

Izražaj imunosupresijskih molekula PD-1 i CTLA-4 u zloćudnim tumorima mokraćnog mjehura

Čičmir-Vestić, Mate

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:224111>

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

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



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mate Čičmir-Vestić

**IZRAŽAJ IMUNOSUPRESIJSKIH MOLEKULA PD-1 i CTLA-4 U ZLOĆUDNIM
TUMORIMA MOKRAĆNOG MJEHURA**

Diplomski rad

Akadska godina: 2014./2015.

Mentor:

Prof. dr. sc. Janoš Terzić

U Splitu, srpanj 2015.

Najiskrenije zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Janošu Terziću, koji mi je svojim savjetima, iskustvom i potporom omogućio izradu ovoga diplomskoga rada. Zahvaljujem i laborantici Sandri Vujević na pomoći tijekom prikupljanja uzoraka i analiza koje su dio ovog rada. Zahvaljujem i svojoj obitelji na ljubavi i podršci.

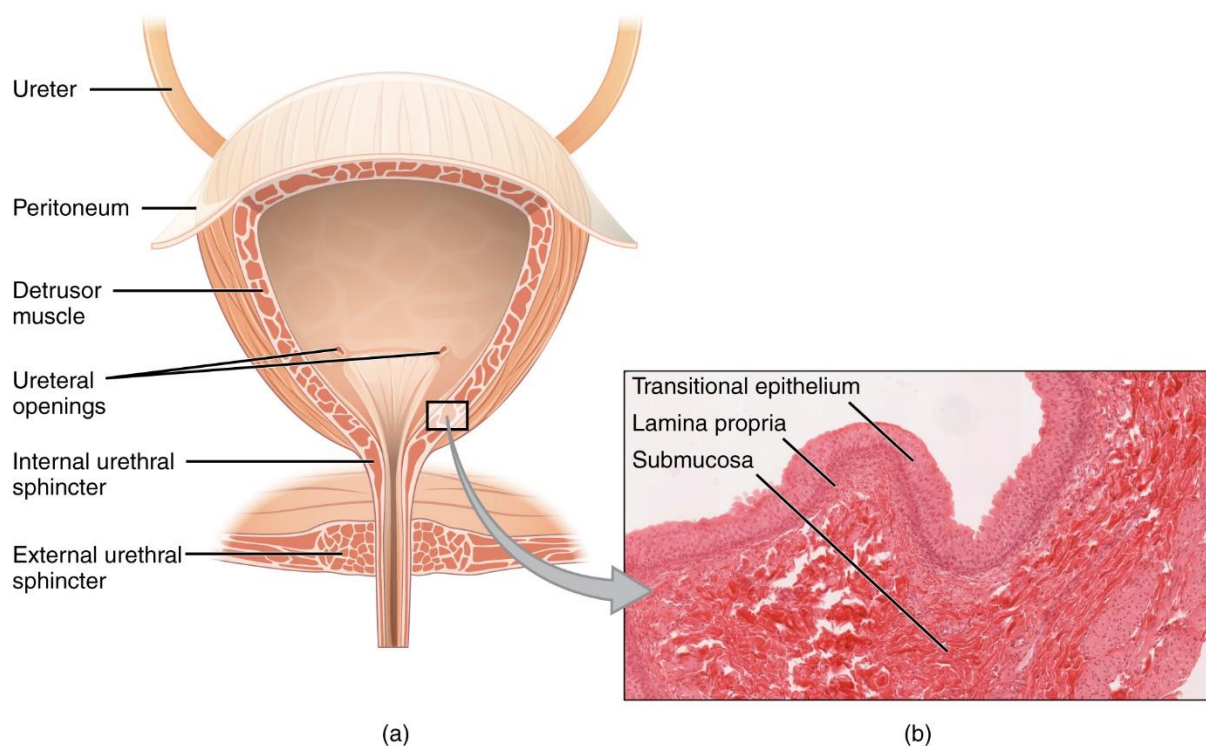
Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1.	Mokraćni mjehur	2
1.1.1.	Histološka građa mokraćnog mjehura	2
1.1.2.	Zloćudni tumori mokraćnog mjehura	4
1.1.3.	Etiologija i čimbenici rizika za nastanak karcinoma mokraćnog mjehura ..	4
1.1.4.	Klinička slika i dijagnostika	5
1.1.5.	Stupnjevanje bolesti	6
1.1.6.	Gradus tumora mokraćnog mjehura	8
1.1.7.	Prognoza i liječenje	9
1.2.	Imunosupresijske molekule CTLA-4 i PD-1	10
1.2.1.	Molekula CTLA-4	10
1.2.2.	Molekula PD-1	11
1.2.3.	Klinički značaj CTLA-4 i PD-1	12
2.	HIPOTEZA	14
3.	ISPITANICI I POSTUPCI	16
3.1.	Ispitanici i uzorci	17
3.2.	Postupak izolacije RNA iz tkiva	17
3.3.	Sinteza cDNA i priprema qRT-PCR	18
3.4.	Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	19
3.5.	Obrada podataka	21
4.	REZULTATI	22
5.	RASPRAVA	25
6.	ZAKLJUČCI	28
7.	SAŽETAK	30
8.	SUMMARY	32
9.	POPIS LITERATURE	34
10.	ŽIVOTOPIS	39

1. UVOD

1.1. Mokraćni mjehur

Mokraćni mjehur (lat. *vesica urinaria*) je šuplji mišićni organ smješten u zdjelici iza preponske kosti (Slika 1). U žena leži ispred prednje rodničke stijenke, a u muškaraca ga od rektuma odvaja rektovezikalna udubina. Ispod njega su sjemenski mjehurići i sjemenovod. Njegova je funkcija skladištenje urina koji iz bubrega dolazi mokraćovodima (lat. *ureter*), a iz mjehura odlazi mokraćnom cijevi (lat. *urethra*). Kad je napunjen, kapacitet mu je oko 500 mL. Anatomski se dijeli na bazu (lat. *fundus*), vrat (lat. *cervix*), tijelo (lat. *corpus*) i vrh (lat. *apex*) (1).



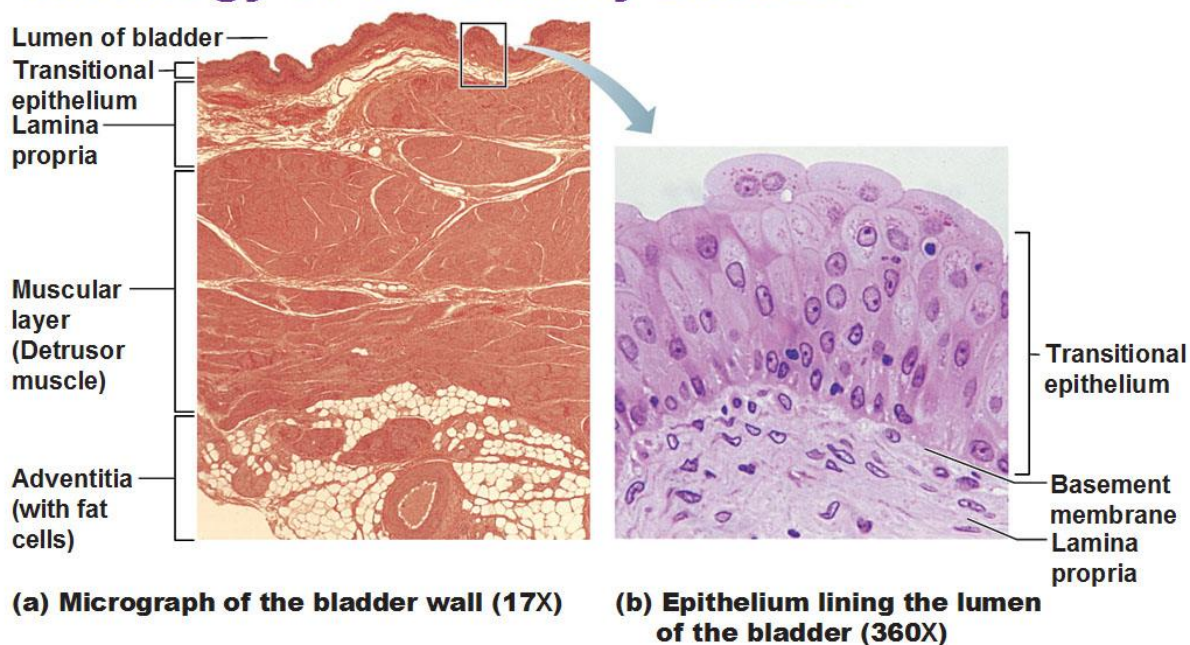
Slika 1. Shematski prikaz anatomije mokraćnog mjehura (a) i njegov histološki presjek (b) (preuzeto sa https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/dc/2605_The_Bladder.jpg).

