

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

LUCIJA FRANKOVIĆ

ULOGA MASTOCITA U RAZVOJU TUMORA MOKRAĆNOG MJEHURA U
MIŠJEM MODELU

Doktorski rad

Doktorski rad

Split, 2025.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

LUCIJA FRANKOVIĆ

ULOGA MASTOCITA U RAZVOJU TUMORA MOKRAĆNOG MJEHURA U
MIŠJEM MODELU

Doktorski rad

Doktorski rad

Split, 2025.

Ova doktorska disertacija izrađena je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, u Laboratoriju za istraživanje raka. Istraživanje je provedeno u sklopu Uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Imunomodulacijski učinci mastocita i eozinofila u mikrookolišu tumora mokraćnog mjehura, emBC“, šifra projekta UIP-2019-04-6680 te projekta razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti „Imunomodulacijski učinci mastocita i eozinofila u mikrookolišu tumora mokraćnog mjehura“ DOK-2020-01-9351 voditeljice izv. prof. dr. sc. Jelene Korać Prlić.

Voditeljica rada: izv. prof. dr. sc. Jelena Korać Prlić

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Prevalencija tumora mokraćnog mjehura	2
1.2. Etiologija	2
1.3. Klasifikacija tumora mokraćnog mjehura	4
1.3.1. Razlike u molekularnim putovima razvoja NMIBC i MIBC.....	5
1.4. Simptomi i dijagnoza.....	6
1.5. Terapijski protokoli za liječenje tumora mokraćnog mjehura	6
1.6. Mikrookoliš mokraćnog mjehura	7
1.7. Mikrookoliš tumora	8
1.8. Mastociti	10
1.9. Uloga mastocita u tumorskom mikrookolišu.....	10
1.10. Kromolin.....	12
1.11. Modeli istraživanja tumora mokraćnog mjehura na miševima	12
1.11.1. Predklinički model tumora mokraćnog mjehura.....	13
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	14
2.1. Cilj istraživanja.....	15
2.2. Hipoteze.....	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijali	17
3.1.1. Pokusne životinje	17
3.1.2. Stanice.....	17
3.1.3. Aparati.....	17

3.1.4. Kemikalije i reagensi	18
3.1.5. Otopine i puferi	19
3.1.6. Enzimi	19
3.1.7. Biljezi	19
3.1.8. Komercijalno dostupni kompleti.....	19
3.1.9. Protutijela	20
3.2. Metode	20
3.2.1. Genotipizacija	20
3.2.2. Elektroforeza	22
3.3.3. Mišji model raka mokraćnog mjehura uzrokovanog BBN-om.....	23
3.3.4. Stabilizacija mastocita u mišjem modelu raka mokraćnog mjehura.....	24
3.3.5. Pokusi s potkožnim tumorima	25
3.3.6. Stabilizacija mastocita u potkožnim tumorskim eksperimentima.....	26
3.3.7. Uklapanje tkiva u parafin.....	27
3.3.8. Histološka analiza	27
3.3.9. Kvantifikacija mastocita	27
3.3.10. Imunohistokemija.....	28
3.3.11. Izolacija RNA	28
3.3.12. Analiza sekvenciranja RNA.....	29
3.3.13. Tretiranje stanica raka mokraćnog mjehura s kromolinom	30
3.3.14. Statistički postupci	30
4. REZULTATI.....	31
4.1. Progresija raka mokraćnog mjehura uzrokovanog BBN-om.	32

4.2. Nakupljanje mastocita tijekom progresije raka mokraćnog mjehura	33
4.3. Model tumora mokraćnog mjehura s kromolin tretmanom	37
4.4. MB49 potkožni tumorski model s terapijom kromolinom	38
4.5. Analiza RNA sekvenciranja MB49 potkožnih tumora miševa s terapijskim kromolin tretmanom	39
4.6. MB49 potkožni tumorski model s kontinuiranim kromolin tretmanom.....	44
4.7. Analiza RNA sekvenciranja MB49 potkožnih tumora miševa kontinuirano tretiranih kromolinom	45
4.8. Utjecaj kromolin tretmana na apoptozu i nekroptozu u MB49 potkožnim tumorima...	48
4.9. Utjecaj kromolina na stanične linije tumora mokraćnog mjehura.....	50
4.10. Utjecaj potpunog nedostatka mastocita na razvoj MB49 potkožnih tumora.....	51
4.11. Model tumora mokraćnog mjehura uzrokovanog BBN-om u miševa s nedostatkom mastocita	53
4.12. Analiza podataka RNA sekvenciranja mokraćnih mjehura miševa s nedostatkom mastocita nakon BBN tretmana	54
5. RASPRAVA.....	56
6. ZAKLJUČAK	64
7. SAŽETAK.....	66
8. LAIČKI SAŽETAK	69
9. SUMMARY	71
10. LAY SUMMARY	74
11. LITERATURA.....	76
12. ŽIVOTOPIS	87

POPIS OZNAKA I KRATICA

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

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

BCG – *Bacillus Calmette–Guérin*

BSA – goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)

CIS – lat. *carcinoma in situ*

CTMC – mastociti vezivnog tkiva (engl. *connective tissue mast cells*)

DAMPs – molekulski obrasci povezani s oštećenjem (engl. *damage associated molecular patterns*)

EMT – epitelno-mezenhimalni prijelaz (engl. *epithelial to mesenchymal transition*)

FGF-2 – faktor rasta fibroblasta 2 (engl. *fibroblast growth factor 2*)

FGFR-3 – receptor faktora rasta fibroblasta 3 (engl. *fibroblast growth factor receptor 3*)

FANFT – N-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil]-formamid

GO – genska ontologija engl. *gene ontology*

HIF-1 α – hipoksijom inducirani faktor-1 alfa

KEGG – engl. *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*

MDSC – mijeloidne supresorske stanice (engl. *myeloid-derived suppressor cells*)

MIBC – nemišićnoinvazivni rak mokraćnog mjehura (engl. *muscle invasive bladder cancer*)

MLKL – engl. *mixed lineage kinase domain like pseudokinase*

MMC – mukozni mastociti (engl. *mucosal mast cells*)

MNU – N-metil-N-nitrozourea

NF- κ B – nuklearni faktor kapa B

NES – normalizirani rezultat obogaćivanja (engl. *normalised enrichment score*)

NK – stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer cells*)

NMIBC – nemišićnoinvazivni rak mokraćnog mjehura (engl. *non-muscle invasive bladder cancer*)

pMLKL – engl. *phosphorylated mixed lineage kinase domain like pseudokinase*

PDGF – trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*)

PUNLMP – papilarna urotelna neoplazija niskog malignog potencijala (engl. *papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*)

RIPK – engl. *receptor interacting serine/threonine kinase*

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*)

SCF – faktor rasta matičnih stanica (engl. *stem cell factor*)

SDS – natrijev dodecil sulfat

TAM – makrofagi povezani s tumorom (engl. *tumor-associated macrophages*)

TAN – neutrofili povezani s tumorom (engl. *tumor-associated neutrophils*)

TNF – faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

TNM – tumor, limfni čvor, metastaza (engl. *tumour, node, metastasis*)

TURBT – transuretralna resekcija tumora mokraćnog mjehura (engl. *transurethral removal of bladder tumor*)

VEGFA – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor A*)

1.1. Prevalencija tumora mokraćnog mjehura

Rak mokraćnog mjehura je šesti najčešći tumor kod muškaraca u svijetu, dok je u Europi na četvrtom mjestu. Samo u 2022. godini zabilježeno je više od pola milijuna novih slučajeva i više od 220 000 smrtnih slučajeva (1).

S obzirom na to da se rak mokraćnog mjehura najčešće dijagnosticira kod osoba starijih od 65 godina, Svjetska zdravstvena organizacija predviđa da će se, uslijed starenja populacije, učestalost i smrtnost od ove bolesti udvostručiti (3). Prema podacima iz 2022. godine, Hrvatska je po incidenciji svih tumora na osmom mjestu u Europi, dok je po smrtnosti na drugom mjestu (4,5). Iste je godine u Hrvatskoj zabilježeno 1213 novih slučajeva tumora mokraćnog mjehura u oba spola, pri čemu su muškarci činili većinu s 860 novooboljelih. (6). Globalno se, kao i kod većine drugih tumora, bilježi pad dobno standardizirane stope smrtnosti od tumora mokraćnog mjehura zahvaljujući napretku u liječenju, ranijem otkrivanju i boljem praćenju bolesti. Međutim, Hrvatska predstavlja iznimku i bilježi porast stope smrtnosti tumora mokraćnog mjehura za 15 % u razdoblju od 2011. do 2019. godine (5).

Uz visoku prevalenciju, rak mokraćnog mjehura se povezuje i sa značajnim morbiditetom, smrtnošću i ekonomskim teretom (3). Budući da više od polovice oboljelih od raka mokraćnog mjehura razvije recidive, ovaj tip tumora zahtjeva učestala praćenja, što ga čini jednim od ekonomski najzahtjevnijih vrsta tumora (7).

1.2. Etiologija

Prosječna dob dijagnoze različitih tumora je između 65 i 70 godina, što ukazuje na povezanost starenja s razvojem bolesti. U slučaju tumora mokraćnog mjehura, prosječna dob dijagnoze iznosi 73 godine, a više od 80 % oboljelih se dijagnosticira nakon 65 godine života (8). Više međusobno povezanih čimbenika pridonosi toj povezanosti. Tijekom života dolazi do nakupljanja oštećenja DNA koja mogu dovesti do mutacija, kao i do epigenetskih promjena koje narušavaju pravilne obrasce genske ekspresije. U starijoj dobi sve je češća i mitohondrijska disfunkcija, koja povećava stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koji dodatno oštećuju stanice. Također dolazi do narušavanja proteostaze, uslijed čega se u stanicama nakupljaju nepravilno presavijeni ili agregirani proteini (9). Uz to, starenjem slabi funkcija stečenog imunološkog sustava, čime se smanjuje sposobnost organizma da ukloni patogene, senescentne i tumorske stanice. Istodobno se razvija i kronična upala niskog intenziteta koja dodatno pogoduje nastanku malignih promjena (9,10).

Najveći čimbenik rizika za razvoj tumora mokraćnog mjehura je pušenje, a istraživanja pokazuju da je više od polovice tih tumora posljedica pušenja. Razlike u prevalenciji u svijetu, kao i veća učestalost bolesti kod muškaraca u odnosu na žene se može povezati s trendovima vezanim uz pušenje. Duhanski dim sadrži brojne poznate kancerogene spojeve poput policikličkih aromatskih ugljikovodika, aromatskih amina i nitrozamina. Aromatski amini iz duhanskog dima, kao što su 4-aminobifenil i 2-naftilamin, stvaraju DNA adukte koji mogu uzrokovati mutacije i razvoj tumora (11,12). Prestanak pušenja značajno smanjuje rizik od razvoja tumora mokraćnog mjehura, i to za 40 % već unutar prve do četiri godine. Međutim, potrebno je čak 20 godina da bi rizik bio smanjen na razinu kao prije pušenja (8). Kancerogeni spojevi slični onima prisutnima u duhanskom dimu se mogu pronaći i u industrijama koje se bave proizvodnjom gume, boja, metala te preradom naftnih derivata. Zbog toga, profesionalna izloženost tim tvarima predstavlja čimbenik rizika. Povećana učestalost tumora mokraćnog mjehura je, iz istih razloga, zabilježena i među zanimanjima poput frizera i vatrogasaca. Osim toga, okolišni čimbenici poput onečišćenog zraka i vode kontaminirane arsenom dodatno povećavaju rizik od razvoja tumora mokraćnog mjehura (3,8).

U subsaharskoj Africi i dijelovima Bliskog istoka, glavni uzročnik tumora mokraćnog mjehura je infekcija s parazitom *Schistosoma haematobium*. Infekcija sa *Schistosoma haematobium* pretežito uzrokuje skvamozni tip mokraćnog mjehura i do prije 40 godina bila je najčešći uzrok smrtnosti muškaraca u dobi od 20 do 40 godina, na tom geografskom području. Masovna primjena antihelmintika, uz poboljšanje sanitacije vode je dovela do drastičnog smanjenja skvamoznih tumora mokraćnog mjehura u Egiptu (3,7).

Također, na razvoj tumora mokraćnog mjehura utječe i disbioza normalne mikrobiote, kako crijevne, tako i one specifične za pojedine organe i tkiva (13). Snažan utjecaj crijevne mikrobiote na razvoj tumora mokraćnog mjehura je pokazan u istraživanju koje je dokazalo da je mikrobiota ključna za proces tumorigeneze uzrokovane nitrozaminom BBN-om (N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin). Mikrobiota metabolizira BBN i pretvara ga u BCPN (N-butil-N-(3-karboksipropil)-nitrozamin) koji zatim potiče tumorigenezu u urotelu (14).

Urološki tumori se u literaturi sve češće povezuju i s apnejom. Meta-analiza iz 2024. godine je pokazala da osobe s opstruktivnom apnejom, poremećajem koji uzrokuje kratkotrajne prekide disanja tijekom sna, imaju 76 % veći rizik od razvoja tumora mokraćnog mjehura (15). Hipoksija uzrokovana apnejom dovodi do povećane ekspresije HIF-1 α (hipoksijom inducirani faktor-1 alfa), koji ima važnu ulogu u razvoju tumora mokraćnog mjehura potičući angiogenezu i proliferaciju tumorskih stanica. Osim toga, hipoksija u kombinaciji s fragmentacijom sna uzrokovanom apnejom

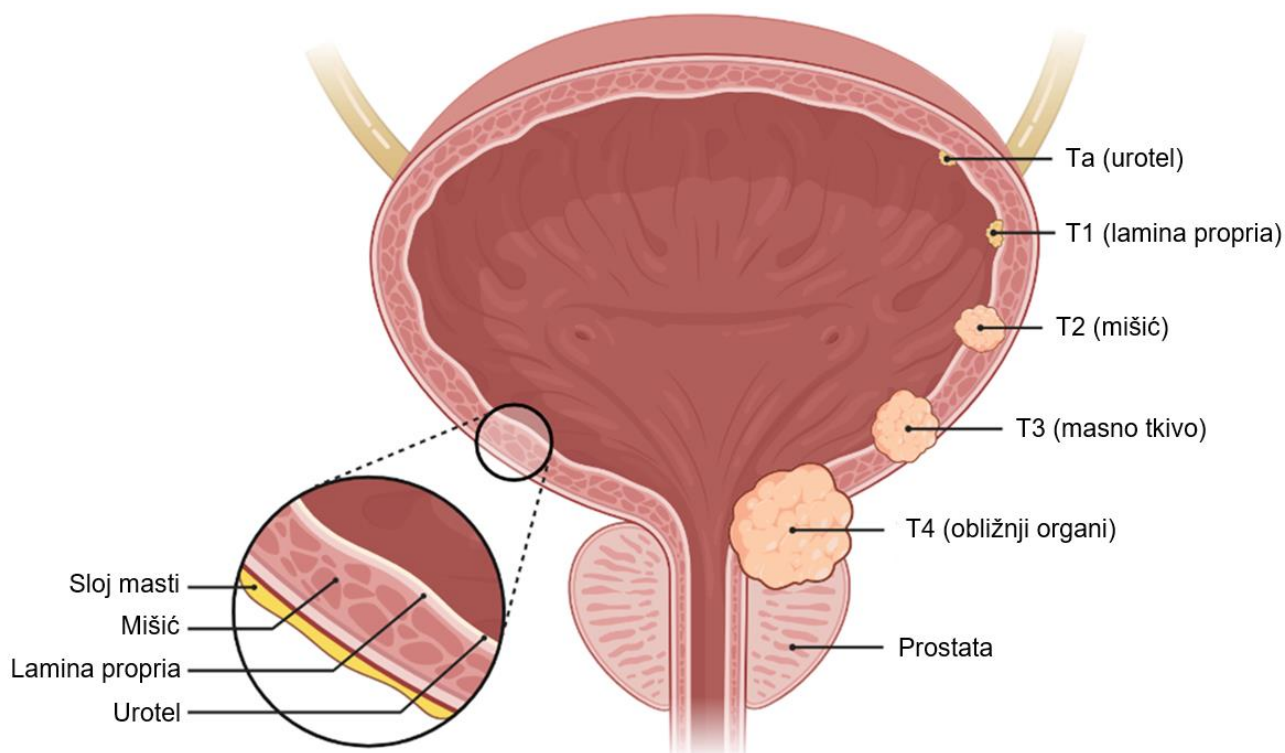
doprinosi razvoju upale, a kronična upala predstavlja dobro poznati čimbenik rizika za nastanak raka (10,15,16).

1.3. Klasifikacija tumora mokraćnog mjehura

Više od 90 % dijagnosticiranih tumora mokraćnog mjehura su urotelni karcinomi, dok ostatak čine karcinomi skvamoznih stanica, adenokarcinomi i neuroendokrini tumori. Glavna podjela tumora mokraćnog mjehura je s obzirom na invaziju u mišić, pa tako imamo nemišićnoinvazivni rak mokraćnog mjehura (engl. *non-muscle invasive cancer*, NMIBC) i mišićnoinvazivni rak mokraćnog mjehura (engl. *muscle invasive bladder cancer*, MIBC) (7). Oko 75 % novodijagnosticiranih slučajeva su površinski urotelni karcinomi, međutim, rekurentni NMIBC visokog gradusa predstavlja značajan rizik od napredovanja do invazije u mišić i pojave metastaza (3).

Od neoplastičnih promjena, u mokraćnom mjehuru pronalazimo benigne urotelne papilome koji rastu u lumen mokraćnog mjehura, te invertirane urotelne papilome. Oba tipa su niske incidencije i ne predstavljaju rizik. U slučaju kada promjene uključuju blagu citološku atipiju, govorimo o papilarnoj urotelnoj neoplaziji niskog malignog potencijala (engl. *papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*, PUNLMP) koja čini 40 – 50 % urotelnih neoplazija i smatra se stadijem Ta, prema TNM (engl. *tumour, node, metastasis*) klasifikaciji. Kategoriji Ta također pripadaju i neinvazivni papilarni urotelni karcinomi, koji pokazuju jezgrenu atipiju i blage poremećaje u arhitekturi urotelnog epitela, a mogu biti niskog ili visokog gradusa.

Zatim pronalazimo i ravne lezije ili CIS (lat. *carcinoma in situ*), odnosno neoplastične promjene visokog gradusa, lokalizirane u urotelu. Ovaj stadij predstavlja veliki rizik od napredovanja u MIBC. Invazivni tumori mokraćnog mjehura se dalje kategoriziraju u četiri stupnja. T1 stupanj čine tumori koji su invadirali u subepitelno vezivno tkivo. T2 kategoriju čine tumori koji su se proširili u mišić, točnije tumor koji je invadirao površinski sloj mišića spada u T2a, a tumor koji je invadirao dubinski sloj mišića pripada kategoriji T2b. T3 kategoriju sačinjavaju tumori koji su prodrli u perivezikalno masno tkivo, a T4 kategoriju tumori koji su se proširili u okolne organe (17). Podjela tumora mokraćnog mjehura prema TNM sustavu se može vidjeti iz slike 1.



Slika 1. Podjela tumora mokraćnog mjehura prema TNM. Preuzeto i prilagođeno prema Trushina i sur. (18), licenca CC BY 4.0.

1.3.1. Razlike u molekularnim putovima razvoja NMIBC i MIBC

NMIBC i MIBC se razlikuju na molekularnoj razini i predstavljaju dva zasebna puta razvoja raka mokraćnog mjehura. Ta tumori, koji su najčešći oblik NMIBC-a, pokazuju veću genomsku stabilnost, odnosno manji broj kromosomskih aberacija. Nasuprot tome, MIBC karakterizira velika genomaska nestabilnost. Jedna od najranijih molekularnih promjena u razvoju raka mokraćnog mjehura se događa na kromosomu 9, gdje dolazi do gubitka heterozigotnosti, što se primjećuje u više od 50 % slučajeva NMIBC-a i MIBC-a (19).

Značajna razlika između ova dva oblika tumora se vidi u učestalosti aktivacijskih mutacija gena za receptor faktora rasta fibroblasta 3 (engl. *fibroblast growth factor receptor 3*, *FGFR3*). Ove mutacije se povezuju s dobrom prognozom i prisutne su u više od 80 % Ta tumora, dok se u MIBC-u javljaju u samo 10 – 20 % slučajeva, dok u CIS-u uopće nisu zabilježene. Mutacije gena *FGFR3* aktiviraju MAPK signalni put, koji dovodi do proliferaciju stanica (19).

U MIBC-u delecije dijelova kromosoma 9 dovode do gubitka funkcije važnih tumor supresorskih gena poput *TP53*, *RB1* i *CDKN2A*. Rezultat toga je narušena regulacija staničnog ciklusa

i odgovora na oštećenje DNA, što pridonosi agresivnijem ponašanju tumora i lošijoj prognozi. Gen *TP53* je mutiran u oko 65 % CIS-eva, dok se ista mutacija nalazi u svega 3 % Ta tumora, što može objasniti razlike u agresivnosti i sklonosti progresiji u invazivnu bolest između ta dva tipa (19,20).

1.4. Simptomi i dijagnoza

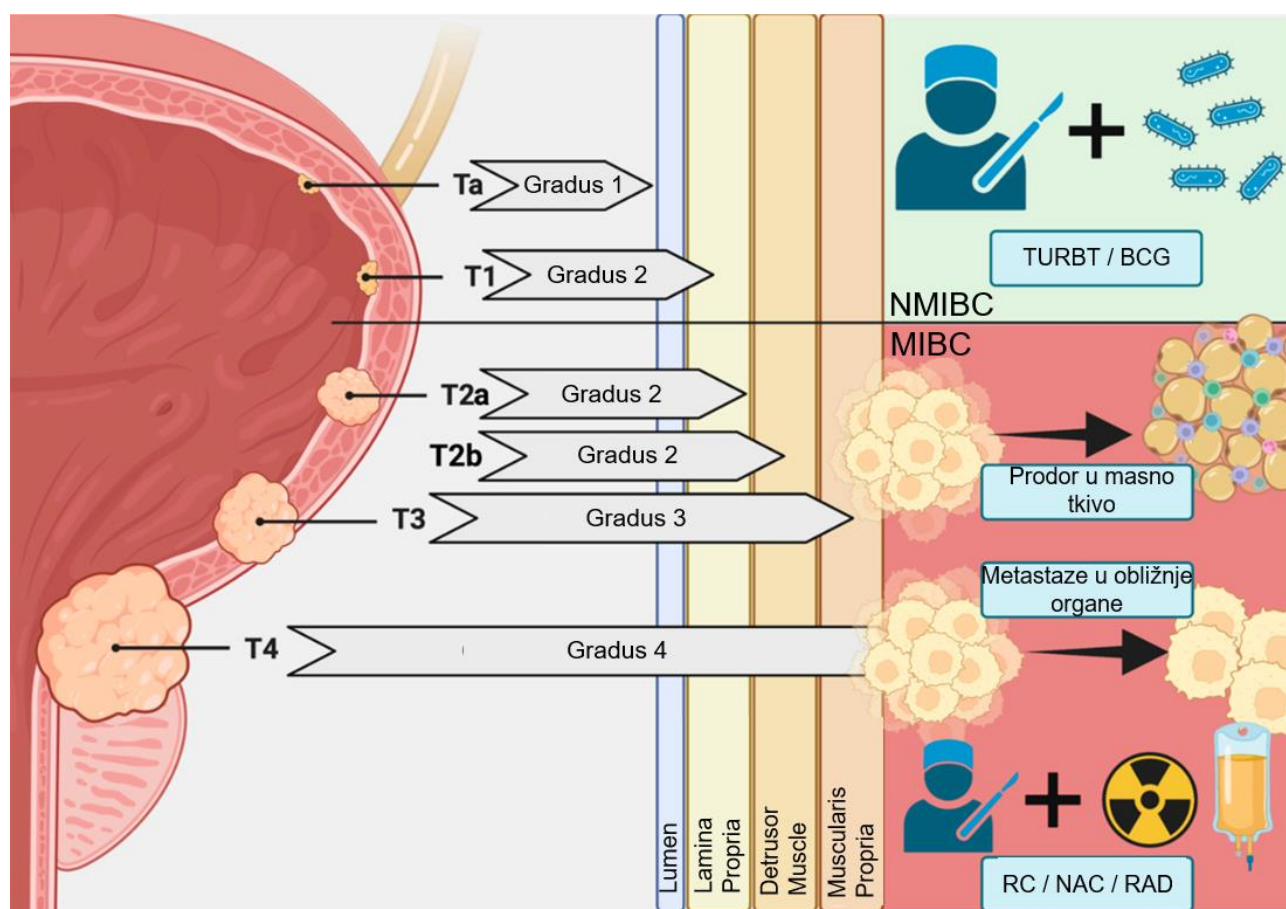
Najčešći simptom tumora mokraćnog mjehura je bezbolna hematurija, odnosno prisutnost krvi u mokraći, koja se javlja u oko 80 % pacijenata. Drugi simptomi uključuju disuriju, a s napredovanjem tumora javlja se povećana hitnost, kao i frekvencija mokrenja. Pojavom metastaza može se pojaviti bol u kostima i bokovima. Ultrazvuk, kompjuterizirana tomografija (engl. *computed tomography*, CT) i magnetska rezonanca (MR) se koriste za prikaz tumorske mase unutar mjehura, dok se tretman određuje na osnovi citoskopskog pregleda i histološke analize biopsata (21).

1.5. Terapijski protokoli za liječenje tumora mokraćnog mjehura

Glavna podjela tumora mokraćnog mjehura se radi na NMIBC i MIBC, zbog toga što te dvije skupine zahtijevaju drugačije pristupe terapiji. Za NMIBC, standardan pristup liječenju uključuje transuretralnu resekciju tumora mokraćnog mjehura (engl. *transurethral resection of bladder tumor*, TURBT), praćenu s intravezikalnom terapijom s *Bacillus Calmette–Guérin* (BCG). Pacijenti s NMIBC obično imaju dobru prognozu, s petogodišnjim preživljenjem koje iznosi oko 90 % (19).

Pacijenti s MIBC se, zbog njegove agresivne prirode, obično podvrgavaju cistektomiji. Uz kiruršku resekciju, standardni tretman uključuje i neoadjuvantnu kemoterapiju s cisplatinom. Budući da nema podataka da drugi kemoterapeutske lijekovi u neoadjuvantnoj terapiji raka mokraćnog mjehura poboljšavaju ishod, pacijenti koji ne toleriraju cisplatinu se podvrgavaju kirurškoj cistektomiji kao prvom koraku liječenja. U slučaju kada se želi poštedjeti mjehur, koristi se kombinacija kemoterapije i radioterapije (3,22). Slikoviti prikaz terapije različitih stadija tumora mokraćnog mjehura se nalazi u slici 2. Posljednjih godina, imunoterapija koja koristi inhibitore kontrolnih točaka (engl. *immune checkpoint inhibitors*, ICI) se pojavila kao obećavajući tretman. Za liječenje metastatskog urotelnog karcinoma Europska agencija za lijekove je odobrila pet lijekova koji su usmjereni na PD-1 ili PD-L1: Pembrolizumab, Atezolizumab, Nivolumab, Avelumab, Durvalumab. Ovi ICI se fokusiraju na os PD-1 / PD-L1 i koriste se u liječenju lokalno uznapredovalog i metastatskog raka mokraćnog mjehura. Iako je sistemska imunoterapija s ICI pokazala značajnu učinkovitost, tek svaki peti pacijent, točnije oko 15 % - 25 % pacijenata s metastatskom bolešću

odgovori pozitivno na tu vrstu terapije (23). Petogodišnje preživljenje pacijenata s MIBC je manje od 50 %, a unatoč napretku medicine, tijekom posljednjih desetljeća nije došlo do poboljšanja te stope (7). U slučaju kada tumor metastazira na limfne čvorove, stopa preživljenja dodatno opada na 35 % (24). S obzirom na i dalje niske stope preživljenja pacijenata oboljelih od raka i visoke troškove razvoja novih lijekova protiv raka, postoji sve veća potreba za istraživanjem novih pristupa liječenju. Jedan od tih pristupa uključuje kombiniranje konvencionalnih terapija s lijekovima koji izvorno nisu namijenjeni liječenju raka. Time se nastoji poboljšati ishod liječenja, odnosno smanjiti rast tumora i stvaranje metastaza, te smanjiti otpornost na lijekove (25).



Slika 2. Prikaz podjele tumora i pripadajućih tretmana. Preuzeto i prilagođeno prema Yand i sur. (22), licenca CC BY 4.0.

