



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Ana V. Ristić Petrović

**ZNAČAJ EKSPRESIJE MARKERA HIPOKSIJE I
NEOANGIOGENEZE U PRAĆENJU PACIJENATA SA
UROTELNIM KARCINOMOM MOKRAĆNE BEŠIKE**

Doktorska disertacija

Mentor: Ljubinka Janković Veličković

Tekst ove doktorske disertacije stavlja se na uvid javnosti, u skladu sa članom 30., stav 8. Zakona o visokom obrazovanju ("Sl. glasnik RS", br. 76/2005, 100/2007 – autentično tumačenje, 97/2008, 44/2010, 93/2012, 89/2013 i 99/2014).

NAPOMENA O AUTORSKIM PRAVIMA:

Ovaj tekst smatra se rukopisom i samo se saopštava javnosti (član 7. Zakona o autorskim srodnim pravima, "Sl. glasnik RS", br. 104/2009, 99/2011 i 119/2012).

Nijedan deo ove doktorske disertacije ne sme se koristiti ni u kakve svrhe, osim za upoznavanje sa njenim sadržajem pre odbrane disertacije.

Niš, 2022.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE

Ana V. Ristić Petrović

**THE SIGNIFICANCE OF THE HYPOXIA-RELATED
AND NEOANGIOGENESIS MARKER EXPRESSION IN
THE UROTHELIAL BLADDER CANCER PATIENTS'
FOLLOW-UP**

Doctoral dissertation

Doctoral supervisor: Ljubinka Janković Veličković

Niš, 2022.

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, čija je stipendija opredelila moj profesionalni put. Doktorska disertacija urađena je pod okriljem projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja OII75092, čiji je rukovodilac prof. dr Ljubinka Janković Veličković.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Ljubinki Janković Veličković, svom mentoru, na ukazanom poverenju, dragocenim savetima i podršci prilikom izrade ove doktorske disertacije. Prof. dr Ljubinki Janković Veličković, dugujem posebnu zahvalnost što me je uvela u svet uropatologije, čiji izazovi su neiscrpni izvor mog entuzijazma.

Zahvaljujem se prof. dr Maji Jovičić Milentijević, šefu Katedre za patologiju, na predivnoj saradnji tokom trajanja specijalizacije i akademskih doktorskih studija i na ukazanom poverenju da predsedava Komisijom za odbranu ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Sanji Radojević Škodrić na inspirativnim susretima, profesionalnoj saradnji i ukazanom poverenju da bude dragoceni član Komisije za odbranu ove doktorske disertacije.

Zahvalna sam prof. dr Miljanu Krstiću, rukovodiocu Centra za patologiju, na svom profesionalnom rastu, iskrenim savetima, ukazanom poverenju i prijateljstvu. Čast mi je i privilegija što sam deo tima Centra za patologiju, Univerzitetskog kliničkog centra u Nišu.

Zahvaljujem se Šiga univerzitetu medicinskih nauka u Japanu, posebno Departmanu za patologiju, prof. dr Takanori Hatoriju i prof. dr Mukaisho Kenichiju, na srdačnom gostoprimstvu, predusretljivosti, edukaciji, motivaciji, inspiraciji i nezaboravnom iskustvu.

Neizmernu zahvalnost dugujem doc. dr Dragani Stokanović na razumevanju, podršci, sugestijama, nesebičnoj pomoći i ličnom zalaganju u izradi ove doktorske disertacije. Posebno sam ponosna na naše prijateljstvo, koje traje od gimnazijskih dana, a koje je obogatilo iskreno drugarstvo naše dece.

Zahvalna sam dr sci. med. Slavici Stojnev na neiscrpoj energiji kojom me obasipa svakog dana, na nezaboravnim Kongresima, na fantastičnim fotografijama iz Šige, Kjota, Osake, Tokija, Kelna, Amsterdama, etc. Posebnu zahvalnost joj dugujem za sprovođenje u delo veoma ambicioznog projekta, ispitivanja preko 600 uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike, koje je upotpunjeno i kliničkim praćenjem pacijenata.

Zahvaljujem se prof. dr Kirilu Trpkovu na bezuslovnoj pomoći, prijateljskim savetima i moralnoj podršci u pravom trenutku.

Zahvaljujem se Internacionalnoj akademiji patologa i prof. dr Ismail Matalki na ukazanom poverenju, časti i odgovornosti da budem njihov stipendista.

Zahvaljujem se Evropskom udruženju patologa, koje mi je omogućilo da vidim, čujem i učim od najpoznatijih svetskih patologa.

Veliku zahvalnost dugujem akademiku prof. dr Vladisavu Stefanoviću koji je svojim savetima i bezrezervnom podrškom pomogao mnogim doktorandima da naprave svoje prve naučničke korake.

S velikom tugom se zahvaljujem prof. dr Jasmini Gligorijević, na iskrenosti, mudrim savetima i zanimljivim trenucima.

Najiskrenije hvala Biljani Tošić, Ljubiši Petroviću, Slađani Todorović, Milkici Tošić Đorđević i Milici Timotijević što me s ljubavlju podržavaju, i svaki moj uspeh doživljavaju kao svoj. Hvala studentima čije uspehe doživljavam kao svoje.

Beskrajno sam zahvalna Damjanu i Milanu, koji su moj život.

Doktorsku disertaciju posvećujem svojim fenomenalnim roditeljima jer su me odgajali bajkovito negujući u meni najlepše ljudske osobine. Hvala Vam.

Ana Ristić Petrović, 2022.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:

Prof. dr Ljubinka Janković Veličković,
Redovni profesor za užu naučnu oblast Patologija,
Katedra za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Naslov:

Značaj ekspresije markera hipoksije i neoangiogeneze u praćenju pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bešike

Rezime:

Najčešći tip karcinoma mokraćne bešike, u preko 90% slučajeva, je urotelni karcinom mokraćne bešike (UKMB). Sedam od deset slučajeva UKMB se detektuje u ranom stadijumu. Otprilike 70-80% novodijagnostikovanih UKMB se prezentuje neinvazivnim (pTa i pTis stadijumi) ili rano invazivnim tumorom (pT1 stadijum). Recidivira u 50-70% slučajeva, dok se invazija mišićnog sloja i progresija u pT2 stadijum javlja u 15-25% slučajeva. U ovoj studiji imunohistohemijski je ispitivana ekspresija HIF1 α , VEGF, VEGFR1, NOTCH3, JAGGED1, i morfometrijski određivana gustina CD34 pozitivnih malih krvni sudova (MVD) na 613 uzoraka UKMB. Analiziran je njihov međusobni odnos kao i povezanost sa kliničko-patološkim parametrima i preživljavanjem pacijenata. Prezentovana studija je identifikovala HIF1 α , VEGFR1, NOTCH3 i MVD kao nezavisne prognostičke parametre za ukupno preživljavanje i UKMB specifično preživljavanje pacijenata. Pozitivna ekspresija NOTCH3, veća gustina malih krvnih sudova (MVD) i odsustvo ekspresije HIF1 α i VEGFR1 ukazuju na kraće ukupno i UKMB-specifično preživljavanje. Molekularni učesnici HIF1 α , VEGF i NOTCH signalnih puteva i njihovo detektovanje u tkivu pokazuju snažan upliv hipoksije i angiogeneze u nastanak invazivnijih klonova UKMB. Prognostička vrednost ovih markera u praćenju UKMB pacijenata je velika i može doprineti individualnijem pristupu prilikom odluke o daljem lečenju, a u cilju odlaganja radikalne cistektomije i što dužeg očuvanja mokraćne bešike. Na manipulaciji ispitivanih signalnih puteva se baziraju najnoviji terapijski modaliteti, čiji je krajnji cilj uvođenje personalizovane, ciljane, molekularne terapije u lečenje UKMB.

Naučna
oblast:

Medicinske nauke

Naučna
disciplina:

Patologija

Ključne reči:

Urotelni karcinom mokraćne bešike, angiogeneza, hipoksija,
imunohistohemija, preživljavanje, prognoza

UDK:

616.62-006.6:612.22-076(043.3)

CERIF
klasifikacija:

B520 Opšta patologija, patološka anatomija
B200 Citologija, onkologija, kancerologija

Tip licence
Kreativne
zajednice:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Professor Ljubinka Janković Veličković, MD, PhD Professor, scientific discipline Pathology, Department of Pathology, Faculty of medicine, University of Niš
Title:	The significance of the hypoxia-related and neoangiogenesis marker expression in the urothelial bladder cancer patients' follow-up
Abstract:	<p>The most common type of bladder cancer, in over 90% of cases, is urothelial bladder cancer. Seven out of ten cases of urothelial bladder cancer are detected at an early stage. Approximately 70-80% of newly diagnosed present with noninvasive (pTa and pTis stages) or early invasive tumors (pT1 stage). Relapses are frequent and occur in 50-70% of cases, while progression to muscle-invasive (pT2 stage) occurs in 15-25% of cases. In this study, the expression of HIF1α, VEGF, VEGFR1, NOTCH3, JAGGED1, and morphometrically determined density of CD34 positive micro-vessels (MVD) on 613 urothelial bladder cancer samples were immunohistochemically examined. Their interrelationship, as well as, the relationship with clinical-pathological parameters and patient survival were analyzed. The presented study identified HIF1α, VEGFR1, NOTCH3 and MVD as independent prognostic parameters for overall survival and bladder cancer specific patient survival. Positive expression of NOTCH3, higher density of micro-vessels (MVD) and absence of expression of HIF1α and VEGFR1 indicate shorter overall and cancer-specific survival. Molecular participants in HIF1α, VEGF and NOTCH signaling pathways and their detection in tissue show a strong influence of hypoxia and angiogenesis in the formation of more invasive bladder cancer clones. The prognostic value of these markers in the monitoring of bladder cancer patients is great and can contribute to a more individual approach when deciding on further treatment, in order to delay radical cystectomy and preserve the bladder for as long as possible. The latest therapeutic modalities are based on the manipulation of the examined signaling pathways, whose ultimate goal is the introduction of personalized, targeted, molecular therapy in the treatment of urothelial bladder cancer.</p>