1.1.1. Histološka građa mokraćnog mjehura

Stjenka mokraćnog mjehura građena je od četiri sloja (Slika 2). Vanjski sloj (adventicija) je rahlo tkivo koje je samo na gornjoj i, u muškaraca, dijelu donje površine prekriveno peritonejem. Mišićni sloj (lat. *muscularis vesicae*) je dobro razvijen i najdeblji dio stijenke mokraćnog mjehura, a mišićna vlakna idu u svim smjerovima. Sluznica ima brojne nabore

koji omogućuju maksimalnu rastegljivost uz uštedu prostora. Prekrivena je prijelaznim epitelom, koji svojim izgledom podsjeća na nekeratinizirajući višeslojni pločasti i cilindrični epitel koji histolozi zovu urotel. Sastavljen se od slojeva okruglastih stanica koje se rastežu i izdužuju kako se mjehur puni. U maksimalno distendiranom mjehuru urotel sadrži svega 2-3 sloja stanica, dok se u kontrahiranom stanju nalazi 7-8 slojeva stanica. Prijelazni epitel (urotel) sprječava resorpciju mokraće (2). Navedena građa stijenke mokraćnog mjehura koristi se za stupnjevanje malignih tumora, postavljanje dijagnoze, donošenje terapijskih odluka kao i u prognostičke svrhe (3).

Histology of the Urinary Bladder



Slika 2. Presjek mokraćnog mjehura. Vide se slojevi mokraćnog mjehura: prijelazni epitel, lamina proprija, mišićni sloj i adventicija pri povećanju 17X (a) i 360X (b) (preuzeto s <http://antranik.org/wp-content/uploads/2011/12/histology-of-urinary-bladder-transitional-epithelium-muscular-layer-detrusor-adventitia-microscope-micrograph.jpg>)

1.1.2. Zloćudni tumori mokraćnog mjehura

Karcinom mokraćnog mjehura je zloćudni tumor nastao od stanica mokraćnog mjehura. Najčešći tip je karcinom prijelaznih stanica (urotelni ili tranzitocelularni karcinom) koji čini približno 90% svih tumora mokraćnog mjehura. Ostali tipovi su skvamozni karcinom koji čini 5% i adenokarcinom koji čini 2% ukupnih tumora (4).

Karcinom mokraćnog mjehura je na devetom mjestu po učestalosti malignih tumora i najčešći je maligni tumor mokraćnog sustava te je drugi po smrtnosti. Trostruko je češći u muškaraca nego u žena s medijanom dobi dijagnoze od 70 godina. Karcinom mokraćnog mjehura uključuje površinsku, invazivnu i metastatsku bolest od kojih svaka ima svoju kliničku sliku, prognozu i liječenje (1).

1.1.3. Etiologija i čimbenici rizika za nastanak karcinoma mokraćnog mjehura

Karcinom mokraćnog mjehura uzrokovan je genetskim abnormalnostima i vanjskim rizičnim faktorima uključujući izlaganje karcinogenima, nutritivnim faktorima, unosu tekućine i alkohola, infekcijama, upali i kemoterapijskom tretmanu (5).

Uz kožu i pluća, mokraćni mjehur je glavni organ koji je izložen karcinogenima iz okoliša. Tu spadaju aromatski amini (benzidin i anilinske boje) koji se vežu na DNA. Uglavnom se koriste u kemijskoj industriji, tiskarama, industrijskoj obradi gume, kože i metala gdje udisanjem ili apsorpcijom kroz kožu ulaze u organizam. Njihovo vezanje na DNA ovisi o aktivaciji enzima čiji je izražaj različit u populaciji, čineći određene ljude podložnijima formiranju karcinoma kao što je slučaj u polimorfizmu gena N-acetil transferaze (NAT) i glutation-S-transferaze (GSTM1) (1). Karcinom mokraćnog mjehura smatra se jednim od najbolje poznatih tzv. industrijskih karcinoma. Vrijeme latencije kemijskih karcinogena, tj. vrijeme od izloženosti do pojave karcinoma je vrlo dugo te iznosi od 30 do 50 godina. Ukupni rizik razvoja karcinoma mokraćnog mjehura u industrijskih radnika je 30%, te je najviši u industriji gume, a najniži u poljoprivredi. Pušenje cigareta je statistički glavni čimbenik rizika za razvoj karcinoma mokraćnog mjehura i odgovorno je za 30-60% svih karcinoma mokraćnog mjehura u muškaraca i žena. Osobe koje puše imaju 2 do 3 puta veće šanse za razvoj karcinoma mokraćnog mjehura, a intenzitet i godine pušenja linearno odgovaraju porastu rizika (6).

Prvi rođaci pacijenata oboljelih od karcinoma mokraćnog mjehura imaju dvostruki veći rizik za razvoj bolesti što pokazuje ulogu nasljednih čimbenika, ali visoko rizične obitelji za razvoj bolesti su relativno rijetke (1).

1.1.4. Klinička slika i dijagnostika

Makroskopska, bezbolna hematurija je glavni simptom u 85% pacijenata s dijagnozom karcinoma mokraćnog mjehura, a mikroskopska hematurija prisutna je u gotovo svih pacijenata. Hematurija je obično povremena i svaka epizoda vidljive hematurije zahtjeva detaljnu obradu čak i ako je analiza urina negativna. Od pacijenata s vidljivom hematurijom, 20% će imati urološki malignom, a 12% tumor mokraćnog mjehura. Diferencijalna dijagnoza uključuje uroinfekciju, cistitis, urolitijazu, upale prostate, a jedino potpunom obradom je moguće doći do prave dijagnoze (7).

Potpuna obrada hematurije za karcinom mokraćnog mjehura uključuje cistoskopiju, citologiju urina, UZV mokraćnog mjehura i trbuha, slikovnu pretragu urinarnog trakta (najčešće CT abdomena i zdjelice i intravenska urografija) i PSA-test. Cistoskopijom se vizualno prikaže karcinom mokraćnog mjehura, te utvrđuje njegovu lokalizaciju. Ako cistoskopija otkrije tumor, radi se transuretralna resekcija (TUR) tumora mjehura. Transuretralnim putem tumor se, ako je moguće, ukloni u cijelosti i šalje na patohistološku analizu. Na osnovi patohistološke analize, potvrđuje se dijagnoza i određuje histološki gradus tumora na čemu se temelji klinički stadij bolesti, određuje način liječenja i prognoza tumorske bolesti (8).

Slijedeći važan simptom je bol koja nastaje zbog invazije karcinoma izvan epitela mokraćnog mjehura i povezana je s veličinom i lokacijom karcinoma i/ili metastaza. Posljedice invazije su funkcionalno smanjenje kapaciteta mjehura, pretjerana aktivnost mišića, te začepljenje izlaza mjehura što dovodi do smetnji prilikom mokrenja, a koje se javljaju u trećine pacijenata. Smetnje mokrenja uključuju disuriju, polakisuriju i urgenciju (9).

Kod uznapredovale bolesti prisutni su opći simptomi kao što su gubitak tjelesne težine i apetita, umor te simptomi lokalnog širenja tumora kao što su palpabilna masa u zdjelici, hidronefroza, limfedem, opstipacija te simptomi udaljenih metastaza (10).