1.6. Mikrookoliš mokraćnog mjehura

Mikrookoliš tumora mokraćnog mjehura je složena i dinamična okolina koju, osim strukturnih stanica, čine imunološke i stromalne stanice, komponente izvanstaničnog matriksa te razne signalne molekule (26). Funkcija mokraćnog mjehura zahtijeva njegovu blizinu vanjskom okruženju, što ga istovremeno čini podložnim infekcijama patogenima. To potvrđuje i podatak da svako druga žena

najmanje jednom u životu oboli od cistitisa. Osim toga, u mokraćnom mjehuru prisutna je i komenzalna mikrobiota, što imunološkom sustavu nameće izazov održavanja ravnoteže između obrane od patogena i tolerancije komenzalne mikrobiote. Urotel mokraćnog mjehura predstavlja fizičku barijeru od mikrobiote i sadržaja urina. Građen je od bazalnih, intermedijarnih i površinskih (engl. *umbrella*) stanica koje tvore čvrste spojeve koji sprječavaju prolazak iona, otopljenih tvari i patogena. Uz urotel, mokraćni mjehur sadrži i brojne stanice prirodene i stečene imunosti. Pokazano je da memorijske CD4⁺ i CD8⁺ stanice mogu trajno ostati unutar tkiva, gdje omogućuju brzi odgovor u slučaju ponovne infekcije istim patogenom. Kao dio imunološkog miljea, mastocite pronalazimo ispod urotela, u *lamini propriae* blizu krvnih i limfnih žila, te u mišićnom sloju. Oni igraju važnu ulogu kontroliranja prirodnog i stečenog imunološkog odgovora (27). Prilikom infekcije, urotel izlučuje interleukin-1 β kojim privlači mastocite, koji zatim ispuštaju kimazu i tako potiču ljuštenje zaraženog urotela (28). Također, potiču odgovor neutrofila na infekciju, što je potvrđeno istraživanjem na miševima. Naime, miševi bez mastocita su pokazali oslabljen odgovor neutrofila na infekciju, što je rezultiralo smanjenim uklanjanjem bakterija. Nakon 6 do 12 sati od infekcije, mastociti počnu izlučivati interleukin-10, čime suprimiraju imunološki odgovor, a pretpostavlja se da ovaj proces služi obnovi epitela (29).

1.7. Mikrookoliš tumora

Kao što mokraćni mjehur ima svoj jedinstveni mikrookoliš, tako i tumori posjeduju specifičan mikrookoliš koji igra ključnu ulogu u njihovom razvoju. Dinamička interakcija između tumora i njegovog mikrookoliša sve više dobiva na značaju, jer ta komunikacija ima važnu ulogu u razvoju i progresiji tumora, te stvaranju metastaza. Infiltrirajuće imunološke stanice, poput T-stanica, makrofaga i dendritičnih stanica, mogu poticati, ali i suzbijati progresiju tumora, ovisno o njihovom funkcionalnom stanju (10,30,31).

Ključne imunološke stanice u tumorskom mikrookolišu su citotoksični CD8⁺ T limfociti koji prepoznavanju i uništavaju tumorske stanice prepoznavajući antigene na površini tumora. Njihova prisutnost u tumorima se često povezuje s boljim ishodom bolesti. Međutim, unutar tumorskog mikrookoliša često poprimaju iscrpljen fenotip koji dovodi do smanjenih efektorskih funkcija. Pomagački CD4⁺ T limfociti Th1 podtipa dodatno pojačavaju imunološki odgovor. Izlučuju citokine poput IFN- γ i IL-2 kojima pojačavaju djelovanje citotoksičnih CD8⁺ T limfocita. Suprotno tome, Th2 podtip CD4⁺ T limfocita potiče privlačenje i aktivaciju imunosupresivnih stanica. U tumorskom mikrookolišu često možemo pronaći i regulacijske T limfocite (Treg) koji potiskuju imunološki

odgovor i time pomažu tumorskim stanicama da izbjegnu eliminaciju, najčešće putem izlučivanja IL-10 i TGF- β (30,31).

Osim stečenog imunološkog odgovora predvođenog T stanicama, stanice prirođene imunosti također značajno utječu na razvoj i ponašanje tumora. Jedne od takvih stanica su makrofagi, koji se nalaze u najvećem broju u tumorskom mikrokolišu. Oni se uobičajeno klasificiraju na M1 i M2, odnosno klasično aktivirane (proupalne) i alternativno aktivirane (protuupalne) makrofage. Makrofagi u tumorskom mikrokolišu se nazivaju TAM (makrofagi povezani s tumorom, engl. *tumor-associated macrophages*) i poprimaju fenotip sličan M2 makrofagima. Oni izlučuju brojne čimbenike poput VEGF-A, IL-10 i TGF- β kojima potiču angiogenezu i vrše imunosupresiju, čime potiču invazivnost tumora. Slično TAM, pronalazimo i neutrofile povezane s tumorom (engl. *tumor-associated neutrophils*, TAN). Oni se u tumoru dijele na N1 i N2 fenotipe. N1 neutrofili djeluju protutumorski izlučujući proupalne citokine koji privlače i aktiviraju citotoksične CD8⁺ T limfocite. N2 neutrofili pak djeluju protumorski smanjujući aktivaciju imunološkog sustava i potičući angiogenezu (30–32). Na tumor također utječu i mijeloidne supresorske stanice (engl. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) koje inhibiraju imunološki odgovor na tumor sprječavajući aktivaciju citotoksičnih T stanica, NK stanica i dendritičnih stanica. Dendritične stanice su stanice koje služe prezentiranju antigena, ali u tumorskom mikrokolišu često prelaze u tolerogeno stanje i kao takve imaju smanjenu mogućnost aktivacije T limfocita. Tumori mogu biti prepoznati i od stanica prirodnih ubojica (engl. *natural killer cells*, NK), koje za razliku od citotoksičnih CD8⁺ T limfocita, mogu direktno eliminirati tumorske stanice bez potrebe za prethodnom aktivacijom. U tumorskom mikrokolišu njihovo je djelovanje često narušeno zbog imunosupresivnog okruženja. Također, hipoksični uvjeti karakteristični za tumorsko okoliš narušavaju citotoksično djelovanje NK stanica i potiču njihovu autofagiju (30,31,33).

S obzirom na to da tumor mokraćnog mjehura pokazuje dobar odgovor na BCG imunoterapiju, karakterizacija prisutnog imunološkog sustava u ovom tumoru je već dobro istražena, iako još uvijek postoji potreba za istraživanjem njegove uloge u interakciji s tumorskim mikrokolišem. S obzirom na infiltraciju T stanica, tumori mokraćnog mjehura se dijele na one s visokom infiltracijom T stanica i one s niskom infiltracijom, tzv. imunološke pustinje (engl. *immune desert*). Tumori s visokom infiltracijom T stanica obično imaju bolji odgovor na terapiju, što naglašava važnu ulogu imunološkog sustava u razvoju tumora (26).

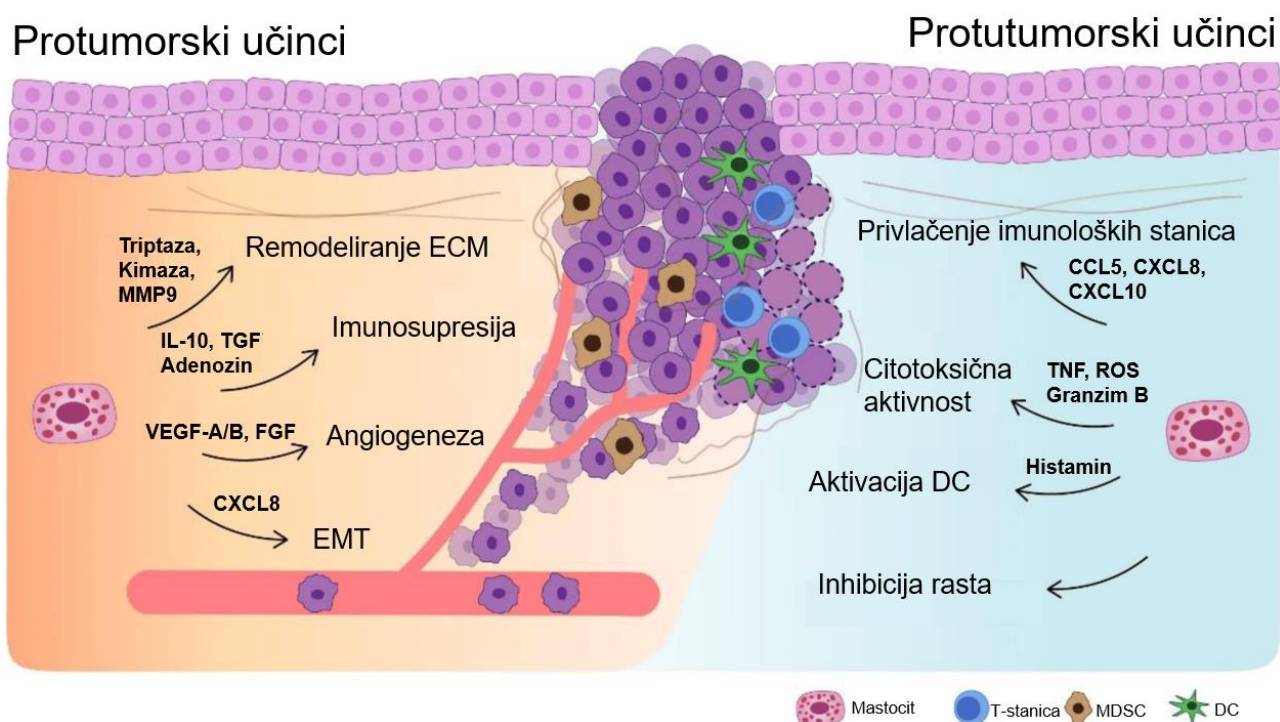
1.8. Mastociti

Imunoterapija pokazuje važnu ulogu imunološkog sustava u modulaciji rasta i progresije tumora. Budući da imunoterapija u obliku ICI-a djeluje preko T stanica, modulacija drugih vrsta imunoloških stanica nosi potencijal novih pristupa liječenju (34). Imunološke stanice su ključna komponenta složenog i dinamičnog tumorskog mikrookoliša. Međutim, stanice raka mogu manipulirati tim mikrookolišem u svoju korist, u konačnici omogućavajući rast tumora i stvaranje metastaza (13). Mastociti su jedne od imunoloških stanica koje žive u tkivima i prisutne su od početka stvaranja tumora. Razvijaju se iz mijeloidne loze u koštanoj srži i kao progenitori odlaze u tkiva gdje sazrijevaju u skladu s podražajima specifičnim za mikrookoliš tih tkiva. Budući da svako tkivo ima svoj jedinstveni mikrookoliš, fenotip i funkcija mastocita varira ovisno o njihovoj lokaciji (35). Uz tu razliku, mastociti unutar istog tkiva također imaju različite fenotipe, što se odnosi na sastav proteaza koje proizvode. U ljudi, mastociti se uglavnom dijele na dvije populacije, mastocite koji sadržavaju triptazu i mastocite koji sadržavaju triptazu i kimazu. U miševa su različiti fenotipi mastocita vezani za njihove lokacije, pa tako razlikujemo mastocite vezivnog tkiva (engl. *connective tissue mast cells*, CTMC) i mukozne mastocite (engl. *mucosal mast cells*, MMC). Ljudski mastociti koji sadrže triptazu se povezuju s mišjim MMC, a ljudski mastociti koji sadrže obje proteaze odgovaraju mišjim CTMC (36,37).

1.9. Uloga mastocita u tumorskom mikrookolišu

Budući da fenotip mastocita ovisi o mikrookolišu, a tumor utječe na mikrookoliš tkiva i stvara specifične uvijete, mastociti u tom okruženju mogu poprimiti dva različita fenotipa. Proupalni fenotip, karakterizirani niskom ekspresijom interleukina-10, koji djeluje protutumorski i imunosupresivni fenotip, karakteriziran s visokom ekspresijom interleukina-10, koji djeluje protumorski, potičući progresiju tumora (38). Mastociti su tkivno rezidentne stanice, ali u tumorima se njihov broj često povećava. Glavni signal koji privlači mastocite u tumorski mikrookoliš je faktor matičnih stanica (engl. *stem cell factor*, SCF) koji proizvodi sami tumor. Niske koncentracije SCF-a privlače mastocite, dok visoke koncentracije SCF-a potiču aktivaciju mastocita (39). Osim imunomodulacijskih svojstava, mastociti mogu utjecati i na druge komponente tumorskog mikrookoliša, kao i na sami tumor. Mastociti sadrže brojne proteaze, poput triptaze, kimaze i matriks metaloproteinaze 9 kojima mogu remodelirati izvanstanični matriks i tako omogućiti tumoru lakše širenje. Izlučujući interleukin-10 i adenozin vrše imunosupresiju i tako sprječavaju adekvatan imunološki odgovor protiv tumora (40). Također, mastociti sadrže brojne faktore kojima mogu poticati angiogenezu. Osim što izlučuju najpotentniji faktor angiogeneze, vaskularni endotelni faktor

rasta A (engl. *vascular endothelial growth factor A*, VEGFA), izlučuju i fibroblastni faktor rasta 2 (engl. *fibroblast growth factor 2*, FGF-2), trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF) i interleukin-6, koji dodatno pridonose stvaranju novih krvnih žila. Dodatno, svojim proteazama mogu razgraditi izvanstanični matriks i tako osloboditi druge proangiogene čimbenike (41–43). Mastociti također mogu utjecati na prijelaz epitela u mezenhim (engl. *epithelial to mesenchymal transition*, EMT). EMT slabi veze između stanica, narušava polaritet stanica i omogućava tumoru lakše širenje i metastaziranje (40,44). Mastociti imaju i brojne protutumorske učinke, poput otpuštanja brojnih kemokina kojima mogu privući imunološke stanice, koje onda sudjeluju u borbi protiv tumora. Također, mogu djelovati direktno na tumor izlučujući citotoksične faktore poput faktora nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF), ROS-a i granzima B (40,45). Nadalje, mogu ispuštati histamin koji, ovisno koje histaminske receptore aktivira, može djelovati protumorigeno ili protutumorigeno. Također, histaminom mastociti mogu aktivirati dendritične stanice (40,46). Djelovanje mastocita na tumore je prikazano u slici 3.



Slika 3. Protumorsko i protutumorsko djelovanje mastocita na tumore. Preuzeto i prilagođeno prema Lee i sur. (40), licenca CC BY 4.0.

Ovi brojni učinci mastocita na tumor i tumorski mikrokoliš objašnjavaju njihovu promjenjivu prognostičku vrijednost, s obzirom da istraživanja često objavljuju proturječne podatke,

ostavljajući ulogu mastocita u razvoju i progresiji raka mokraćnog mjehura još uvijek nedovoljno razjašnjenom (38,41,47). Osim utjecaja na tumor i tumorski mikrokoliš, istraživanja upućuju na to da mastociti mogu interferirati s anti-PD-1 terapijom kod miševa, smanjujući njezinu učinkovitost (48).

1.10. Kromolin

Budući da su mastociti odgovorni za simptome alergija, njihovu aktivnost možemo modulirati antialergijskim lijekovima. Jedan od takvih lijekova je kromolin (kromolin natrij), koji se najčešće propisuje za ublažavanje simptoma astme i alergija (49). Mehanizam djelovanja kromolina se temelji na inhibiciji degranulacije mastocita, na način da blokira dotok kalcija u mastocite, time sprječavajući otpuštanje prostaglandina, leukotriena, histamina i drugih upalnih tvari (50). Budući da su mastociti privučeni u tkiva uglavnom preko interakcije SCF-a i c-Kit receptora na mastocitima, kromolin ne utječe na njihov broj, ali je pokazano da smanjuje njihovu aktivaciju (39,51).

1.11. Modeli istraživanja tumora mokraćnog mjehura na miševima

U istraživanju tumora mokraćnog mjehura postoji nekoliko modela koje možemo koristiti. Budući da je navedeni tumor uzrokovan izlaganjem kemijskim karcinogenima iz okoliša, poput duhanskog dima i aromatskih amina, u miševa možemo koristiti karcinogene za razvoj istog tumora. Najčešće korišteni kancerogeni su N-metil-N-nitrozourea (MNU), N-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil]-formamid (FANFT) i BBN. MNU se aplicira intravezikalno, FANFT uzrokuje tumore nakon pet do osam mjeseci primjene, dok BBN zahtjeva pet mjeseci primjene, te uzrokuje tumore histološki i genetski slične ljudskim tumorima mokraćnog mjehura što ga čini najboljim izborom (52,53).

Također, moguće je koristiti ortotropne modele u kojima se tumorske stanice izravno ugrađuju u mokraćni mjehur miša. Kada se primjenjuju ljudske tumorske stanice, nužna je upotreba imunodeficientnih miševa, što predstavlja ograničenje ovog modela jer izostaje važna interakcija između tumora i imunološkog sustava (52).

U istraživanju tumora često se koriste i heterotopni modeli, pri čemu se tumorske stanice implantiraju na mjesto različito od njihove prirodne lokacije nastanka. Osim toga, tumorske stanice mogu se ubrizgavati intravenozno, što omogućuje proučavanje procesa metastaziranja. Ipak, najčešće se tumorske stanice implantiraju potkožno zbog jednostavnosti praćenja tumora, budući da se tumori lako mogu pratiti i mjeriti preko kože (52).

1.11.1. Predklinički model tumora mokraćnog mjehura

BBN je nitrozamin metabolički izveden iz dibutil-N-nitrozamina, spoja prisutnog u dimu cigareta, i kao takav specifično uzrokuje nastanak tumora mokraćnog mjehura. BBN je indirektan karcinogen, koji se uglavnom metabolizira u karcinogen BCPN i u BBN-glukuronid koji ne posjeduje karcinogena svojstva (14,54). Tumor mokraćnog mjehura nastaje uslijed genotoksičnih svojstava BBN-a, pri čemu se njegov metabolit BCPN veže za DNA, stvarajući DNA adukte koji uzrokuju mutacije i oštećenje genetskog materijala, što u konačnici potiče razvoj raka (54,55). BBN model uzrokuje tumore koji morfološki nalikuju ljudskom MIBC-u, te najčešće metastaziraju u limfne čvorove i pluća, slično kao i ljudski tumori mokraćnog mjehura (54,56). Osim morfološke sličnosti, BBN inducirani tumori posjeduju i visoko mutacijsko opterećenje, s mutacijama u istim genima (*Trp53*, *Kmt2d*, *Kmt2c*) kao i ljudski tumori, što ovaj model čini iznimno vrijednim za istraživanje razvoja i progresije raka mokraćnog mjehura (55).

BBN se najčešće daje u vodi za piće, zaštićen od svjetla zbog fotoosjetljivih svojstava, u koncentracijama od 0,05 do 0,1 % (54,57). Nakon dva tjedna tretmana, u mokraćnim mjehurima se pojavljuje jaka upala, s prisutnom reaktivnom atipijom u urotelu. Nakon četiri tjedna, većina miševa razvije displaziju, dok se imunološki infiltrat povlači, a vezivno tkivo postaje fibrozno. Nakon 12 tjedana BBN-a i osam tjedana vode, oko 70 % miševa razvije tumore mokraćnog mjehura koji invadiraju ili subepitelno vezivno tkivo ili mišić. Nakon još dodatnih pet tjedana vode, ukupno 25 tjedana od početka tretmana, svi miševi razviju invazivne tumore sa skvamoznom ili glandularnom diferencijacijom (53).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Cilj istraživanja

Glavni ciljevi ovog istraživanja su otkrivanje utjecaja nedostatka mastocita i terapije kromolinom na razvoj i progresiju tumora mokraćnog mjehura.

Kako bismo bolje razumjeli mehanizme koji stoje iza glavnih ishoda, kao jedan od sporednih ciljeva ćemo ispitati utjecaj kromolina na gensku ekspresiju, s posebnim naglaskom na gene povezane s privlačenjem i aktivacijom imunološkog odgovora. Uz to, analizirat ćemo njegov učinak na apoptozu i nekroptozu. Iste te sporedne ciljeve istraživanja utjecaja na ekspresiju gena, te na procese apoptoze i nekroptoze postaviti ćemo i u kontekstu uloge nedostatka mastocita, kako bismo utvrdili njihov doprinos razvoju tumora mokraćnog mjehura.

2.2. Hipoteze

- I. Mastociti utječu na razvoj i progresiju tumora mokraćnog mjehura, djelujući prvenstveno preko regrutiranja i aktivacije imunoloških stanica unutar tumorskog mikrookoliša.
- II. Blokiranje degranulacije mastocita kromolinom utječe na razvoj tumora mokraćnog mjehura. Stabilizacijom mastocita, terapija kromolinom modulira njihovu protutumorsku ulogu, utječući na razvoj i progresiju raka mokraćnog mjehura putem regrutiranja i aktivacije imunoloških stanica unutar tumorskog mikrookoliša.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Pokusne životinje

C57BL/6J i B6.Cg-Kit^{W-sh}/HNihrJaeBsmJ miševi smo naručili iz The Jackson Laboratory. Cpa3^{Cre/+} miševe smo dobili na dar od Thorsten B. Feyerabenda i Hans-Reimer Rodewalda iz Njemačkog centra za istraživanje raka u Heidelbergu. Cpa3^{+/+} kontrolne miševe smo dobili križanjem Cpa3^{Cre/+} s Cpa3^{+/+} miševima. U pokusima smo koristili samo mužjake, starosti od šest do osam tjedana, prosječne mase 25 g. Broj miševa po skupini smo unaprijed odredili na temelju prethodnih sličnih studija, kao i u skladu s 3R načelima (zamjena, smanjenje i poboljšanje). Svi pokusi na životinjama su napravljeni u skladu sa svim primjenjivim pravilima, smjernicama i načelima Zakona o zaštiti životinja (Narodne novine, broj 102/17 i 32/19), Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Narodne novine, br. 55/2013, 39/17 i 116/19), Direktivi 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe te Provedbenoj odluci Komisije (EU) 2020/569. Za projekt je dobiveno odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (003-08/19-03/0003) i Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane RH (UP/I-322-01/19-01/47). Miševi su bili držani u standardnim uvjetima s 12-satnim ciklusom svjetlo / tama, s omogućenim neograničenim pristupom hrani i vodi. Koristili smo standardnu hranu za miševe i štakore koja posjeduje 4RF25 certifikat.

3.1.2. Stanice

MB49 mišju staničnu liniju urotelnog karcinoma smo dobili na dar prof. Thomasa Töttermana iz švedskog Sveučilišta Uppsala. Stanične linije ljudskog karcinoma mokraćnog mjehura T24 (ACC 376) i 5637 (ACC 35) smo kupili od DSMZ instituta (Braunschweig, Njemačka). DSMZ jamči autentično podrijetlo stanica, dok smo identitet stanica MB49 potvrdili kariotipizacijom i procjenom njihove specifične morfologije.

3.1.3. Aparati

Aparatura za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad), aparatura za izlijevanje gelova (Bio-Rad), autoklav 5075 EL-D (Tuttnauer), centrifuga Biofuge Primo R (Heraeus), centrifuga 5810 R (Eppendorf), centrifuga Heraeus Fresco 17 (Thermo Fisher Scientific), centrifuga 5425 R (Eppendorf), inkubator FN 400 (Nuve), inkubator Hereaus HeraCell 150i (Thermo Fisher Scientific), PCR uređaj Arktik Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), PCR uređaj Eppendorf Mastercycler Personal (Sigma), PCR uređaj T100 Thermal Cycler (Bio-Rad), parno kuhalo (Tefal) pH-metar

SevenCompact™ pH / Ion S220 (Mettler-Toledo), hladna soba s agregatom i automatikom, homogenizator za tkiva Precellys laboratorijski okomiti zamrzivač U445 Igloo (Telstar), Minilys (Bertin Instruments), kemijski zaštitni ormar (Proklima), kemijski zaštitni ormar ESCO laminar flow cabinet (Esco Scientific), kemijski zaštitni ormar Fume Cupboard VC150810ADST (Flores Valles), mikrobiološki zaštitni kabinet KTB-NS (Klimaoprema), mikrotom RM2125 RTS (Leica), NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), samostojeći kabinet Aria Bio C36 (Tecniplast), samoventilirajući kavezi s nosačem LN126FESU i LN126 (Tecniplast), samoventilirajući kavezi s nosačem HN36FESU (Tecniplast), spremnik za tekući dušik CryoSystem 2000 (MVE), sustav deionizirane vode (Milipore), stereo mikroskop STEMI 508 (Carl Zeiss), svjetlosni invertni mikroskop Axio Vert.A1 (Carl Zeiss), svjetlosni mikroskop Olympus BX43 mikroskop (Olympus Corporation), termoblok Thermo Shaker Incubator Thriller (Preqlab), vage (Mettler Toledo), univerzalna ventilacijska jedinica za IVC sustav kaveza Smart Flow Boxunfeu (Tecniplast), UV transiluminator s kamerom Uvidoc HD6 (UVITEC), vibracijska miješalica BioVortex V1 (Biosan), vodena kupelj za histološke rezove 1052 (GFL), zamrzivač TSE240VGP (Thermo Fisher Scientific).

3.1.4. Kemikalije i reagensi

Agarosa niske točke tališta (eng. *low-melting point agarose*; Zellx Biochem), albumin goveđeg seruma (BSA) (Roth), boja za praćenje elektroforeze Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega), bromfenol plavo (Kemika), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma), ditiotreitol (DTT) (Sigma), eozin (Merck), etanol (J.T. Baker), etidijev bromid (10 mg/ml) (Sigma), etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) (Roth), Eukitt Quick-hardening mounting medium (Sigma) glicerol (Fagron), goveđi fetalni serum (Sigma-Aldrich), hematoksilin (Sigma), histanol (Biognost), kalijev dihidrogenfosfat (Kemika), kalijev klorid (Kemika), klorovodična kiselina (Kemika), koktel proteaznih inhibitora (Completablets Easy pack 04693116001, Roche), ksilol (Biognost), medij za uzgoj stanica s visokim udjelom glukoze (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)) (Sigma), 2-merkaptetanol (Fluka), natrijev citrat (Sigma), natrijev dodecil sulfat (SDS) (Roth), natrijev hidroksid (Kemika), natrijev hidrogenfosfat heptahidrat (Kemika), natrijev klorid (Kemika), Nonidet P-40 (Sigma), penicilin/streptomycin za stanične kulture (Sigma), 2- propanol (Sigma), Toluidin plavo (Biognost), 4% paraformaldehid (Biognost), proteinaza K (Roth), tripan plavo (Sigma), tripsin-EDTA (Sigma), Tris (Sigma), Triton-X-100 (AppliChem), TRIZMA base (Sigma), TRizol reagens (Thermo Fisher Scientific), Tween-20 (Sigma), voda oslobođena od nukleaza (Invitrogen), 30 % vodikov peroksid (Fargon).

3.1.5. Otopine i puferi

- Blokirajuća otopina za imunohistokemiju: 1X TBS, 0,025 % Tween 20, 1 % BSA
- Blokirajuća otopina za imunohistokemiju: 1X TBS, 0,025 % Tween 20, 15 % BSA
- Citratni pufer za otkrivanje antigena u protokolu imunohistokemije: 10 mM $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$, 0,05% Tween 20, pH 6, u vodi
- Digestijski pufer za lizu uški i repova miševa: 40 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,5 mM EDTA, 0,4 % NP-40, 0,4 % Tween 20, pH 8. U pufer se prije upotrebe svježe dodaje proteinaza K u omjeru 1:200
- EDTA pufer za otkrivanje antigena u protokolu imunohistokemije: 1 mM EDTA, 0,05 % Tween 20, pH 8, u vodi
- Pufer za ispiranje u protokolu imunohistokemije (1X TBS, 0,025 % Tween 20)
- 10 × PBS puferska otopina (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 2 mM KH_2PO_4)
- 1X TBS pufer pripremljen iz matične otopine 10X TBS (500 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,7, u vodi
- 6X boja za nanošenje: 3,5 mL deionizirana voda, 1,5 ml glicerol, 0,0125 g bromfenol plavo

3.1.6. Enzimi

- proteinaza K 100 mg / ml (Roth)

3.1.7. Biljezi

- DNA biljeg: 100 pb DNA Step Ladder (Promega).

3.1.8. Komercijalno dostupni kompleti

- DNA polimeraza Taq (Thermo Fisher Scientific)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

3.1.9. Protutijela

Popis korištenih primarnih protutijela se nalazi u tablici 1.

Tablica 1. Značajke primarnih protutijela upotrebljenih u istraživanju.

Naziv protutijela	Porijeklo	Vrsta protutijela	Proizvidač	Kataloški broj	Razrijeđenje
anti-cleaved caspase 3	zec	poliklonalno	Cell Signaling	9661	1:200
anti-pMLKL	zec	monoklonalno	Abcam	ab196436	1:2000

Značajke korištenog sekundarnog protutijela se nalaze u tablici 2.

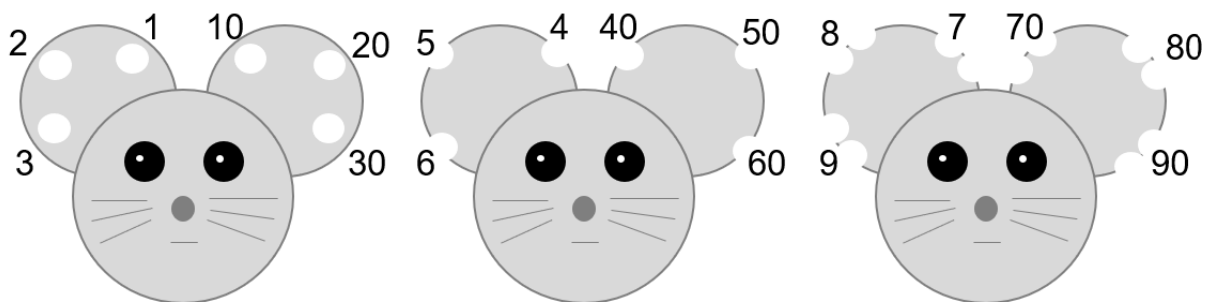
Tablica 2. Značajka sekundarnog protutijela upotrebljenog u istraživanju.