Scientific Field:	Medical sciences
Scientific Discipline:	Pathology
Key Words:	Urothelial bladder cancer, angiogenesis, hypoxia, immunohistochemistry, survival, prognosis
UDC:	616.62-006.6:612.22-076(043.3)
CERIF Classification:	B520 General pathology, pathological anatomy B 200 Citology, oncology, cancerology
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

Lista skraćenica:

AK	Aristolohična/Aristolohinska kiselina
AR	Androgen receptor
BCG	<i>Bacillus Calmette–Guérin</i>
BEN	Balkanska endemska nefropatija
CD34	Klaster diferencijacije 34 (engl. <i>Cluster of Differentiation 34</i>)
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
CT	Kompjuterizovana tomografija (engl. <i>Computed Tomography</i>)
DLL3/4	Delta-like ligand 3/4
DNA/DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EBRT	Spoljašnja usmerena radijaciona terapija (engl. <i>External Beam Radiation Therapy</i>)
ECM	Ekstracelularni matriks
EGFR	Receptor epidermalnog faktora rasta (engl. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EMT	Epitelno-mezenhimna tranzicija
ER	Estrogen receptor
FGFR	Receptor fibroblastnog faktora rasta (engl. <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>)
GLOBOCAN	Globalna Kancerološka Opservatorija (engl. <i>Global Cancer Observatory</i>)
HE	Hematoksilin-eozin
HG	Visok gradus (engl. <i>high grade</i>)
HIF1 α	Hipoksija-inducibilni faktor 1-alfa (engl. <i>Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha</i>)
IHC	Imunohistohemija/imunohistohemijski
JAG1	Jagged kanonični Notch ligand (engl. <i>jagged canonical Notch ligand 1</i>)
KMB	Karcinom mokraćne bešike
LG	Nizak gradus (engl. <i>low grade</i>)
MB	Mokraćna bešika
MBOCA	4,4'-metilen-bis (2-hloroanilin)
MVD	Gustina malih krvnih sudova (engl. <i>microvessel density</i>)
NAT1	N-acetil transferaza 1
NAT2	N-acetil transferaza 2
NF- κ B	Nuklearni faktor kapa B (engl. <i>Nuclear Factor kappa B</i>)
NOTCH3	Neurogeni <i>notch</i> lokus hlogni protein (engl. <i>neurogenic locus notch homolog protein 3</i>)

OTA	Ohratoksin A
PDGF	Faktor rasta trombocita (engl. <i>Platelet Derived Growth Factor</i>)
PET	Pozitronska emisiona tomografija (engl. <i>Positron Emission Tomography</i>)
<i>PTEN</i>	Homolog fosfataze i tenzina (engl. <i>Phosphatase and TENsin homolog</i>)
PUNLMP	Papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala (engl. <i>Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential</i>)
SCKMB	Skvamocelularni karcinom mokraćne bešike
TACE	Konvertujući enzim faktora nekroze α (engl. <i>Tumor necrosis factor-α-Converting Enzyme</i>)
TERT	Telomerazna reverzna transkriptaza
TGF	Transformišući faktor rasta (engl. <i>Transforming Growth Factor</i>)
TUR	Transuretralna resekcija
UKGUT	Urotelni karcinom gornjeg urinarnog trakta
UKMB	Urotelni karcinom mokraćne bešike
VEGF	Vaskularni endotelni faktor rasta (engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VEGFR1	Vaskularni endotelni faktor rasta receptor 1 (engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1</i>)
β hCG	β -subjedinica humanog horiogonadotropina

SADRŽAJ

1	UVOD I PREGLED LITERATURE	1
1.1	MOKRAĆNA BEŠIKA	1
1.2	KARCINOM MOKRAĆNE BEŠIKE	2
1.3	EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE	3
1.3.1	INCIDENCA	3
1.3.2	MORTALITET	3
1.3.3	PREŽIVLJAVANJE	4
1.4	ETIOLOGIJA KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE	4
1.4.1	NASLEDNI (HEREDITARNI) SINDROMI	4
1.4.2	GENETSKA PREDISPOZICIJA I OSETLJIVOST NA KANCEROGENE	4
1.4.3	KONGENITALNE ANOMALIJE MOKRAĆNE BEŠIKE	5
1.4.4	FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE IZ ŽIVOTNE SREDINE	5
1.4.5	FAKTORI RIZIKA ZA KARCINOM MOKRAĆNE BEŠIKE NA KOJE SE NE MOŽE UTICATI	10
1.5	KLINIČKA SLIKA: ZNACI I SIMPTOMI UROTELNOG KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE	10
1.5.1	DIJAGNOSTIKA UROTELNOG KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE	11
1.6	PATOHISTOLOŠKA DIJAGNOZA UROTELNIH LEZIJA MOKRAĆNE BEŠIKE	11
1.6.1	NEINVAZIVNE UROTELNE LEZIJE MOKRAĆNE BEŠIKE	12
1.6.2	INFILTRATIVNI UROTELNI KARCINOM MOKRAĆNE BEŠIKE	22
1.7	TNM STADIRANJE UROTELNOG KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE	32
1.7.1	T KATEGORIJA	32
1.7.2	N KATEGORIJA	34
1.7.3	M KATEGORIJA	34
1.8	TERAPIJA UROTELNOG KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE	35
1.8.1	HEMIOTERAPIJA	36
1.8.2	RADIOTERAPIJA	36
1.8.3	KOMBINOVANA HEMIOTERAPIJA I RADIOTERAPIJA	37
1.8.4	TERAPIJA UZNAPREDOVALE I METASTATSKE BOLESTI	37
1.8.5	NAJNOVIJE TERAPIJSKE STRATEGIJE	38
1.9	NEOANGIOGENEZA I SIGNALNI PUT VASKULARNOG FAKTORA RASTA	39
1.9.1	NEOANGIOGENEZA	39
1.9.2	VASKULARNI FAKTOR RASTA (VEGF) SIGNALNI PUT	40
1.10	HIPOKSIJA I SIGNALNI PUT HIPOKSIJA INDUCIBILNOG FAKTORA 1 ALFA	44
1.10.1	HIPOKSIJA	44

1.10.2	HIPOKSIJA INDUCIBILNI FAKTOR 1 ALFA (HIF1A) SIGNALNI PUT	44
1.11	NOTCH SIGNALNI PUT	45
1.12	NOTCH SIGNALNI PUT I HIF1A SIGNALNI PUT	49
2	<u>CILJ ISTRAŽIVANJA</u>	53
3	<u>MATERIJAL I METODE</u>	55
3.1	KARAKTERISTIKE PACIJENATA I UZORAKA UROTELNOG KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE	55
3.2	LABORATORIJSKA OBRADA I PATOHISTOLOŠKA ANALIZA	57
3.3	IMUNOHISTOHEMIJA	60
3.3.1	IMUNOHISTOHEMIJSKA METODA	60
3.3.2	IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA	61
3.4	STATISTIČKA ANALIZA	64
4	<u>REZULTATI</u>	67
4.1	VEGF I VEGFR1	67
4.2	GUSTINA MALIH KRVNIH SUDOVA	71
4.3	HIF1A	73
4.4	NOTCH3	75
4.5	JAG1	77
4.6	MEĐUSOBNA POVEZANOST EKSPRESIJE ANALIZIRANIH IHC MARKERA (JAG1, NOTCH3, HIF1A, VEGF, VEGFR1)	82
4.7	RECIDIVANTNOST KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE	83
4.8	UKUPNO PREŽIVLJAVANJE	93
4.9	UKMB SPECIFIČNI MORTALITET	97
5	<u>DISKUSIJA</u>	105
5.1	PROGNOSTIČKI FAKTORI UROTELNOG KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE	109
5.2	RIZIK ZA RECIDIV UROTELNOG KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE	110
5.3	RIZIK ZA PROGRESIJU UROTELNOG KARCINOMA MOKRAĆNE BEŠIKE	111
5.4	PROGNOSTIČKI ZNAČAJ NOTCH3 U UROTELNOM KARCINOMU MOKRAĆNE BEŠIKE	112
6	<u>ZAKLJUČAK</u>	115

7	<u>LITERATURA</u>	119
8	<u>ZNAČAJ EKSPRESIJE MARKERA HIPOKSIJE I NEOANGIOGENEZE U PRAĆENJU PACIJENATA SA UROTELNIM KARCINOMOM MOKRAĆNE BEŠIKE</u>	137
9	<u>THE SIGNIFICANCE OF THE HYPOXIA-RELATED AND NEOANGIOGENESIS MARKER EXPRESSION IN THE UROTHELIAL BLADDER CANCER PATIENTS' FOLLOW-UP</u>	139
10	<u>BIOGRAFIJA AUTORA</u>	141

1 UVOD I PREGLED LITERATURE

1.1 Mokraćna bešika

Mokraćna bešika (lat. *vesica urinaria*) je šuplji organ smešten u donjem abdomenu koji se preko uretera doprema i odlaže urin iz bubrega sve do mikcije. Delovi mokraćne bešike (MB) su apeks/kupola, baza, vrat i trigonum. Većim delom je endodermalnog porekla i potiče od alantoisa, izuzev trigonuma i proksimalne uretre koji vode poreklo od mezoderma. Kod muškarca, sa zadnje strane MB nalaze se semene kesice, odvodni semeni kanali, ureteri i rektum, dok je kod žena između MB i rektuma položen uterus sa vaginom. Kupola i zadnja površina MB su pokriveni peritoneumom, tako da je u tom delu MB u kontaktu sa tankim crevom i sigmoidnim kolonom, dok je preostali deo položen ekstraperitonealno u maloj karlici.

Histološki slojevi zida MB su mukoza (lat. *mucosa*), koja se sastoji od urotela, *lamina propria* i diskontinualne *muscularis mucosae*, mišićni sloj (lat. *muscularis propria*), adventicijalni sloj (lat. *tunica adventitia*) i *serosa*/peritoneum na svodu MB. U zidu MB submukoza nije prisutna.