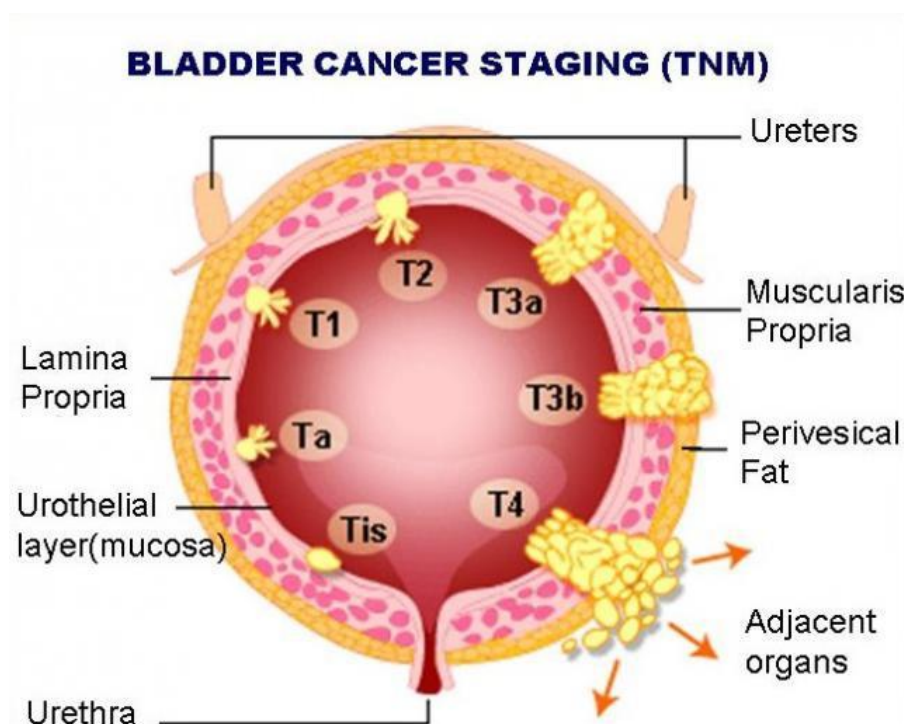
1.1.5. Stupnjevanje bolesti

Procjena stadija proširenosti karcinoma mokraćnog mjehura temelji se na TNM klasifikaciji (engl. *tumor, lymph nodes, metastasis*) Američkoga udruženja za rak (AJCC). Prognoza karcinoma mokraćnog mjehura ovisi o više parametra od kojih su najvažniji klinički stadij tumora i njegov histološki gradus (10,11).

Tablica 1. TNM klasifikacija tumora mokraćnog mjehura (AJCC).

Primarni tumor (T)	
Tx	Primarni se tumor ne može opisati
T0	Nema dokaza primarnog tumora
Ta	Neinvazivni papilarni karcinom
Tis	Karcinom <i>in situ</i>
T1	Tumor invadira subepitelno vezivno tkivo
T2	Tumor invadira mišićni sloj
T2a	Tumor invadira površinski mišićni sloj (unutarnja polovica)
T2b	Tumor invadira duboki mišićni sloj (vanjska polovica)
T3	Tumor invadira perivezikalno tkivo
T3a	Mikroskopska invazija perivezikalnoga tkiva
T3b	Makroskopska invazija perivezikalnoga tkiva
T4	Tumor invadira jedno od navedenoga: stroma prostate, sjemeni mjehurići, maternica, vagina, zdjelična stjenka, trbušna stjenka
T4a	Tumor invadira jedno od navedenoga: stroma prostate, sjemeni mjehurići, maternica, vagina
T4b	Tumor invadira zdjeličnu stjenku, trbušnu stjenku
Regionalni limfni čvorovi (N)	
NX	Limfni čvorovi ne mogu biti određeni
N0	Nema zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova
N1	Jedan zahvaćeni regionalni limfni čvor u zdjelici
N2	Više od jednog zahvaćenog limfnog čvora u zdjelici
N3	Metastaze u zajedničkim ilijačnim limfnim čvorovima
Udaljene metastaze (M)	
MX	Metastaze ne mogu biti određene
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze

Tumori stadija Ta, Tis i T1 ne prodiru u mišićni sloj i čine skupinu površinskih karcinoma. Oni čine 75-80% dijagnoza karcinoma mokraćnog mjehura, dok ostatak čini invazivni karcinom. Stadij Ta predstavlja neinvazivni papilarni tumor, dok Tis predstavlja karcinom in situ tj. ograničen na epitel. Tumor T1 se dijeli na T1a koji je ograničen na podsluznicu i T1b koji je ograničen na laminu propriju. Od površinskih karcinoma oko 70% čini Ta stadij, 20% T1 i 10% karcinom in situ (Tis). Tumore koji prodiru u mišićni sloj nazivamo invazivnima te u njih spadaju stadiji T2, T3 i T4. T2 stadij tumora, koji se dijeli na T2a i T2b, prodire u mišićni sloj (unutarnju i vanjsku polovicu), ali ne prelazi granice mokraćnog mjehura. T3 se dijeli na T3a i T3b i (mikroskopski i makroskopski) invadira okolno perivezivno tkivo. Stadij T4a je tumor koji invadira jedno od okolnih tkiva (prostatu, sjemeni mjehurić ili maternicu i vaginu), a T4b kad invadira zdjeličnu i/ili trbušnu stjenku (11), (Slika 3).



Slika 3. Stadiji tumora mokraćnog mjehura: Ta, Tis, T1, T2, T3, T4. (slika preuzeta s <http://www.bergenurological.com/cab1.jpg>)

Tablica 2. Klinički stadij tumora mokraćnog mjehura.

STADIJ	T	N	M
0a	Ta	N0	M0
0is	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
III	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
	T4b	N0	M0
IV	Any T	N1-3	M0
	Any T	Any N	M1

Klinički karcinom mokraćnog mjehura možemo podijeliti u četiri stadija ovisno o TNM statusu tumora tj. razvoju tumora, prisutnosti pozitivnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza. Prisutnost pozitivnih metastaza u limfnim čvorovima ili udaljenih metastaza uz bilo koji T stadij tumora čini četvrti klinički stadij čija je prognoza najlošija (12).

1.1.6. Gradus tumora mokraćnog mjehura

Prema stupnju diferenciranosti (engl. *grading*) stupnjevanjem po WHO (World Health Organisation) možemo razlikovati 3 gradusa ili stupnja zloćudnosti tumora mokraćnog mjehura. To su dobro diferencirani tumor (G1), srednje diferencirani tumor (G2) i loše diferencirani tumor (G3). Gradus ovisi o diferencijaciji stanica tj. njihovoj ukupnoj staničnoj i jezgrinoj abnormalnosti kao i o mitotskoj aktivnosti tumorskih stanica. Histološki promatrano gradus tumora povezan je sa stadijem tumora. Međutim, gradus ima neovisnu prognostičku vrijednost unutar određenog stadija (13). Navedena podjela, uz TNM klasifikaciju koristi se za dijagnostičke, prognostičke i terapijske potrebe.

1.1.7. Prognoza i liječenje

Površinski tumori mokraćnog mjehura liječe se u početku transuretralnom resekcijom tumora (TUR) s daljnjom intravezikalnom kemoterapijom ili imunoterapijom (9). Lokalni kirurški zahvat je često potrebno ponavljati zbog toga što u oko 70% pacijenata s površinskim tumorom dolazi do recidiva, a stopa progresije u invazivni karcinom je oko 30%. Imunoterapija se osniva na intravezikalnoj primjeni BCG-a (*Bacillus Calmette-Guerin*), te reakciji imunološkog sustava protiv stanica tumora koja uslijedi nakon davanja BCG-a. Od početka primjene, prije 40 godina, davanje BCGa je jedan od najboljih primjera imunoterapije protiv tumora (14). Česte i redovite kontrole svakih 3-6 mjeseci ključne su u ranom otkrivanju recidiva nakon kojih slijedi ponovni kirurški zahvat i patohistološka analiza.

Invazivni tumori mokraćnog mjehura liječe se radikalnom cistektomijom uz neoadjuvantnu kemoterapiju. Postoperacijska kemoterapija i radioterapija ovisi o stadiju bolesti, histološkom gradusu tumora te zahvaćenosti limfnih čvorova. Nihov cilj je uništavanje preostalih tumorskih stanica nakon radikalnog operacijskog zahvata (15,16).