Naziv protutijela	Porijeklo	Vrsta protutijela	Proizvidač	Kataloški broj	Razrijeđenje
anti-rabbit	koza	poliklonalno	Dako	P0448	1:300

3.2. Metode

3.2.1. Genotipizacija

Označavanje miševa smo provodili biopsijom dijela uški na određenoj poziciji. Primjer označavanja uški je prikazan na slici 4.



Slika 4. Sustav označavanja miševa bušenjem uški na određenoj lokaciji.

Te iste bioptirane uzorke smo koristili za određivanje genotipa miševa s genetskom ablacijom mastocita i kontrolnih miševa. Također, na kraju eksperimenta smo uzeli vrhove repova miševa da bi dodatno potvrdili genotip. Bioptate smo uronili u digestijski pufer za lizu uški i repova miševa, sa svježe dodanom proteinazom K (razrjeđenje 1:200) i držali preko noći na 55°C. Volumen digestijskog pufera je bio prilagođen veličini bioptiranih uzoraka. Za uzorke uški smo koristili volumene od 25 do 50 µL, dok smo za uzorke repova koristili 100 µL pufera. Sutradan smo uzorke inkubirali 10 min na 95°C s ciljem inaktivacije proteinaze K. Uzorke smo zatim pohranili na 4°C do provođenja postupka genotipizacije.

Za postupak genotipizacije smo koristili Taq DNA Polymerase kit (invitrogen, ref: 10342-020). Za proces genotipizacije jednog uzorka, u 8,9 µL sterilne vode bez DNaza smo dodali 1,5 µL 10x PCR pufera, 1,2 µL MgCl₂ i 0,1 µL Taq polimeraze iz kita. Dodatno smo u reakciju dodali 1,5 µL uzorka, 0,3 µL smjese dNTP (40 mM) i po 0,5 µL od svakog Cpa3-Cre primera u koncentraciji od 10 µM: F; 5'- GGA CTG TTC ATC CCC AGG AAC C -3', R WT; 5'- CTG GCG TGC TTT TCA TTC TGG -3' i R KI; 5'- GTC CGG ACA CGC TGA ACT TG -3' (Tablica 3).

Tablica 3. Lista korištenih početnica. Prefiks „m“ označava početnice za mišji gen, dok „F“ i „R“ označavaju „forward“, odnosno „reverse“ početnice, a „WT“ i „KI“ označavaju „wild type“ i „knock-in“.

Početnice	Slijed nukleotida (5'-3')
mCpa3-Cre F	GGA CTG TTC ATC CCC AGG AAC C
mCpa3-Cre R WT	CTG GCG TGC TTT TCA TTC TGG
mCpa3-Cre R KI	GTC CGG ACA CGC TGA ACT TG

Napravljeni miks smo stavili u PCR (engl. *polymerase chain reaction*) uređaj i pokrenuli program prema tablici 4.

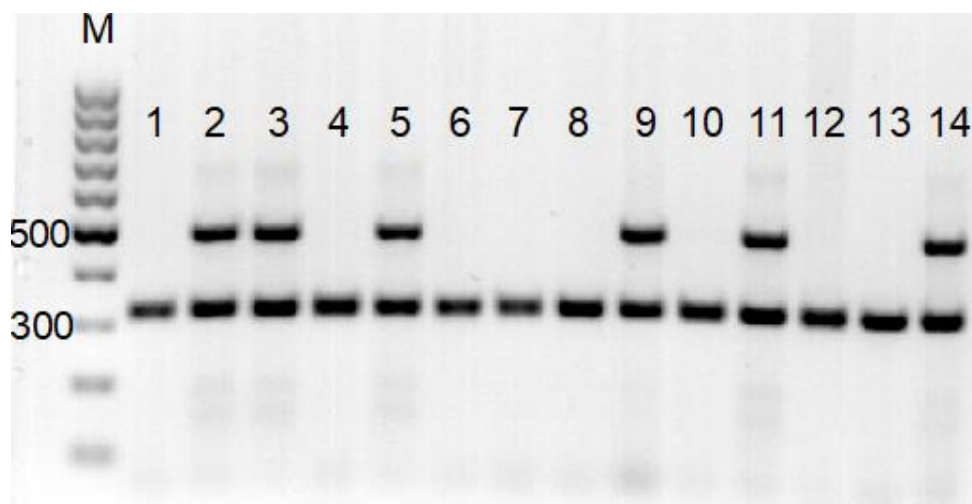
Tablica 4. Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju Cpa3^{Cre/+} i Cpa3^{+/+} miševa.

Korak	Temperatura (°C)	Vrijeme (sekunda)	Ciklus
1	94	120	1
2	94	20	35
3	62	30	
4	72	30	
5	72	300	1
6	4	∞	

3.2.2. Elektroforeza

Dobivene PCR produkte, odnosno umnoženu DNA, smo vizualizirali gel elektroforezom. Gel smo dobili otapanjem 0,75 g agaroze u 50 mL 1X TAE pufera uz povremeno miješanje i zagrijavanje do vrenja. Nakon hlađenja, u gelove smo dodali 1 µL etidij bromida da konačna koncentracija bude 0,2 mg / L. Takvu otopinu smo izlili u kalupe, stavili češljic i ostavili 30 min da se gel polimerizira.

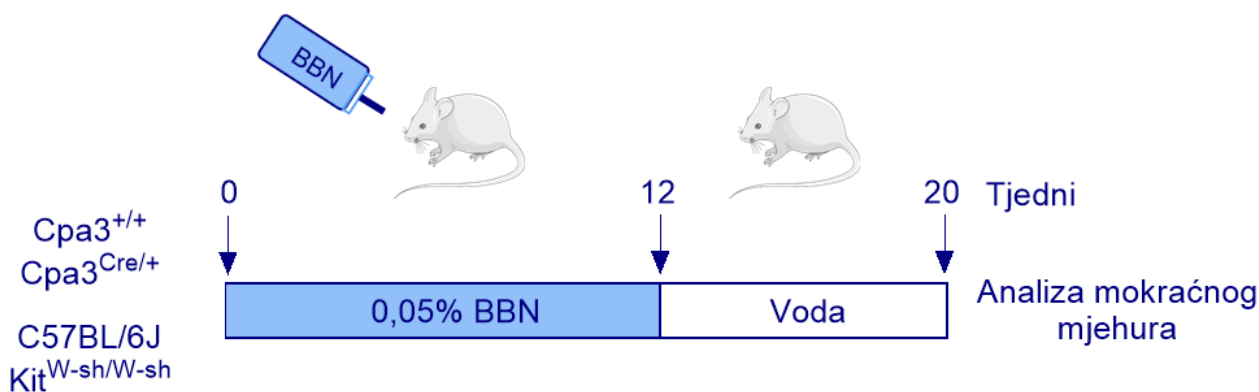
Uzorke PCR reakcije smo prvo pomiješali s 2 µL 6X boje za nanošenje (engl. *loading dye*), te smo ih nanijeli na 1,5 % agarozni gel. Elektroforezu smo namjestili na konstantu od 90 V, u trajanju od 50 min, a produkte na gelu smo vizualizirali UV transiluminatorom. Kontrolni miševi Cpa3^{+/+} miševa imaju amplikon od 320 parova baza, dok Cpa3^{Cre/+} miševi imaju dodatni amplikon od 450 parova baza. Primjer dobivenog rezultata na gel elektroforeze je prikazan u slici 5.



Slika 5. Gel elektroforeza PCR produkata genotipizacije. Na veličini od 320 bp se nalazi PCR produkt dijela *Cpa3* gena prisutnog u svim miševima. Produkt veličine 450 bp predstavlja *Cre* rekombinazu umetnutu u *Cpa3* gen. Prema tome, kontrolni $Cpa3^{+/+}$ miševi na gelu imaju vidljiv jedan PCR produkt, dok $Cpa3^{Cre/+}$ miševi imaju vidljiva dva produkta. M označava marker, a brojevi od 1 do 14 različite uzorke.

3.3.3. Mišji model raka mokraćnog mjehura uzrokovanog BBN-om

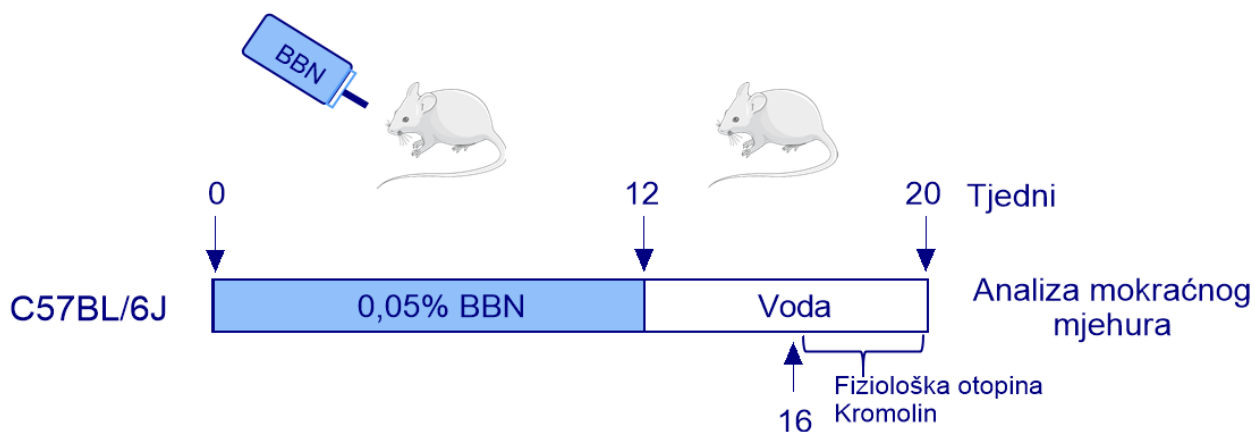
Miševima starim od 6 do 8 tjedana smo dali BBN u vodi za piće, u koncentraciji od 0,05%. Otopinu BBN-a smo svježe pripremali s autoklaviranom vodom svaki tjedan i skladištili u crnim bocama kako bi smanjili degradaciju zbog fotoosjetljivih svojstava BBN-a. Otopinu smo davali 12 tjedana, nakon čega smo miševima 8 tjedana dali piti običnu vodu. Nakon ukupno 20 tjedana, većina miševa je razvila rak mokraćnog mjehura, te smo ih žrtvovali cervikalnom dislokacijom (Slika 6). Zatim smo uzeli mokraćne mjehure miševa, izvagali ih, fotografirali i sagitalno prerezali na dva dijela. Jednu polovicu mjehura smo odmah pohranili u tekući dušik za kasniju izolaciju RNA, dok smo drugu polovicu fiksirali u 4 % paraformaldehidu za uklapanje u parafin i daljnju histološku analizu.



Slika 6. Shematski prikaz tretmana BBN-om.

3.3.4. Stabilizacija mastocita u mišjem modelu raka mokraćnog mjehura

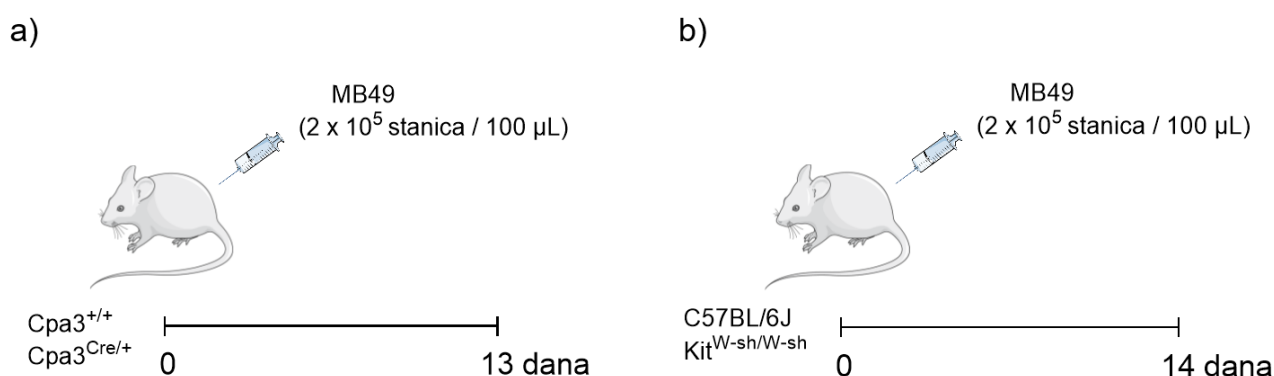
Za stabilizaciju mastocita i sprječavanje njihove degranulacije koristili smo lijek kromolin. Kromolin (HY-B1619, MedChemExpress) smo otopili u fiziološkoj otopini, u koncentraciji od 50 mg / kg, a davali smo ga intraperitonealno u volumenu od 100 μ L. Miševe smo tretirali svako dva dana, unutar zadnja četiri tjedna BBN eksperimenta. Shematski prikaz eksperimenta se nalazi na slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz kromolin tretmana u modelu mokraćnog mjehura uzrokovanog BBN-om.

3.3.5. Pokusi s potkožnim tumorima

Ovi eksperimenti su provedeni korištenjem mišjih MB49 stanica tumora mokraćnog mjehura. Stanice smo kultivirali u inkubatorima predviđenim za uzgoj stanica, na temperaturi od 37 °C, s 5 % razinom CO₂ u zraku. Stanice su uzgajane u Petrijevoj zdjelici od 10 cm, u DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) hranjivom mediju, obogaćenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma i 1 % antibiotika penicilin/streptomycin. Za eksperiment smo koristili stanice koje su dosegle 90 % konfluencije. Tada smo posisali medij, isprali stanice u PBS-u (engl. *phosphate-buffered saline*, fiziološka otopina s fosfatnim puferom) i dodali 1 mL tripsina da bi odvojili stanice od podloge. Stanice s tripsinom smo inkubirali 1 min u inkubatoru za uzgoj stanica i zatim dodali 4 mL DMEM medija da bi inaktivirali tripsin. Takvu suspenziju stanica smo centrifugirali, uklonili supernatant i pelet stanica resuspendirali u fiziološkoj otopini. Od te otopine smo uzeli 10 µL, pomiješali s 90 µL fiziološke otopine da bi dobili rjeđu suspenziju. Zatim smo uzeli 10 µL te otopine, pomiješali s 10 µL boje tripan plavo i prenijeli u Burker-Turk komoricu za bojanje. Na mikroskopu smo izbrojali stanice, izračunali ukupan broj stanica u suspenziji, te dodali određeni volumen fiziološke otopine da konačna koncentracija stanica bude 2×10^6 stanica / mL. Takvu suspenziju MB49 stanica u fiziološkoj otopini smo aplicirali miševima potkožno, u desni bok, u volumenu od 100 µL (2×10^5 stanica). Kraj eksperimenta je bio određen veličinom tumora, odnosno miševi su se žrtvovali cervikalnom dislokacijom kada se veličina tumora približila maksimalnom dopuštenom promjeru od ~ 15 mm (58). Na slici 8 se vidi shema provedenog eksperimenta.

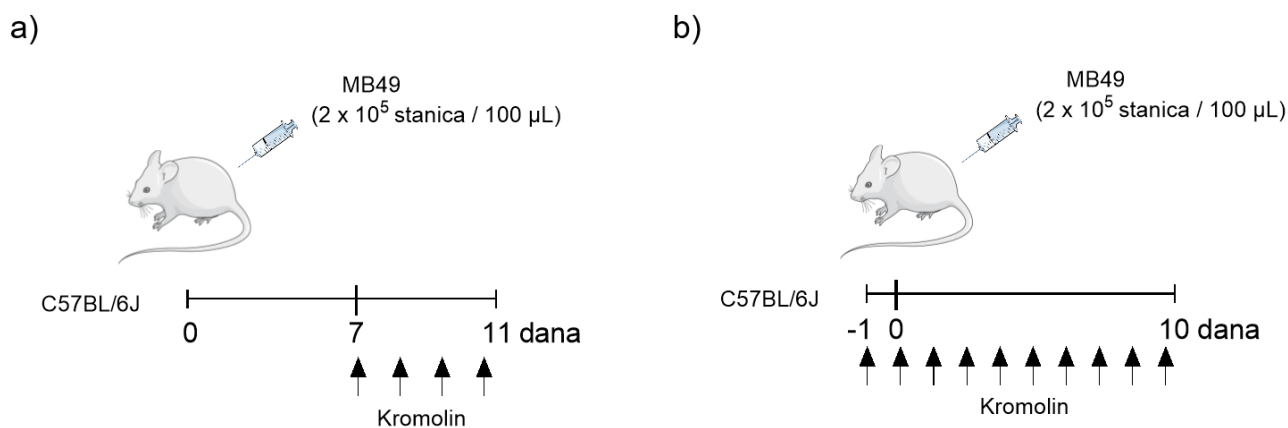


Slika 8. Shematski prikaz potkožnih tumorskih eksperimenata na miševima bez mastocita. a) Eksperiment na Cpa3^{Cre/+} miševima. b) Eksperiment na Kit^{W-sh/W-sh} miševima.

Na kraju eksperimenta, zaslijepljeni istraživač je izrezao tumore koje smo potom izvagali, izmjerili volumen i fotografirali. Jedan dio tumora smo pohranili u tekući dušik za daljnju izolaciju RNA, a drugi dio smo prebacili u tubicu s fiksativom, 4 % paraformaldehidom, za daljnje uklapanje u parafinske blokove i histološku analizu. Kriteriji isključenja su bili prisutnost ulkusa i intraperitonealno mjesto tumora.

3.3.6. Stabilizacija mastocita u potkožnim tumorskim eksperimentima

Kromolin smo pripremili u fiziološkoj otopini, u koncentraciji od 50 mg / kg, te smo ga dali miševima u ukupnom volumenu od 100 μ L. Miševe smo tretirali s kromolinom u potkožnim tumorskim eksperimentima na dva različita načina. U jednom eksperimentu, C57BL/6J miševe smo tretirali s kromolinom sedmi dan nakon inokulacije MB49 stanica, odnosno nakon formiranja tumora, i nastavili ih tretirati svaki dan do kraja eksperimenta. U trenutku početka tretmana, tumori su bili približne veličine 1 x 1 mm i 2 x 2 mm, što nam je omogućilo ravnomjernu raspodjelu miševa u kontrolnu i ispitivanu skupinu, osiguravajući jednaku distribuciju životinja s tumorima slične veličine (Slika 9a). U drugom eksperimentu, C57BL/6J miševe smo tretirali dan prije inokulacije MB49 stanica i svaki sljedeći dan do kraja eksperimenta (Slika 9b).



Slika 9. Shematski prikaz kromolin tretmana u potkožnim tumorskim eksperimentima. a) Terapijski tretman kromolinom. b) Kontinuirani tretman kromolinom u C57BL/6J miševa.

3.3.7. Uklapanje tkiva u parafin

Mokraćne mjehure i potkožne tumore smo držali u 4 % paraformaldehidu 24 sata na + 4°C. Nakon toga smo uklonili 4 % paraformaldehid i uzorke inkubirali u 75 % alkoholu naredna 24 sata. Zatim smo zamijenili 75 % alkohol s 80 % alkoholom sat vremena, nakon čega smo inkubirali uzorke u 90 %, odnosno 95 % alkoholu, svaki po sat vremena. Zatim su uslijedile tri izmjene 100 % alkohola za potpunu dehidraciju tkiva. Nakon toga smo proveli uzorke kroz 3 izmjene ksilola, svaki po 45 min. U sljedećem koraku smo uzorke prebacili u kazetice za uklapanje tika i inkubirali u parafinu, u sušioniku na 60°C. Nakon sat vremena, napravili smo izmjenu parafina i nastavili inkubaciju preko noći. Sutradan su uzorci uklopljeni u parafinske blokove.

3.3.8. Histološka analiza

Mokraćne mjehure uklopljene u parafinske blokove smo izrezali koristeći mikrotom RM2125 RTS (Leica) na tanke rezove od 4 µm. Stakalca s rezovima smo proveli kroz dvije izmjene ksilola (15 min i 10 min) da bi makli parafin, te smo ih zatim rehidrirali inkubacijom kroz serije alkohola (dvije izmjene 100 % i 95 % alkohola, 1 min svaki) sve do vode. Stakalca su potom uronjena u hematoksilin 10 min, isprana u običnoj vodi, inkubirana u eozinu 10 min, te dehidrirana kroz serije alkohola (dvije izmjene 95 % i 100 % alkohola, 1 min svaki). Nakon dodatne dvije izmjene ksilola od 1 min, na stakalca smo stavili medij za uklapanje (Eukitt) i pokrili ih pokrovnim stakalcem. Tako obojene rezove mokraćnog mjehura smo analizirali na mikroskopu, gdje je patologica svrstala uzorke u sljedeće kategorije: normalno/displazija, CIS s diskontinuitetom bazalne membrane, invazija u subepitelne slojeve i invaziju u submukozno vezivno tkivo / invazija u mišić. Reprezentativne mikroskopske slike smo snimili mikroskopom Olympus BX43 (Olympus Corporation).

3.3.9. Kvantifikacija mastocita

Da bi vizualizirali mastocyte u histološkim presjecima, bojali smo ih toluidin bojom. Toluidin boja je metakromatska boja koja vezanjem na kisele komponente mijenja boju iz plave u ljubičastu. Veže se na nukleinske kiseline (DNA i RNA), dajući plavu boju stanicama, dok se u mastocitima veže na granule koje boja ljubičasto zbog kiselih svojstava heparina (kisele mukopolisaharid) (59). Radnu toluidin otopinu smo svaki put svježe pripremali. Prvo bi pripremili 1 % otopinu NaCl, namjestili pH na 2,0 – 2,5, te dodali osnovnu toluidin otopinu da konačni volumen bude 5 % (5 ml na ukupan volumen od 100 ml).

Rezove debljine 4 μm smo proveli kroz izmjene ksilola, rehidrirali kroz izmjene alkohola (100 %, 95 %) do vode i zatim inkubirali 2 – 3 min u toluidin boji. Stakalca smo isprali u vodi, dehidrirali kroz seriju alkohola (95 %, 100 %), provukli kroz dvije izmjene ksilola, te pokrili medijem za uklapanje (Eukitt) i pokrovnim stakalcima. Na mikroskopu smo izbrojali ukupan broj mastocita na cijelom presjeku i zatim taj broj podijelili s brojem vidnih polja na 100x povećanju. Dodatno, mastocite smo kategorizirali prema stupnju degranulacije u tri skupine: nedegranulirani, djelomično degranulirani i potpuno degranulirani. Primjeri kategorija degranulacije su prikazani u odjeljku 4.2 rezultata, slika 12.

3.3.10. Imunohistokemija

Uzorke smo izrezali iz parafinskih blokova na 4 μm debele rezove. Uranjanjem u dvije izmjene ksilola smo uklonili parafin, a uranjanjem u vodu nakon 100% i 95% etanola smo rehidrirali uzorke. Rezove smo zatim kuhali 30 min u 1 mM EDTA puferu (pH 8) za otkrivanje antigena. Endogene peroksidaze smo blokirali inkubacijom s 3 % H_2O_2 . Za blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela, stakalca smo inkubirali s određenim postotkom BSA/TBS-T, ovisno o protutijelu. Zatim smo rezove inkubirali s primarnim protutijelima preko noći. Koristili smo sljedeća protutijela: anti-pMLKL (Abcam, ab196436, 1:2000, blokiranje s 15 % BSA / TBS-T) i anti-pocijepana caspasa-3 (Cell Signaling, 9661S, 1:200, blokiranje s 1 % BSA / TBS-T). Nakon ispiranja primarnog protutijela, stakalca smo inkubirali 1,5 h s poliklonskim kozjim anti-zečjim sekundarnim protutijelom (Dako, P0448, razrjeđenje 1:300). Nakon ispiranja, rezove smo inkubirali s DAB (Dako, K3468). Hematoksilin smo koristili za kontrastno bojanje rezova, nakon čega smo ih dehidrirali, inkubirali u ksilenu i pokrili s pokrovnim stakalcima uz primjenu medija za uklapanje. Pozitivne stanice smo brojali u 3 vidna polja najveće koncentracije (engl. *hot spots*), pod povećanjem od 400x.

3.3.11. Izolacija RNA

Smrznute uzorke mokraćnih mjehura ili potkožnih tumora smo prebacili iz tekućeg dušika u tubicu s 250 μL ili 500 μL TRIzol-a (otopina fenola i gvanidijevog tiocijanata), ovisno o veličini uzorka. Koristeći Precellys Minilys homogenizator tkiva, uzorke smo homogenizirali tri puta po 30 sekunda na 5000 rpm (engl. *revolutions per minute*). Između runda homogenizacije, tubice smo hladili na ledu 10 sekunda. Zatim smo u tubicu dodali 50 μL , odnosno 100 μL kloroforma, vorteksirali 15 sekunda i ostavili na sobnoj temperaturi tri minute. Dodatak kloroforma omogućuje razdvajanje RNA od DNA i proteina. Centrifugiranjem uzoraka 15 minuta na 12 000 g i +4°C u tubici smo dobili

tri faze: gornju vodenu fazu koja sadržava RNA, srednju interfazu koja sadržava DNA i donju, organsku fazu koja sadržava proteine otopljene u fenolu i kloroformu. Pažljivo smo prebacili vodenu fazu s RNA u novu tubicu, dodali 125 μ L izopropanola, vorteksirali i inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi. Isopropanol precipitira RNA, koja formira pelet nakon 10 minuta centrifugiranja na 12 000 g i +4°C. Pelet smo zatim isprali dva puta u 75 % alkoholu s centrifugiranjem 5 minuta na 7 500 g i +4°C. Zatim smo pelet osušili na zraku i otopili u određenoj količini vode bez DNaza i RNaza, da ukupna koncentracija ne prelazi 1 μ g / μ L. Ukupnu koncentraciju i čistoću RNA smo izmjerili korištenjem omjera apsorbancije 260 / 280 i 260 / 230 pomoću uređaja Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

3.3.12. Analiza sekvenciranja RNA

Izolaciju ukupne RNA iz potkožnih tumora i tumora mokraćnih mjehura smo proveli korištenjem standardnog Trizol protokola i Minilys homogenizatora tkiva. Glasničku RNA (mRNA) smo izolirali iz ukupne RNA pomoću poli-T oligo-vezanih magnetskih kuglica. Nakon fragmentacije, prvi lanac cDNA smo sintetizirali s nasumičnim heksamernim početnicama, nakon čega je uslijedila sinteza drugog lanca korištenjem dTTP-a za neusmjerenu biblioteku. Sekvenciranje smo proveli s 40 milijuna očitavanja po uzorku na Illumina Novaseq PE150. Neobrađena očitavanja sekvenciranja smo filtrirali za očitavanja niske kvalitete ili očitavanja s adapterima i uskladili pomoću HISAT2 na mm10 referentni genom. Diferencijalnu analizu ekspresije gena smo proveli pomoću DESeq2 (60), a gene s $\log_2FC \geq 1$ smo smatrali diferencijalno eksprimiranim s P vrijednošću $\leq 0,05$. Analizu diferencijalne ekspresije, kao i analize obogaćivanja GO i KEGG setovima gena smo analizirali na platformi NovoMagic (<https://ocsseurope.novogene.com/oauth/login>, pristupljeno 1 listopada 2024). Analizu obogaćivanja skupa gena (GSEA) smo dodatno proveli korištenjem modula GenePattern GSEA, na DESeq2 normaliziranim podacima, na zbirkama skupa gena MSigDB s 1000 permutacija po formiranom skupu gena (61). Točkaste dijagrame obogaćenja gena smo generirali pomoću alata dostupnih na online platformi Bioinformatics (<https://www.bioinformatics.com.cn>, pristupljeno 1 listopada 2024). Z-vrijednosti toplinskih karta (engl. *heatmap*) generirane su pomoću FPKM-normaliziranih podataka sekvenciranja RNA i iscrtane pomoću GraphPad Prism softvera, verzija 10.4.2.

3.3.13. Tretiranje stanica raka mokraćnog mjehura s kromolinom

Tri stanične linije tumora mokraćnog mjehura (MB49, T24, 5637) smo kultivirali u inkubatorima predviđenim za uzgoj stanica, na temperaturi od 37 °C, s 5 % razinom CO₂ u zraku. Stanice smo uzgajali u hranjivom mediju DMSO, obogaćenim s 10 % fetalnog goveđeg seruma i 1 % antibiotika penicilin / streptomycin. Kada su stanice dosegle 70 % konfluencije, tretirali smo ih 48 sati s kromolinom otopljenim u DMSO, u koncentracijama od 25 µM i 50 µM, dok smo kontrolnu skupinu tretirali samo s DMSO. Na kraju tretmana, stanice smo isprali u PBS-u i odvojili od podloge koristeći tripsin. Tripsin smo zatim neutralizirali s DMEM-om, stanice centrifugirali, resuspendirali u PBS-u i izbrojali pomoću tripan plavo boje.