Urotel (lat. *urothelium*) je epitel koji oblaže MB, pijelon, uretere i proksimalni deo uretre. Sastoji se od 5-7 slojeva ćelija u kontrahovanoj MB, odnosno, 2-3 sloja u distendiranoj MB. Ćelije urotela se prilagođavaju volumenu urina sposobnošću izravnavanja pod pritiskom. Superficialni sloj urotela (engl. *umbrella cell layer*) čine ćelije oblika kišobrana, koje imaju obilje eozinofilne citoplazme i veliko, elipsasto jedro sa prominentnim jedarcem. Intermedijalne urotelne ćelije su nisko cilindrične do kubične, imaju dobro definisane ćelijske membrane, amfofilnu citoplazmu bogatu glikogenom i ovalna jedra. Bazalne ćelije leže u kontinuitetu na bazalnoj lamini, manje su, zaravnjeno cilindrične, a na jedrima imaju longitudinalne žlebove.

Lamina propria je smeštena između bazalne membrane i muskularis proprije, u blizini arterija i vena srednjeg kalibra, i tanja je na trigonumu i vratu MB. Sastoji se od rastresitog do gustog vezivnog tkiva, krvnih sudova različite veličine, limfatika, ponekad i masnog tkiva.

Muskularis mukoza se sastoji od diskontinualno raspoređenih glatkih mišićnih vlakana. U oko 5% MB može se uočiti dobro razvijena, kontinualna muskularis mukoza, koja može biti hiperplastična, naročito kod žena, i može podsećati na muskularis propriju. Masno tkivo je često prisutno duboko u lamini propriji i u mišićnom sloju MB. Ispod tunike mukoze (lat. *lamina propria*) je tunika muskularis (lat. *muscularis propria*) i sastavljena je od glatkog mišića (lat. *musculus detrusor vesicae urinariae*), koji može da se relaksira u cilju akomodacije većim zapreminama urina i može da se kontrahuje (voljno ili refleksno) ne bi li se urin potisnuo niz uretru i evakuisao iz organizma (1). Mišićni sloj (lat. *muscularis propria*) se sastoji od unutrašnjeg longitudinalnog, cirkularnog i spoljašnjeg mišićnog sloja koji je predstavljen gustim, longitudinalnim glatkomišićnim snopovima. Seroza (lat. *tunica serosa*) je refleksija peritoneuma, koji pokriva samo gornju površinu i gornji deo bočnih površina MB. Adventicija (lat. *tunica adventitia*) je vezivno-tkivni spoj između organa, na mestima MB gde nema seroze. Perivezikalno masno tkivo je sloj masnog tkiva koji okružuje MB izvan seroze/adventicije.

1.2 Karcinom mokraćne bešike

Urotelne ćelije su konstantno izložene potencijalno mutagenim etiološkim faktorima, koji se iz krvi filtriraju preko bubrega u urin. Karcinom mokraćne bešike (KMB) je najčešća maligna neoplazma MB. Na KMB se uglavnom posumnja zbog bezbolne hematurije. Dijagnostikuje se cistoskopijom, transabdominalnim ultrazvukom, i/ili kompjuterizovano-tomografskom urografijom. KMB je deseti karcinom u svetu po učestalosti, sa rastućom incidencom u razvijenim zemljama (2, 3). Najčešći tip KMB, u preko 90% slučajeva, je urotelni karcinom mokraćne bešike (UKMB). Sinonimni naziv za urotelni karcinom, tranziciocelularni karcinom (lat. *transitional cell carcinoma*) je u najnovijoj WHO klasifikaciji napušten i preporuka je da se ne piše u patohistološkom izveštaju (4). Drugi histološki tipovi, kao što su skvamocelularni KMB (SCKMB) (5% svih malignih neoplazmi MB), adenokarcinom, sarkom i metastaze u MB su mnogo ređi.

Sedam od deset slučajeva KMB se detektuje u ranom stadijumu. Otprilike 70-80% novodijagnostikovanih UKMB se prezentuje neinvazivnim (pTa i pTis stadijumi) ili rano invazivnim tumorom (pT1 stadijum). Recidivi su česti i javljaju se u 50-70% slučajeva, dok se progresija javlja u 15-25% slučajeva (5). Superficialni UKMB ima izvanrednu prognozu, za razliku od UKMB koji je invadirao mišićni sloj. Direktno širenje u okolne pelvične strukture podrazumeva infiltraciju prostate, uretre, uterusa i vagine. Regionalnim limfogenim širenjem

nastaju metastaze u obturatornim, presakralnim, ilijačnim i paraaortalnim limfnim nodusima. Hematogenim putem UKMB metastazira u jetru, pluća, kosti, nadbubrežne žlezde i tada je prognoza loša.

Neinvazivni i rano invazivni KMB se uklanjaju transuretralnom resekcijom (TUR). Dodatna, intravezikalna citotoksična terapija se ordinira kod visoko rizičnih slučajeva. Radikalna cistektomija je glavna hirurška opcija u 30% pacijenata, koji se prezentuju sa mišićno-invazivnim karcinomom, dok neoadjuvantna ili adjuvantna hemioterapija smanjuje rizik od recidiva. Eksterna usmerena radioterapija u nekim slučajevima može držati lokalizovanu bolest pod kontrolom. Metastatska bolest ima samo 5% peto-godišnju stopu preživljavanja, a terapija izbora je hemioterapija bazirana na platini. Novije terapije se baziraju na imunoterapiji, a primena inhibitora kontrolnih tačaka je prva terapijska linija u najnovijim onkološkim protokolima (6). Iako su se stope preživljavanja poboljšale ranom dijagnozom, robotskim hirurškim tehnikama i uvođenjem imunoterapije, KMB ostaje značajan teret zdravstvenom sistemu širom sveta, posebno u razvijenim zemljama (2). Zanimljiv je podatak da kumulativni troškovi po pacijentu od trenutka dijagnoze do smrti pacijenta čine KMB najskupljim malignitetom za kliničko praćenje i lečenje (7). Bolje razumevanje epidemiologije i faktora rizika, koji leže u osnovi KMB je presudno za prevenciju ove maligne bolesti.

1.3 Epidemiologija karcinoma mokraćne bešike

1.3.1 Incidenca

Prema podacima GLOBOCAN-a godišnje se dijagnostikuje 550.000 novih slučajeva KMB, što otprilike predstavlja 3% od svih novodijagnostikovanih karcinoma. KMB je druga najčešća maligna neoplazma u urologiji. KMB se četiri puta češće javlja kod muškaraca nego kod žena. KMB je bolest starije populacije, dijagnostikuje se nakon 55 godine, a prosečna starost je 73 godina. U muškoj populaciji KMB je četvrti najčešći karcinom, nakon prostate, pluća i kolorektalnog karcinoma. Jedan od 26 muškaraca tokom života razvije KMB (8).

1.3.2 Mortalitet

KMB je deseta najčešća neoplazma na svetu, osma u Sjedinjenim Američkim Državama, na trinestom mestu je prema smrtnosti, a prema podacima GLOBOCAN-a KMB odnese oko 200.000 života godišnje. Najviša stopa mortaliteta je u Severnoj i Istočnoj Africi i

na Bliskom Istoku, gde je i najviša stopa incidence infekcija šistozomijazom. Pik mortaliteta od KMB je u Egiptu (8).

1.3.3 Preživljavanje

Prema američkim statističkim podacima 5-godišnja stopa preživljavanja obolelih od KMB iznosi 77,1%. Kod *in situ* slučajeva 5-godišnje preživljavanje je 95,8% (51% svih KMB), lokalizovane bolesti 69,5% (34% svih KMB), regionalno proširene 36,3% (7% svih KMB) i samo 4,6% za metastatsku bolest (5% svih KMB). Ovakvi statistički podaci govore u prilog dijagnostici u ranom stadijumu, ali i dalje vrlo lošoj prognozi za metastatsku bolest. Stopa 10-godišnjeg preživljavanja je 70%, a 15-godišnjeg 65% (9).

1.4 Etiologija karcinoma mokraćne bešike

1.4.1 Nasledni (hereditarni) sindromi

Iako se KMB smatra nenaslednim, određeni sindromi povećavaju rizik za nastanak KMB.

- Linč sindrom (engl. *Lynch syndrome*) je autozomno dominantni poremećaj izazvan defektom u „*DNA mismatch repair*” genima. Pacijenti imaju predispoziciju za nastanak brojnih tumora, kao što su ne-polipozni kolorektalni karcinom, tumori tankog creva, želuca, endometrijuma, jajnika, mozga, kože, hepatobilijarnog i urinarnog sistema (10).
- Kostelo sindrom (engl. *Costello syndrome - faciocutaneoskeletal syndrome*) je autozomno dominantni poremećaj, koji nastaje zbog jedne ili više mutacija HRAS gena na hromozomu 11 i karakteriše se mnogobrojnim deformitetima, lošim intelektualnim razvojem, srčanim defektima i sklonošću razvoja benignih i malignih tumora raznih lokalizacija, uključujući i MB. Kod pacijenata sa Kostelo sindromom papilarni UKMB nastaje još u detinjstvu (11).
- Koudenov sindrom (engl. *Cowden's syndrome*) je hereditarni defekt u tumor-supresornom genu PTEN, koji predisponira veliki broj neoplazmi, uključujući i UKMB i SCKMB (9).

1.4.2 Genetska predispozicija i osetljivost na kancerogene

Ustanovljeno je da je genetska predispozicija odgovorna za oko 7% UKMB, iako genetske studije nisu uspele da identifikuju glavne genetske igrače u nastanku sporadičnog UKMB. Genetska sklonost se ogleda u povećanom riziku za UKMB, koji je dva puta češći među rođacima prvog kolena (pozitivna porodična anamneza) (12).

