D3. Geni povezani sa staničnim procesima objedinjenima kroz KEGG „ribosomskim put“

Gen	log2(FC)	P vrijednost
<i>Rpl17</i>	-0,363784881503982	0,049
<i>Rpl5</i>	-0,379480560934895	0,049
<i>Rpl10a</i>	-0,497172546782072	0,0368159486877718
<i>Rpl39</i>	-0,415051809425473	0,0342456955688886
<i>Rps7</i>	-0,37730215397716	0,0312921288047657
<i>Rps3</i>	-0,367037806446859	0,0254558854584916
<i>Rpl11</i>	-0,412051746005976	0,0352495036296788
<i>Rps3a1</i>	-0,401267584340186	0,0308136945823818
<i>Rps11</i>	-0,422246444636425	0,0351948723140998
<i>Rpl23</i>	-0,415228869130652	0,0279434065295841
<i>Rpl19</i>	-0,448161434297867	0,0369371909364001
<i>Rpl6</i>	-0,434662863642402	0,0289269498483849
<i>Rpl35a</i>	-0,452834146948553	0,0302586724858531
<i>Rpl35</i>	-0,461510735322538	0,0231304466739024
<i>Rps16</i>	-0,432512441645759	0,02340484699878
<i>Rpl22</i>	-0,432025997175897	0,0241270550585589
<i>Rps27l</i>	-0,460358748021939	0,0290824129212369
<i>Rpl27a</i>	-0,40195635498173	0,0191506633468102
<i>Rps23</i>	-0,456683571803461	0,0274667470819897
<i>Rpl26</i>	-0,457236136799476	0,0282037624411297
<i>Rpl9</i>	-0,435148249887431	0,0187443777255181
<i>Rpl18</i>	-0,506439544194232	0,0218788633690524
<i>Rps27rt</i>	-0,512834013584476	0,021113267061645
<i>Rpl32</i>	-0,485994511527518	0,0297814324579346
<i>Rpl22l1</i>	-0,446633871733969	0,0159981571262593
<i>Rplp1</i>	-0,520997957001331	0,0342791678821783
<i>Rpl36</i>	-0,52024727760504	0,033258893228626
<i>Rpl36a</i>	-0,504857911550776	0,0268552546677212
<i>Rps27</i>	-0,465352091170227	0,0160260796628556
<i>Rps15a</i>	-0,477916301093653	0,0185011861734144
<i>Rpl3</i>	-0,464661731238478	0,0145049328949144
<i>Rpl18a</i>	-0,506439544194232	0,0218788633690524
<i>Rps13</i>	-0,473776134420752	0,0167183012981794
<i>Rps19</i>	-0,500418407510564	0,0118204717700275
<i>Rps12</i>	-0,584893239537679	0,0242535730115137
<i>Rps14</i>	-0,496605673627002	0,0111075645243008
<i>Rps9</i>	-0,525151990307061	0,0158185284386134
<i>Rps8</i>	-0,525732206457465	0,0160627116833742
<i>Rps15a</i>	-0,477916301093653	0,0185011861734144
<i>Rps28</i>	-0,551899238422087	0,0175314322425019
<i>Rpsa</i>	-0,557951267669535	0,0135847407221316
<i>Rpl37a</i>	-0,572818905733231	0,0140808618043586
<i>Rpl13a</i>	-0,588289485800446	0,0147609085041593
<i>Fau</i>	-0,579795111700881	0,0113989145183922
<i>Rpl34</i>	-0,574219535938719	0,00394364077196173
<i>Rpl34-ps1</i>	-0,579446339386019	0,00221124906075928
<i>Rpl38</i>	-0,648981491198995	0,0148143083006054
<i>Rps24</i>	-0,630136696263826	0,00780517151666246
<i>Rpl41</i>	-0,658903253517206	0,0114447120750904
<i>Rplp2</i>	-0,690934969079127	0,0136333235601605
<i>Rpl3l</i>	-3,06682E+14	5,25E+08

FC – engl. *fold change*