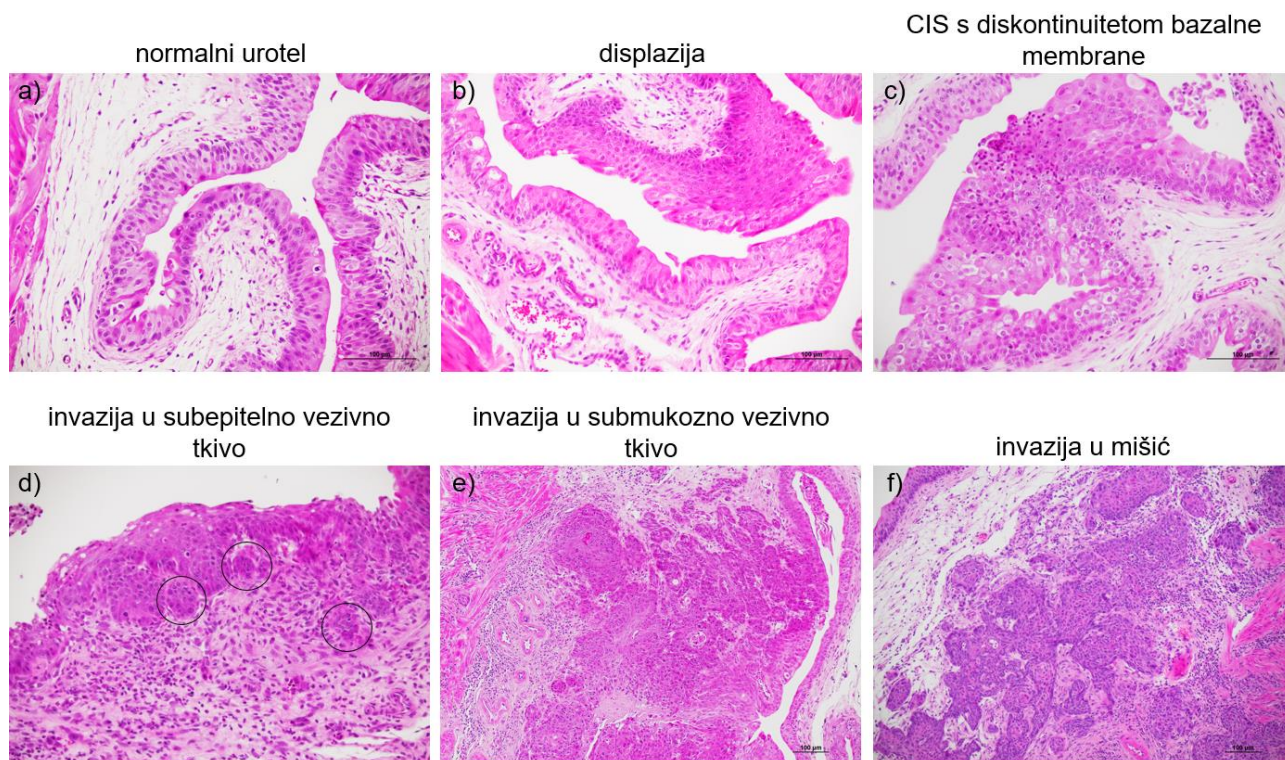
3.3.14. Statistički postupci

Sve statističke analize smo izveli pomoću softvera GraphPad Prism, verzija 10.4.2. Učinak kromolina na rak mokraćnog mjehura smo ispitali s dvostranim studentovim t-testom koji smo koristili za analizu razlika u masi tumora i broju pozitivnih stanica nakon imunohistokemijskog bojanja. Kronični BBN tretman smo analizirali Mann-Whitney U testom, koji smo koristili za analizu fenotipskih razlika. Za analizu razlika u broju MB49, T24 i 5637 stanica nakon tretmana kromolinom, primijenili smo jednosmjernu ANOVA, praćenu post hoc Tukey testom. Statističku značajnost smo definirali kao $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Progresija raka mokraćnog mjehura uzrokovanog BBN-om.

Nakon 5 mjeseci tretiranja miševa, odnosno 12 tjedana davanja BBN-a u vodi za piće i 8 tjedana obične vode, većina miševa razvije kancerogene promjene na mokraćnom mjehuru s različitim stadijima progresije raka mokraćnog mjehura. Dio miševa ima normalni urotel, točnije urotel bez malignih promjena. U takvim mokraćnim mjehurima može doći do displazije, odnosno do preneoplastičnih promjena povećane proliferacije stanica urotela i poremećene organizacije slojeva urotela. Zatim imamo CIS s diskontinuitetom bazalne membrane što predstavlja prvi korak maligne transformacije. U tom stadiju, stanice su pleomorfne, gube polarnost, a urotel gubi svoju normalnu arhitekturu i slojevitost. CIS je visokog gradusa i iako je ograničen na urotel, predstavlja veliki rizik od probijanja kroz bazalnu membranu i daljnju invaziju. U slučaju kada maligne stanice probiju bazalnu membranu, odvajaju se od urotela u invazivnim otočićima. Ako imamo nekoliko invazivnih otočića u lamini propriji, odmah ispod bazalne membrane, klasificiramo uzorak kao invaziju u subepitelno vezivno tkivo. Takva invazija može progredirati kroz cijelu laminu propriu i tada svrstavamo uzorak pod invaziju u submukozno vezivno tkivo. Zadnja kategorija je invazija u mišić, gdje vidimo jasne invazivne otočiće u mišićnom sloju. Navedene promjene se mogu vidjeti u slici 10.

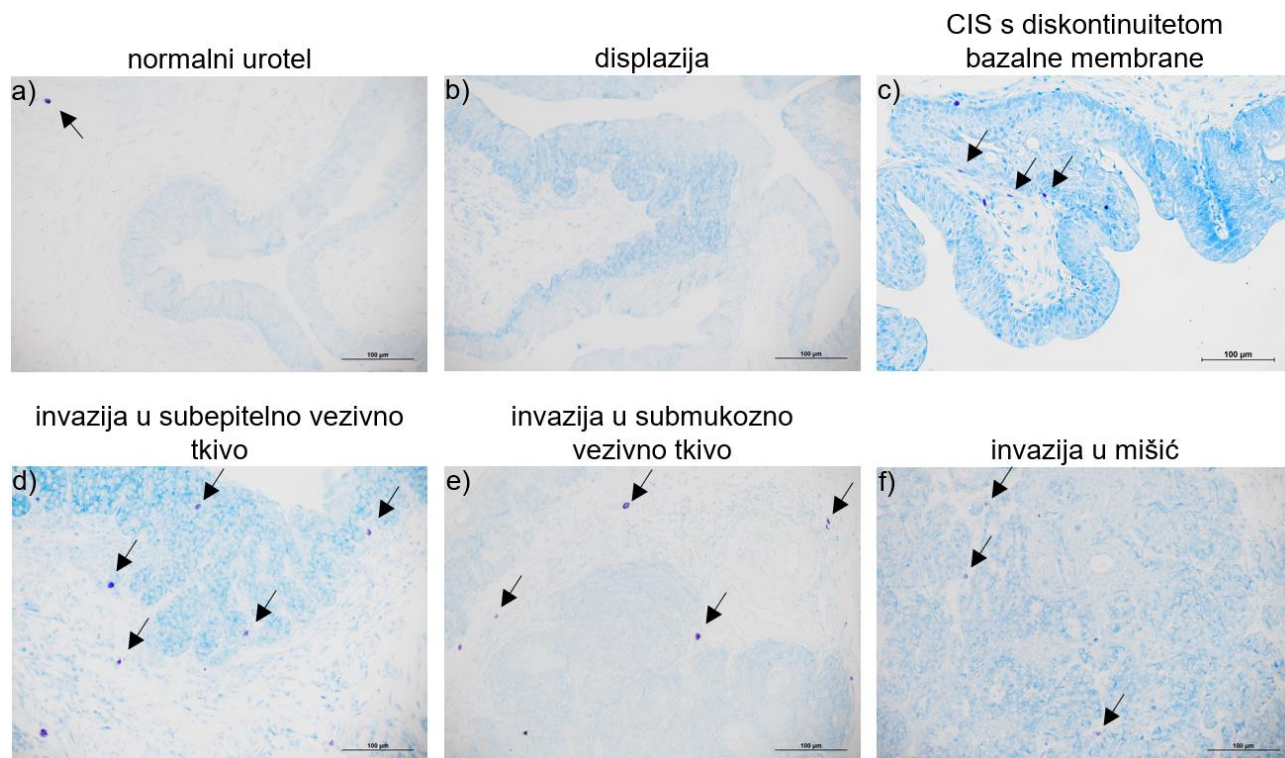


Slika 10. Histopatološke promjene u mokraćnom mjehuru miševa tretiranih s BBN-om. Bojanje različitih stadija raka mokraćnog mjehura hematoksilinom i eozinom. a) Normalan urotel bez malignih promjena. b) Displazija, predneoplastične promjene urotela. c) CIS s diskontinuitetom bazalne membrane. d) Invazija u subepitelno tkivo. Crni kružići pokazuju invazivne otočiće. e) Invazija u submukozno vezivno tkivo. f) Invazija u mišić. (a – d) Povećanje 200x, skala 100µm. (e, f) Povećanje 100x, skala 100µm.

4.2. Nakupljanje mastocita tijekom progresije raka mokraćnog mjehura

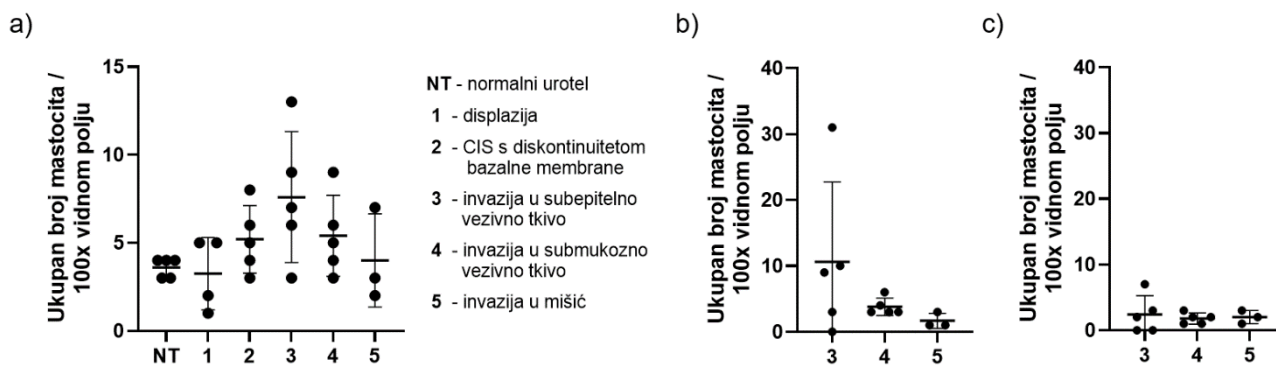
Različite stadije tumora mokraćnog mjehura smo obojili Toluidine bojom da bi vizualizirali mastocite te analizirali promjene u njihovoj brojnosti i fenotipu. Pokazali smo da se mastociti nakupljaju s progresijom tumora, te da se lokaliziraju u blizini patoloških promjena (Slika 11). U mokraćnim mjehurima bez malignih promjena, mastocite nalazimo sporadično, najčešće u lamini proprii oko krvnih žila, te nešto u mišiću (Slika 11a). S razvitkom preneoplastičnih promjena, poput displazije, još uvijek ne primjećujemo promjene u brojnosti mastocita (Slika 11b). Međutim, s malignom transformacijom urotela, odnosno razvitkom CIS-a sa diskontinuitetom bazalne membrane vidimo povećanje broja mastocita i promjenu u njihovoj lokalizaciji. U tom stadiju, mastociti se približavaju urotelu i pozicioniraju ispod urotela, uz maligne promjene (Slika 11c). Najveći broj mastocita vidimo u sljedećem stadiju, odnosno kada dolazi do invazije u subepitelne slojeve. Tada mastocite pronalazimo ispod malignih promjena, kao i u samom urotelu (Slika 11d). Progresijom tumora, odnosno invazijom u submukozu, primjećujemo peritumoralno koncentriranje mastocita

(Slika 11e). Kod tumora koji su invadirali mišić, uz peritumoralnu lokalizaciju, pronalazimo mastocite i unutar tumora (Slika 11f).



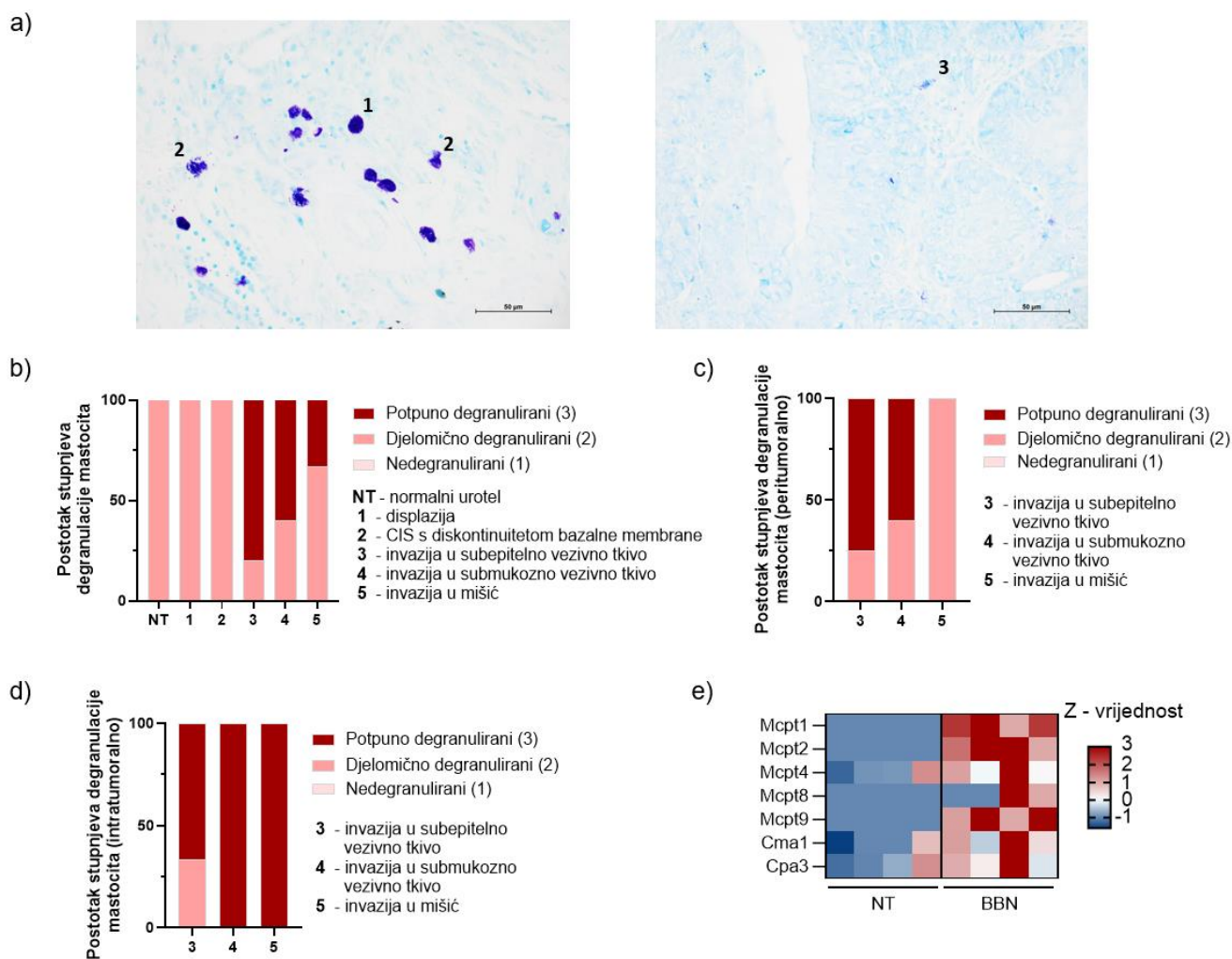
Slika 11. Nakupljanje mastocita uz patološke promjene u mokraćnom mjehuru miševa tretiranih BBN-om. Bojanje različitih stadija raka mokraćnog mjehura toluidine bojom. a) Normalan urotel bez malignih promjena. b) Displazija, predneoplastične promjene urotela. c) CIS s diskontinuitetom bazalne membrane. d) Invazija u subepitelno tkivo. e) Invazija u submukozno vezivno tkivo. f) Invazija u mišić. (a – f) Povećanje 200x, skala 100µm. Crne strelice označavaju mastocite.

Broj mastocita smo izbrojali na cijelom uzorku i normalizirali po vidnom polju. Kvantifikacija je potvrdila što smo primijetili na toluidin bojanju, da su mastociti najbrojniji kod invazije u subepitelne slojeve (Slika 12a). Također, u tom stadiju vidimo nešto veći broj mastocita peritumoralno, u odnosu na intratumoralno (Slike 12b, 12c).



Slika 12. Kvantifikacija mastocita u različitim stadijima tumora mokraćnog mjehura u miša. a) Broj mastocita u netretiranim mokraćnim mjehurima, te u različitim stadijima tumora mokraćnog mjehura, normaliziran po vidnom polju. b) Broj mastocita lokaliziran peritumoralno u različitim stadijima invazije tumora mokraćnog mjehura, normaliziran po vidnom polju. c) Broj mastocita lokaliziran intratumoralno u različitim stadijima invazije tumora mokraćnog mjehura, normaliziran po vidnom polju.

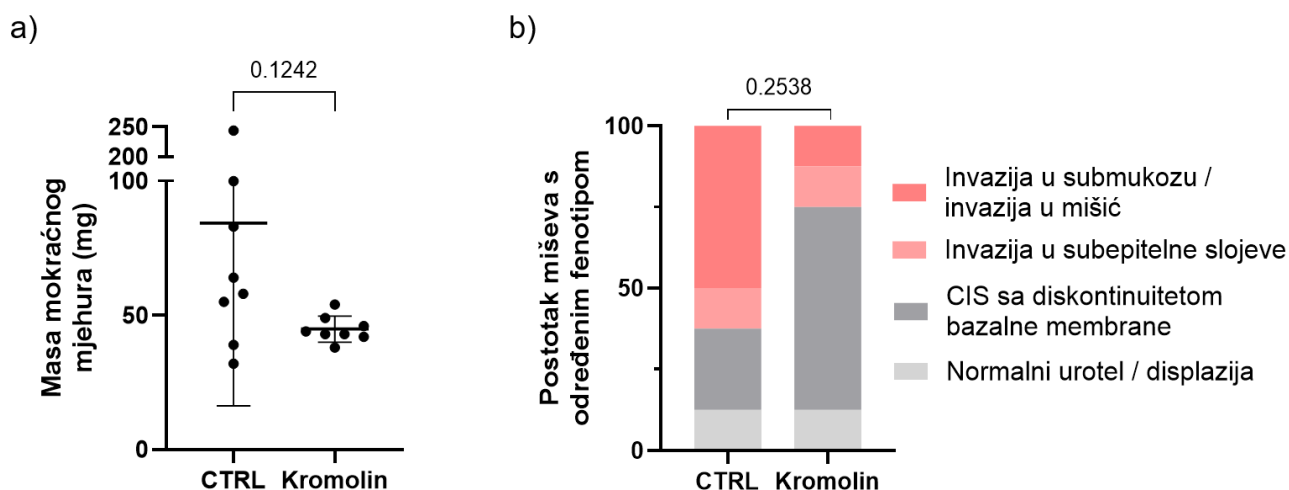
Osim broja mastocita, analizirali smo i stadij njihove degranulacije. Po njihovoj morfologiji, svrstali smo ih u tri kategorije. U prvu kategoriju su bili svrstani nede granulirani mastociti, karakterizirani po gusto kondenziranoj toluidine boji unutar mastocita, bez vidno ispuštenih granula. Sljedeću kategoriju, kategoriju dva, su sačinjavali mastociti koji su se djelomično degranulirali. Takvi mastociti se vide kao djelomično ispražnjeni, odnosno dio mastocita nije prekriven toluidine bojim i oko njih nalazimo ispuštene granule. U kategoriju tri su bili svrstani potpuno degranulirani mastociti, koji su se u potpunosti raspukli i ispustili svoje granule (Slika 13a). Brojanjem i svrstavanjem mastocita u prethodno opisane kategorije smo vidjeli da se s progresijom tumora povećava udio degranuliranih mastocita. Također, vidjeli smo da su mastociti unutar tumora potpuno degranulirani (Slike 13b, 13c, 13d). Analizom podataka RNA sekvenciranja vidimo i povećanu ekspresiju gena za proteaze specifične za mastocite: *Mcpt1*, *Mcpt2*, *Mcpt4*, *Mcpt8*, *Mcpt9*, *Cma1* i *Cpa3* (Slika 13e).



Slika 13. Degranulacija i aktivacija mastocita u različitim stadijima tumora mokraćnog mjehura u miša. a) Reprezentativne slike različitih stupnjeva degranulacije mastocita. b) Stupanj degranulacije mastocita u netretiranim mokraćnim mjehurima, te u različitim stadijima tumora mokraćnog mjehura. c) Stupanj degranulacije mastocita lokaliziranih peritumoralno u različitim stadijima invazije tumora mokraćnog mjehura. d) Stupanj degranulacije mastocita lokaliziranih intratumoralno u različitim stadijima invazije tumora mokraćnog mjehura. e) Toplinska karta (engl. *heatmap*) specifičnih proteaza mastocita u mokraćnim mjehurima BBN tretiranih miševa u usporedbi s netretiranim mokraćnim mjehurima. (a, b) Povećanje 400x, skala 50μm.

4.3. Model tumora mokraćnog mjehura s kromolin tretmanom

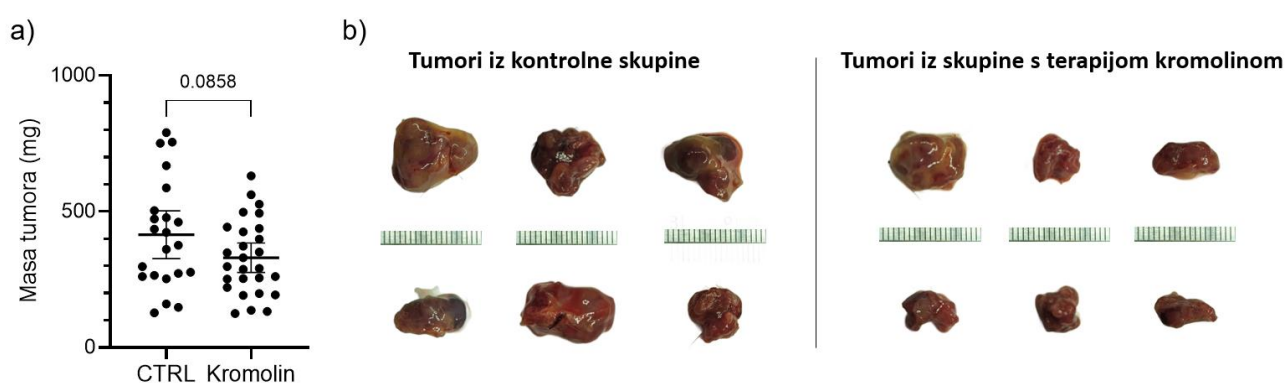
Budući da smo vidjeli da se broj i stadij degranulacije mastocita povećava s progresijom tumora, htjeli smo vidjeti efekt inhibicije njihove degranulacije na razvoj i progresiju tumora mokraćnog mjehura. Da bi to istražili koristili smo kromolin, lijek koji je namijenjen ublažavanju simptoma astme i alergije. Način njegovog djelovanja je stabilizacija degranulacije mastocita. Kromolin smo prvo primijenili u mišjem tumorskom modelu mokraćnog mjehura uzrokovanog BBN-om, opisanom u metodama. Na kraju eksperimenta smo izvagali mokraćne mjehure i opazili manju masu mokraćnih mjehura miševa tretiranih kromolinom iako ta razlika nije bila statistički značajna (Slika 14a). Analizom histoloških preparata smo također vidjeli tendenciju boljeg fenotipa s manje invazivnih tumora u skupini miševa tretiranih kromolinom (Slika 14b).



Slika 14. Utjecaj terapije kromolinom na masu i fenotip mokraćnih mjehura u BBN-induciranom tumorskom modelu. a) Grafički prikaz masa mokraćnih mjehura na kraju BBN eksperimenta tretiranih kromolinom. Student t-test, $P = 0,1242$ b) Prikaz fenotipskih razlika u miševa tretiranih s BBN-om i kromolinom, u usporedbi s kontrolnim miševima tretiranih samo s BBN-om. Mann-Whitney U test, $P = 0,2538$.

4.4. MB49 potkožni tumorski model s terapijom kromolinom

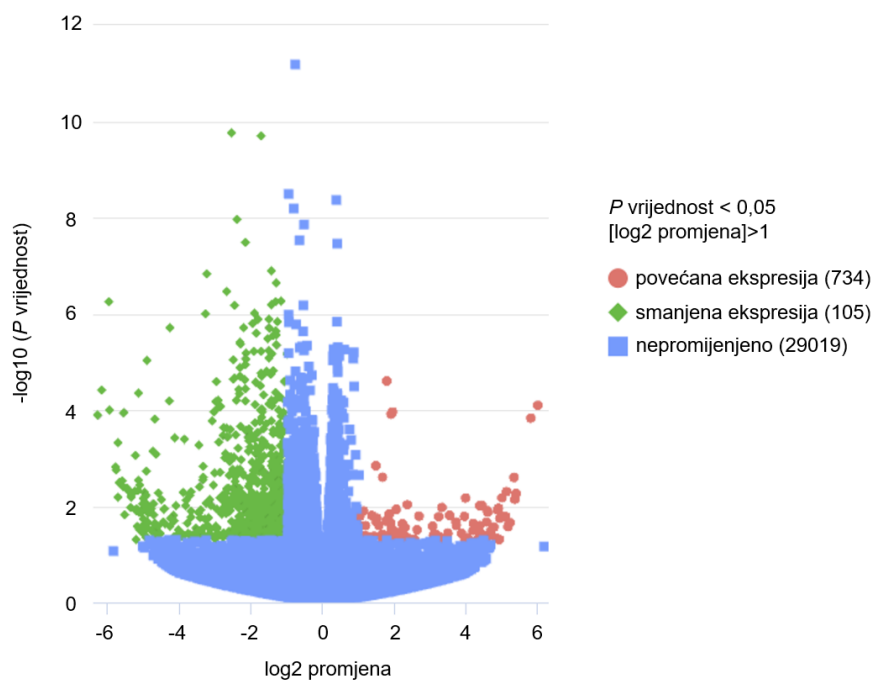
Dalje, testirali smo utjecaj lijeka kromolin na potkožnom tumorskom modelu opisanom u metodama. Miševima smo ubrizgali MB49 stanice tumora mokraćnog mjehura. Terapiju kromolinom smo započeli sedmog dana, nakon što su se tumori razvili. Miševe smo nastavili tretirati s kromolinom svaki sljedeći dan do kraja eksperimenta. Na kraju eksperimenta smo izvagali potkožne tumore i primijetili njihovu manju masu u miševa tretiranih s kromolinom, iako razlika nije bila statistički značajna. Razlika od $-84,46$ mg [95CI $-181,3$, $+12,37$], $P = 0,0858$ u prosječnoj masi tumora između kontrolne i ispitivane skupine (Slika 15).



Slika 15. Učinak terapije kromolinom na masu potkožnih tumora. a) Grafički prikaz masa potkožnih tumora miševa tretiranih s kromolinom. Student t-test, $P = 0,0858$. b) Slike potkožnih tumora miševa iz kontrolne skupine i skupine tretirane kromolinom. Skala 2 cm.

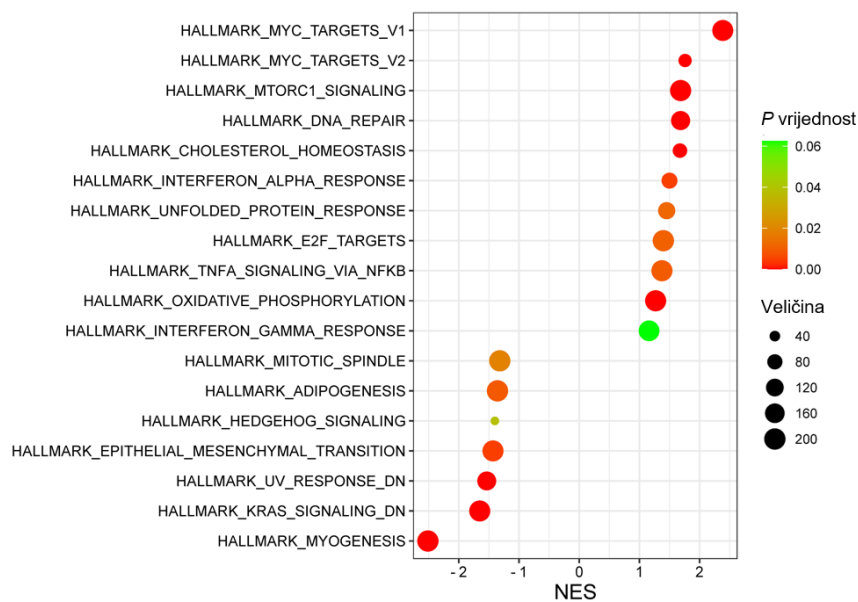
4.5. Analiza RNA sekvenciranja MB49 potkožnih tumora miševa s terapijskim kromolin tretmanom

Analizom podataka RNA sekvenciranja pokazali smo 105 prekomjerno eksprimiranih i 734 smanjeno eksprimiranih gena s promjenom većom od dva puta i P vrijednošću manjom od 0,05 u potkožnim tumorima s terapijskim tretmanom kromolinom (Slika 16).