Geni uključeni u nasleđe UKMB su GST, NAT, RB1, TP53, FGFR, RAS i PTEN. Od genetske predispozicije zavisi individualna osetljivost na spoljne kancerogene, uglavnom različita reakcija na izloženost duvanskom dimu (13). Enzimi N-acetil transferaza 1 (NAT1) i N-acetil transferaza 2 (NAT2) učestvuju u detoksikaciji kancerogena. Nasledna spora varijanta N-acetiltransferaze 2 (NAT2) i glutation S-transferaza mu 1 - nulti genotip su već ustanovljeni rizik faktori za nastanak UKMB. Faktori kao što je spora acetilacija ne dovode direktno do nastanka UKMB, ali predstavljaju dodatni rizik kod osoba, koje su izložene potvrđenim kancerogenima, kao što su produkti duvana (14).

Od somatskih mutacija najnovije studije ističu da FGFR učestvuje u više od 20% rekurentnih UKMB. FGFR3 je često mutiran u LG neinvazivnim UKMB, zbog čega je i odobren inhibitor tirozin kinaze (erdafitinib), kao kasna linija terapije UKMB (15). Kao i u mnogim neoplazmama, mutacije *p53* učestvuju u KMB kancerogenezi i imaju prognostičku vrednost (16). Tri velike studije genoma demonstrirale su osam uobičajenih sekvenci lociranih na 8q24.21, 3q28, 8q24.3, 4p16.3, 22q13.1, 19q12, 2q37.1 i 5p15.33, koje su povezane sa UKMB (17).

1.4.3 Kongenitalne anomalije mokraćne beške

Kongenitalna ekstrofija MB se karakteriše histološkim promenama u mukozi, uključujući hroničnu inflamaciju, subepitelnu fibrozu, skvamoznu metaplaziju, hronični proliferativni cystitis (lat. *cystitis cystica et cystitis glandularis*) i intestinalnu metaplaziju. Kongenitalna ekstrofija MB povećava rizik za nastanak svih histoloških varijanti KMB (18).

1.4.4 Faktori rizika za nastanak karcinoma mokraćne beške iz životne sredine

Faktori životne sredine igraju važnu ulogu u karcinogenezi urotela i uključuju širok spektar hemijskih jedinjenja, koja mogu ući u organizam preko respiratornog, digestivnog trakta ili kože (19).

- **Pušenje** je najvažniji faktor rizika za nastanak UKMB i kod muškaraca i kod žena. Pušači tri puta češće oboljevaju od nepušača. Relativan rizik od UKMB zbog upotrebe cigareta je odmah iza karcinoma pluća (20). Rizik za UKMB korelira sa dužinom i intenzitetom pušenja i prestanak pušenja smanjuje rizik od UKMB tokom vremena. Efekat pušenja cigareta je povezan sa više hemijskih agenasa, a najmanje 70 je direktno karcinogeno. Aromatični amini (policiklični aromatični ugljovodonici, naftilamin-2 i aminobifenil-4) su

obavezan sastojak dima cigareta, metabolišu se u organizmu i pokreću karcinogenezu kroz formiranje DNK adukata (21).

- **Profesionalna ekspozicija**

- Aromatični amini: Najvažniji faktor rizika za UKMB, posle pušenja, je profesionalna ekspozicija aromatičnim aminima (2-naftilamin, 4-aminofenil, benzidin, beta-naftilamin), uglavnom preko kože. Radna mesta sa povećanom ekspozicijom karcinogena su industrije za proizvodnju gume, kože, tekstila, boja i lakova. Ova hemijska jedinjenja se mogu naći u farbama, farbama za kosu, gumi, plastici, dimu cigareta, izduvnim gasovima vozila, bojama, lakovima i fungicidima. Profesionalna izloženost aromatičnim aminima u izduvnim gasovima prisutna je među vozačima, a kancerogeni efekat je sinergizovan pušenjem cigareta (22).

- 4,4'-metilen-bis (2-hloroanilin) (MBOCA) je hemijsko jedinjenje koja se koristi u poliuretanskoj proizvodnji. Najveći rizik od izloženosti MBOCA je kod radnika kod kojih se MBOCA apsorbuje u vidu pare ili prašine kroz kožu i respiratorni trakt. Rezultati studija pokazali su da umereno i hronično izlaganje MBOCA može prouzrokovati sve tumore bešike (23).

- **Jatrogena ekspozicija**: Prema Američkoj agenciji za lekove duža upotreba pioglitazona, leka za dijabetes tip 2, povećava rizik nekoliko puta (24). Značajno povećanje rizika za nastanak UKMB je prisutno kod onkoloških pacijenata koji su primali hemioterapiju, baziranu na ciklofosfamidu, i/ili kod kojih je zračena mala karlica, u cilju lečenja drugih maligniteta (25).

- **Radioterapija**: Zračna terapija male karlice zbog karcinoma prostate i karcinoma grlića materice povećava rizik za nastanak i UKMB i SCKMB (25). Kompjuterizovana tomografija u detinjstvu ili ranoj adolescenciji povećava rizik od KMB (26).

- **Komorbiditeti** kao što su diabetes mellitus i obesitas povećavaju rizik za nastanak UKMB.

- **Nutritivni faktori**: Nedovoljno unošenje tečnosti, naročito vode dovodi do dužeg kontakta kancerogena sa urotelom, što može biti uvod u urotelnu displaziju (27). Hipovitaminoza vitamina D, naročito kod muškaraca pušača, značajno povećava rizik za nastanak KMB. Koncentracija arsena preko 300 µg/l je snažno povezana sa UKMB u krajevima Bangladeša, Indiji, Kini i Mađarskoj gde je arsen prisutan u vodi za piće i zemljištu. Biljni suplementi u ishrani, koji sadrže aristolohičnu kiselinu povećavaju rizik za urotelni karcinom bilo gde u urinarnom traktu, a taj rizik je višestruko uvećan ukoliko je prisutan i arsenik u vodi za piće (28). Kancerogeni efekat svih navedenih etioloških faktora se

pojačava pušenjem cigareta (29). Potencijalni kancerogeni za nastanak KMB su nitriti i nitрати, koji u organizam uglavnom ulaze preko hrane, a ima ih u povrću, prerađevinama od mesa i kontaminiranoj vodi (27).

- **Infektivni etiološki faktori**

- Hronične urinarne infekcije i iritacije mokraćne bešike, urolitijaza i dugoročna kateterizacija su faktori rizika za KMB kako preko displazija-CIS-UKMB sekvence, tako i preko metaplazija-displazija-CIS-SCKMB puta kancerogeneze.
- Hronična infekcija ešerihijom koli (lat. *Escherichia coli*) može dovesti do razvoja UKMB posredstvom aktivacije NF-κB signalnog puta, i sledstvene inhibicije apoptoze i povećanja inflamacije (30).
- Šistozomijaza (lat. *schistosomiasis, bilharziasis*) je hronična, parazitarna infekcija MB, i smatra se jednim od najvažnijih etioloških faktora za nastanak SCKMB. Perzistentna hronična inflamacija urinarnog trakta povećava rizik za nastanak i UKMB, i SCKMB i adenokarcinoma MB. *Schistosoma haematobium* izaziva hroničnu inflamaciju, koja podstiče karcinogenezu. Prisustvo jaja *Schistosoma haematobium* u lamini propriji i muskularis propriji izaziva tešku hroničnu upalu i fibrozu, uzrokujući hiperplaziju urotela i skvamoznu metaplaziju (17).
- Više naučnih studija je pokazalo značajnu povezanost između HPV16 infekcije i UKMB (31).

- **Hronična tubulointersticijalna nefropatija** je povezana sa urotelnim karcinomom i opisana je u tri klinička entiteta: analgezična nefropatija, nefropatija izazvana kineskim biljem i Balkanska endemska nefropatija (BEN).

- Analgezična nefropatija: Kod pacijenata koji su zavisni od analgetika razvija se bilateralna kalcificirajuća papilarna nekroza, koja je povezana sa intersticijalnom fibrozom i tubularnom atrofijom, što na kraju dovodi do naglašene ožiljne kortikalne retrakcije. Dugotrajna upotreba fenacetina je snažno povezana sa urotelnim karcinomom gornjeg urinarnog trakta i UKMB (32).
- Nefropatija izazvana kineskim biljem / kineska herbalna nefropatija: Aristolohična kiselina (AK) je uzrok kineske herbalne nefropatije (nefropatija izazvana aristolohičnom kiselinom). Nefropatija izazvana AK-om je rapidno progresivna, intersticijalna, fibrozirajuća bubrežna bolest sa povećanom stopom urotelnih maligniteta (28). Nefrolozi u Belgiji su zapazili povećanje broja relativno mladih žena, koje su razvile bubrežnu insuficijenciju nakon korišćenja preparata za mršavljenje, koji

su bili na bazi kineskog bilja (*Aristolochia fangchi* i *Aristolochia clematidis*). Zbog greške u proizvodnji pilula za mršavljenje biljka *Stephania tetrandra* je zamenjena *Aristolochiom fangchi*, koja je nefrotoksična i karcinogena (33). Ekspozicija AK je najčešći uzrok mutacija p53 i nastajanja urotelne atipije, sa sledstvenim razvojem displazije i urotelnog karcinoma (34). Zbog dokazane etiologije 2001. godine je predložena izmena naziva u Nefropatija aristolohične kiseline (35). AK može da aktivira Smad signaling, da posreduje u EMT i stimulaciji stvaranja matriksnog kolagena u renalnoj fibrozi. AK aktivira p53 i pokreće apoptozu u tubularnom epitelu (36).