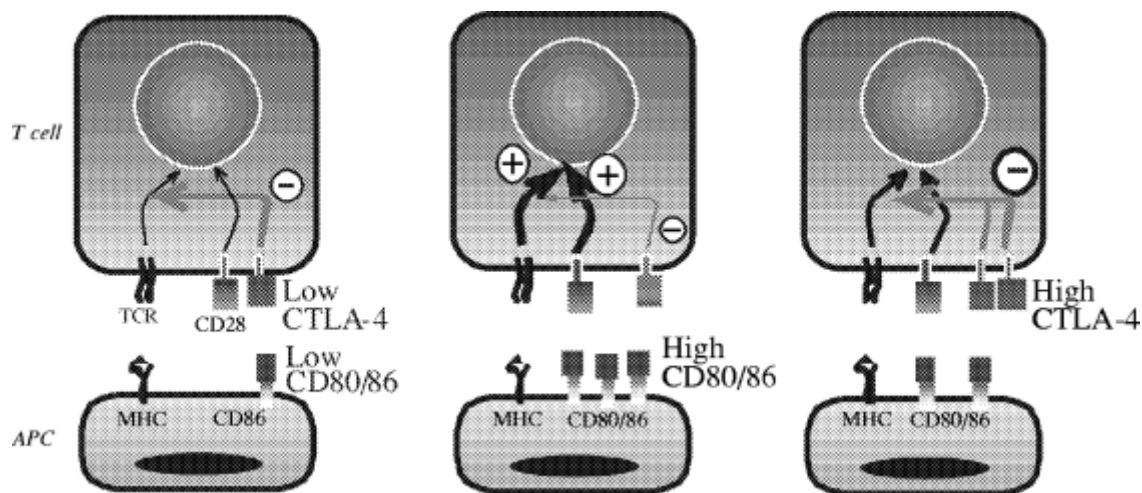
Na prognozu karcinoma mokraćnog mjehura utječu njegove genetske, patološke i fenotipske promjene. Genetska nestabilnost je jedno od glavnih svojstava invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura, specifično mutacije gena TP53, RB i PTEN povezane su s jako lošom prognozom bolesti. Unatoč velikom napretku u razumijevanju genetike karcinoma mokraćnog mjehura, stadij i gradus tumora još uvijek su najvažniji prognostički elementi. Gradus predstavlja potencijal rasta zloćudnih stanica, a stadij opisuje opseg proširenosti karcinoma i njegovu sposobnost invazije. Mnogi su genetski i epigenetski uzroci invazivnog fenotipa tumora, ali, zbog velike šarolikosti genetskih promjena u različitim tumorima, teško je odrediti točan uzrok i učinak bilo koje točno određene genetske promjene. Svakodnevno se otkrivaju novih biljezi proliferacije i invazije, signalni putevi, onkogeni, tumor supresorski geni i čimbenici rasta koji sudjeluju u razvoju karcinoma mokraćnog mjehura (17). Za pretpostaviti je da će integracija stadija, gradusa i molekularnih biljega tumora u budućnosti značajno poboljšati određivanje prognoze karcinoma mokraćnog mjehura kao i pomoći u otkrivanju bolesti i terapijskom pristupu stvaranjem novih meta na koje će se moći terapijski djelovati.

1.2. Imunosupresijske molekule CTLA-4 i PD-1

1.2.1. Molekula CTLA-4

Molekula CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) je proteinski receptor koji se nalazi na površini pomagačkih i citotoksičnih limfocita T (18). Po genetskoj strukturi pokazuje sličnosti s CD28 molekulom, još jednom imunomodulacijskom molekulom (19).

CTLA-4 djeluje kao „kontrolna točka“ imunološkog sustava i posljednja istraživanja govore o njenoj važnoj ulozi negativnog regulatora aktivacije limfocita T. CTLA-4 je u direktnoj kompeticiji s CD28 molekulom za CD80 i CD86 ligand (također poznatih kao B7-1 i B7-2) na površini antigen prezentirajućih stanica. Vezanje CD28 za CD80 i CD86 ligand čini nužni korak za aktivaciju limfocita T, zajedno s vezanjem TCR (engl. *T cell receptor*) za molekule MHC (engl. *major histocompatibility complex*) na antigen prezentirajućim stanicama (19,20).



Slika 4. Model djelovanja molekule CTLA-4 pri aktivaciji T-stanica. Pri niskoj razini izražaja molekule CTLA-4, limfocit T prima aktivacijski signal preko molekule CD28 te stanica postaje aktivna u borbi protiv mikroba i tumorskih stanica. Jednako tako, kada je razina izražaja molekule CTLA-4 visoka, limfocit T prima inhibicijski signal.

Prema ovom modelu aktivacija naivnih T-limfocita zahtijeva signalizaciju preko TCR i CD28 signalnog puta zajedno. U uvjetima suboptimalne kostimulacije, niska razina izražaja CTLA-4 mogla bi inhibirati aktivaciju T-stanica preko inhibitornih signala ili direktnom kompeticijom s CD28 (Slika 4). U uvjetima dostatne kostimulacije, niska razina izražaja CTLA-4 postaje nedostatna za svoje inhibitorno djelovanje i slijedi potpuna aktivacija T-limfocita. Ako se izražaj molekule CTLA-4 poveća, može ponovno kompetirati s CD28 i time stvarati inhibitorne signale kojima se ograničava odgovor T-stanica (20,21).

Mehanizam djelovanja CTLA-4 još nije dovoljno istražen, a predloženi mehanizmi su aktiviranje fosfataze na T-staničnom receptoru, vezivanje i otklanjanje CD80/86 receptora na antigen prezentirajućim stanicama, sprječavajući aktiviranje limfocita T pomoću CD-28 (21,22).

Ovaj model govori o važnoj ulozi CTLA-4 u održavanju periferne imunotolerancije. Reguliranje interakcije TCR i CD28 u dovoljnoj mjeri da inicira aktivaciju T-stanica, CTLA-4 smanjuje reaktivnost T-stanica na vlastite antigene i prevenira autoimunost. Pokus u kojem je u CTLA-4 potpuno uklonjen iz organizma miševa (tzv. *knock-out* miševi) doveo je do masivne letalne limfoproliferacije i autoimunosti što na impresivan način podupire gornju tvrdnju (22-24). U studijama na ljudima potvrđena je povezanost CTLA-4 polimorfizama s autoimunom hipertireozom i Gravesovom bolesti. Također se mutacije ovog gena povezuju s raznim drugim autoimunim bolestima, kao što su inzulin ovisni dijabetes mellitus, Hashimotova bolest štitnjače, celijakija, sistemski lupus eritematosus, primarna bilijarna ciroza, multipla skleroza (24).

1.2.2. Molekula PD-1

Molekula PD-1 (eng. *programmed death 1*) je inhibitorni receptor izražen na površini aktiviranih limfocita T i pro-B-limfocita koji modulira njihov odgovor tijekom imunološke reakcije u različitim tkivima, uključujući i imunološku reakciju na tumor (25). Na njega se vežu ligandi PD-L1 i PD-L2 koji su izraženi na epitelnim i endotelnim stanicama, na stanicama koje prezentiraju antigen (dendritične stanice, makrofagi i limfociti B) te na tumorskim stanicama (26,27).

Protein PD-1, kao i CTLA-4, služi kao „kontrolna točka“ imunog sustava sprječavajući aktivaciju limfocita T, što omogućava toleranciju na vlastitih antigena te tako smanjuje autoimunost. Inhibitorni efekt PD-1 postignut je dvostrukim mehanizmom poticanja

apoptoze (programirane stanične smrti) u antigen specifičnim limfocitima T uz istovremeno smanjivanje apoptoze regulacijskih (supresorskih) limfocita T (27,28).

Izražaj PD-1 liganda (PD-L1) u tkivima kao i CTLA-4 u limfocitima T može biti pojačana interferonima prisutnim u upalnim stanjima kao što je kronična infekcija. Smatra se da tumori „iskorištavaju“ njihovu regulacijsku funkciju da bi izbjegli specifični imunološki odgovor limfocitima T (29,30). Pojačani izražaj CTLA-4 pronađen je u neoplastičnim limfoidnim i mijeloidnim stanicama, kao i u solidnim tumorima poput rabdomiosarkoma, osteosarkoma, melanoma, neuroblastoma, raka debelog crijeva, pluća kao i mnogim drugima (31). Pojačan izražaj PD-L1 nađen je u mnogim karcinomima poput dojke, pluća, cerviksa, ovarija, kolona, rektuma, bubrega, te je povezan s lošom prognozom što govori u prilog imunosupresivnom djelovanju PD-1/PD-L1 signalnog puta (32-35). Nova istraživanja u pacijenata oboljelih od PD-L1 pozitivnog melanoma govore u prilog boljoj prognozi kada je izražaj PD-L1 na tumorskim stanicama povećan, jer dolazi do infiltracije tumora limfocitima T i stvaranja interferona- γ , što ukazuje na „prilagodbu tumora“ tj. kompenzacijsko povišenje aktivnosti PD-L1 liganda i učinkovitijeg napada tumorskih stanica limfocitima T (36).