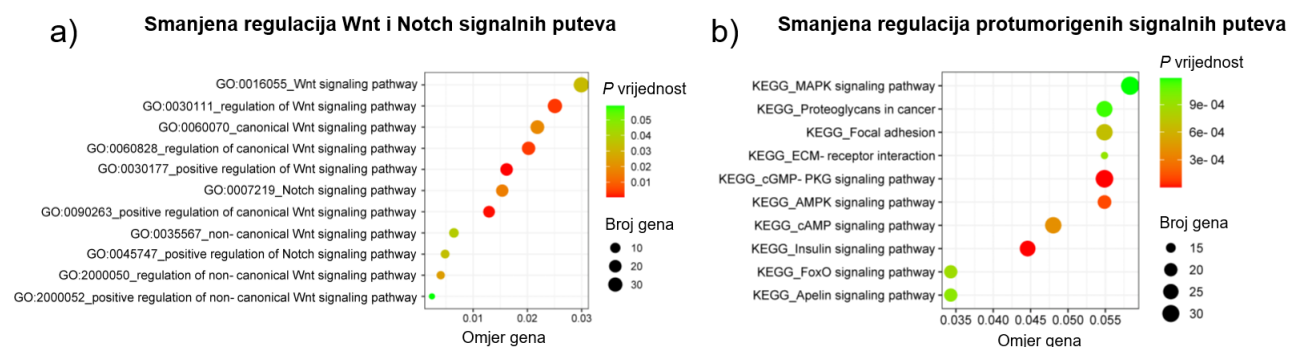
Slika 16. Diferencijalno promijenjeni geni u potkožnim tumorima miševa terapijski tretiranih kromolinom.

Analizom obogaćivanja *hallmark* setova gena pokazali smo da terapija kromolinom poboljšava protutumorski imunološki odgovor, što smo vidjeli iz povećanog signaliziranja NF- κ B puta, te povećanog interferon-alfa i interferon-gama odgovora. Također, pokazali smo da terapija kromolinom smanjuje regulaciju prijelaza epitela u mezenhim u potkožnim tumorima (Slika 17).



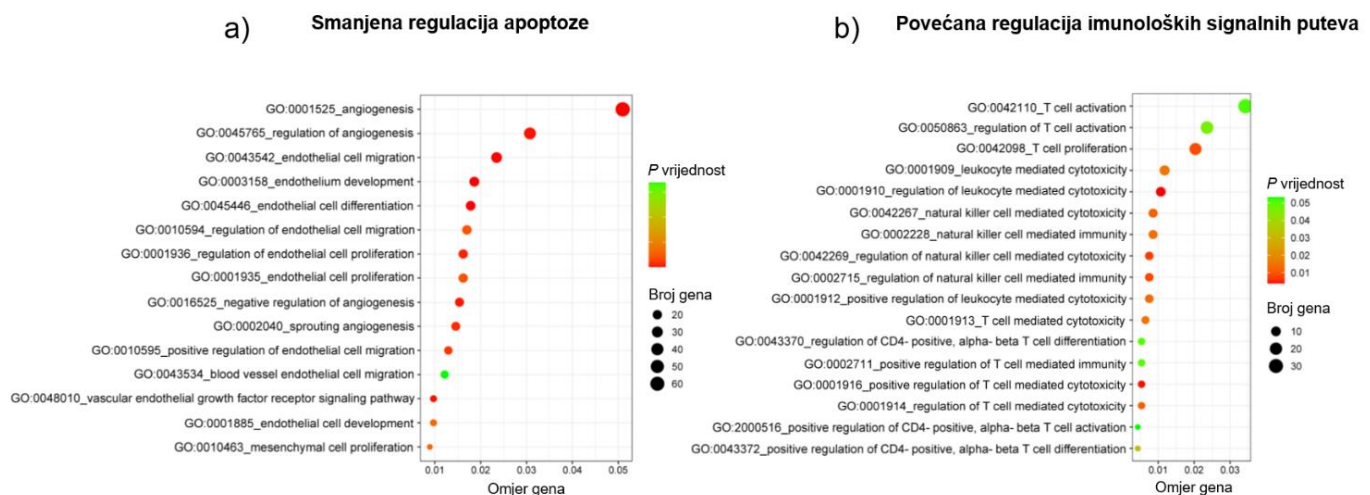
Slika 17. Rezultati analize obogaćenja *Hallmark* setova gena u potkožnim tumorima miševa terapijski tretiranih kromolinom. Y os označava diferencijalno obogaćene puteve, dok X os predstavlja normalizirani rezultat obogaćivanja (engl. *normalised enrichment score*, NES). Gradijent boja, od crvene do zelene, označava *P* vrijednost, pri čemu crvena boja označava niže *P* vrijednosti, a zelena boja više *P* vrijednosti. Veličina mjehurića korelira s brojem gena uključenih u svaki put.

Daljnjom KEGG (eng. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) analizom podataka RNA sekvenciranja smo pokazali smanjenu regulaciju protumorskih signalnih puteva u potkožnim tumorima s terapijskim tretmanom kromolinom. Analizom GO (eng. *Gene Ontology*) signalnih puteva, ti isti tumori su imali i smanjenu regulaciju poznatih protumorskih signalnih puteva Wnt i Notch (Slika 18).



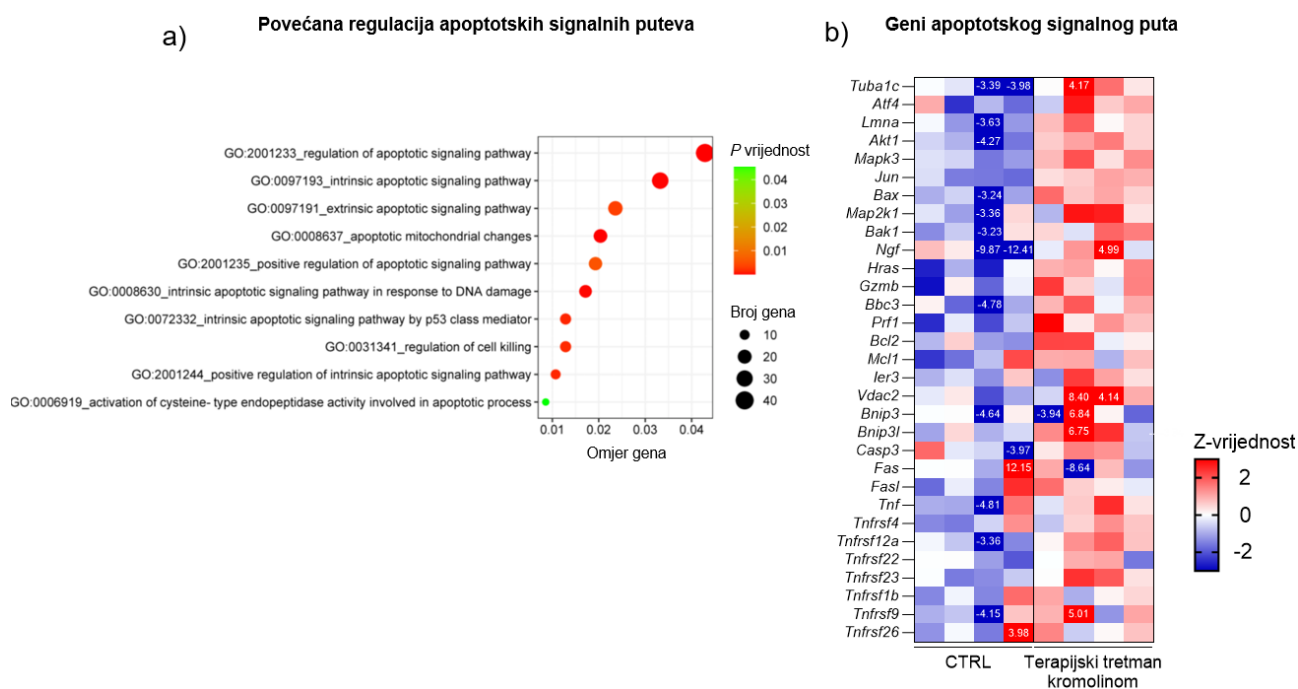
Slika 18. Rezultati analize obogaćenja GO i KEGG protumorigenih setova gena u potkožnim tumorima miševa terapijski tretiranih kromolinom. a) GO analiza Wnt i Notch signalnih puteva. b) KEGG analiza obogaćenja protumorigenih signalnih puteva. Y osi označavaju diferencijalno obogaćene puteve, dok X osi predstavljaju omjer gena (engl. *gene ratio*). Gradijent boja, od crvene do zelene, označava *P* vrijednost, pri čemu crvena boja označava niže *P* vrijednosti, a zelena boja više *P* vrijednosti. Veličina mjehurića korelira s brojem gena uključenih u svaki put.

Budući da mastociti utječu na stvaranje novih krvnih žila, analizirali smo i GO signalne puteve vezane za angiogenezu i pokazali njihovu smanjenu regulaciju u potkožnim tumorima s terapijskim tretmanom kromolinom. Smanjeno stvaranje novih krvnih žila istaknuto je i smanjenom regulacijom pupajuće angiogeneze (engl. *sprouting angiogenesis*) (Slika 19a). Jedan od glavnih učinaka mastocita na tumorski mikrookoliš je imunoregulacija, pa smo stoga analizirali i GO imunološke signalne puteve. Pokazalo se da terapija kromolinom povećava regulaciju tih puteva u potkožnim tumorima, točnije da terapijski protokol davanja kromolina poboljšava pozitivan imunološki odgovor protiv tumora. To vidimo iz povećane regulacije signalnih puteva vezanih za aktivaciju i proliferaciju T stanica, te njihovu citotoksičnost. Također, vidimo i povećanu regulaciju citotoksičnosti NK stanica (Slika 19b).



Slika 19. Rezultati analize obogaćenja GO bioloških procesa u potkožnim tumorima miševa terapijski tretiranih kromolinom. a) GO analiza koja pokazuje smanjenje obogaćenosti gena signalnih puteva angiogeneze. b) GO analiza obogaćenja imunoloških signalnih puteva. Y osi označavaju diferencijalno obogaćene putove, dok X osi predstavljaju omjer gena. Gradijent boja, od crvene do zelene, označava *P* vrijednost, pri čemu crvena boja označava niže *P* vrijednosti, a zelena boja više *P* vrijednosti. Veličina mjehurića korelira s brojem gena uključenih u svaki put.

Budući da T i NK stanice sudjeluju u posredovanju stanične smrti, napravili smo GO analizu RNA podataka za apoptozu i pokazali povećanu regulaciju apoptotičnih signalnih puteva (Slika 20a). Također smo pokazali i povećanu ekspresiju specifičnih gena vezanih za apoptozu (Slika 20b).



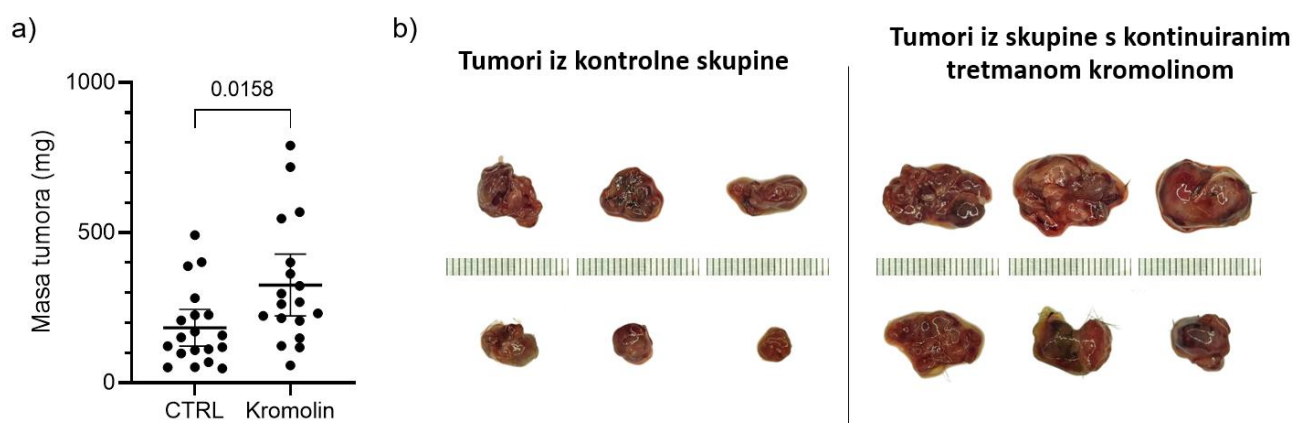
Slika 20. Povećana ekspresija apoptotskih gena u potkožnim tumorima miševa terapijski tretiranih kromolinom. a) GO analiza obogaćenja apoptotskih signalnih puteva. Y os označava diferencijalno obogaćene puteve, dok X os predstavlja omjer gena. Gradijent boja, od crvene do zelene, označava P vrijednost, pri čemu crvena boja označava niže P vrijednosti, a zelena boja više P vrijednosti. Veličina mjehurića korelira s brojem gena uključenih u svaki put. b) Toplinska karta koja prikazuje povećanu ekspresiju pojedinih gena vezanih za apoptozu. Z vrijednost predstavlja broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije.

Svi navedeni rezultati analize RNA sekvenciranja potvrđuju fenotip manje uznapredovalih potkožnih tumora opaženih u miševa s terapijom kromolinom.

4.6. MB49 potkožni tumorski model s kontinuiranim kromolin tretmanom

Nakon što smo pokazali da kromolin ima utjecaja na razvoj tumora mokraćnog mjehura, htjeli smo istražiti učinke kontinuiranog tretmana kromolinom na rak mokraćnog mjehura. U tu svrhu smo dizajnirali protokol kontinuiranog tretmana gdje smo miševima prvo intraperitonealno ubrizgali kromolin, nakon čega smo sljedeći dan potkožno ubrizgali MB49 stanice tumora mokraćnog mjehura. Kromolin smo nastavili davati svaki dan do kraja eksperimenta. Time smo htjeli oponašati situaciju kod ljudi koji su na terapiji kromolinom u vrijeme nastanka tumora. Na taj način smo željeli istražiti imali li kromolin protektivni učinak kod razvoja raka mokraćnog mjehura ili postoji potencijalni rizik povezan s primjenom kromolina u ranom stadiju tumorigeneze.

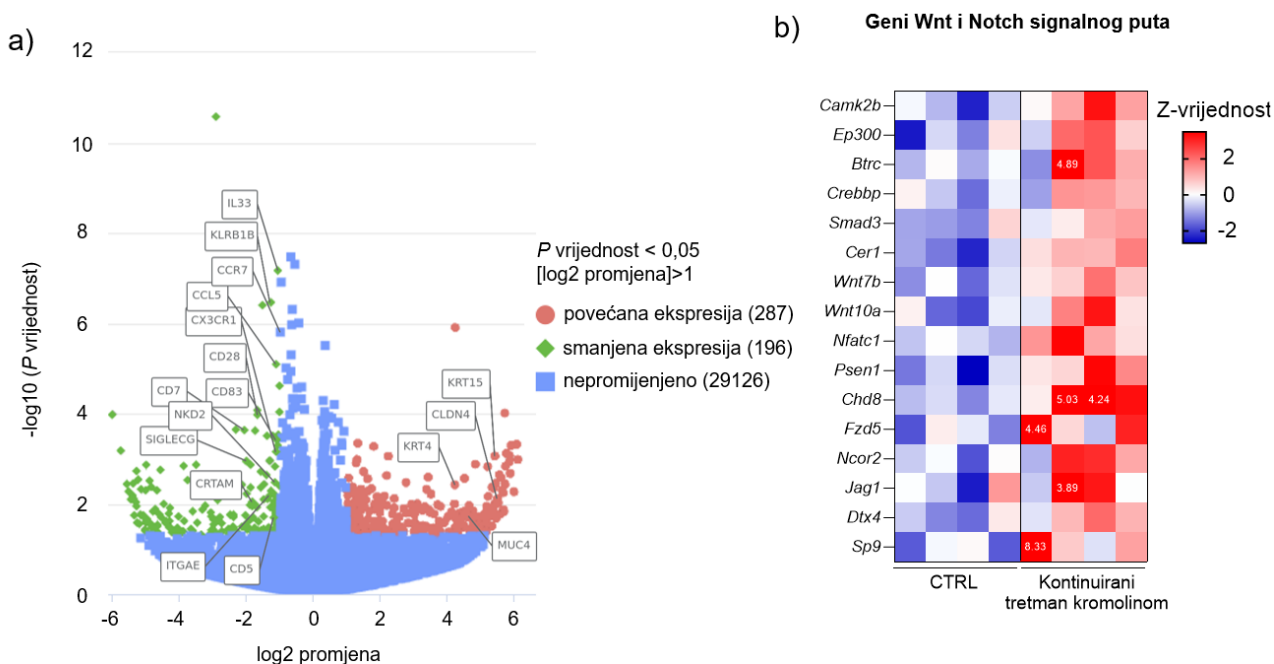
Ovakav protokol kontinuiranog tretmana kromolinom je dao suprotne rezultate od eksperimenata s terapijom kromolinom opisanim u prethodna dva potpoglavlja. Na kraju eksperimenta, tumori u skupini kontinuirano tretiranoj kromolinom su bili teži od tumora u kontrolnoj skupini s prosječnom razlikom od +142,4 mg [95CI +28,42, +256,4], $P = 0,0158$ (Slika 21).



Slika 21. Učinak kontinuiranog tretmana kromolinom na potkožne tumore. a) Grafički prikaz masa potkožnih tumora miševa kontinuirano tretiranih s kromolinom. Student t-test, $P = 0,0158$. b) Slike potkožnih tumora miševa iz kontrolne skupine i skupine kontinuirano tretirane kromolinom. Skala 2 cm.

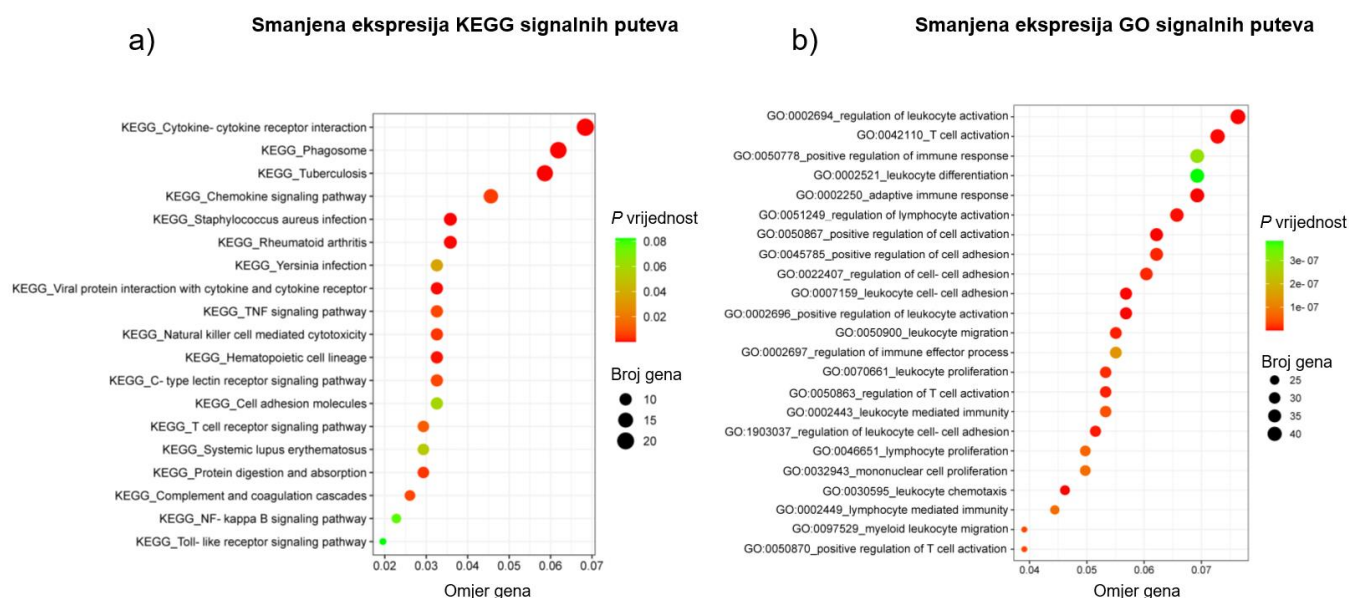
4.7. Analiza RNA sekvenciranja MB49 potkožnih tumora miševa kontinuirano tretiranih kromolinom

Analizirali smo podatke RNA sekvenciranja tumora miševa kontinuirano tretirani kromolinom i identificirali 287 prekomjerno eksprimiranih, te 196 smanjeno eksprimiranih gena, promijenjenih više od dva puta i s P vrijednosti manjom od 0,05 (Slika 22a). Suprotno terapijskom pristupu s kromolinom, kontinuirani tretman je doveo do povećane ekspresije geni povezanih s Wnt i Notch signalnim putevima (Slika 22b).



Slika 22. Diferencijalno promijenjeni geni u potkožnim tumorima miševa kontinuirano tretiranih kromolinom. a) Diferencijano izraženi geni, promijenjeni više od dva puta i s P vrijednosti manjom od 0,05. b) Toplinska karta koja pokazuje sniženu ekspresiju gena Wnt i Notch signalnih puteva. Z vrijednost predstavlja broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije.

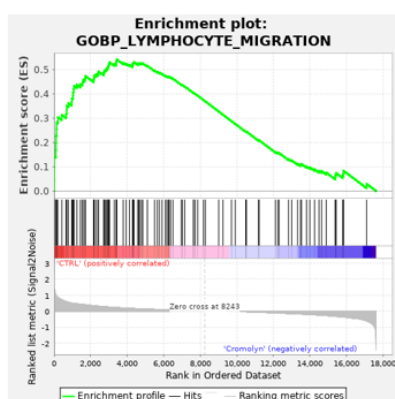
KEGG analizom podataka RNA sekvenciranja smo opazili sniženu regulaciju imunoloških putova (Slika 23a). GO analizom bioloških procesa potvrdili smo te rezultate prikazujući smanjenu ekspresiju gena povezanih s imunološkim odgovorima u miševima kontinuirano tretiranim kromolinom (Slika 23b).



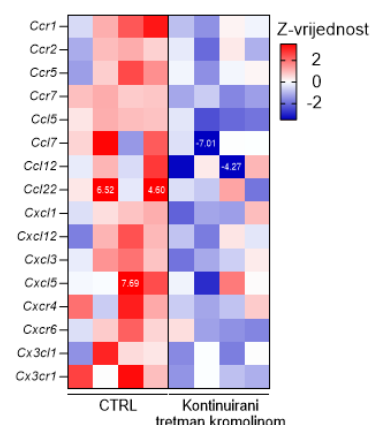
Slika 23. Smanjeni imunološki odgovor u potkožnim tumorima miševa kontinuirano tretiranih kromolinom. a) KEGG analiza obogaćenja imunoloških signalnih puteva. b) GO analiza obogaćenja imunoloških signalnih puteva. Y osi označavaju diferencijalno obogaćene putove, dok X osi predstavljaju omjer gena. Gradijent boja, od crvene do zelene, označava P vrijednost, pri čemu crvena boja označava niže P vrijednosti, a zelena boja više P vrijednosti. Veličina mjehurića korelira s brojem gena uključenih u svaki put.

Pokazali smo i da kontinuirani tretman kromolinom u potkožnim tumorima dovodi do smanjenja migracije limfocita, te smanjenja ekspresije specifičnih kemokina i receptora kemokina ključnih za privlačenje imunoloških stanica (Slika 24a, 24b). Također, primijetili smo i smanjenje obogaćenosti signalnog puta stečenog imunološkog odgovora, te smanjenje ekspresije gena povezanih s odgovorima citotoksičnih T stanica i NK stanica (Slika 24c, 24d).

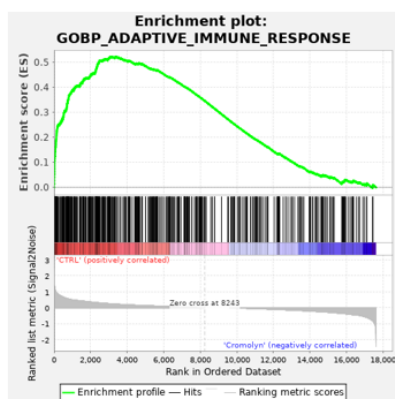
a) Graf obogaćenja GO signalnog puta za migraciju leukocita



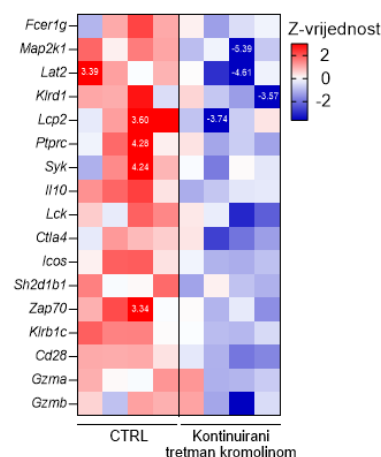
b) Ekspresija gena za kemokine i kemokinske receptore



c) Graf obogaćenja GO signalnog puta za stečeni imunološki odgovor



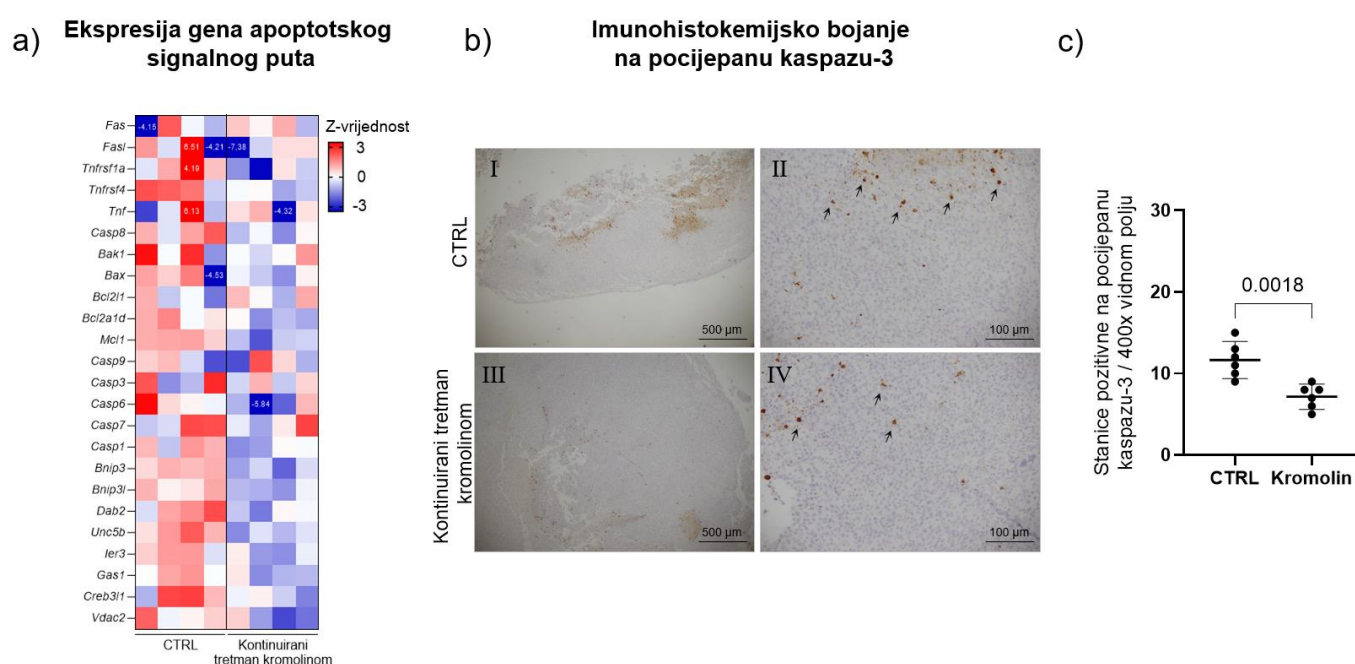
d) Ekspresija gena za odgovor T i NK stanica



Slika 24. Snižena ekspresija gena uključenih u privlačenje leukocita i stečeni imunološki odgovor u potkožnim tumorima miševa kontinuirano tretiranih kromolinom. a) Grafikon obogaćenja signalnog puta za privlačenje leukocita. b) Toplinska karta koja pokazuje sniženu ekspresiju citokina i kemokina za privlačenje imunoloških stanica. c) Grafikon obogaćenja signalnog puta za aktivaciju stečenog imunološkog odgovora. d) Toplinska karta koja pokazuje sniženu ekspresiju gena uključenih u odgovor T i NK stanica. Z vrijednosti predstavljaju broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije.