- Balkanska endemska nefropatija (BEN) je hronična tubulointersticijalna nefropatija sa podmuklim početkom i sporom progresijom do terminalne bubrežne insuficijencije. Prvi put je opisana 1956 u Bugarskoj, u Srbiji 1957, kada je zapaženo da se ova nefropatija češće javlja kod ljudi koji žive u aluvijalnim ravnicama duž pritoka Dunava u Bosni, Bugarskoj, Hrvatskoj, Rumuniji i Srbiji. Incidenca BEN je oko 2–5 na 1000 stanovnika na endemskom području, a incidenca urotelnog karcinoma gornjeg urinarnog trakta (UKGUT) u ovoj regiji je oko 0,5 na 1000. Obe bolesti više pogađaju žene nego muškarce. Opisan je familijarni karakter bolesti, a dokazana je i genetska predispozicija. BEN se može javiti kod nekoliko članova istog domaćinstva, u jednoj i više generacija. Povećana incidenca UKGUT je otkrivena među stanovnicima endemskih naselja, kod pacijenata obolelih od BEN i u familijama u kojima je BEN dijagnostikovao. UKGUT je 100 puta češći kod obolelih od BEN. BEN se karakteriše tubularnom atrofijom i disfunkcijom, predominantno proksimalnih tubula, i difuznom, naglašenije kortikalnom, intersticijalnom, hipocelularnom fibrozom. U početku su lezije fokalne i povezane su sa intersticijalnim edemom i degeneracijom epitelnih ćelija proksimalnih tubula. Dijagnoza BEN se postavlja kod endemskog stanovništva, na osnovu epidemioloških kriterijuma, smanjene glomerularne filtracije, proteinurije ispod 1g/24h, mikroalbuminurije, tubularnih markera (glukozurija, aminoacidurija, tubularni tip proteinurije, povećana urinarna ekskrecija beta2-mikroglobulina i/ili alfa-1-mikroglobulina), smanjenje veličine bubrega na ultrazvuku i obavezno isključenje drugih bubrežnih bolesti (hronični pijelonefritis, opstruktivna nefropatija, adulta policistična bolest bubrega, hronični glomerulonefritis etc.) (37).

Urotelni karcinom gornjeg urinarnog trakta i UKMB imaju iste faktore rizike: starija populacija, muški pol, pušenje, konzumiranje kafe, profesionalna ekspozicija karcinogenima,

terapija ciklofosfamidom, dugotrajna zloupotreba. Utvrđena je i genetska predispozicija, kao što je gubitak heterozigotnosti i sedam mikrosatelitskih lokusa na 3q21.3-3q27.3. Familijarni BEN obrazac ukazuje na multifaktorijalnu prirodu bolesti, koja uključuje genetsku predispoziciju na specifičnom BEN lokusu na 3q25 (38). Studija o gubitku heterozigotnosti identifikovala je mogući tumor supresorni gen na 3q24. Kod pTa BEN tumora utvrđena je izuzetno visoka genomska nestabilnost, a FISH-om su potvrđeni visoko kompleksni hromozomski rearanžmani (39).

Etiologija BEN i urotelnog karcinoma nastalog na terenu BEN je kompleksna i nekoliko hipoteza je prisutno u naučnoj literaturi. Dugotrajna ekspozicija policikličnim aromatičnim ugljenim hidratima, od kojih je najtoksičniji benzo-[a]-piren, i drugim toksičnim organskim jedinjenjima koje se nalaze u tragovima u vodi za piće u endemskim naseljima, mogu biti uzrok karcinoma nastalih na terenu BEN (40). Ochratoxin A (OTA) je mikotoksin koji učestvuje u nastanku BEN i urotelnim karcinomom povezanim sa BEN. Za OTA je utvrđeno da je nefrotoksičan (41). Ekstenzivna apoptoza koja je primećena u tubularnom epitelu može da igra glavnu ulogu u podmuklom razvitku BEN. OTA, citrinin i AK se smatraju etiološkim faktorima za BEN i kinesku herbalnu nefropatiju, i sa njima asociranim urotelnim karcinomom. Postoje dokazi da dugotrajna izloženost teškim metalima, kao i deficit nekih elemenata u tragovima (npr. selen, koji je neophodan u enzimima za detoksikaciju OTA) mogu učestvovati u patogenezi BEN. Neke studije ukazuju na infektivnu etiologiju, i prisustvo virusnih partikula u tkivu bubrega, mada nema naučnih dokaza da je BEN infektivna bolest. Najnovija molekularna istraživanja su pokazala da je hronična ekspozicija korovskoj travi (*Aristolochia clematitis*), koja raste u poljima pšenice endemskih naselja i čija glavna komponenta je AK, uzrok BEN i veće stope karcinoma gornjeg urinarnog trakta. Metali i metaloidi u visokim koncentracijama, silicijum dioksid, olovo, uranijum, bakar, kobalt, cink, mangan, arsen, titan, barijum, aluminijum, hrom, stroncijum, kadmijum, bizmut, molibden, nikl, volfram, antimon i kalaj su prisutni u vodi i zemljištu u BEN endemskim područjima, mada nema naučnih dokaza da uzrokuju BEN i karcinom povezan sa BEN-om (42). Visoke koncentracije naftalena, fluora, fenantrena, pirena, ftalata, policiklični aromatični ugljenih hidrata, benzena, fenola, alifatičnih, aromatičnih i jedinjenja nastalih degradacijom lignita. Jedna od enigmi BEN je da je njegova prevalenca samo 3–7%. To sugerise da su individualna genetska osetljivost na AK, enzimski polimorfizmi, epigenetske i imunološke promene, od presudnog značaja za razvitak BEN (43). Histološki, BEN se karakteriše ekstenzivnom hipocelularnom intersticijalnom fibrozom udruženom sa tubularnom atrofijom. Prisutna je

periglomerularna fibroza i glomerularne lezije, ishemični i mikrocistični glomeruli, lezije slične trombotičnoj mikroangiopatiji i fokalnoj segmentalnoj sklerozi (44). Nakon asimptomatskog stadijuma, pacijenti pate od slabosti i malaksalosti, blagog lumbalnog bola, bledila koža i bakarno-smeđe kolorisanih dlanova i tabana. Zbog nespecifične kliničke slike BEN često ostane neprepoznat nekoliko godina. Kada se razvije anemija povezana je sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom. Intermitentna proteinurija ukazuje na oštećenje proksimalnih tubula. Dijagnoza BEN se može postaviti ukoliko su prisutne histološke promene bubrega, u odsustvu drugog bubrežnog oboljenja, i epidemiološkom, kliničkom, biohemijskom potvrdom kod osoba koje žive u endemskim područjima za BEN (45).

1.4.5 Faktori rizika za karcinom mokraćne bešike na koje se ne može uticati

- **Prethodna urotelna neoplazma:** UKMB često recidivira, što se može objasniti delovanjem kancerogena na celu površinu urotela, nekompletnom TUR-om i jatrogenom implantacijom eksfoliranih tumorskih ćelija prilikom TUR (27).
- **Godine starosti:** KMB je bolest starije populacije. Devet od deset pacijenata sa UKMB je starije od 55 godina, a prosečna starost u trenutku dijagnoze je 73 godine. Potrebne su decenijske ekspozicije kancerogenima ne bi li se savladali ćelijski tumor-supresivni mehanizmi i kulminirala kancerogeneza. Izuzetno retko KMB može nastati kod dece i adolescenata, uglavnom je LG neinvazivni papilarni UKMB i ima dobru prognozu (17).
- **Pol:** UKMB mnogo češće nastaje kod muškaraca nego kod žena, dok je smrtnost veća kod žena u odnosu na muškarce. Najviša incidenca UKMB u ženskoj populaciji je u Libanu (4).
- **Rasna i etnička pripadnost:** Belci češće oboljevaju od KMB u odnosu na afrikanace i latino-amerikance, a najređe je zastupljen kod azijata (4).

1.5 **Klinička slika: znaci i simptomi urotelnog karcinoma mokraćne bešike**

Više od 90% urotelnih karcinoma nastaje u MB, ostalih 5-10% nastaje u gornjem urinarnom traktu i izuzetno retko mogu nastati u uretri. Tumori lokalizovani u uretri, ureterima ili pijelonu mogu biti sinhroni ili metahroni sa tumorima u MB (46).

Hematurija je osnovni simptom svih urotelnih neoplazmi. Većina pacijenata sa invazivnim UKMB ima bar mikroskopsku hematuriju (47). Ozbiljnost simptoma zavisi od tumorske lokalizacije i stadijuma bolesti. Najčešći simptomi su bezbolna hematurija, inkontinencija, nokturija i dizurija. Dizurične tegobe uglavnom imaju žene, kod kojih se i

dijagnoza UKMB postavlja se zakašnjenjem i u višem stadijumu u odnosu na pacijente muškog pola. Pacijenti sa difuznim tumorima ili tumorom lokalizovanim na vratu bešike i/ili sa ekstenzivnim CIS se češće prezentuju iritativnim urinarnim simptomima. Ukoliko je tumor velika, palpabilna, suprapubična masa može izazvati opstruktivne smetnje i edem donjih ekstremiteta. Gubitak težine, anemija, kaheksija i lokalizovan bol u kostima već ukazuju na progresivnu i metastatsku bolest. Najčešća mesta metastaza su jetra, pluća i kosti (48).

1.5.1 Dijagnostika urotelnog karcinoma mokraćne bešike

Cistoskopija, bimanualni pregled pod anestezijom i biopsija/transuretralna resekcija su najbolje metode za postavljanje dijagnoze i stadiranje bolesti. Invazivni UKMB mogu biti unifokalni ili multifokalni. Većina su polipoidni, sesilni ili ulceroinfiltrativni. Papilarna arhitektura je nekad već makroskopski uočljiva. Konkomitantni CIS se uočava kao eritematozno polje na mukozi.

Transabdominalna i intravezikalna sonografija ne pružaju dodatnu vrednost cistoskopiji. Multislajms imaging modaliteti (CT i MRI) imaju i do 90% senzitivnost da detektuju tumor, ali ne mogu da zamene cistoskopiju i biopsiju (49). Prisustvo zadebljanja na CT ne ukazuje uvek na mišićnu invaziju. *PET imaging* je superioran u odnosu na CT i MRI. CT-om navođena iglena biopsija limfnih nodusa je korisna za potvrdu metastaza. Prema najnovijim podacima iz literature *PET/CT imaging* može poboljšati kliničko stadiranje UKMB (50).