1.2.3. Klinički značaj CTLA-4 i PD-1

Osim kod autoimunih bolesti, veliko kliničko značenje ovih molekula je u imunoterapiji malignih bolesti. Inhibitorni receptori (i njihovi signalni putevi) poput CTLA-4 i PD-1, čiji se izražaj nalazi na tumor specifičnim limfocitima T, dovode do njihove smanjene aktivacije i lize tumorskih stanica. Modulacijom tih receptora korištenjem monoklonskih protutijela može dovesti do povećane aktivacije imunološkog sustava protiv stanica raka i temelj je novog oblika imunoterapije koja se vrlo uspješno počinje primjenjivati pri liječenju raka (29-36). Tako je davanje monoklonskog protu-CTLA-4 protutijela *ipilimumab*-a pacijentima oboljelih od metastatskog melanoma rezultiralo povećanom stopom ukupnog preživljenja u fazama 3 kliničkih pokusa. Mnogi pacijenti s metastatskom bolesti prošli su granicu od 10 godina preživljenja bez potrebe za dodatnim intervencijama (37,38). Nova istraživanja upućuju da blokada PD-1 i PD-L1 receptora, kao i zajednička blokada CTLA-4 i PD-1/PD-L1 kombinirana s kemoterapijom i radioterapijom, može imati još značajniji učinak pri liječenju različitih vrsta tumora uključujući karcinom pluća ne-malih stanica, tumore bubrega, rak debelog crijeva, a koji nisu bili podložni nikakvoj vrsti imunoterapije (39-44).

Izražaj CTLA-4 i PD-1 signalnih puteva još je predmet aktivnog istraživanja u mnogim solidnim tumorima i hematološkim malignitetima, što može otvoriti nove terapijske ciljeve pri liječenju tih tumora.

2. HIPOTEZA

S obzirom na imunosupresivno djelovanje molekula CTLA-4 i PD-1 i njihovu važnu ulogu u razvoju različitih malignih bolesti, očekuje se njihov povećan izražaj u urotelnim tumorima mokraćnoga mjehura niskog gradusa.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Ispitanici i uzorci

U analizu istraživanja uključeni su uzorci pacijenata koji su bili podvrgnuti transuretralnoj resekciji tumora mokraćnog mjehura (TUR) u Kliničkom bolničkom centru Split, Odjelu za urologiju. Pri operacijama uzeti su uzorci tkiva za analizu izražaja gena te su uzorci odmah nakon operacije pohranjeni u tekućem dušiku (na -196°C) gdje su čuvani do izolacije molekule mRNA.

Analizirano je dvanaest karcinoma mokraćnog mjehura prijelaznih stanica koji su imali niski gradus. Svi su ispitanici potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju, a u skladu s dopuštenjem Etičkog odbora KBC Split (klasa: 500-03/06-01/208, ur.br: 2181-147-06-01/01-MJ) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (klasa: 003-08-10-03/0005, ur.br: 2181-198-03-04/10-10-0011).

Proučavanje izražaja gena provedeno je u laboratoriju Katedre za imunologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Splitu.

3.2. Postupak izolacije RNA iz tkiva

Izolacija RNA iz zdravog i tumorskog tkiva je prvi korak u istraživanju. Uzorak iz tekućeg dušika homogeniziran je (eng. *tissue pulverizer*) snažnim udaranjem metalnim čekićem, a nakon toga uzorak smrvljenog tkiva prebačen u 1,5 ml tubice bez DNaze i RNaze u koju se dodaje 1mL Qiazol Lysis reagensa i ostavlja da odstoji 5 minuta na $15-25^{\circ}\text{C}$. Korišteno je ~100 mg uzorka na 1 ml reagensa, a volumen dodanog tkiva ne smije prelaziti 10% volumena Qiazol Lysis Reagent-a. Zatim se smjesi dodaje 0,2mL kloroforma i vorteksira 15 sekundi, te ostavlja da smjesa odstoji na sobnoj temperaturi 2-3 minute. Nakon toga slijedi centrifugiranje smjese na 12,000 okretaja kroz 15 minuta na temperaturi od 4°C . Rezultat centrifugiranja je taloženje proteina na dnu tubice, DNA u srednjem sloju i RNA na vrhu. Prozirna faza u kojoj se nalazi molekula mRNA pipetiranjem se prebaci u novu tubicu i doda joj se 0,5mL isopropanola (na 1 ml Qiazol Lysis Reagent-a), te vorteksira i inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon ponovnog centrifugiranja na 12,000 okretaja kroz 10 minuti na temperaturi od 4°C u tubici se dobije RNA pelet kao bijeli talog na dnu. Aspirira se supernatant i na RNA dodaje 1mL 75% etanola i ponovno centrifugira na 7,500 okretaja kroz 15 minuta na temperaturi od 4°C . Nakon ponovnog otklanjanja supernatanta ostavlja se RNA pelet da se osuši. U posljednjem koraku RNA talog je pažljivim pipetiranjem otopljen u

određenom volumenu *DNase*, *RNase free* vode (30µl). Istim postupkom izolirana je RNA iz sva 24 uzorka (12 uzoraka zdravog i 12 uzoraka tumorskog tkiva istog ispitanika). Nakon toga moguće koncentracija RNA je izmjerena spektrofotometrom (NanoDrop Spectometar). Uzorci su zatim pohranjeni na -80°C do postupka sinteze cDNA.

3.3. Sinteza cDNA i priprema qRT-PCR

Izolirana mRNA prevodi se u cDNA enzimom reverznom transkriptazom. Za sintezu cDNA je korišten kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems).

Za vrijeme cijelog postupka sve komponente kita drže se na ledu. U tubici se miješaju sljedeće komponente: 10x RT Buffer (2,0 µl), 25x dNTP Mix(100mM) (0,8 µl), 10xRT Random Primers (2,0 µl), MultiScribe™Reverse Transcriptase (1,0 µl), RNase Inhibitor (1,0 µl), voda bez nukleaza (3,2 µl), RNA (izračuna se, do 1µg) i doda se voda bez RNaza do 20µL. Budući da je navedena smjesa je dostatna za jedan uzorak, smjesa je načinjena za sva 24 uzorka istovremeno i podijeljena na 24 tubice u koje je naknadno dodana RNA (1µg) u potrebnom volumenu s vodom bez RNaza do 20µL. Nakon nježnog miješanja sadržaja tubice, slijede 3 koraka inkubacije: 10 minuta na 25°C, 30 minuta na 50°C te 5 minuta na 85°C. Zatim se doda 1µL *E. coli* RNaseH i inkubira 20 minuta na 37°C. Dobivena cDNA može se koristiti za kvantitativni PCR ili pak pohraniti na -20°C.

Svaka jažica na ploči koja ide u RT-PCR aparat (7500 Real Time PCR System-Applied Biosystems) sadrži uzorak od ukupno 20µL, od kojih je 16µL MIX-a i 4µL uzorka cDNA. MIX se sastoji od 4µL RNaza/DNaza free vode, 10µL SYBR Green boje, te po 1µL Forward i 1µL Reverse početnice za svaki pojedinačni uzorak cDNA.

Zbog kontrole uspješnosti qRT-PCR-a, na svaku ploču ispipetirani su i kontrolni uzorci koji su uz MIX s početnicama, sadržavali i RPS23. RPS23 je uvijek podjednako izražen u svakom humanom tkivu te služi kao kontrola izražaja gena u tim tkivima.