4.8. Utjecaj kromolin tretmana na apoptozu i nekroptozu u MB49 potkožnim tumorima

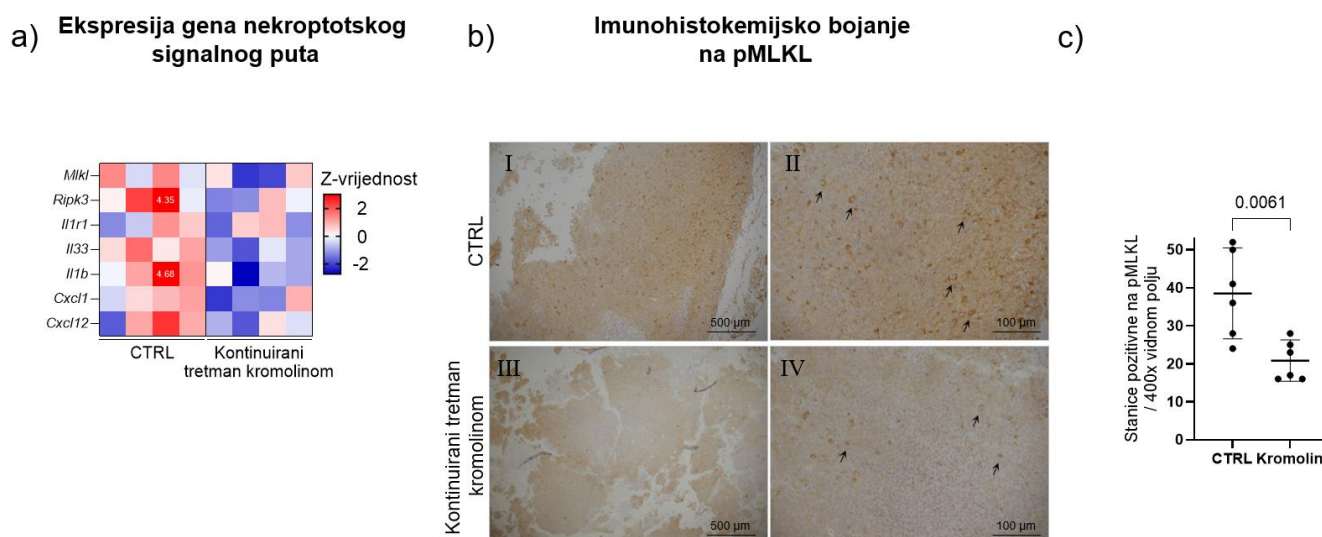
Budući da smo vidjeli smanjenu ekspresiju gena vezanih za odgovor citotoksičnih T stanica i NK stanica, a te stanice su glavni posrednici apoptoze, u sljedećem koraku smo analizirali podatke RNA sekvenciranja na apoptozu. Kao što smo i očekivali, geni povezani s apoptozom su bili smanjeno eksprimirani (Slika 25a). Smanjenje apoptoze u potkožnim tumorima miševa kontinuirano tretiranih kromolinom smo potvrdili imunohistokemijskim bojanjem, koristeći protutijelo za marker apoptoze, pocijepanu kaspazu-3 (Slika 25b). Kvantifikacijom pozitivno obojenih stanica smo pokazali statistički značajno ($P = 0,0018$) smanjenje apoptotičnih stanica (Slika 25c).



Slika 25. Smanjenje apoptoze u potkožnim tumorima miševa kontinuirano tretiranih kromolinom.

a) Toplinska karta koja pokazuje sniženu ekspresiju gena uključenih u apoptotski signalni put. Z vrijednost predstavlja broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije. b) Reprezentativne slike imunohistokemijskog bojanja s markerom apoptoze, pocijepanom kaspazom-3. (I, III) povećanje 40x, skala 500μm, (II, IV) povećanje 200x, skala 100μm. c) Kvantifikacija broja stanica pozitivnih na pocijepanu kaspazu-3.

Osim smanjene apoptoze, isti potkožni tumori iz skupine miševa kontinuirano tretiranih kromolinom su pokazali i smanjenje ekspresije gena ključnih za nekroptozu, kao što su *Ripk3* i *MLKL* (Slika 26a). Imunohistokemijskom analizom, koristeći protutijelo za marker nekroptoze pMLKL, dodatno smo potvrdili rezultat smanjene nekroptoze (Slika 26b). Kvantifikacijom pozitivno obojenih stanica, pokazali smo statistički značajno ($P = 0,0061$) smanjenje nekroptotičnih stanica (Slika 26c).

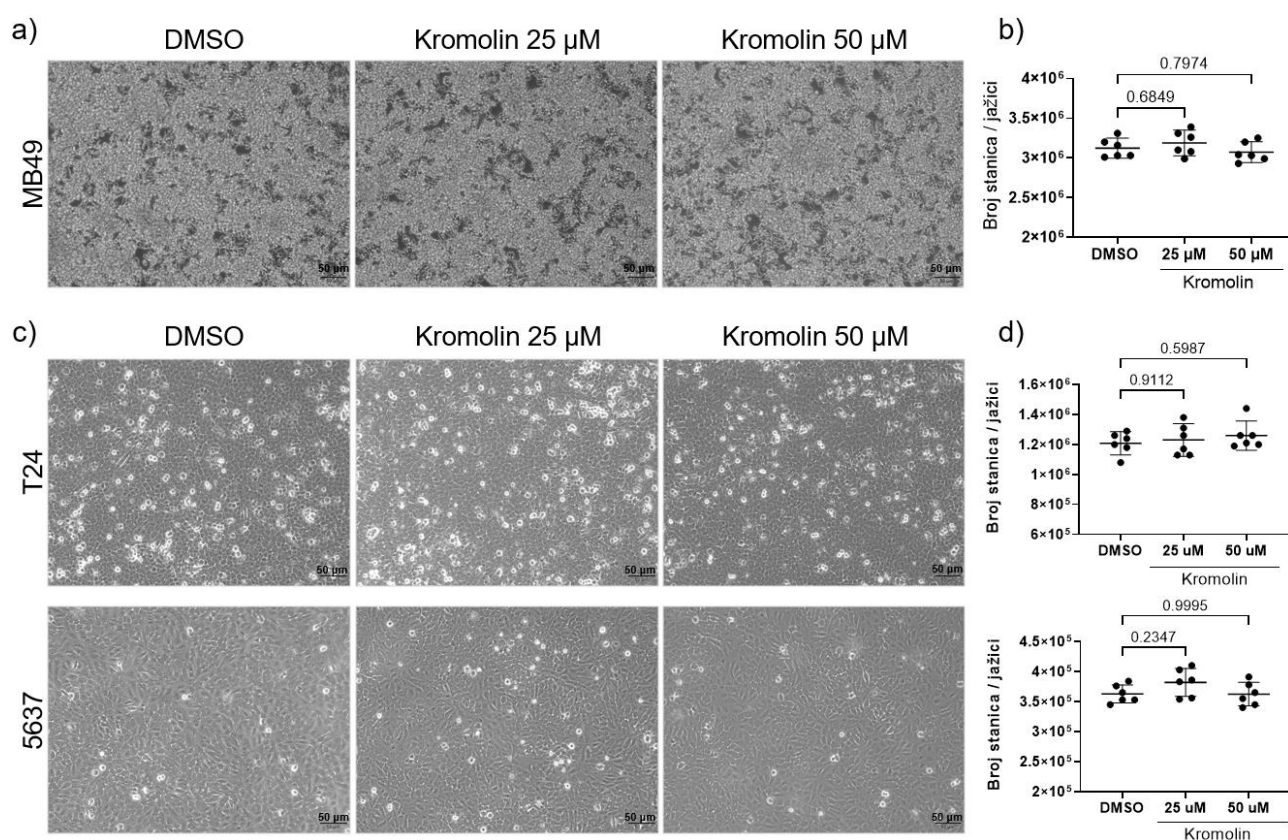


Slika 26. Smanjenje nekroptoze u potkožnim tumorima miševa kontinuirano tretiranih kromolinom.

a) Toplinska karta koja pokazuje sniženu ekspresiju gena povezanih s nekroptozom. Z vrijednost predstavlja broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije. b) Reprezentativne slike imunohistokemijskog bojanja s markerom nekroptoze, pMLKL. (I, III) povećanje 40x, skala 500μm, (II, IV) povećanje 200x, skala 100μm. c) Kvantifikacija broja stanica pozitivnih na pMLKL.

4.9. Utjecaj kromolina na stanične linije tumora mokraćnog mjehura

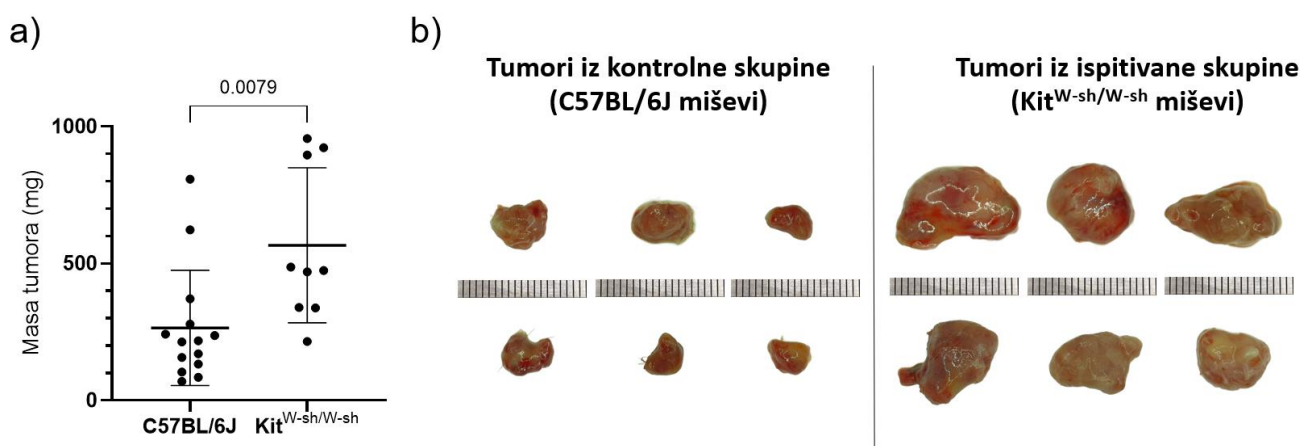
Kako bismo utvrdili utječe li kromolin izravno na vijabilnost MB49 stanične linije tumora mokraćnog mjehura, tretirali smo te stanice izravno s koncentracijama kromolina od 25 μM i 50 μM (Slike 27a, 27c). Brojanjem stanica, pokazali smo da različite testirane koncentracije kromolina nisu utjecale na broj MB49 stanica (Slika 27b). Eksperiment smo ponovili i na ljudskim staničnim linijama tumora mokraćnog mjehura, T24 i 5637, tretirajući ih s istim koncentracijama kromolina. Kao i u eksperimentu s MB49 stanicama, nismo uočili promjene u broju stanica u usporedbi s kontrolom (Slika 27d). Ovim analizama smo pokazali da kromolin nema izravan utjecaj na vijabilnost mišjih i ljudskih staničnih linija raka mokraćnog mjehura.



Slika 27. Utjecaj kromolina na stanične linije tumora mokraćnog mjehura. a) Slike kontrolnih mišjih MB49 stanica tumora mokraćnog mjehura tretiranih s DMSO te stanica tretiranih s kromolinom u koncentraciji od 25 i 50 μM . b) Kvantifikacija MB49 stanica. c) Slike kontrolnih ljudskih T24 i 5637 stanica tumora mokraćnog mjehura tretiranih s DMSO te stanica tretiranih s kromolinom u koncentraciji od 25 i 50 μM . d) Kvantifikacija T24 i 5637 stanica. (a, c) povećanje 400x, skala 50 μm .

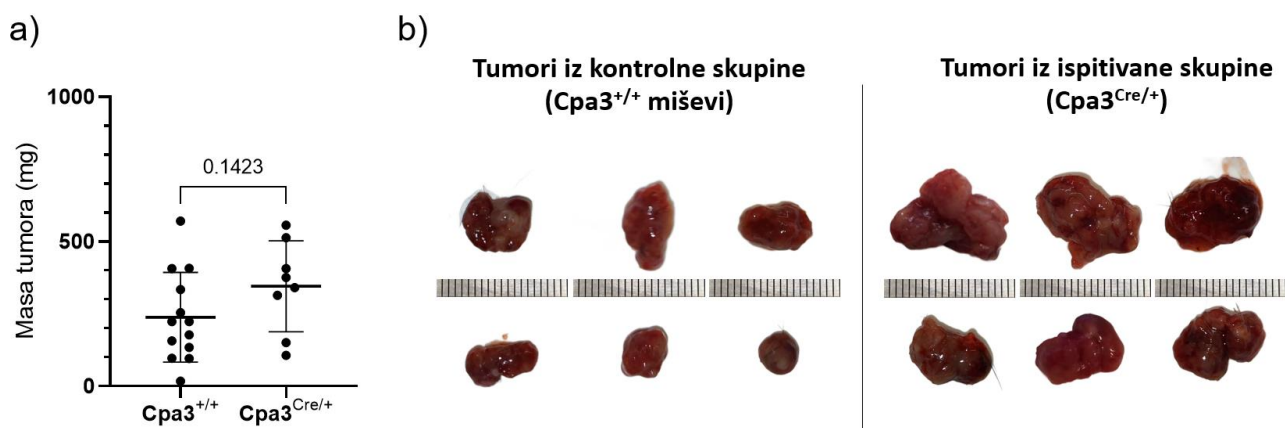
4.10. Utjecaj potpunog nedostatka mastocita na razvoj MB49 potkožnih tumora

Utjecaj stabilizacije mastocita na razvoj tumora mokraćnog mjehura smo prvo istražili koristeći lijek kromolin u BBN tumorskom modelu, a zatim u potkožnom tumorskom modelu s MB49 tumorskim stanicama. U eksperimentu s kontinuiranom terapijom kromolinom u potkožnom tumorskom modelu smo inhibirali mastocite prije i tijekom formiranja tumora. Kako bi detaljnije istražili ulogu mastocita u razvoju tumora, te procijenili jesu li učinci kromolina isključivo posljedica stabilizacije mastocita ili uključuju i druge mehanizme, ponovno smo proveli singenični potkožni tumorski model koristeći sojeve miševa s nedostatkom mastocita, $Cpa3^{Cre/+}$ i $Kit^{W-sh/W-sh}$. Na kraju eksperimenta smo izvagali tumore i pokazali veće tumorsko opterećenje kod $Kit^{W-sh/W-sh}$ miševa s nedostatkom mastocita, s razlikom u masi od +301,7 mg [95CI +87,99, +515,4], $P = 0,0079$ (Slika 28).



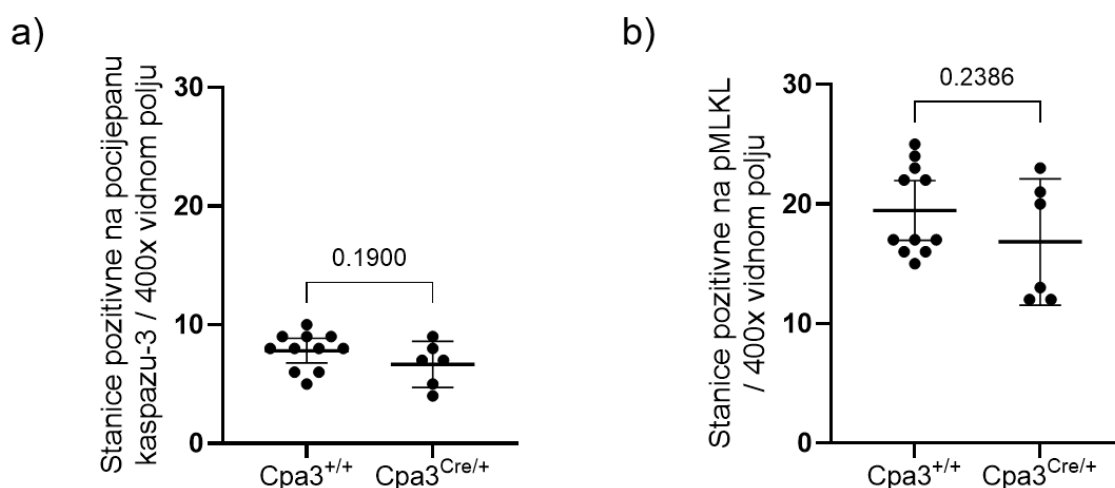
Slika 28. Utjecaj nedostatka mastocita u $Kit^{W-sh/W-sh}$ miševa na MB49 potkožne tumore. a) Grafički prikaz masa potkožnih tumora. Student t-test, $P = 0,0158$. b) Slike potkožnih tumora kontrolnih i $Kit^{W-sh/W-sh}$ miševa. Skala 2 cm.

Kod $Cpa3^{Cre/+}$ miševa s nedostatkom mastocita, zapazili smo samo blagi porast tumorskog opterećenja u usporedbi s kontrolom, s razlikom u masi od +107,2 mg [95CI -39,37, +253,57], $P = 0,1423$ (Slika 29).



Slika 29. Utjecaj nedostatka mastocita u $Cpa3^{Cre/+}$ miševa na MB49 potkožne tumore. a) Grafički prikaz masa potkožnih tumora. Student t-test, $P = 0,0158$. b) Slike potkožnih tumora kontrolnih i $Cpa3^{Cre/+}$ miševa. Skala 2 cm.

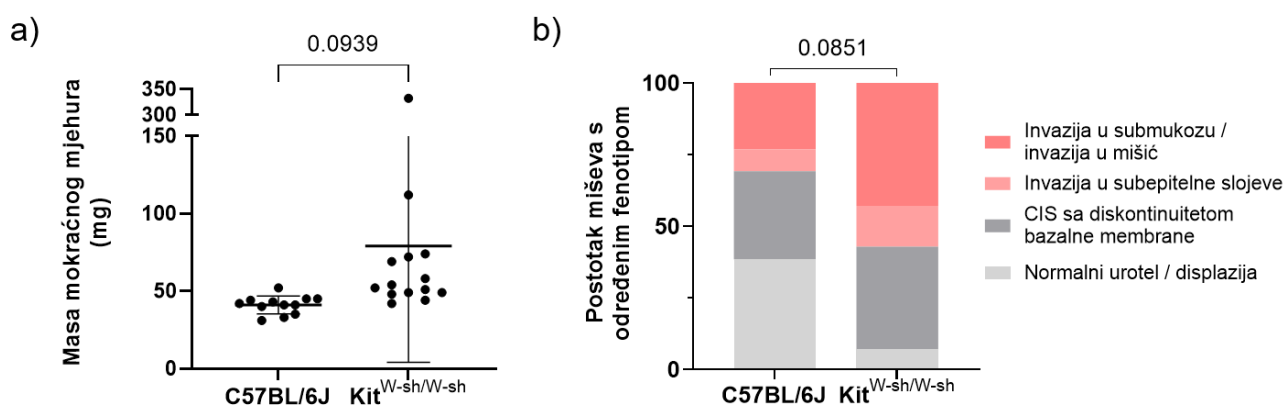
Potkožne tumore miševa bez mastocita smo zatim analizirali na apoptozu i nekroptozu, koristeći imunohistokemiju i protutijela za pocijepanu kaspazu-3 i pMLKL. Kvantifikacijom stanica smo primijetili manji broj stanica pozitivnih na markere aktivirane apoptoze i nekroptoze, iako te razlike nisu bile statistički značajne (Slika 30).



Slika 30. Utjecaj nedostatka mastocita u $Cpa3^{Cre/+}$ miševa na apoptozu i nekroptozu u MB49 potkožnim tumorima. a) Kvantifikacija broja stanica pozitivnih na marker apoptoze, pocijepanu kaspazu-3. b) Kvantifikacija broja stanica pozitivnih na marker nekroptoze, pMLKL.

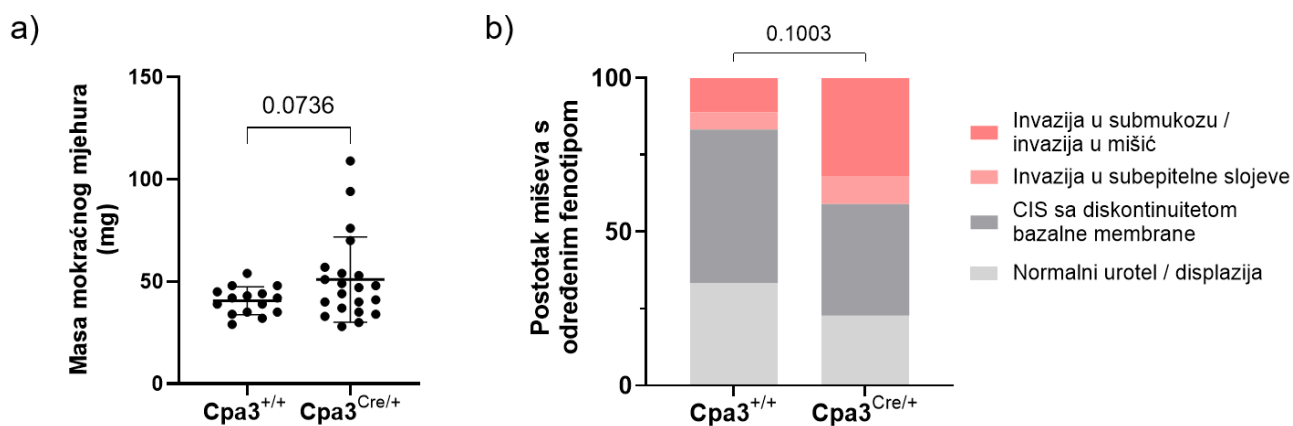
4.11. Model tumora mokraćnog mjehura uzrokovanog BBN-om u miševa s nedostatkom mastocita

Potpuni nedostatak mastocita na razvoj tumora mokraćnog mjehura smo istražili i koristeći BBN tumorski model mokraćnog mjehura. Analizom tumorskih masa na kraju eksperimenta, primijetili smo veću masu mokraćnih mjehura u $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ miševa, iako ta razlika nije dosegla statističku značajnost ($P = 0,0939$) (Slika 31a). Patohistološkom analizom fenotipa mokraćnih mjehura, pokazali smo veći broj invazivnih tumora u $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ miševa, iako taj broj nije rezultirao statistički značajnom P vrijednosti ($P = 0,0851$) (Slika 31b).



Slika 31. Utjecaj nedostatka mastocita u $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ miševa na masu i fenotip mokraćnih mjehura u BBN induciranom tumorskom modelu. a) Grafički prikaz masa mokraćnih mjehura na kraju BBN eksperimenta. Student t-test, $P = 0,0939$. b) Prikaz fenotipskih razlika u $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ miševa s nedostatkom mastocita, u usporedbi s kontrolnim miševima. Mann-Whitney U test, $P = 0,0851$.

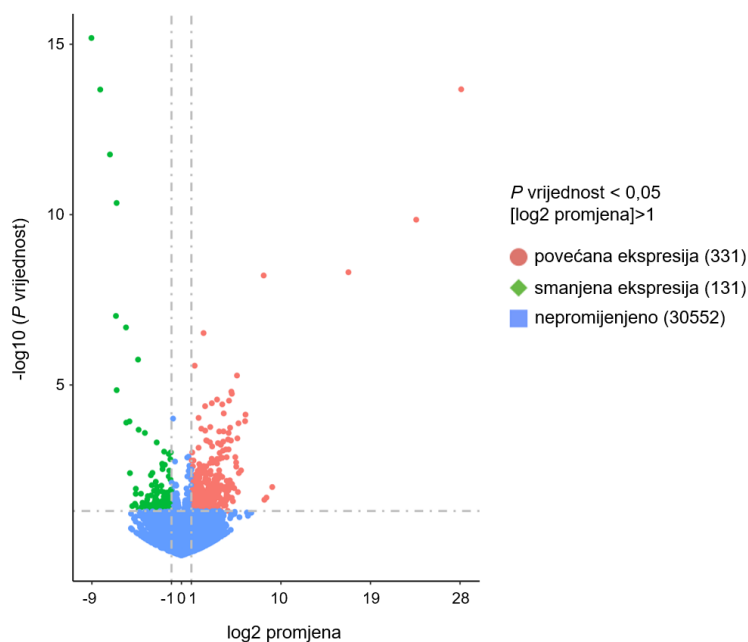
Analizom masa mokraćnih mjehura u $\text{Cpa3}^{\text{Cre/+}}$ miševa smo pokazali istu tendenciju kao i u $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ miševa, odnosno $\text{Cpa3}^{\text{Cre/+}}$ miševi su imali veću masu mokraćnih mjehura, ali s P vrijednošću od 0,0736 (Slika 32a). Patohistološkom analizom fenotipa, pokazali smo naprednije stadije raka mokraćnog mjehura u $\text{Cpa3}^{\text{Cre/+}}$ miševa, iako ta razlika nije bila statistički značajna ($P = 0,1003$) (Slika 32b).



Slika 32. Utjecaj nedostatka mastocita u $Cpa3^{Cre/+}$ miševa na masu i fenotip mokraćnih mjehura u BBN induciranom tumorskom modelu. a) Grafički prikaz masa mokraćnih mjehura na kraju BBN eksperimenta. Student t-test, $P = 0,0736$. b) Prikaz fenotipskih razlika u $Cpa3^{Cre/+}$ miševa s nedostatkom mastocita, u usporedbi s kontrolnim miševima. Mann-Whitney U test, $P = 0,1003$.

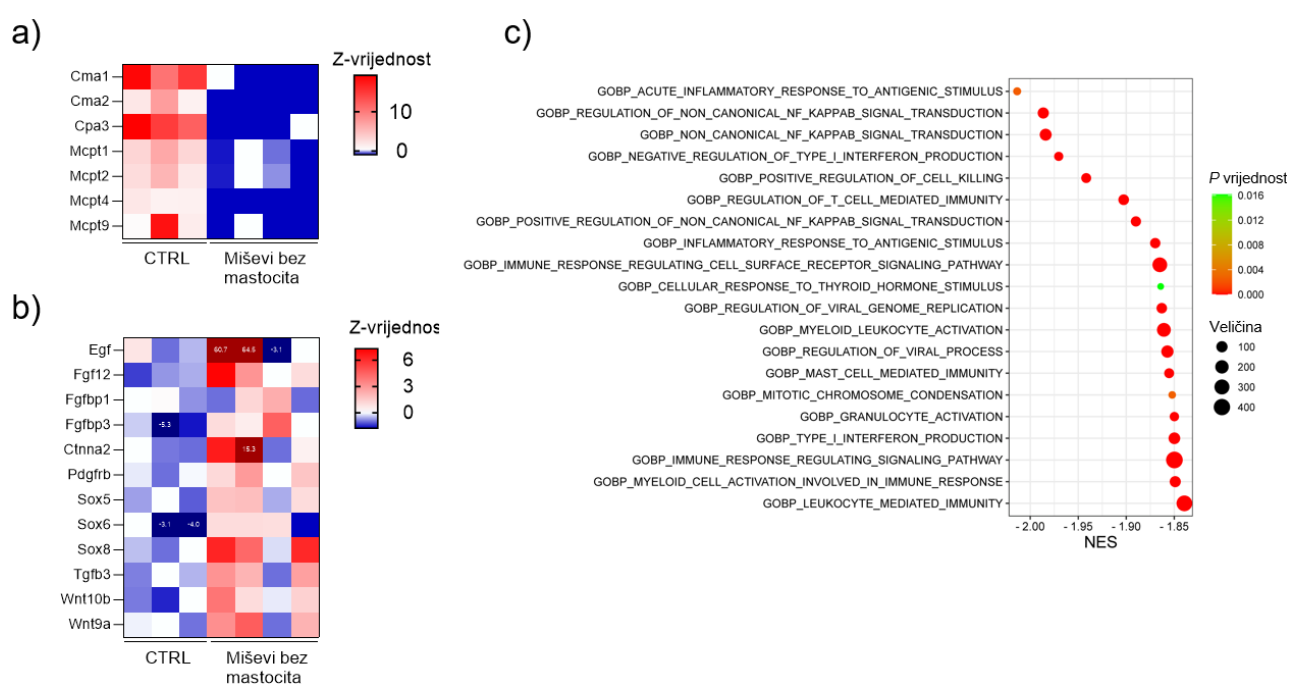
4.12. Analiza podataka RNA sekvenciranja mokraćnih mjehura miševa s nedostatkom mastocita nakon BBN tretmana

Analizom podataka RNA sekvenciranja smo pokazali 331 prekomjerno eksprimiranih i 131 smanjeno eksprimiranih gena s promjenom većom od dva puta i P vrijednošću manjom od 0,05, u mokraćnim mjehurima s invazivnim tumorima kod $Cpa3^{Cre/+}$ miševa (Slika 33).



Slika 33. Diferencijalna ekspresija gena u mokraćnim mjehurima s invazivnim tumorima kod $Cpa3^{Cre/+}$ miševa. Diferencijalno izraženi geni, promijenjeni više od dva puta i s P vrijednosti manjom od 0,05.

Kako bi potvrdili fenotip miševa s nedostatkom mastocita, analizirali smo mokraćne mjehure $Cpa3^{Cre/+}$ miševa na ekspresiju specifičnih proteaza mastocita, pokazujući njihovu odsutnost (Slika 34a). Analizom podataka RNA sekvenciranja smo također primijetili povećanu ekspresiju gena povezanih s rakom mokraćnog mjehura, uključujući faktore rasta (*Egf*, *Fgf12*, *Fgfbp1*, *Fgfbp3*, *Pdgfrb*), gene uključene u embrionalni razvoj (*Sox5*, *Sox6*, *Sox8*) i gene koji su dio Wnt signalnog puta (*Wnt9a*, *Wnt10b*) (Slika 34b). Također, na istim podacima smo napravili analizu obogaćivanja GO bioloških procesa i pokazali smanjenu regulaciju signalnih puteva uključenih u upalni odgovor (Slika 34c).