1.6 Patohistološka dijagnoza urotelnih lezija mokraćne bešike

- **Patohistološki izveštaj za biopsijske uzorke dobijene transuretralnom resekcijom (TUR)**

Transuretralna resekcija je dijagnostičko/terapijska procedura i inicijalni korak u lečenju urotelnih neoplazmi MB. Patohistološki nalaz za TUR biopsijske uzorke bi trebalo da bude informativan:

1. Prisustvo/odsustvo tumora
2. Način rasta
3. Gradus (LG/HG)
4. Prisustvo/odsustvo invazije subepitelnog tkiva
 - Ukoliko je moguće izjasniti se o dubini invazije T1mi, T1a, T1b, T1c.
5. Prisustvo/odsustvo tunike muskularis

- Ponekad je teško napraviti razliku između muskularis proprije i hipertrofične muskularis mukoze.
- Ukoliko je tunika muskularis prisutna izjasniti se o prisustvu/odsustvu tumora i dubini invazije u mišićni sloj (pT2a, pT2b).

6. Prisustvo/odsustvo perivezikalnog masnog tkiva

- Submukoza može sadržati masno tkivo, koje može biti u prisnom kontaktu sa muskularis proprijom te bi se trebalo oprezno izjašnjavati o invaziji masnog perivezikalnog tkiva na TUR biopsijskim uzorcima.

7. Invazija limfatika, vaskularna invazija i perineuralna invazija

8. Širenje u prostatu (duktusi i/ili stroma)

9. Prisustvo CIS u random biopsijama MB.

• **Patohistološki izveštaj za operativni materijal dobijen radikalnom cistektomijom**

Uzorci sa radikalne cistektomije bi trebalo biti markirani na hirurškim ekscizionim marginama, a zatim i uzorkovani sa mesta tumora i nasumično iz naizgled normalne mukoze.

Patohistološka dijagnoza bi trebalo da sadrži sledeće informacije:

1. Prisustvo/odsustvo tumora
2. Histološki gradus (LG/HG)
3. Broj, lokalizacija i veličina tumora
4. Dubina invazije tumora
5. Infiltracija perivezikalnog masnog tkiva i seroze mokraćne bešike
6. Invazija limfatika, vaskularna invazija i perineuralna invazija
7. Marginalna ekstenzija, uključujući uretru i uretere
8. Metastaze u limfnim nodusima (broj) i ekstranodalno širenje
9. Širenje u prostatu (duktusi i/ili stroma)
10. Prisustvo/odsustvo CIS

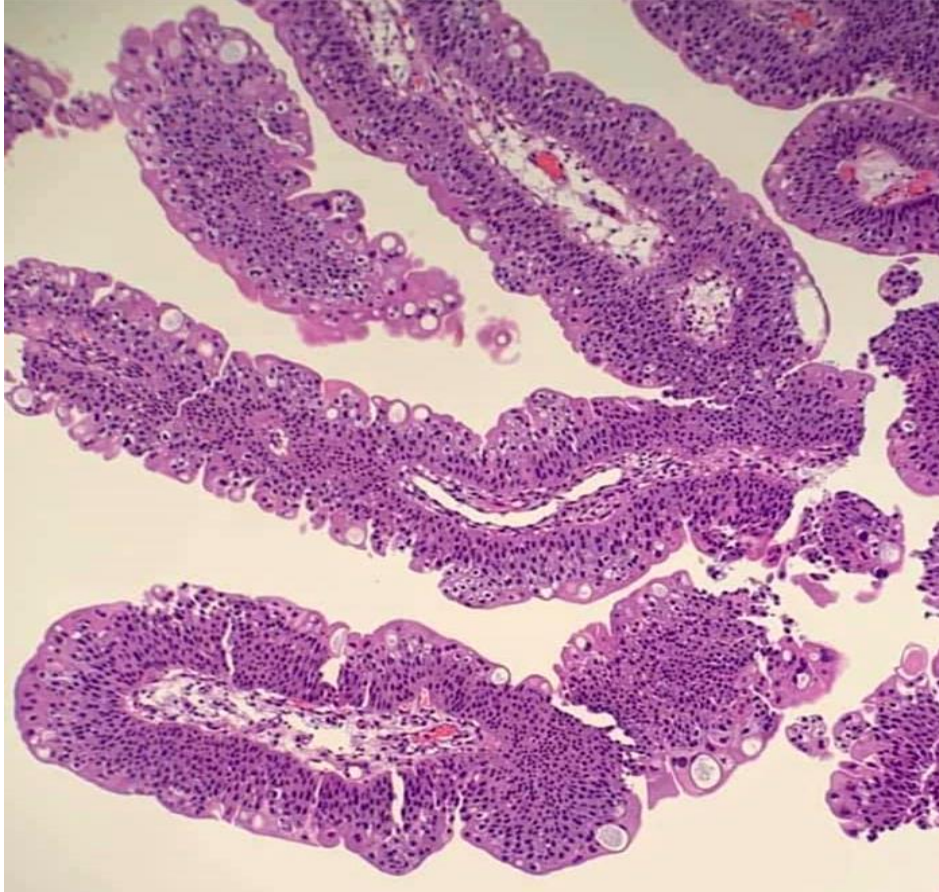
1.6.1 Neinvazivne urotelne lezije mokraćne bešike

1.6.1.1 Papilarne urotelne lezije mokraćne bešike

1.6.1.1.1 Urotelni papilom

Urotelni papilom je benigna, papilarna urotelna neoplazma koja se karakteriše delikatnom fibrovaskularnom stromom obloženom urotelom normalnog izgleda i debljine. Urotelni papilom se dijagnostikuje kod 4% neinvazivnih UKMB. Viđa se kod pacijenata

mlađih od 50 godina, uključujući mlađe odrasle i decu. Kliničke karakteristike su iste kao i za ostale urotelne neoplazme. Može se javiti de novo ili udružen sa drugim urotelnim neoplazmama. Češći je kod muškaraca. Terapija izbora je TUR.



Slika 1. Mikrofotografija urotelnog papiloma mokraćne bešike (HE, x100)

1.6.1.1.2 Invertni urotelni papilom

Invertni urotelni papilom je urotelna neoplazma sa kompleksnim, anastomozirajućim invertnim načinom rasta i odsutnom minimalnom citološkom atipijom. Invertni papilomi čine manje od < 1 % svih urotelnih neoplazmi. Većina pacijenata je u šestoj ili sedmoj dekadi života. Javlja se pet puta češće kod muškaraca nego kod žena. Najčešći simptom je bezbolna hematurija, mnogo ređe se prezentuje iritativnim tegobama donjeg urinarnog trakta i opstruktivnim smetnjama. Većina tumora je solitarno, a manje od 5% multiple prezentacije, prosečne veličine 12mm. U literaturi su opisani papilomi veličine i 8cm. Najčešća lokalizacija je vrat MB (41%), trigonum, lateralni i posteriorni zid i izuzetno retko u gornjem urinarnom traktu i uretri. Endoskopski izgled je identičan papilarnim LG UKMB (51).

Patohistološki se karakteristišu jednostavnim papilarnim grananjem sa minimalnim epitelnim konfluiranjem između papilla. Imaju trabekularni obrazac rasta, nastaju od urotela, koji može biti normalan, istanjen ili hiperplastičan, ali koji praveći invaginacije u laminu propriju je izdiže u egzofitičnu promenu. Urotel nije zadebljan, normalnih je citoloških karakteristika i uredno orjentisanih ćelija. Broj slojeva varira od 5 do 10. Površni sloj je prominentan i često je prisutna nukleomegalija, multilobulacija jedara i vakuolizacija citoplazme. Ponekad je udružen sa cističnim promenama i vakuolizacijom luminalnih ćelija simulirajući floridni proliferativni cistitis (lat. *cystitis cystica et cystitis glandularis*). Periferija tumorskih traka i trabekula je prekrivena palisadirajućim, tamnijim ćelijama bazalnog sloja. Neoplastične ćelije pokazuju minimalnu citološku atipiju, ali može se uočiti i degenerativna atipija. Retke mitotske figure mogu biti prisutne na periferiji. Stroma je minimalna i često fibrozirana, sa minimalnom inflamacijom. U fibrovaskularnoj stromi mogu se uočiti dilatirani limfni sudovi. Prisustvo nuklearne atipije, kao što je iregularna distribucija hromatina, uvećani iregularni nukleolusi, ekspanzivan rast i povećan broj mitoza govore u prilog invertnom urotelnom karcinomu. Imunohistohemija nije neophodna za postavljanje dijagnoze, a CK20 bojenje naglašava kišobran ćelije i negativno je u ostalim ćelijama urotela. Ki-67 indeks proliferacije je nizak (tipično < 5%). Stopa recidiva za urotelne papilome se kreće od 8-14%, a progresija u karcinom je < 1 %, i diskutabilno je da li nastaje u urotelnom papilomu ili je povezan sa drugim prisutnim urotelnim neoplazmama. Nakon kompletne TUR recidiv i progresija se ne javljaju (52).

1.6.1.1.3 Papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala (engl. *Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential* - PUNLMP)

Papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala (PUNLMP) je urotelni papilarni tumor sa minimalnom atipijom. Debljina atipičnog epitela uglavnom ne prelazi normalnu debljinu urotela. Pet puta se češće javlja kod muškaraca nego kod žena, kod osoba oko 64 godine. Specifična etiologija je nepoznata, iako se smatra da je slična za sve papilarne urotelne neoplazme. Većina pacijenata se javlja zbog mikroskopske ili makroskopske hematurije, a citologija urina je uglavnom negativna na malignitet. Cistoskopija otkriva LG papilarni tumor varijabilne veličine. Invazivna komponenta nikad nije direktno udružena sa ovom lezijom.