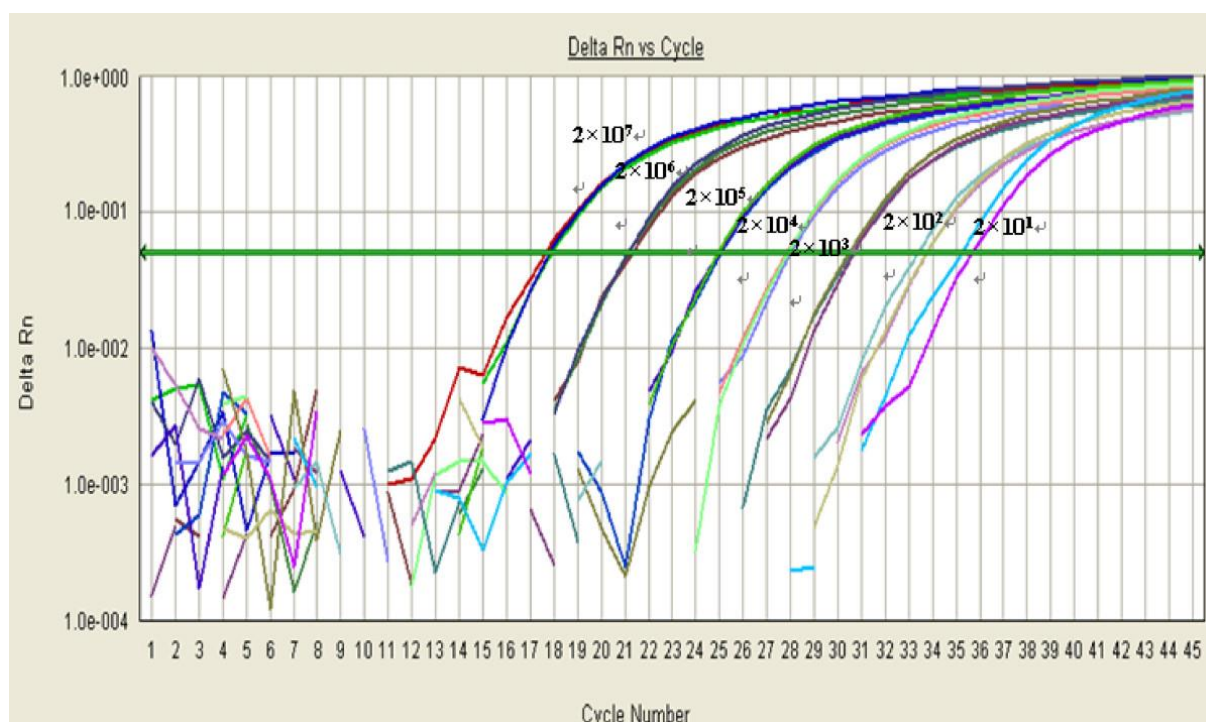
Preko gotove ploče lijepi se naljepnica kako se uzorci ne bi pomiješali te se centrifugira na 4,600 okretaja kroz 13 minuta na 4°C.

3.4. Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*) je laboratorijska metoda koja omogućava višestruko umnažanje određenog DNA fragmenta iz jako male količine početnog materijala, stvarajući eksponencijalno rastući broj kopija. Sastoji se od tri osnovna koraka. Prvi korak je denaturacija dvolančane DNA u jednolančanu uz pomoć topline, najčešće na temperaturi od 95 °C. Drugi korak je hibridizacija komplementarnih oligonukleotidnih lanaca tj. primera s jednolančanom DNA. Treći korak je produljenje početnica uz pomoć enzima Taq polimeraze, na temperaturu otporne DNA polimeraze, stvarajući novi lanac po modelu jednolančane DNA. Otpornost na visoku temperaturu je veoma važna, jer se na kraju svakog ciklusa kopiranja DNA dvolančana DNA mora ponovno denaturirati. Tri navedena koraka čine jedan ciklus PCR-a na kraju kojega se broj DNA kopija udvostruči, a koji se tokom reakcije ponavlja 25-45 puta pri čemu se željeni fragment DNA umnoži milijun do milijardu puta.

U tradicionalnom PCR-u, rezultat se analizira samo na kraju reakcije. Najčešće korištena metoda detekcije je elektroforeza na agaroznom gelu koja razdvaja DNA fragmente na osnovu njihove molekularne mase. Na kraju razdvajanja, gel se boja etidij bromidom koji veže DNA i može se vizualizirati pod UV svjetlom. Prisustvo gena u izuzetno velikom broju od milijun do milijardu kopija olakšava njegovu detekciju, a zatim i analizu eventualnih izmjena njegove nukleotidne strukture. Međutim često je važno ne samo otkriti neki gen u uzorku, već i odrediti broj kopija u kima je prisutan. Problem koji je nastao u korištenju tradicionalnog PCR-a jest postojanje platoa detekcije na agaroznom gelu, što znači da ako postoje veoma niske koncentracije originalne DNA nećemo biti u mogućnosti na taj način detektirati i kvantificirati željene fragmente. Klasična metoda RT-PCR (engl. *reverse transcriptase PCR*) je semikvantitativna, stoga je potreba za preciznijom kvantifikacijom mRNA dovela do razvoja nove tehnike nazvane kvantitativna PCR u stvarnom vremenu (qRT-PCR, od engl. *real time PCR*). qRT-PCR je pouzdana i precizna metoda za kvantifikaciju specifičnih molekula DNA. Za reakciju su potrebne vrlo male količine mRNA, što omogućava upotrebu ove metode u slučajevima kada na raspolaganju imamo vrlo male količine tkiva (mikrodisekcija). Produkti PCR obilježeni fluorescencijskom bojom kontinuirano se analiziraju. Fluorescencijska boja (najčešće se koristi SYBR Green I) vezana je uz prigušivač (Q- quencher), a emitira fluorescenciju tek nakon razdvajanja od njega, tj. vezanjem za dvolančanu (novonastalu) DNA. Dakle, mjerenjem fluorescencije mjerimo nastalu DNA jer količina fluorescencije razmjerna je količini PCR proizvoda.

Ovo omogućava detekciju originalne mRNA/cDNA u femtogramima. Rezultati qRT-PCR-a se očitavaju na krivulji umnažanja. Ta krivulja pokazuje porast intenziteta fluorescencije (laserski detektirano) u odnosu na broj PCR ciklusa. U tu krivulju se postavlja detekcijski prag, koji nakon što ga intenzitet fluoresciranja prijeđe, ukazuje na sigurnu pojavu umnažanja kopija DNA. Ciklus u kojem je taj prag prijeđen se naziva Ct tj. pragovni ciklus (engl. *cycle threshold*). Što je ciklus u kojemu se prijeđe prag niži, veća je količina DNA u određenom uzorku (i obrnuto).



Slika 5. Amplifikacijske krivulje qRT-PCR reakcije. Na njoj je kvantificirana količina fluorescencije (RN) u odnosu na broj ciklusa (Cycles). Količina početnog materijala diktira vrijednost u kojoj fluorescencija pojedinog uzorka prijeđe predviđeni intenzitet – prag ciklusa (Ct). Niži Ct ukazuje na veći broj mRNA/cDNA molekula gena koji se istražuje, što odgovara njegovom većem izražaju.

3.5. Obrada podataka

Rezultati kvantitativne PCR reakcije u stvarnom vremenu predstavljaju Ct vrijednosti koje definiraju ciklus u kojem fluorescentni signal prelazi zadani prag detekcije. Ct vrijednost predstavlja izražaj testiranih gena u tkivu mokraćnog mjehura i obrnuto je proporcionalna izražaju testiranih gena u uzorku. Mjerile su se relativne promjene izražaja ciljanih gena (PD-1 i CTLA-4) u tumorskom i zdravom tkivu istih pacijenata, a kao endogena kontrola za kvantifikaciju korišten je gen RPS 23.

Relativne vrijednosti promjena ciljnog gena u odnosu na kontrolni, za tumorsko i zdravo tkivo dobivene su po formuli $2^{(Ct_{kontrola} - Ct_{ciljanog\ gena})}$. Zatim je izračunat omjer relativnih vrijednosti za tumorsko tkivo i relativne vrijednosti za zdravo tkivo i time je dobivena razina promjene (porast ili pad) izražaja ciljnog gena u tumorskom tkivu. Omjer > 2 smatran je porastom izražaja PD-1 i CTLA-4. U skupinu s porastom izražaja također su svrstani uzorci kod kojih je Ct-vrijednost PD-1 i CTLA-4 u zdravom tkivu bila ispod praga detekcije, dok je Ct-vrijednost PD-1 i CTLA-4 u tumorskom tkivu bila unutar detekcijskog praga. Napravljen je one sample H-kvadrat test kako bi se utvrdila promjena izražaja istraživanih gena u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo istog pacijenta. Vrijednost od $P < 0.05$ smatrana je statistički značajnom. Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Izračun relativnih promjena ciljanih gena napravljan je u programu Microsoft Office Excell 2013.