Slika 34. Analiza promijenjenih gena u $Cpa3^{Cre/+}$ miševa tretiranih BBN-om. a) Toplinska karta koja prikazuje smanjenu gensku ekspresiju proteaza specifičnih za mastocite. b) Povećana ekspresija gena povezanih s razvojem raka, prikazana u obliku toplinske karte. Z vrijednost predstavlja broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije. c) Analiza GO bioloških procesa koja pokazuje smanjenje obogaćenosti imunoloških signalnih puteva. Y os označava diferencijalno obogaćene puteve, dok X os predstavlja NES. Gradijent boja, od crvene do zelene, označava P vrijednost, pri čemu crvena boja označava niže P vrijednosti, a zelena boja više P vrijednosti. Veličina mjehurića korelira s brojem gena uključenih u svaki put.

Tumor mokraćnog mjehura ima visoku prevalenciju, uzrok je značajnog morbiditeta i smrtnosti, te predstavlja značajan ekonomski teret zbog česte rekurencije i potrebnih kontrola (3). Uz značajan komorbiditet cistektomije, MIBC ima petogodišnje preživljenje manje od 50%, što dovodi do potrebe za pronalaskom novih pristupa liječenju (19). U ovom istraživanju smo u tu svrhu proučili utjecaj mastocita i lijeka kromolina na razvoj i napredovanje tumora mokraćnog mjehura. Prvo smo htjeli vidjeti da li razvoj tumora mokraćnog mjehura utječe na broj i aktivaciju mastocita. Pokazali smo da se broj mastocita povećava s napredovanjem tumora, te da mastociti mijenjaju svoju lokaciju, dolazeći bliže malignim promjenama (Slika 11). Istraživanja potvrđuju taj rezultat, opisujući promjene u broju i lokalizaciji mastocita u različitim tumorima. Ovisno o vrsti raka i njihovoj lokaciji, mijenja se njihovo prognostičko značenje. Peritumoralnu lokalizaciju često povezuju s lošim ishodima, dok intratumoralni mastociti mogu ukazivati na dobru ili lošu prognozu (38,42). Specifično u tumoru mokraćnog mjehura kod ljudi, literatura pokazuje veće nakupljanje mastocita u CIS-u, u usporedbi s uznapredovalim tumorima (T1, T2) (40). Također, pacijenti s većom infiltracijom mastocita u stromi su imali lošije ukupno preživljenje, te kraće preživljenje bez recidiva (62). Analizom podataka RNA sekvenciranja smo pokazali i da tumori uzrokovani BBN tretmanom imaju povećanu ekspresiju proteaza specifičnih za mastocite (Slika 13e). Taj rezultat može indicirati povećanu aktivnost mastocita ili njihov povećan broj, budući da su navedene proteaze markeri mastocita, visoko eksprimirani u normalnim uvjetima (63). Najveći broj mastocita smo ipak vidjeli u stadiju invazije u subepitelno vezivno tkivo, dok je broj mastocita u naprednijim stadijima bio malo manji. To možemo objasniti preko drugog rezultata, gdje smo pokazali da se broj degranuliranih mastocita povećava s napredovanjem tumora, te da su intratumoralni mastociti potpuno degranulirani (Slika 13d). Naime, vizualizacija mastocita se temelji na vezivanju boje ili protutijela na komponente granula. Ako su mastociti potpuno degranulirani, boja ili protutijelo se nema na što vezati i takav mastocit se ne može vizualizirati. U literaturi je ultrastrukturnom analizom potvrđeno da degranulirani mastociti mogu biti prisutni bez pozitivnog toluidin bojanja. Takve mastocite su nazvali „fantomski mastociti“ (64). Povećana degranulacija mastocita u tumorima je također opisana i u istraživanju raka pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*), gdje su veći broj degranuliranih mastocita povezali s boljim preživljenjem (65).

Budući da su mastociti glavni medijatori simptoma alergija, njihovu aktivnost smo modulirali koristeći antialergijski lijek kromolin. Prvo smo ispitali njegovo djelovanje u BBN modelu tumora mokraćnog mjehura, tretirajući miševe s kromolinom zadnja četiri tjedna eksperimenta (Slika 7). Miševi tretirani s kromolinom su imali manju masu i bolji fenotip, iako te razlike nisu bile statistički značajne ($P = 0,1242$ i $P = 0,2538$) (Slika 14a, 14b). Zatim smo djelovanje kromolina ispitali na modelu potkožnih tumora koristeći MB49 mišje stanice tumora mokraćnog mjehura. Terapiju

kromolinom smo započeli sedmi dan nakon inokulacije tumorskih stanica i pokazali da miševi tretirani kromolinom imaju tendenciju manje mase ($P = 0,0858$) (Slika 15). Ova dva navedena eksperimenta sugeriraju povoljan utjecaj kromolina, odnosno stabilizacije mastocita na tumor mokraćnog mjehura. Slično našem istraživanju, u literaturi se opisuju pozitivni učinci kromolina na druge tumorske modele. U eksperimentu s potkožnim tumorom raka debelog crijeva na miševima, pokazano je da kromolin može smanjiti masu i volumen tumora, iako ta razlika nije bila statistički značajna u usporedbi s kemoterapeutskom intervencijom s doksorubicinom (66). Literatura potvrđuje sličan ishod i u potkožnom tumorskom modelu raka želuca u NOD / SCID miševa. Nakon što su se tumori formirali, istodobna primjena kromolina i mastocita iz koštane srži je rezultirala smanjenim volumenom tumora i usporenom progresijom bolesti (67). Slično je opisano i u miševa s ubrizganim stanicama ekstrahepatičnog bilijarnog raka. Primjena kromolina u stadiju kada su se tumori već formirali je dovela do usporenog rasta, odnosno manjih veličina tumora usred eksperimenta. Međutim, na kraju eksperimenta nije bilo razlike (68). Analizom obogaćenja *Hallmark* setova gena smo pokazali da je terapija kromolinom dovela do povećanog protutumorskog odgovora u potkožnim tumorima (Slika 17). To vidimo iz povišenja interferon alfa ($IFN-\alpha$) i interferon gama ($IFN-\gamma$) odgovora, oba koja se povezuju s protutumorskim imunološkim odgovorom (29,30). $IFN-\alpha$ ima citotoksične i protuproliferativne učinke i koristi se kao alternativni tretman za pacijente koji ne odgovaraju na BCG terapiju (69). $IFN-\gamma$ sprječava razvoj i napredovanje tumora, a visoke razine $IFN-\gamma$ koreliraju sa smanjenom smrtnosti u pacijenata s rakom mokraćnog mjehura, naročito MIBC-a (70). Nadalje, blokiranje aktivacije mastocita kromolinom je u istim tumorima dovela do snižene regulacije prijelaza epitela u mezenhim, procesa uključenog u progresiju i metastaziranje tumora (44). U literaturi je sugerirano da kromolin smanjuje EMT blokiranjem otpuštanja histamina iz mastocita (68). Analizom GO bioloških procesa smo također pokazali smanjenu regulaciju Wnt i Notch signalnih puteva u potkožnim tumorima miševa tretiranih kromolinom, što korelira s boljim fenotipom (Slika 18a). Wnt signalni put je kritičan za održavanje homeostaze tkiva i regulaciju matičnih stanica i njihove diferencijacije (71). Literatura implicira da disregulacija Wnt / β -katenin puta stvara matične stanice raka (engl. *cancer stemm cells*, CSC) iz ranih stanica raka mokraćnog mjehura. Također, disregulacija tog puta pridonosi otpornosti na kemoterapiju u ljudskim stanicama raka mokraćnog mjehura (72,73). U literaturi, terapija kromolinom, isključivo u obliku kitozan nanočestica, je u štakora s kolorektalnim karcinomom dovela do smanjenja proteina β -katenina, dijela Wnt signalnog puta (74). Notch signalni put je uključen u regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i homeostaze tkiva (75). U raku mokraćnog mjehura, Notch signalizacija ima nerazjašnjenu ulogu, odnosno može biti i tumor supresor i onkogen (76). Istraživanje iz 2024. je povezalo povećanu ekspresiju Notch receptora (*NOTCH3*) s gorom prognozom pacijenata oboljelih

od tumora mokraćnog mjehura, te su pokazali da njegova inhibicija smanjuje masu potkožnih tumora ljudskih staničnih linija tumora mokraćnog mjehura (T24 i 5637), te sprječava njihovo metastaziranje (77). KEGG analizom smo pokazali smanjenju obogaćenost drugih protumorskih puteva, uključujući i MAPK signalni put, koji kada je pojačano aktiviran, u kombinaciji s aktiviranim Notch signalnim putem, karakterizira visoko agresivne tumore mokraćnog mjehura (77). Analizom bioloških procesa prema GO, pokazali smo smanjeno obogaćenje signalnih puteva povezanih s angiogeneom, posebno smanjene puta pupajuće angiogeneze (Slika 19a). Smanjeno stvaranje novih krvnih žila dovodi do slabije opskrbe tumora kisikom i hranjivim tvarima, što usporava njegovo napredovanje, te je u skladu s našim rezultatima boljeg fenotipa miševa terapijski tretiranih s kromolinom. Literatura potvrđuje ovu povezanost, ističući mastocyte kao ključne pokretače angiogeneze, koju potiču putem izlučivanja različitih molekula, uključujući VEGFA, histamina i proteaza specifičnih za mastocyte. (42,78). U ljudskim tumorima mokraćnog mjehura, pokazana je korelacija između gustoće mastocita i gustoće mikrovaskularne mreže (79). Ta ista poveznica je potvrđena i u drugim vrstama tumora, poput ljudskog raka pluća nemalih stanica (80). Poboljšani fenotip se može objasniti i povećanim obogaćenjem imunoloških puteva vezanih za citotoksičnost NK stanica i aktivaciju T stanica, kao što smo pokazali GO analizom podataka RNA sekvenciranja (Slika 19b). U literaturi se opisuje složen odnos između mastocita i NK stanica, gdje se napominje da mastociti mogu imati različite učinke na NK stanice, ovisno o njihovim aktivacijskim signalima. Jedan od protumorskih učinaka mastocita je otpuštanje adenoizina, koji inhibira NK stanice da proizvode IFN- γ (81). Također smo pokazali obogaćenje apoptotskih signalnih puteva, kao i povećanu ekspresiju apoptotskih gena, što se slaže s prikazanom povećanom aktivnosti NK i T stanica, budući da su te stanice jedne od glavnih posrednika apoptoze (82). Literatura potvrđuje naše rezultate povećane apoptoze terapijom kromolinom, opisujući povećanje markera apoptoze BAX u *in vivo* modelu ligacije žučnih vodova (83). Inhibirajući mastocyte kromolin terapijom, u miševa s potkožnim tumorima smo pokazali obogaćenja setova gena protutumorskog imunološkog odgovora, smanjene protumorskih signalnih puteva uz smanjenje EMT-a i angiogeneze, te povećanje apoptoze, što upućuje na to da mastociti usvajaju protumorski fenotip u kasnijim stadijima razvoja tumora, fenotip koji smo uspješno blokirali kromolin terapijom.

Koristeći isti potkožni tumorski model mokraćnog mjehura ali mijenjajući protokol davanja kromolina, dobili smo suprotne rezultate. Kontinuiran tretman kromolinom, započet prije inokulacije MB49 tumorskih stanica je rezultirao većim tumorskim opterećenjem (Slika 21). Gori fenotip se dijelom može objasniti pronađenom smanjenom ekspresijom gena uključenih u privlačenje imunološkog sustava (*Il33*, *Klrb1*, *Ccr7*, *Ccl5*, *Cx3cr1*), budući da je učinkovita aktivacija imunološkog sustava ključna za eradikaciju tumora u ranim fazama (Slika 22a) (84–89). Analizom

smo također pokazali povećanu ekspresiju *Krt4* i *Krt15*, markera povezanih s manje diferenciranim tumorima (90,91). *KRT4* je visoko eksprimiran u skvamoznom tumoru mokraćnog mjehura, povezanom s lošom prognozom (90). Također smo primijetili povećanu ekspresiju *Muc4*, gena za transmembranski mucin povezan s metastatskim urotelnim karcinomom, te povećanu ekspresiju *Cldn4*, markera invazivnih urotelnih karcinoma visokog gradusa (92,93). Također smo pokazali smanjenu ekspresiju gena povezanih s Wnt i Notch signalnim putevima što odgovara primijećenom gore fenotipu. Daljnjom analizom bioloških procesa prema GO i KEGG, pokazali smo neadekvatan imunološki odgovor u modelu kontinuiranog tretmana kromolinom (Slika 23). Također, pokazali smo smanjenu ekspresiju specifičnih gena uključenih u proces migracije leukocita, te gena uključenih u odgovor T i NK stanica. Slijedom toga, analizirali smo uzorke potkožnih tumora miševa kontinuirano tretiranih s kromolinom na apoptozu i nekroptozu. Analizom podataka RNA sekvenciranja smo pokazali smanjenu ekspresiju gena uključenih u signalni put apoptoze, što smo dodatno potvrdili imunohistokemijom (Slika 25).

Iste uzorke smo dalje analizirali na drugi tip stanične smrti, nekroptozu. Iz analize podataka RNA sekvenciranja smo pokazali smanjenu ekspresiju gena vezanih za nekroptozu (Slika 26a). Budući da je nekroptozu imunogena stanična smrt, sa smanjenjem glavnih efektor nekroptoze *Mkl1* i *Ripk3*, vidimo i smanjenje ekspresije proupalnih citokina *Il1b* i *Il33*, te interleukin receptora *Il1r1*. Nekroptozu uzrokuje otpuštanje DAMP-ova (engl. *damage-associated molecular patterns*) i proupalnih citokina i kemokina, poput *CXCL1* i *CXCL12* čija je ekspresija snižena u tumorima miševa kontinuirano tretiranih s kromolinom (94,95). Smanjenje nekroptoze smo potvrdili i imunohistokemijom (Slika 26b, 26c).

U literaturi, utjecaj kromolina je istražen *in vitro* na različitim staničnim linijama raka, gdje se pokazalo da smanjuje vijabilnost stanica, inhibira proliferaciju i potiče apoptozu (96). Kromolin je također pokazao veću selektivnost od kemoterapijskog lijeka doksorubicina u tretiranju stanica raka debelog crijeva, gdje je inducirao apoptozu u stanicama raka, bez štetnog djelovanja na zdrave stanice (66). Da bi potvrdili da dobiveni rezultati nisu rezultat direktnog utjecaja kromolina na tumorske stanice, tretirali smo tumorske stanice mokraćnog mjehura s kromolinom i pokazali izostanak direktnog utjecaja kromolina. Taj podatak pokazuje da kromolin utječe na tumor modulirajući tumorski mikrookoliš (Slika 27).

Da bi provjerili je li kromolin djeluje preko mastocita ili utječe i na druge komponente tumorskog mikrookoliša, ponovili smo eksperimente na miševima bez mastocita. U potkožnom modelu mokraćnog tumora, *Kit^{W-sh/W-sh}* miševi su imali značajno veće tumorsko opterećenje (Slika 28). Isti eksperiment na *Cpa3^{Cre/+}* miševima je pokazao tendenciju većeg tumorskog opterećenja, bez

statističke značajnosti ($P = 0,1003$). Ova razlika između dva soja miševa bez mastocita se može pripisati komorbiditetu Kit^{W-sh/W-sh} soja. (97) Potkožne tumore Cpa3^{Cre/+} miševa i njihovih Cpa3^{+/+} kontrola smo imunohistokemijski analizirali na apoptozu i nekroptozu. Pokazali smo smanjenje apoptoze i nekroptoze iako razlika nije bila statistički značajna ($P = 0,1900$ i $P = 0,2386$) (Slika 30). Ovi rezultati se slažu s podacima dobivenim kontinuiranim protokolom davanja kromolina, gdje slično kao i u miševima bez mastocita, imamo izostanak aktivacije mastocita od početka i posljedično gori fenotip. U literaturi je pokazano da mastociti imaju nepovoljan učinak na razvoj potkožnih tumora. Miševi s inokuliranim T24 ljudskim stanicama raka mokraćnog mjehura i HMC-1 (engl. *human mast cell*) mastocitima su imali značajno veće tumore nego miševi inokulirani samo s T24, bez mastocita (98). Iako eksperimenti kontinuiranog tretmana kromolinom i eksperimenti na miševima bez mastocita idu u istom smjeru, u miševa bez mastocita je gori fenotip manje izražen. Razlog tomu može biti utjecaj kromolina na druge komponente tumorskog mikrookoliša, kao što je pokazano u literaturi (50,99,100). U istraživanju koje je analiziralo imunomodulatorne učinke mastocita *in vitro*, utvrđeno je da kromolin različito djeluje na ljudske i mišje mastocite. Također, studija je sugerirala da kromolin može utjecati i na druge imunološke stanice, poput NK stanica i eozinofila, naglašavajući njegov potencijalno širi učinak na imunološki sustav (100).

Također smo proveli eksperimente s BBN modelom tumora mokraćnog mjehura na miševima bez mastocita. U oba soja, Kit^{W-sh/W-sh} i Cpa3^{Cre/+}, pokazali smo veću masu mokraćnih mjehura, kao i veći broj invazivnih tumora, iako te razlike nisu dosegle statističku značajnost (Slike 31, 32). U literaturi, Cpa3^{Cre/+} miševi su imali gori fenotip u melanomu, dok su u adenokarcinomu pluća imali bolji fenotip. Kit^{W-sh/W-sh} miševi također imaju različite ishode u različitim tumorskim modelima, odnosno imaju gori fenotip u tumoru crijeva i bolji fenotip u tumoru gušterače, dojke i želuca (38). Analizom podataka RNA sekvenciranja smo potvrdili fenotip miševa bez mastocita, pokazujući smanjenu ekspresiju proteaza specifičnih za mastocite. Također, pokazali smo povećanu ekspresiju gena povezanih s rakom (Slika 34b). Čimbenici rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factors*, FGF) imaju ključnu ulogu u staničnom rastu, preživljavanju, diferencijaciji i angiogenezi, čime mogu utjecati na preživljavanje i progresiju tumora. U literaturi su povećane razine FGF-a povezane s povećanom invazivnošću kod različitih vrsta raka (101). U Cpa3^{Cre/+} miševa vidimo povećanu ekspresiju vezujućih proteina faktora rasta fibroblasta (*Fgfbp1* i *Fgfbp3*), za koje je u literaturi pokazano da potiču invazivnost tumora (102). Pokazali smo i povećanu ekspresiju *Pdgfrb*, koji je pokazan kao dobar potencijalni biomarker za recidive kod NMIBC (103). U Cpa3^{Cre/+} miševa smo primijetili i povećanu ekspresiju Sox gena, posebno Sox5, Sox6 i Sox8. Sox geni su bitni za embrionalni razvoj i diferencijaciju stanica, a njihov povećana ekspresija je povezana s lošom prognozom u raznim vrstama raka. U ljudskim uzorcima tumora mokraćnog mjehura zabilježene su

povećane ekspresije *SOX2*, *SOX4* i *SOX10*. Ta skupina gena je regulirana *Wnt* signalizacijom, što se slaže s našim rezultatima budući da vidimo i povećanu ekspresiju *Wnt9a* i *Wnt10b* (71). Nadalje, vidimo povećanu ekspresiju *Tgfb3*, citokina koji ima dvojnu ulogu u tumoru mokraćnog mjehura, a nalazi se povećano eksprimiran u invazivnim ljudskim tumorima mokraćnog mjehura. Također, *TGFB3* pospješuje rast i povećava mobilnost i invazivnost T24 stanica ljudskog raka mokraćnog mjehura (104). U BBN modelu mokraćnog tumora, TGF- β djeluje protumorski, potičući EMT, progresiju tumora i stvaranje CSC (105). Navedeni geni kolektivno potiču proliferaciju i invaziju tumora i pokazuju agresivniji, manje diferencirani fenotip karcinoma mokraćnog mjehura, dok potiču stvaranje CSC-a, što je u skladu s opaženim pogoršanim fenotipom. Analizom bioloških procesa prema GO, pokazali smo i smanjenje obogaćenosti puteva vezanih za upalu u *Cpa3^{Cre/+}* miševa, što se slaže s rezultatima potkožnih tumorskih eksperimentima s kontinuiranom terapijom kromolinom.

Ovim istraživanjem smo pokazali da mastociti utječu na rast i razvoj tumora mokraćnog mjehura i da se njihova uloga mijenja ovisno o stadiju tumora. Razlika u ulozi mastocita ovisno o stadiju tumora je opisana i u adenokarcinomima kod ljudi i miševa. Pokazano je da se mastociti nakupljaju u ranim stadijima gdje djeluju protumorski, dok u naprednijim stadijima postaju nepotrebni (106). Pokazali smo da se mastociti akumuliraju u ranim fazama karcinogeneze gdje djeluju protutumorski. Taj zaključak podupire ubrzana progresija tumora mokraćnih mjehura uočena u odsutnosti mastocita i s kontinuiranom stabilizacijom mastocita kromolinom prije i tijekom stvaranja potkožnih tumora. Mastociti vjerojatno vrše svoju zaštitnu ulogu privlačeći imunološki sustav. U prilog tome idu opaženi smanjeni imunološki odgovori u miševima bez mastocita i u potkožnim tumorima miševa kontinuirano tretiranih kromolinom, gdje smo blokirali mastocite u početnim fazama nastanka tumora. Kada tumor uznapreduje, radi promjene u svom mikrookolišu i mastociti prelaze u protumorigeni fenotip. To smo dokazali upotrebom kromolina nakon formacije potkožnih tumora i upotrebom kromolina u BBN modelu mokraćnog tumora. U oba eksperimenta smo s kromolinom vidjeli tendenciju manjih masa potkožnih tumora i mokraćnih mjehura, te tendenciju manje invazivnih tumora u BBN modelu. Protumorsku ulogu, koju smo uspješno blokirali kromolinom, mastociti ostvaruju imunosupresijom, poticanjem EMT-a i angiogeneze, te aktivacijom protumorskih signalnih puteva, uključujući *Wnt* i *Notch*, što smo pokazali analizom podataka RNA sekvenciranja.

Budući da je kromolin lijek koji se često koristi za ublažavanje simptoma alergija i astme, njegova dugotrajna upotreba nije neuobičajena. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da kontinuirana upotreba kromolina ima značajan utjecaj na razvoj i progresiju tumora mokraćnog

mjehura u mišjem modelu. Stoga postoji potreba za dodatnim istraživanjima kako bi se procijenila sigurnost njegove dugotrajne upotrebe te povezanost s razvojem tumora u ljudi.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja su doveli do sljedećih zaključaka:

- Prilikom malignih promjena urotela, dolazi do povećanja broja i degranulacije mastocita, te njihovog nakupljanja uz te promjene.
- U početnim fazama tumora mokraćnog mjehura, mastociti imaju zaštitnu ulogu, odnosno djeluju protutumorski.
- U početnim fazama tumora mokraćnog mjehura, mastociti potiču adekvatan imunološki odgovor protiv tumora.
- U kasnijim fazama tumora mokraćnog mjehura, mastociti mijenjaju svoj fenotip i djeluju protumorski.
- U kasnijim fazama tumora mokraćnog mjehura, mastociti vrše imunosupresiju, potiču EMT, angiogenezu, te aktiviraju protumorske signalne puteve, uključujući Wnt i Notch.
- Lijek kromolin uspješno stabilizira mastocite i tako djeluje na tumor mokraćnog mjehura.
- Terapija postojećih tumora kromolinom poboljšava fenotip u mišjem modelu.
- Kontinuiran tretman kromolinom negativno utječe na razvoj tumora mokraćnog mjehura, odnosno potiče njegov razvoj i napredovanje u mišjem modelu.

7. SAŽETAK

NASLOV: ULOGA MASTOCITA U RAZVOJU TUMORA MOKRAĆNOG MJEHURA U MIŠJEM MODELU

CILJEVI ISTRAŽIVANJA: Glavni ciljevi ovog istraživanja su bili otkrivanje uloge mastocita u razvoju i progresiji tumora mokraćnog mjehura, kao i učinka njihove farmakološke inhibicije kromolinom. Naglasak je stavljen na razumijevanje mehanizma putem kojih mastociti, kao i njihova inhibicija, oblikuju tumorski mikrookoliš. Pritom smo željeli istražiti kako ti čimbenici utječu na gensku ekspresiju, s naglaskom na gene povezane s privlačenjem i aktivacijom imunoloških stanica, te s regulacijom stanične smrti.

MATERIJALI I METODE: U ovom istraživanju je korišten mišji model tumora mokraćnog mjehura induciran kemikalijom BBN. C57BL/6J miševima je tijekom posljednja četiri tjedna eksperimenta intraperitonealno primjenjivan kromolin u dozi od 50 mg / kg, svakih 48 h. Uz taj model, provedeni su i eksperiment s potkožnim tumorima u kojima su korištene mišje MB49 stanice tumora mokraćnog mjehura, injicirane potkožno istom soju miševa. U navedenom modelu primijenjena su dva pristupa tretmana kromolinom. Prvim, terapijskim pristupom, ispitivan je učinak kromolina na već formirane tumore. Nakon što je došlo do razvoja tumora, započeta je svakodnevna intraperitonealna primjena kromolina u dozi od 50 mg / kg, koja je nastavljena sve do završetka eksperimenta. Drugim pristupom, koji oponaša situaciju u kojoj su osobe već pod terapijom u trenutku nastanka tumora, kromolin je primijenjen u dozi od 50 mg / kg dan prije inokulacije MB49 stanica, a svakodnevna primjena je nastavljena do kraja eksperimenta. Kako bi se dodatno ispitala uloga mastocita, oba eksperimentalna modela provedena su i na sojevima miševa s genetskim nedostatkom mastocita: Cpa3^{Cre/+} i Kit^{W-sh/W-sh}.

REZULTATI: U BBN modelu, terapijska primjena kromolina je pokazala tendenciju smanjenja tumorske mase i poboljšanja fenotipa. Sličan učinak je zabilježen i u modelu potkožnih tumora, gdje je terapijski protokol doveo do djelomičnog smanjenja tumorskog opterećenja. Terapija kromolinom je rezultirala sa smanjenom ekspresijom gena uključenih u angiogenezu te povećanom ekspresijom gena koji potiču aktivaciju citotoksičnih T stanica i NK stanica. Nasuprot tome, kontinuirana primjena kromolina je dovela do smanjene ekspresije gena ključnih za privlačenje i aktivaciju imunoloških stanica, kao i za puteve apoptoze i nekroptoze, što je rezultiralo značajno većim tumorskim opterećenjem. Također je pokazano da miševi s genetskim nedostatkom mastocita (Cpa3^{Cre/+} i Kit^{W-sh/W-sh}) razvijaju veće tumore u potkožnom tumorskom modelu, uz tendenciju lošijeg fenotipa i u BBN modelu.

ZAKLJUČCI: Provedeno istraživanje pokazalo je da mastociti u ranoj fazi tumora mokraćnog mjehura imaju zaštitnu ulogu, dok se tijekom napredovanja bolesti njihov fenotip mijenja i počinju djelovati protumorski. Pokazano je da kromolin, koji prvenstveno djeluje putem mastocita, može poboljšati fenotip već formiranih tumora. S druge strane, pokazano je i da kontinuirana primjena ovog lijeka može potaknuti progresiju bolesti u mišjem modelu.

8. LAIČKI SAŽETAK

NASLOV: ULOGA MASTOCITA U RAZVOJU TUMORA MOKRAĆNOG MJEHURA U MIŠJEM MODELU

CILJEVI ISTRAŽIVANJA: Ovo istraživanje se bavilo ulogom jedne vrste imunoloških stanica, mastocita, u razvoju tumora mokraćnog mjehura. Cilj je bio bolje razumjeti kako mastociti utječu na rast tumora, te može li se blokiranjem njihove aktivnosti lijekom kromolinom utjecati na tijek bolesti.

MATERIJALI I METODE: Istraživanje je provedeno na miševima uz korištenje dva različita tumorska modela. U prvom modelu, miševima je dana kemikalija BBN koja s vremenom uzrokuje razvoj tumora mokraćnog mjehura. Pred kraj eksperimenta je započet tretman kromolinom kako bi se spriječila aktivacija mastocita. U drugom modelu, miševima su ispod kože ubrizgane tumorske stanice koje su s vremenom formirale tumor. U tim su eksperimentima provedena dva protokola terapije kromolinom. Terapijski protokol, u kojem je kromolin davan svakodnevno nakon što se tumor razvio, te protokol kontinuiranog tretmana, koji je započet dan prije injiciranja tumorskih stanica i provodio se do kraja eksperimenta. Kako bi se dodatno provjerilo kako mastociti utječu na razvoj tumora, oba tumorska modela su ponovljena i na miševima koji nemaju mastocite.