Makroskopski, ove neoplazme se prezentuju kao pojedinačne ili multiple diskretno egzofitične papilarne lezije, varijabilne veličine. Patohistološki PUNLMP ima papilarnu

strukturu, bez histološke abnormalnosti i bez gubitka polariteta ćelija, prekrivenu urotelom, koji je deblji i/ili celularniji od normalnog urotela. Citološki PUNLMP ima monoton izgled, sa ćelijama koje deluju identično. Jedra su diskretno uvećana i zgomilana u odnosu na normalni urotel. Mogu se uočiti jedarne brazde, koje se retko vidaju u HG lezijama. Nukleolusi su ili odsutni ili neupadljivi. Hromatin je uniformno raspoređen. Mitoze su izuzetno retke i limitirane na bazalni sloj. Genetski profil je isti kao i za ostale neinvazivne papilarne UKMB. Iako postoje diskretne ćelijske i histološke razlike između PUNLMP i LG UKMB neke studije smatraju da nema razlike u prognozi između ova dva entiteta. Ipak je više istraživanja pokazalo da PUNLMP ima manji rizik od recidiva i bolju prognozu od papilarnih LG UKMB. Izuzetno mali procenat neinvazivnih LG papilarnih UKMB progredira u invazivni ili HG papilarni UKMB, dok PUNLMP ne progredira niti u stadijumu niti u gradusu. Zbog rizika od recidiva, nakon uklanjanja, preporuka je praćenje i za PUNLMP i za LG papilarne UKMB (53).

1.6.1.1.4 Neinvazivni papilarni UKMB

Otprilike 70-75% novodijagnostikovanih urotelnih karcinoma je neinvazivno i papilarno, tri puta češće se javljaju u muškoj u odnosu na žensku populaciju. Ovi tumori imaju visoku stopu recidiva, ali manje od 15% pacijenata razvija invazivnu bolest. Etiološki faktori su isti za superficijalni i invazivni UKMB. Najčešća klinička karakteristika je bezbolna, intermitentna hematurija. Najčešće lokalizacije su lateralni i posteriorni zid MB, mada se ove neoplazme mogu naći bilo gde duž urotelne površine.

Na cistoskopiji lezije su egzofitične, varijabilne veličine, i mogu biti pojedinačne ili multiple. Lezije visokog gradusa (engl. *high grade* - HG) se makroskopski prezentuju kao hiperemične i neprozirne. Neinvazivni papilarni UKMB je papilarna, urotelna neoplastična proliferacija sa prisutnom citološkom i histološkom atipijom vidljivom na malom i srednjem uvećanju, ali bez invazije ispod bazalne membrane (pTa).

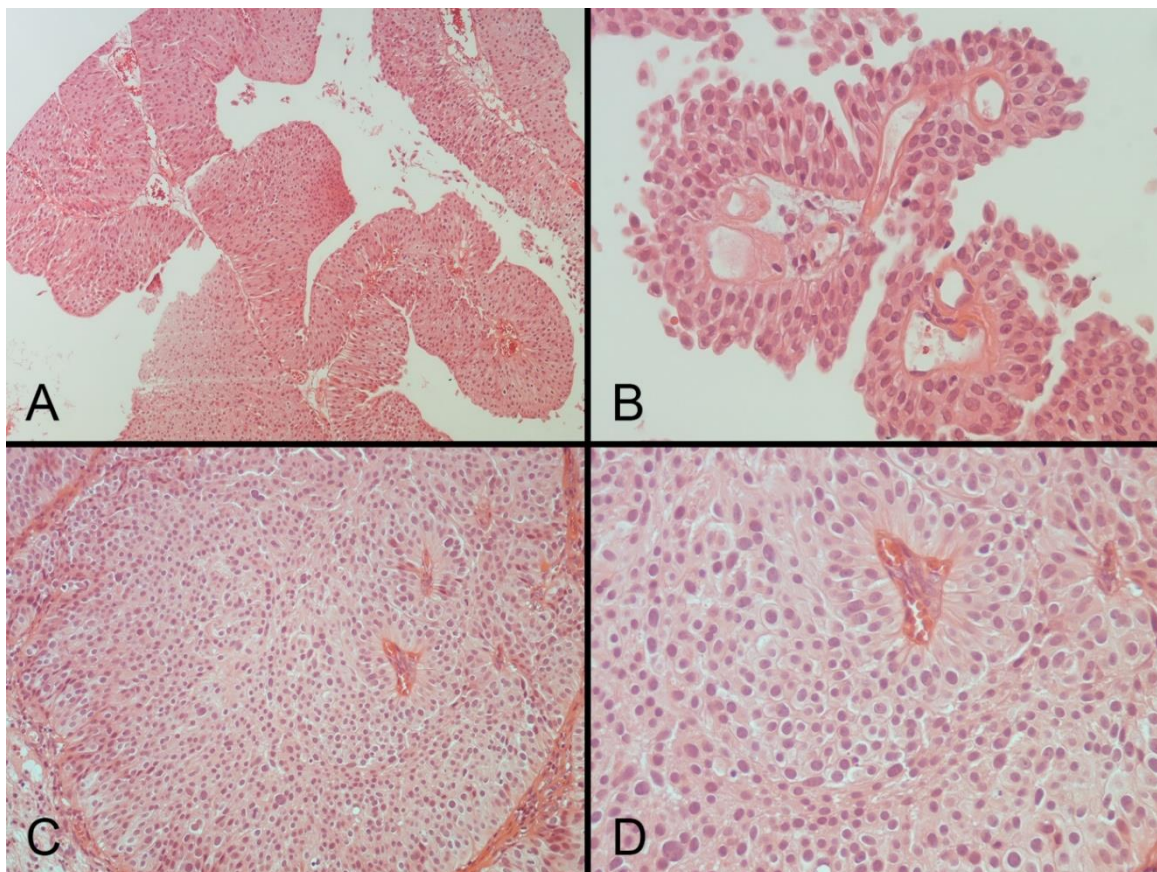
Neinvazivni papilarni UKMB se karakteriše prstastim izraštajima sa tankim fibrovaskularnim sržima prekrivenih neoplastičnim urotelom varijabilne debljine. Heterogenost u gradiranju je karakteristika papilarnog UKMB. Gradus tumora određuje najviši gradus prisutan u tumoru, a granična vrednost je prisustvo HG komponente u bar 5% tumora (54). Neki istraživači su utvrdili da se tumori koji imaju manje od 10% HG komponente klinički ponašaju kao LG (engl. *low grade*) tumori, shodno tome je najbolje naznačiti procenat HG komponente u patohistološkom izveštaju (55). Čisti HG papilarni UKMB su agresivniji u

odnosu na mešovite LG i HG lezije. Kao što je slučaj sa svim epitelnim neoplazmama gradiranje je često vrlo subjektivno. WHO sistem zahteva procenu nivoa citološke i histološke atipije na malom i srednjem uvećanju (100x i 200x). Citološka atipija se definiše kao poremećaj u nukleo-citoplazmatskom odnosu, nuklearnoj veličini, obliku i hromatinu, a histološka se ogleda u abnormalnoj orijentaciji ćelija međusobno i u odnosu na bazalnu membranu.

Na osnovu patohistoloških karakteristika neinvazivni papilarni UKMB mogu biti niskog gradusa (*low grade* - LG) i visokog gradusa (*high grade* - HG).

1.6.1.1.5 *Low grade* (LG) papilarni UKMB

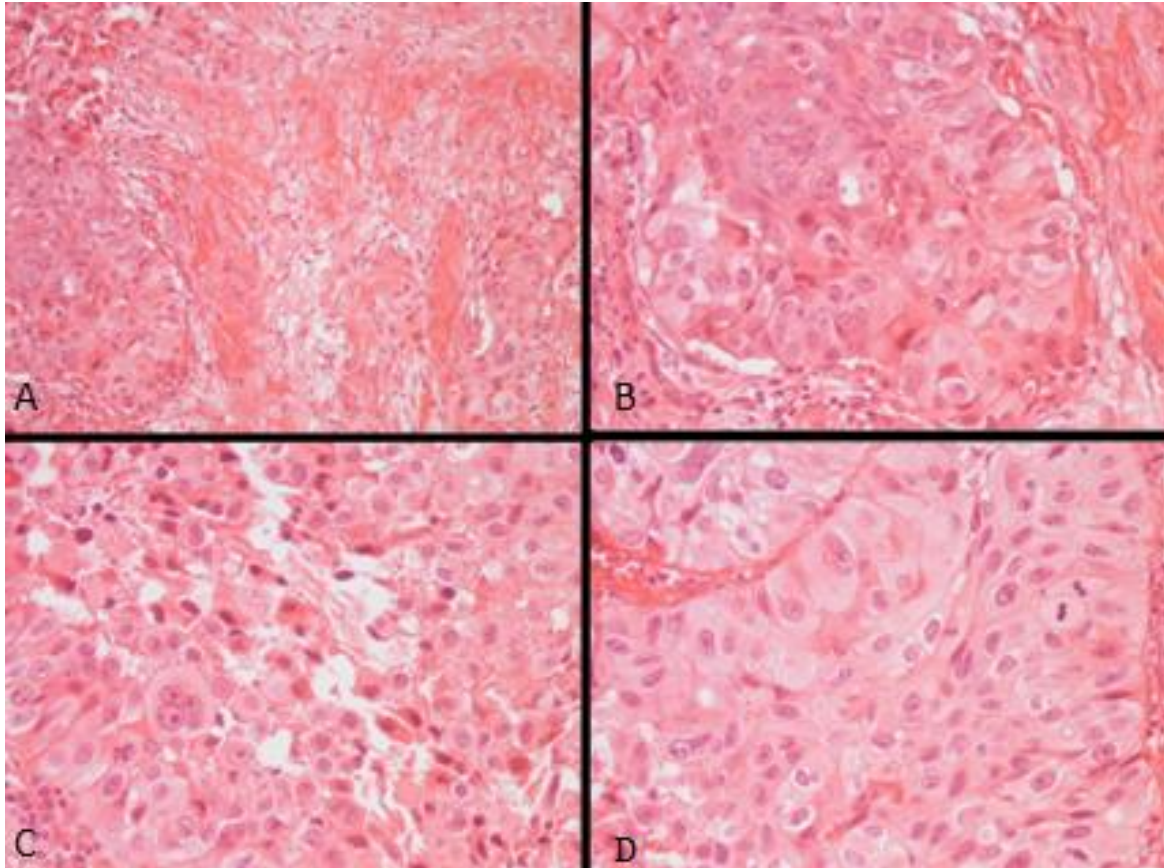
LG lezije imaju delikatne papile sa obimnim grananjem. Na malom uvećanju su relativno urednog izgleda, na srednjem uvećanju se uočava delimičan gubitak ćelijskog polariteta, kao i blaga nuklearna iregularnost i pleomorfizam. Mitoze ne moraju biti prisutne i uglavnom nisu atipične (56).