4. REZULTATI

Razina promjene izražaja gena CTLA-4 i PD-1 u tumorima dobivena je usporedbom relativnih vrijednosti izražaja gena u tumorskom i zdravom tkivu. Omjer veći (ili manji) od 2 smatran je porastom (smanjenjem) izražaja CTLA-4 i PD-1. U skupinu s porastom izražaja također u svrstani uzorci kod kojih je Ct-vrijednost PD-1 i CTLA-4 u normalnom tkivu bila ispod praga detekcije, dok je Ct-vrijednost PD-1 i CTLA-4 u tumorskom tkivu bila unutar detekcijskog praga. Relativne vrijednosti promjene izražaja pojedinih gena u tumorskom tkivu kao i zdravom tkivu mokraćnog mjehura dobivene su analizom Ct vrijednosti za pojedine gene (CTLA-4 i PD-1), te njihovom usporedbom s Ct vrijednošću genskog standarda (RPS23

Tablica 3. Promjena izražaja gena CTLA-4, prikazano kao višekratnik porasta, u pojedinim tumorima mokraćnoga mjehura (u odnosu na zdravo tkivo istog mokraćnoga mjehura).

Naziv uzorka tkiva	Porast/pad izražaja gena u tkivu
M004T	0,000253345
M005T	3,573683528
M009T	16,58360017
M012T	Detekcija ispod praga za zdravo tkivo, a iznad praga za tumorsko.
M015T	712166,2181
M016T	209190,8771
M017T	Detekcija ispod praga za zdravo tkivo, a iznad praga za tumorsko.
M018T	2,690128797
M020T	134,3780078
M030T	0,001052879
M031T	Detekcija ispod praga za zdravo tkivo, a iznad praga za tumorsko.
M040T	Detekcija ispod praga za zdravo tkivo, a iznad praga za tumorsko.

Povećan izražaj gena za CTLA-4 u tumorskom tkivu uočena je kod 10 od 12 ispitanika (83.33%) $P=0,0433$, *one sample* Hi-kvadrat test.

Srednja vrijednost promjena kod uzoraka kojima je bilo moguće izračunati razinu promjene, koja ukazuje na porast aktivnosti gena CTLA-4 iznosila je 115 189 puta.

Tablica 4. Promjena izražaja gena PD-1, prikazano kao višekratnik porasta, u pojedinim tumorima mokraćnoga mjehura (u odnosu na zdravo tkivo istog mokraćnoga mjehura).

Naziv uzorka tkiva	Porast/pad izražaja gena u tkivu
M004T	0,002341641
M005T	0,156073265
M009T	3,24380941
M012T	Detekcija ispod praga za zdravo tkivo, a iznad praga za tumorsko.
M015T	183,4003058
M016T	851,0690414
M017T	0,000458295
M018T	5,402910565
M020T	Detekcija ispod praga za zdravo tkivo, a iznad praga za tumorsko.
M030T	0,085703375
M031T	1,02746225
M040T	Detekcija ispod praga za zdravo tkivo, a iznad praga za tumorsko.

Povećan izražaj gena za PD-1 u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo kod istog pacijenta uočena je kod 7/12 parova uzoraka što odgovara 58.33% uzoraka. *One sample* H-kvadrat test ne pokazuje razinu statističke značajnosti, $P = 0,7728$

Srednja vrijednost promjena kod uzoraka kojima je bilo moguće izračunati razinu promjene, koja ukazuje na porast aktivnosti gena PD-1 iznosila je 116 puta.

5. RASPRAVA

Rezultati istraživanja u kojem smo analizirali izražaj gena za CTLA-4 i PD-1 u tkivu, urotelnih tumora mokraćnog mjehura niskog gradusa pokazali su da je CTLA-4 statistički značajno više izražen ($P = 0,0433$). Nadalje, nije utvrđen statistički značajan porast izražaja molekule PD-1 u tkivu urotelnih tumora ($P = 0,7728$). Usprkos ne postojanju statističkih razlika, neki su tumori imali veliki porast izražaja gena PD-1 pa je prosječni porast izražaja gena PD-1 iznosio 116 puta. Šarolikost genetskih promjena je jedno od glavnih svojstava tumora, pa tako i tumora mokraćnog mjehura pa je to vjerojatni razlog različitosti izražaja gena među različitim tumorima (46).

Imunološki sustav koristi se nizom mehanizama samo-regulacije kojim se sprječava pretjerani imunološki odgovor na vlastite ili bezazlene strane antigene. Iako nužni za imunološku homeostazu, u tumorskom tkivu, inhibitorni signalni putevi mogu prevladati i spriječiti efektivni anti-tumorski imunološki odgovor. Mehanizmi kojima CTLA-4 i PD-1 vrše svoj inhibitorni utjecaj na T-staničnu aktivaciju je višestruki, tako CTLA-4 primarno ograničava T-staničnu aktivaciju i klonalni izražaj dok PD-1 primarno ograničava njihovu efektorsku funkciju u perifernim tkivima.(21,22,27,28).

Njihovu regulacijsku funkciju „iskorištavaju“ mnogi tumori kako bi izbjegli specifični imunološki napad limfocitima T (29,30). Inhibitorni receptori i njihovi signalni putevi, kao što su CTLA-4 i PD-1, čiji se izražaj nalazi na tumor specifičnim T-stanicama, vode do smanjene aktivacije i supresije različitih funkcija limfocita kao što su proliferacija, sekrecija citokina i liza tumorskih stanica. Povećani izražaj CTLA-4 i PD-1 pronađen je u mnogim tumorskim stanicama poput karcinoma dojke, pluća, cerviksa, jajnika, kolona i rektuma, bubrega, kao i u neoplastičnim limfocitnim i mijelocitnim stanicama, te u melanomima (31-36). S obzirom na njihovu važnu ulogu u razvoju mnogih malignih bolesti, cilj ovog rada bio je analizirati njihov izražaj na uzorku urotelnih tumora mokraćnog mjehura niskog gradusa.

Novi pristup imunoterapiji raka temelji se na modulaciji ovih receptora korištenjem monoklonskih protutijela pristupom poznatim kao „blokada kontrolne točke“ (eng. *checkpoint blockade*). Djelovanjem monoklonskih protutijela blokiraju se ovi signalni putevi, što može dovesti do povećane aktivacije imunološkog sustava protiv stanica raka. Mnoga protutijela još se aktivno istražuju, a neka kao *ipilimumab* već je odobren za kliničku primjenu u liječenju melanoma (37-44).

Uspješnost ovog oblika ciljane terapije – imunoterapije ovisi o samom izražaju ciljanih molekula i njihovih liganda u tumorima koji se zbog velike genetske varijabilnosti

razlikuju između istih tumorskih tipova. Testiranje izražaja ciljanih gena ima ključnu ulogu u pronalaženju osoba koje će pokazati najbolji odgovor na ovaj oblik terapije, te isto tako ima i veliku prognostičku vrijednost.

Ova pilot studija pokazala je statistički značajan porast izražaja gena CTLA-4, te trend porasta izražaja gena PD-1 u urotelnim tumorima mokraćnoga mjehura niskog gradusa. Buduća istraživanja trebala bi uključiti veći broj uzoraka tumora mokraćnog mjehura u kojima bi se odredio izražaj gena za CTLA-4 i PD-1 metodom PCR reakcije u stvarnom vremenu, kao i drugim metodama (Western blot i imunohistokemija) kojima bi se na proteinskoj razini potvrdili naše rezultate.

Zaključno, rezultati provedenog pilot istraživanja pokazuju da urotelni tumori imaju visok izražaj imunosupresijskih molekula CTLA-4 i PD-1 pa bi i te tumore trebalo uključiti u klinička testiranja kojima se utvrđuje učinkovitost liječenja tumora monoklonskim protutijelima (npr. *ipilimumab*) koja inhibiraju navedene molekule. Za pretpostaviti je da bi takva terapija mogla biti učinkovita u urotelnim tumorima s visokim izražajem molekula CTLA-4 i PD-1.