REZULTATI: Terapijski protokol primjene kromolina (nakon pojave tumora) je rezultirao smanjenom veličinom tumora, jačom aktivacijom imunološkog odgovora i smanjenim stvaranjem novih krvnih žila za opskrbu tumora kisikom i hranjivim tvarima. S druge strane, kontinuirani protokol primjene kromolina je doveo do lošijih ishoda, odnosno većih tumora, slabijeg imunološkog odgovora i smanjenog odumiranja tumorskih stanica. Miševi bez mastocita su razvili veće tumore u potkožnim tumorskim eksperimentima, dok su u BBN eksperimentima imali nešto više invazivnih tumora.

ZAKLJUČCI: Ovo istraživanje je pokazalo da mastociti imaju zaštitnu ulogu u ranoj fazi raka mokraćnog mjehura. Međutim, tijekom napredovanja bolesti mijenjaju svoje djelovanje i počinju poticati napredak tumora. Pokazano je da primjena lijeka kromolina može biti korisna ako se koristi u pravo vrijeme, no kontinuirana uporaba može imati negativne učinke.

9. SUMMARY

TITLE: THE ROLE OF MAST CELLS IN BLADDER CANCER DEVELOPMENT IN A MURINE MODEL

OBJECTIVES: The primary aim of this study was to explore the role of mast cells in the development and progression of bladder cancer, as well as the effects of their pharmacological inhibition using cromolyn. Particular emphasis was placed on understanding the mechanisms through which mast cells, and their inhibition, shape the tumor microenvironment. The study aimed to investigate how these factors influence gene expression, with a focus on genes involved in immune cell recruitment and activation, as well as regulation of cell death pathways.

MATERIALS AND METHODS: This research utilized a murine model of bladder cancer induced by the chemical carcinogen BBN. In this model, C57BL/6J mice received intraperitoneal injections of cromolyn at a dose of 50 mg / kg every 48 hours during the final four weeks of the experiment. In addition, the study employed a subcutaneous tumor model using murine MB49 bladder cancer cells, which were injected subcutaneously into the same mouse strain. Two treatment protocols were applied in this model. In the first, therapeutic protocol, cromolyn treatment began after tumors had formed and continued daily (50 mg / kg, intraperitoneally) until the end of the experiment to evaluate its effect on tumor progression. In the second protocol, designed to mimic a scenario in which individuals are already undergoing cromolyn therapy at the time of tumor initiation, cromolyn was administered one day before MB49 cell inoculation and continued daily at the same dosage throughout the experiment. To further investigate the role of mast cells, both experimental models were also conducted using genetically mast cell-deficient mouse strains: $Cpa3^{Cre/+}$ and $Kit^{W-sh/W-sh}$.

RESULTS: In the BBN-induced model, therapeutic administration of cromolyn showed a trend toward reduced tumor mass and an improved phenotype. A similar beneficial effect was observed in the subcutaneous tumor model, where cromolyn treatment partially reduced tumor burden. Cromolyn therapy led to decreased expression of genes associated with angiogenesis and increased expression of genes involved in the activation of cytotoxic T cells and NK cells. Conversely, continuous cromolyn administration resulted in lower expression of genes essential for immune cell recruitment and activation, as well as for apoptotic and necroptotic pathways ultimately leading to a significantly increased tumor burden. Additionally, mice lacking mast cells ($Cpa3^{Cre/+}$ and $Kit^{W-sh/W-sh}$) developed larger tumors in the subcutaneous model and showed a trend toward worse outcomes in the BBN model.

CONCLUSIONS: Results of the study have showed that mast cells play a protective role in the early stages of bladder cancer but undergo phenotypic changes during tumor progression, shifting toward

a protumorigenic function. Cromolyn, which primarily acts through mast cell inhibition, appears to improve the phenotype of established tumors. However, prolonged treatment was found to promote tumor progression in the mouse model.

10. LAY SUMMARY

TITLE: THE ROLE OF MAST CELLS IN BLADDER CANCER DEVELOPMENT IN A MURINE MODEL

OBJECTIVES: This study aimed to explore the role of a specific type of immune cell, mast cell, in the development of bladder cancer. The primary goal was to better understand how mast cells influence tumor growth and whether blocking their activity with the drug cromolyn could alter the course of the disease.

MATERIALS AND METHODS: The research was conducted in mice using two different tumor models. In the first model, mice were treated with the chemical BBN which induces bladder cancer development. Toward the end of the experiment, the mice were treated with cromolyn to inhibit mast cell activation. In the second model, tumor cells were injected beneath the skin of the mice (subcutaneously), where they gradually developed into tumors. Two cromolyn treatment protocols were applied in this setting. A therapeutic protocol, where daily cromolyn administration began after tumor formation, and a continuous protocol, where treatment started one day before tumor cell injection and continued until the end of the experiment. Additionally, both tumor models were repeated in mice that lacked mast cells.

RESULTS: In the BBN model, cromolyn therapy showed a trend toward reduced tumor mass. Similar effect was observed in the subcutaneous tumor model, where the therapeutic administration of cromolyn led to smaller tumors, a stronger immune response, and reduced formation of new blood vessels. In contrast, the continuous treatment protocol resulted in larger tumors, weaker immune activation, and decreased tumor cell death. Mice lacking mast cells developed larger tumors in the subcutaneous model, and showed a tendency toward more invasive tumors in the BBN-induced model.

CONCLUSIONS: The study have showed that mast cells play a protective role in the early stages of bladder cancer. However, as the disease progresses, their function appears to shift, and they begin to promote tumor growth. Cromolyn treatment may offer therapeutic benefit if administered at the right time, but prolonged use could have detrimental effects.

11. LITERATURA

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May 4;74(3):229–63.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Observatory. Cancer Today [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. [cited 2025 May 8]. Available from: <https://gco.iarc.fr>
3. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2017 Apr 13;3(1):17022.
4. Elmadani M, Mokaya PO, Omer AAA, Kiptulon EK, Klara S, Orsolya M. Cancer burden in Europe: a systematic analysis of the GLOBOCAN database (2022). *BMC Cancer*. 2025 Mar 12;25(1):447.
5. OECD/European Commission. EU Country Cancer Profile: Croatia 2023. OECD; 2023. (EU Country Cancer Profiles).
6. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I BF. Global Cancer Observatory: Cancer Today, Croatia. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2024.
7. van Hoogstraten LMC, Vrieling A, van der Heijden AG, Kogevinas M, Richters A, Kiemeny LA. Global trends in the epidemiology of bladder cancer: challenges for public health and clinical practice. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(5):287–304.
8. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. Epidemiology of Bladder Cancer. *Med Sci*. 2020 Mar 13;8(1):15.
9. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013 Jun;153(6):1194–217.
10. Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: Advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(10):584–96.
11. Besaratinia A, Tommasi S. Genotoxicity of tobacco smoke-derived aromatic amines and bladder cancer: current state of knowledge and future research directions. *FASEB J*. 2013 Jun 28;27(6):2090–100.
12. Wu Y, Shu J, Yuan Y, Zhou D. Tobacco smoke and bladder cancer: the current research

- status and the future challenges. *Int J Clin Exp Med*. 2019;12(11):12633–9.
13. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan 1;12(1):31–46.
 14. Roje B, Zhang B, Mastroiilli E, Kovačić A, Sušak L, Ljubenkov I, et al. Gut microbiota carcinogen metabolism causes distal tissue tumours. *Nature*. 2024;632(8027):1137–44.
 15. Yeo BSY, Yap DWT, Tan NKW, Tan BKJ, Teo YH, Teo YN, et al. The Association of Obstructive Sleep Apnea with Urological Cancer Incidence and Mortality—A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Focus*. 2024;10(6):958–71.
 16. Chai J, Yin S, Feng W, Zhang T, Ke C. The Role of Hypoxia-inducible Factor-1 in Bladder Cancer. *Curr Mol Med*. 2024 Jul;24(7):827–34.
 17. International Agency for Research on Cancer. Urinary and Male Genital Tumours. Moch H, editor. Vol. 8, WHO Classification of Tumours. International Agency for Research on Cancer; 2022. 576 p.
 18. Marchenko I, Trushina D. Local Drug Delivery in Bladder Cancer: Advances of Nano/Micro/Macro-Scale Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2023 Dec 3;15(12):2724.
 19. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jan 23;15(1):25–41.
 20. Spruck CH, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res [Internet]*. 1994 Feb 1;54(3):784–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306342>
 21. Powles T, Bellmunt J, Comperat E, De Santis M, Huddart R, Loriot Y, et al. Bladder cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2022 Mar;33(3):244–58.
 22. Shi Y, Mathis BJ, He Y, Yang X. The Current Progress and Future Options of Multiple Therapy and Potential Biomarkers for Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Biomedicines*. 2023 Feb 13;11(2):539.
 23. Gopalakrishnan D, Koshkin VS, Ornstein MC, Papatsoris A, Grivas P. Immune checkpoint inhibitors in urothelial cancer: recent updates and future outlook. *Ther Clin Risk Manag*. 2018 Jun 5;Volume 14:1019–40.

24. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng A-C, Boyd S, et al. Radical Cystectomy in the Treatment of Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results in 1,054 Patients. *J Clin Oncol*. 2001 Feb 1;19(3):666–75.
25. Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017 Jun 6;8(23):38022–43.
26. Lee Y-C, Lam H-M, Rosser C, Theodorescu D, Parks WC, Chan KS. The dynamic roles of the bladder tumour microenvironment. *Nat Rev Urol*. 2022 Sep 28;19(9):515–33.
27. Bowyer GS, Loudon KW, Suchanek O, Clatworthy MR. Tissue Immunity in the Bladder. 2025;37:48.
28. Choi HW, Bowen SE, Miao Y, Chan CY, Miao EA, Abrink M, et al. Loss of Bladder Epithelium Induced by Cytolytic Mast Cell Granules. *Immunity*. 2016 Dec;45(6):1258–69.
29. Norman P Spack Daniel E Shumer NJN. the Nature of Immune Responses To Urinary Tract Tract. *Physiol Behav*. 2016;176(12):20.
30. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*. 2023 Mar;41(3):374–403.
31. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 2020 Aug;30(16):R921–5.
32. Wang X, Qiu L, Li Z, Wang X-Y, Yi H. Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2018 Nov 9;9(NOV):1–10.
33. Zhang Y, Guo F, Wang Y. Hypoxic tumor microenvironment: Destroyer of natural killer cell function. *Chinese J Cancer Res*. 2024;36(2):138–50.
34. Roviello G, Catalano M, Santi R, Palmieri VE, Vannini G, Galli IC, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in Urothelial Bladder Cancer: State of the Art and Future Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 31;13(17):4411.
35. Elieh Ali Komi D, Wöhrle S, Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020 Jun 12;58(3):342–65.
36. Benedé S, Cody E, Agashe C, Berin MC. Immune characterization of bone marrow-derived models of mucosal and connective tissue mast cells. *Allergy, Asthma Immunol Res*.

2018;10(3):268–77.

37. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: Armed for battle. Vol. 14, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 478–94.
38. Segura-Villalobos D, Ramírez-Moreno IG, Martínez-Aguilar M, Ibarra-Sánchez A, Muñoz-Bello JO, Anaya-Rubio I, et al. Mast Cell–Tumor Interactions: Molecular Mechanisms of Recruitment, Intratumoral Communication and Potential Therapeutic Targets for Tumor Growth. *Cells*. 2022 Jan 20;11(3):349.
39. Huang B, Lei Z, Zhang G-M, Li D, Song C, Li B, et al. SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1269–79.
40. Choi HW, Naskar M, Seo HK, Lee HW. Tumor-associated mast cells in urothelial bladder cancer: Optimizing immuno-oncology. *Biomedicines*. 2021;9(11):1–14.
41. Komi DEA, Redegeld FA. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020 Jun 29;58(3):313–25.
42. Maltby S, Khazaie K, McNagny KM. Mast cells in tumor growth: Angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2009 Aug;1796(1):19–26.
43. Varricchi G, Galdiero MR, Loffredo S, Marone G, Iannone R, Marone G, et al. Are Mast Cells MASTers in Cancer? *Front Immunol*. 2017 Apr 12;8(APR).
44. Roche J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 Feb 16;10(2):52.
45. Wroblewski M, Bauer R, Cubas Córdova M, Udonta F, Ben-Batalla I, Legler K, et al. Mast cells decrease efficacy of anti-angiogenic therapy by secreting matrix-degrading granzyme B. *Nat Commun [Internet]*. 2017;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00327-8>
46. Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, Visintin A, Segal DM. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest*. 2001 Dec 15;108(12):1865–73.
47. Varricchi G, de Paulis A, Marone G, Galli SJ. Future Needs in Mast Cell Biology. *Int J Mol*

Sci [Internet]. 2019 Sep 6;20(18):4397. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4397>

48. Somasundaram R, Connelly T, Choi R, Choi H, Samarkina A, Li L, et al. Tumor-infiltrating mast cells are associated with resistance to anti-PD-1 therapy. *Nat Commun*. 2021 Jan 12;12(1):346.
49. Minutello K, Gupta V. Cromolyn Sodium [Internet]. StatPearls. Treasure Island (FL); 2025. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557473/>
50. Oka T, Kalesnikoff J, Starkl P, Tsai M, Galli SJ. Evidence questioning cromolyn's effectiveness and selectivity as a 'mast cell stabilizer' in mice.' *Lab Invest*. 2012 Oct 20;92(10):1472–82.
51. Pattabiraman G, Bell-Cohn AJ, Murphy SF, Mazur DJ, Schaeffer AJ, Thumbikat P. Mast cell function in prostate inflammation, fibrosis, and smooth muscle cell dysfunction. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2021;321(4):F466–79.
52. Zhang N, LI D, SHAO J, Wang X. Animal models for bladder cancer: The model establishment and evaluation (Review). *Oncol Lett*. 2015 Apr;9(4):1515–9.
53. Degoricija M, Korac-Prlic J, Vilovic K, Ivanisevic T, Haupt B, Palada V, et al. The dynamics of the inflammatory response during BBN-induced bladder carcinogenesis in mice. *J Transl Med* [Internet]. 2019;17(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02146-5>
54. Vasconcelos-Nóbrega C, Colaço A, Lopes C, Oliveira PA. Review: BBN as an urothelial carcinogen. *In Vivo*. 2012;26(4):727–39.
55. Fantini D, Glaser AP, Rimar KJ, Wang Y, Schipma M, Varghese N, et al. A Carcinogen-induced mouse model recapitulates the molecular alterations of human muscle invasive bladder cancer. *Oncogene* [Internet]. 2018;37(14):1911–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-017-0099-6>
56. Shinagare AB, Ramaiya NH, Jagannathan JP, Fennessy FM, Taplin ME, Van Den Abbeele AD. Metastatic pattern of bladder cancer: Correlation with the characteristics of the primary tumor. *Am J Roentgenol*. 2011;196(1):117–22.
57. Korac-Prlic J, Degoricija M, Vilović K, Vujević S, Terzić J. BBN-driven urinary bladder

- cancer mouse model. In: *Methods in Cell Biology* [Internet]. 1st ed. Elsevier Inc.; 2020. p. 1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.10.020>
58. Stribbling SM, Ryan AJ. The cell-line-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research. *Nat Protoc*. 2022;17(9):2108–28.
 59. Sridharan G, Shankar A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16(2):251.
 60. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014 Dec 5;15(12):550.
 61. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci*. 2005 Oct 25;102(43):15545–50.
 62. Liu Z, Zhu Y, Xu L, Zhang J, Xie H, Fu H, et al. Tumor stroma-infiltrating mast cells predict prognosis and adjuvant chemotherapeutic benefits in patients with muscle invasive bladder cancer. *Oncoimmunology*. 2018 Sep 2;7(9):e1474317.
 63. Rönnerberg E, Ravindran A, Mazzurana L, Gong Y, Säfholm J, Lorent J, et al. Analysis of human lung mast cells by single cell RNA sequencing. *Front Immunol*. 2023 Mar 30;14(March):1–9.
 64. Claman HN, Choi KL, Sujansky W, Vatter AE. Mast cell “disappearance” in chronic murine graft-vs-host disease (GVHD)-ultrastructural demonstration of “phantom mast cells”. *J Immunol*. 1986 Sep 15;137(6):2009–13.
 65. Shikotra A, Ohri CM, Green RH, Waller DA, Bradding P. Mast cell phenotype, TNF α expression and degranulation status in non-small cell lung cancer. *Sci Rep*. 2016 Dec 6;6(1):38352.
 66. Aliabadi A, Haghshenas MR, Kiani R, Panjehshahin MR, Erfani N. Promising anticancer activity of cromolyn in colon cancer: in vitro and in vivo analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2024 Apr 22;150(4):207.
 67. Lv Y pin, Peng L sheng, Wang Q hong, Chen N, Teng Y sheng, Wang T ting, et al. Degranulation of mast cells induced by gastric cancer-derived adrenomedullin prompts gastric cancer progression. *Cell Death Dis*. 2018;9(10):1–12.

68. Johnson C, Huynh V, Hargrove L, Kennedy L, Graf-Eaton A, Owens J, et al. Inhibition of Mast Cell-Derived Histamine Decreases Human Cholangiocarcinoma Growth and Differentiation via c-Kit/Stem Cell Factor-Dependent Signaling. *Am J Pathol.* 2016 Jan 1;186(1):123–33.
69. Martini A, Tholomier C, Mokkapati S, Dinney CPN. Interferon gene therapy with nadofaragene firadenovec for bladder cancer: from bench to approval. *Front Immunol.* 2023 Aug 29;14(August):1–6.
70. Gillezeau C, Movva N, van Gerwen M, Rabon-Stith K, Shire N, Brohawn PZ, et al. Interferon gamma expression and mortality in unselected cohorts of urothelial bladder cancer patients. Ku JH, editor. *PLoS One.* 2022 Aug 30;17(8):e0271339.
71. Grimm D, Bauer J, Wise P, Krüger M, Simonsen U, Wehland M, et al. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2020;67(March 2019):122–53.
72. Garg M, Maurya N. WNT/ β -catenin signaling in urothelial carcinoma of bladder. *World J Nephrol.* 2019;8(5):83–94.
73. Jiménez-Guerrero R, Belmonte-Fernández A, Flores ML, González-Moreno M, Pérez-Valderrama B, Romero F, et al. Wnt/ β -catenin signaling contributes to paclitaxel resistance in bladder cancer cells with cancer stem cell-like properties. *Int J Mol Sci.* 2022;23(1).
74. Motawi TK, El-Maraghy SA, ElMeshad AN, Nady OM, Hammam OA. Cromolyn chitosan nanoparticles as a novel protective approach for colorectal cancer. *Chem Biol Interact.* 2017 Sep 25;275:1–12.
75. Shi Q, Xue C, Zeng Y, Yuan X, Chu Q, Jiang S, et al. Notch signaling pathway in cancer: from mechanistic insights to targeted therapies. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):128.
76. Schulz GB, Elezkurtaj S, Börding T, Schmidt EM, Elmasry M, Stief CG, et al. Therapeutic and prognostic implications of NOTCH and MAPK signaling in bladder cancer. *Cancer Sci.* 2021;112(5):1987–96.
77. Liu C, Ge H, Shen C, Hu D, Zhao X, Qin R, et al. NOTCH3 promotes malignant progression of bladder cancer by directly regulating SPP1 and activating PI3K/AKT pathway. *Cell Death Dis.* 2024 Nov 18;15(11):840.

78. De Souza DA, Santana AC, Da Silva EZM, Oliver C, Jamur MC. The Role of Mast Cell Specific Chymases and Trypsases in Tumor Angiogenesis. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
79. Sari A, Calli A, Cakalagaoglu F, Altinboga AA, Bal K. Association of mast cells with microvessel density in urothelial carcinomas of the urinary bladder. *Ann Diagn Pathol.* 2012;16(1):1–6.
80. Carlini MJ, Dalurzo MCL, Lastiri JM, Smith DE, Vasallo BC, Puricelli LI, et al. Mast cell phenotypes and microvessels in non-small cell lung cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol.* 2010 May;41(5):697–705.
81. Gri G, Frossi B, Inca FD, Danelli L, Betto E, Mion F, et al. Mast cell : an emerging partner in immune interaction. 2012;3(May):1–11.
82. Ramírez-Labrada A, Pesini C, Santiago L, Hidalgo S, Calvo-Pérez A, Oñate C, et al. All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity. *Front Immunol.* 2022;13(May):1–14.
83. Kennedy LL, Hargrove LA, Graf AB, Francis TC, Hodges KM, Nguyen QP, et al. Inhibition of mast cell-derived histamine secretion by cromolyn sodium treatment decreases biliary hyperplasia in cholestatic rodents. *Lab Investig.* 2014 Dec;94(12):1406–18.
84. Teng MWL, Galon J, Fridman W, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest.* 2015 Sep 1;125(9):3338–46.
85. Afferni C, Buccione C, Andreone S, Galdiero MR, Varricchi G, Marone G, et al. The pleiotropic immunomodulatory functions of IL-33 and its implications in tumor immunity. *Front Immunol.* 2018;9(NOV):1–17.
86. Liang C, Chen Y, Chen S, She J, Shi Q, Wang P. KLRB1 is a novel prognostic biomarker in endometrial cancer and is associated with immune infiltration. *Transl Cancer Res.* 2023;12(12):3641–52.
87. Laufer JM, Kindinger I, Artinger M, Pauli A, Legler DF. CCR7 is recruited to the immunological synapse, acts as co-stimulatory molecule and drives LFA-1 clustering for efficient T cell adhesion through ZAP70. *Front Immunol.* 2019;10(JAN):1–15.
88. Kohli K, Pillarisetty VG, Kim TS. Key chemokines direct migration of immune cells in solid tumors. *Cancer Gene Ther.* 2022;29(1):10–21.

89. Yue Y, Zhang Q, Sun Z. CX3CR1 Acts as a Protective Biomarker in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2022;12(January):1–16.
90. Sjö Dahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, et al. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(12):3377–86.
91. Schwarzova L, Varchulova Novakova Z, Danisovic L, Ziaran S. Molecular classification of urothelial bladder carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2023;50(9):7867–77.
92. Kaur S, Momi N, Chakraborty S, Wagner DG, Horn AJ, Lele SM, et al. Altered expression of transmembrane mucins, MUC1 and MUC4, in bladder cancer: Pathological implications in diagnosis. *PLoS One.* 2014;9(3).
93. Săndulescu AŞ, Stepan AE, Mărgăritescu C, Badiu AM, Matei M, Simionescu CE. Claudin-4 Immunoexpression in Urothelial Carcinomas. *Curr Heal Sci J.* 2020;46(4):379–82.
94. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: A regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):1–9.
95. Meier P, Legrand AJ, Adam D, Silke J. Immunogenic cell death in cancer: targeting necroptosis to induce antitumour immunity. Vol. 24, *Nature Reviews Cancer.* Nature Research; 2024. p. 299–315.
96. Motawi TMK, Bustanji Y, EL-Maraghy S, Taha MO, Al-Ghusein MAS. Evaluation of naproxen and cromolyn activities against cancer cells viability, proliferation, apoptosis, p53 and gene expression of survivin and caspase-3. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2014 Apr 1;29(2):153–61.
97. Katz HR, Austen KF. Mast cell deficiency, A game of kit and mouse. *Immunity* [Internet]. 2011;35(5):668–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.11.004>
98. Rao Q, Chen Y, Yeh C-R, Ding J, Li L, Chang C, et al. Recruited mast cells in the tumor microenvironment enhance bladder cancer metastasis via modulation of ERβ/CCL2/CCR2 EMT/MMP9 signals. *Oncotarget.* 2016 Feb 16;7(7):7842–55.
99. Cimpean AM, Raica M. The Hidden Side of Disodium Cromolyn: from Mast Cell Stabilizer to an Angiogenic Factor and Antitumor Agent. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016 Dec 11;64(6):515–22.
100. Puzzovio PG, Brüggemann TR, Pahima H, Mankuta D, Levy BD, Levi-Schaffer F.

Cromolyn Sodium differentially regulates human mast cell and mouse leukocyte responses to control allergic inflammation. *Pharmacol Res.* 2022 Apr 1;178:106172.

101. Korc M, Friesel R. The Role of Fibroblast Growth Factors in Tumor Growth. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009;9(5):639–51.
102. Ronca R, Tamma R, Coltrini D, Ruggieri S, Presta M, Ribatti D. Fibroblast growth factor modulates mast cell recruitment in a murine model of prostate cancer. *Oncotarget.* 2017 Oct 10;8(47):82583–92.
103. Feng J, He W, Song Y, Wang Y, Simpson RJ, Zhang X, et al. Platelet-derived growth factor receptor beta: A novel urinary biomarker for recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *PLoS One.* 2014;9(5):1–10.
104. LIU X-L, XIAO K, XUE B, YANG D, LEI Z, SHAN Y, et al. Dual role of TGFBR3 in bladder cancer. *Oncol Rep.* 2013 Sep;30(3):1301–8.
105. Liang Y, Zhu F, Zhang H, Chen D, Zhang X, Gao Q. Conditional ablation of TGF- β signaling inhibits tumor progression and invasion in an induced mouse bladder cancer model. *Nat Publ Gr.* 2016;(July):2–10.
106. Pittoni P, Tripodo C, Piconese S, Mauri G, Parenza M, Rigoni A, et al. Mast cell targeting hampers prostate adenocarcinoma development but promotes the occurrence of highly malignant neuroendocrine cancers. *Cancer Res.* 2011 Sep 15;71(18):5987–97.

12. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODATCI

Ime i prezime: Lucija Franković

Elektronička pošta: lucija.frankovic@mefst.hr

Državljanstvo: Hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 23.11.1994., Split

RADNO ISKUSTVO

Listopad 2020 - lipanj 2025, Asistentica/doktorand na HRZZ projektu, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

Prosinac 2018 – ožujak 2020, Viši laboratorijski tehničar, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

Lisopad 2017 – srpanj 2018, Volonter, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

IZOBRAZBA

Listopad 2020 – danas, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Poslijediplomski studij TRIBE: Translacijska istraživanja u biomedicini

Rujan 2018 – srpanj 2020, Sveučilište u Rijeci, Fakultet zdravstvenih studija, Diplomski studij Klinički nutricionizam

Diplomirala kao jedna od 10% najboljih studenata u svojoj generaciji.

Listopad 2013 – rujan 2017, Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Prediplomski studij Nutricionizam

MATERINSKI JEZIK

- Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

- Engleski (napredno)
- Nizozemski (osnovno)

OSTALE AKTIVNOSTI

Publikacije:

- Franković L, Degoricija M, Gabela I, Vilović K, Korac-Prlic J. Pro-Tumorigenic Effect of Continuous Cromolyn Treatment in Bladder Cancer. *Int J Mol Sci.* 2025 Feb 14;26(4):1619.
- 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(13).
- Viculin J, Degoricija M, Vilović K, Gabela I, Franković L, Vrdoljak E, et al. Elevated Tumor Cell-Intrinsic STING Expression in Advanced Laryngeal Cancer. *Cancers (Basel).* 2023;15(13).
- Ljubkovic M, Runjic F, Bulat C, Cavar M, Frankovic L, Marovic Z, et al. Assessment of Mitochondrial Respiratory Capacity in Relation To Cardiac Contractile Performance in Patients With Normal To Mildly Decreased Cardiac Systolic Function. *J Physiol Pharmacol.* 2022;73(6):725–35.
- Korac-Prlic J, Degoricija M, Vilović K, Haupt B, Ivanišević T, Franković L, et al. Targeting Stat3 signaling impairs the progression of bladder cancer in a mouse model. *Cancer Lett.* 2020;490:89–99.
- Zupančič D, Korać-Prlić J, Kreft ME, Franković L, Vilović K, Jeruc J, et al. Vitamin A Rich Diet Diminishes Early Urothelial Carcinogenesis by Altering Retinoic Acid Signaling. *Cancers (Basel).* 2020 Jun 28;12(7):1712.

Profesionalno usavršavanje:

- EMBO radionica o pisanju uspješnih prijava za stipendije – Fellowsherpa, rujan 2024.
- EMBO radionica o komuniciranju istraživanja: pisanje istraživanja i kratke prezentacije, rujan 2024.
- Western blot radionica, Proteintech, ožujak 2024.
- Tečaj protočne citometrije, CytomEx, travanj 2022.
- Tečaj za rad s laboratorijskim životinjama, FELASA ekvivalent, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, travanj 2021.
- Bolje vještine za bolje poslove: izvrsna laboratorijska knjiga za izvrsnu karijeru, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, prosinac 2020.
- ERASMUS u Biomedicinskom istraživačkom centru, Institut za eksperimentalnu endokrinologiju, Slovačka akademija znanosti, studeni 2019.
- ERASMUS na Fakultetu farmacije, Sveučilište Pariz jug; Inserm UMR-S 1180, srpanj 2019.

Konferencije/kongresi:

- EACR: Tumorski ekosustav: Stanične interakcije i terapijske mogućnosti, Bergamo, Italija, ožujak 2024. – prezentacija postera
- Ljetna škola: Tumorski mikrokoliš i imunitet, Nove Hrade, Češka Republika, srpanj 2023. – prezentacija postera
- Kongres hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, Brela, Croatia, rujan 2022. – prezentacija postera
- Druga međunarodna elektronička konferencija o raku, ožujak 2022.
- Godišnji skup Hrvatskog imunološkog društva, Trogir, Croatia, rujan 2021.
- EACR-OECI zajednička virtualna konferencija o pristupu molekularne patologije raku, ožujak 2021.

Članstva:

Listopad 2020 – danas, Hrvatsko društvo za istraživanje raka