6. ZAKLJUČCI

- ✓ Genski izražaj CTLA-4 statistički je značajno povećan u urotelnim tumorima mokraćnog mjehura niskog gradusa.
- ✓ Gen PD-1 nema statistički značajno povišen izražaj u urotelnim tumorima mokraćnog mjehura niskog gradusa. Iako ne postoji statistička značajnost, prosječni porast izražaja gena je 116 puta i sugerira da bi s povećanjem broja ispitivanih uzoraka dosegao statističku značajnost.
- ✓ Imunoterapija monoklonskim protutijelima protiv molekula CTLA-4 i PD-1 mogla bi biti učinkovita u urotelnim tumorima koji imaju visok izražaj tih molekula.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Utvrditi postoji li povećan izražaj gena CTLA-4 i PD-1 u urotelnim tumorima mokraćnoga mjehura niskog gradusa.

Metode: Iz uzoraka je izolirana molekula mRNA, nakon čega je RNA reverznom transkripcijom prevedena u cDNA koja je služila kao predložak za qRT-PCR. Elektroforezom na agaroznom gelu potvrđena je specifičnost početnica, a razina promjene izražaja gena utvrđena je usporedbom s izražajom gena RPS23.

Rezultati: Gen za CTLA-4 ima pojačan izražaj u 10 od 12 urotelnih tumora mokraćnog mjehura niskog gradusa ($P = 0,0433$). Gen za PD-1 ima tendenciju k povećanom izražaju (u 7 od 12 tumora mokraćnog mjehura, $P = 0,7728$)

Zaključci: Izražaj gena CTLA-4 statistički značajno je povećan u urotelnim tumorima mokraćnog mjehura niskog gradusa. Gen PD-1 nema statistički značajno povišen izražaj u urotelnim tumorima mokraćnog mjehura niskog gradusa, iako postoji tendencija njegovom povećanom izražaju. Rezultati ovog rada ukazuju na moguću korisnost inhibicije molekula CTLA-4 i PD-1 pri liječenju urotelnih tumora.

8. SUMMARY

Aims: To determine level of expression of immunospressive CTLA-4 and PD-1 molecules in low grade urothelial tumors.

Methods: RNA was isolated from tissues samples and then converted into cDNA by reverse transcription. cDNA was used as a template for qRT-PCR reaction. Specificity of the amplification reaction was verified by agarose gel electrophoresis. RPS23 was used as a housekeeping control.

Results: CTLA-4 was over-expressed in 10 of 12 urothelial bladder tumors ($P = 0,0433$). PD-1 gene display tendency to elevated expression (7 of 12 urothelial bladder tumors showed overexpression, $P = 0,7728$)

Conclusions: Expression of CTLA-4 is significantly elevated in low grade urothelial bladder tumors. PD-1 expression is not significant elevated although there is trend toward its elevation. These results imply great potential of inhibiting CTLA-4 and PD-1 molecules during urothelial cancer therapy.

9. POPIS LITERATURE

1. Wein JA. Campbell-Walsh Urology. 10. izdanje. Philadelphia: Saunders; 2012. str. 74-8, 2299-320.
2. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka Zagreb: Medicinska naklada; 2007. str. 361-3.
3. Sobin LH, Wittekind C. UICC: TNM Classification of Malignant Tumors. 6. izdanje. New York: Wiley; 2002.
4. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E. EAU Guidelines on non-muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder. Eur Urol. 2008;54:303-14.
5. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezi M. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. Nat Clin Pract Urol. 2006;3:327-40.
6. Hayat MJ, Howlander N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program. Oncologist. 2007;12:20-37.
7. Wakui M, Shigaii T. Urinary tract cancer screening analysis of urinary red blood cell volume distribution. Int J Urol. 2000;7:248-53.
8. Medicina.hr Karcinom mokraćnog mjehura; pristupljeno 02.06.2015. Dostupno na: http://www.medicina.hr/clanci/karcinom_mokracnog_mjehura.html
9. Šitum M, Gotovac J. Urologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. str. 124-9.
10. Vrdoljak E, Krajina Z, Šamija M. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2006. str. 236-8.
11. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG. AJCC Cancer Staging Manual 7th ed. New York. NY Springer; 2009.
12. Tanaka T, Miyazawa K, Tsukamoto T, Kuno T, Suzuki K. Pathobiology and Chemoprevention of Bladder Cancer. J Oncol. 2011;2011:1-23.
13. Krušlin B, Belicza M. Određivanje gradusa urotelnog karcinoma prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2004. Liječ Vjesn. 2006;128:201-6.
14. Bohle A, Jocham D, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. J Urol. 2003;169: 90-5.
15. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F. Cancer survival in five continents: a worldwide population based study (CONCORD). Lancet Oncol. 2008;9:730-56.
16. Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watson RC, Ahmed T, Weiselberg LR et al. Preliminary results of methotrexate, vinblastine, Adriamycin and cisplatin (M-VAC) in advanced urothelial tumors. J Urol. 1985;133:403-7.

17. Cheng L, Davison DD, Adams J, Lopez-Beltran A. Biomarkers in bladder cancer: Translational and clinical implications. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2014;89:73-111.
18. Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei MG, Luciani MF, Golstein P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol*. 1991;147:1037-44.
19. Chambers CA, Krummel MF, Boitel B. The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunol Rev*. 1996;153:27-46.
20. Bluestone JA. Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? *J Immunol*. 1997;158:1989-93.
21. Thompson CB, Allison JP. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity*. 1997;7:445-50.
22. Tanchot C, Lemonnier FA, Perarnau B, Freitas AA, Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science*. 1997;276:2057-62.
23. Green JM, Noel PJ, Sperling AI. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity*. 1994;1:501.
24. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol*. 1997;46:551-4.
25. Agata YA, Kawasaki H, Nishimura Y, Ishida T, Tsubata H, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996;8:765-72.
26. Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang IM, Marquette K, Lowe D et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol*. 2003;170:711-18.
27. Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98:13866-71.
28. Chemnitz JM, Parry KE, Nichols CH, Riley J, Riley JN. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon

- primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol.* 2004;173(2):945-54.
29. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N.Engl. J Med.* 2012;366,2443–54.
 30. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007;450,903–7.
 31. Contardi E, Palmisano GL, Tarrazi PL, Martelli AM, Fala F, Fabbi M, et al. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int J Cancer.* 2005;117:538.
 32. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002;8:793–800.
 33. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101:17174–9.
 34. Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, Freeman GJ. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:802–10.
 35. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:12293–7.
 36. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012;4:127-37.
 37. Wolchok JD, Weber JS, Maio M. Four-year survival rates for patients with metastatic melanoma who received ipilimumab in phase II clinical trials. *Ann Oncol.* 2013;24:2174–80.
 38. Prieto PA, Yang JC, Sherry RM. CTLA-4 blockade with ipilimumab: Long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18:2039–47.
 39. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Harriet M, Richard D, Carvajal WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol.* 2014;32:1020–30.

40. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: Results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol.* 2012;30:2046–54.
41. Demaria S, Kawashima N, Yang AM. Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:728–34.
42. Deng L, Liang H, Burnette B. Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J Clin Invest.* 2014;124:687–95.
43. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107:4275-80.
44. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369(2):122-33.
45. Wahba L, Amon JD, Koshland D, Vuica-Ross M. RNase H and multiple RNA biogenesis factors cooperate to prevent RNA:DNA hybrids from generating genome instability. *Mol Cell.* 2011;44:978-88.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Mate Čičmir-Vestić

Datum i mjesto rođenja: 9. ožujka 1991., Split, Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Domovinskog rata 43, 21000 Split, Hrvatska

Broj telefona: 091 164 9307

Elektronska pošta: mate.c-v@hotmail.com

Školovanje:

1997.-2005. Osnovna škola "Bol", Split, Hrvatska

2005.-2009. "Prirodoslovna gimnazija", Split, Hrvatska

2009.-2015. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska

Strani jezici:

Engleski jezik – aktivno

Njemački jezik – osnovno

Talijanski jezik – osnovno