Slika 2. Mikrofotografija *low grade* urotelnog karcinoma mokraćne bešike, pTa stadijum (HE, A: uvećanje x100, B: uvećanje x200, C: uvećanje x100, D: uvećanje x400)

1.6.1.1.6 *High grade* (HG) papilarni UKMB

U HG lezijama, papile mogu biti fuzionisane, dajući tumoru solidan egzofitični izgled. Ćelijska atipija se ogleda u varijacijama u veličini i izgledu jedara, koje su očigledne već na malom uvećanju, debljina urotela je promenljiva. Za HG papilarni UKMB su karakteristični iregularni prominentni nukleolusi, nuklearna anaplazija i brojne mitoze, uključujući i atipične mitotske figure. Papilarni UKMB eksprimira GATA3, CK7, CK20, p63, CK5/6 i CK HMW, ali IHC nema značaj u gradiranju UKMB (57).



Slika 3. Mikrofotografija *high grade* papilarnog urotelnog karcinoma mokraćne bešike, pT1 stadijum (HE, A: uvećanje x100, B: uvećanje x200, C: uvećanje x200, D: uvećanje x400)

Papilarni UKMB se može prezentovati invertnim načinom rasta. Neki urotelni karcinomi imaju pretežno endofitični način rasta i karakterišu se granajućim, anastomozirajućim papilama dok stromalno-epitelni interfejs ima glatku konturu. Kod ovih tumora stromalna reakcija je uglavnom odsutna, kao i stromalna invazija i infiltracija mišićnog zida.

1.6.1.1.7 Genetski profil neinvazivnih papilarnih UKMB

Najnoviji podaci ukazuju na to da se karcinogeneza u urotelu može odvijati na bilo kom mestu i može uključiti više mesta prema teoriji polja (58). Sve je više naučnih dokaza da se urotelne stem ćelije transformišu u kancerske stem ćelije sticanjem genetskih alteracija koje vode formiranju tumora kroz klonalnu ekspanziju (59).

Tumori MB nastaju putem dva potpuno različita mehanizma: FGFR3 signalni put i TP53 signalni put (60). Tumori nastali iz ova dva signalna puta se prezentuju kao heterogene grupe tumora, različitog i fenotipa i genotipa i drastično različitog biološkog ponašanja i kliničkog ishoda. LG neinvazivni UKMB se karakterišu aktivirajućom mutacijom FGFR3, dok se HG UKMB karakterišu genetskim ili epigenetskim alteracijama u *TP53* genu ili regulatornim genima za *TP53*, kao što je *CDKN2A (p16)* (61). Nedavne studije su identifikovale da su u UKMB najčešće somatske mutacije u genu promotoru za katalitičku subjedinicu telomerazne reverzne transkriptaze (*TERT*). Otprilike 70-80% neinvazivnih UKMB nosi ove mutacije. Često su prisutne sa *FGFR3* mutacijama i nisu povezane sa tumorskim stadijumom, histološkim gradusom ili kliničkim ishodom (62).

Numeričke i strukturne hromozomske aberacije su česte u neinvazivnim UKMB, i uključuju gubitke brojnih hromozoma: 2q, 3p, 5q, 9p21, 9q22-q31, 10q23-25, 11p13q14, 17p13, i Y (63). Susedni urotel normalnog izgleda gubi iste alele hromozoma 9 kao i tumor. U neinvazivnim UKMB je amplifikacija gena reda od drugih genetskih alteracija. U nekoliko naučnih studija potvrđene su amplifikacije *MDM2*, *RAF1*, *CCND1* i *FGFR1* (64).

1.6.1.2 Ravne (engl. flat) lezije mokraćne bešike

1.6.1.2.1 Urotelna proliferacija neodređenog malignog potencijala (engl. *Urothelial proliferation of uncertain malignant potential*)

Urotelna proliferacija neodređenog malignog potencijala je prisustvo upadljivog zadebljanja urotela bez ili sa minimalnom citološkom atipijom i bez formiranja pravih papilarnih struktura. Sinonimi za ovaj entitet, koji se više ne koriste u literaturi su papilarna i zaravnjena hiperpazija. Nema predilekcionu lokalizaciju. Makroskopski je tipično fokalna, lako izdignuta i sesilna. Patohistološki, zadebljali urotel je aranžiran u uske valovite sluzokožne nabore različitih visina. Citološka atipija je minimalna. Ukoliko je kompletno ravna lezija, makroskopski se teško može uočiti. Mikromorfološki se uočava zadebljan urotel sa preko 10 slojeva epitela i većom ćelijskom gustinom. Ove lezije se mogu videti izolovano, uglavnom kod pacijenata sa prethodnom istorijom za UKMB, ili u blizini LG papilarnih UKMB ili da

predstavlja lateralnu ekstenziju papilarne neoplazme (engl. *shoulder lesion*). Većina pacijenata je imalo ili ima i urotelnu neoplazmu. U genetskom profilu ove lezije, delecije hromozoma 9 su česte, dok su *FGFR3* mutacije i amplifikacija *FGFR3* retkost (65). Za urotelnu proliferaciju se smatra da je klonalni proces i verovatno je rana manifestacija LG papilanog UKMB (66).

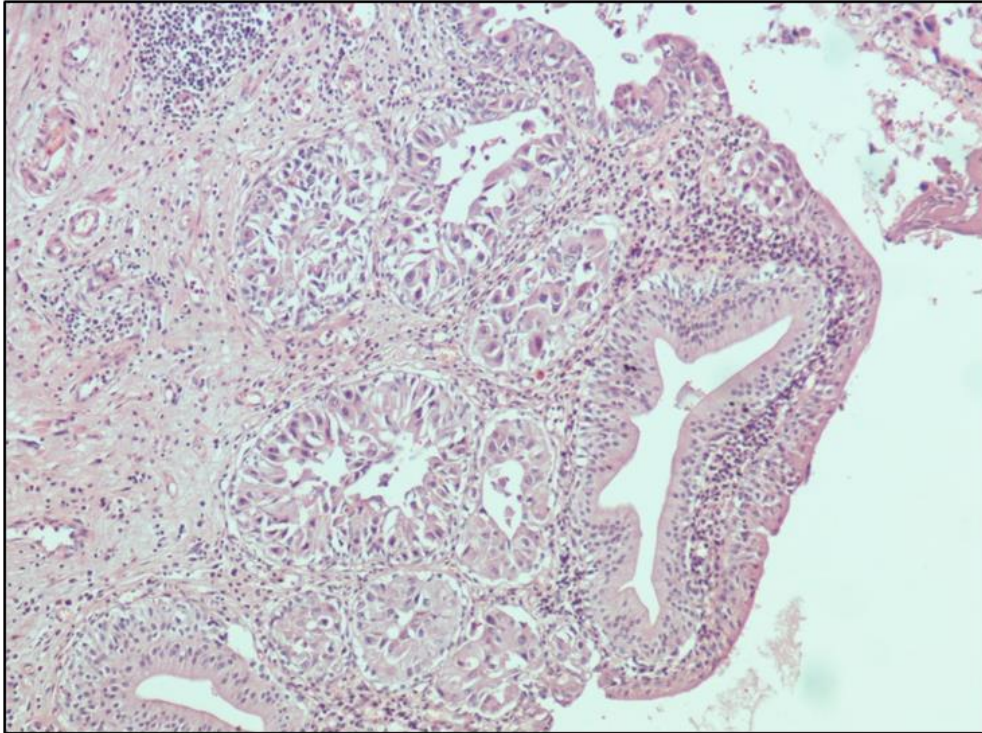
1.6.1.2.2 Urotelna displazija

Urotelna displazija ima primetne citološke i histološke karakteristike za koje se smatra da su preneoplastične, ali nedovoljne za dijagnozu CIS. Sinonim za urotelnu displaziju, koji je napušten, je intraurotelna neoplazija LG. Urotelna displazija nije dovoljno proučavana, izuzetno retko se viđa *de novo* i teško se razlikuje od CIS. Etiološki faktori su isti kao i za urotelni CIS. Pacijenti imaju simptome povezane sa papilarnim ili invazivnim UKMB, a ne sa urotelnom displazijom, koja se retko viđa izolovano i tada može da izaziva iritativne smetnje tokom uriniranja. Makroskopski se uočava eritemna sluzokoža, ali je češće naizgled normalna. Patohistološki urotelnu displaziju je najteže definisati. Morfološki treba je razlikovati od normalnog urotela, urotela sa reaktivnom atipijom i CIS. Normalni urotel nema značajnu citološku atipiju, stratifikovan je i sadrži od tri do šest slojeva urotelnih ćelija poređanih u bazalni, intermedijalni i superficijalni sloj. Ćelije intermedijalnog sloja održavaju polaritet, sa linearnim poravnanjem prema gore, a vertikalno u odnosu na bazalnu membranu. Kišobran ćelije superficijalnog sloja, imaju eozinofilnu citoplazmu sa vakuolama i često multilobulirano jedro. Kod reaktivne urotelne atipije, prisutno je uniformno uvećanje jedara, sa jednakom raspodelom hromatina, glatkim nuklearnim konturama i tačkastim jedarcima. Mešoviti zapaljenski infiltrat je prisutan subepitelno, a ponekad i intraepitelno. Mitotska aktivnost je povećana i mitoze se mogu videti i u gornjim slojevima urotela. U anamnezi se navodi prethodna kateterizacija, cistitis, urolitijaza, prethodna intravezikalna terapija. Lezije klasifikovane kao urotelna displazija gube perpendikularni aranžman urotelnih ćelija sa minimalnim iregularnostima i povećanjem jedara, i uglavnom bez inflamacije. Mnogi uropatolozi klasifikuju ovu kategoriju kao „urotelna atipija neodređenog značaja, ne može se isključiti displazija”. Ukoliko je prisutan nuklearni pleomorfizam i veličina jedara kao 5-6 limfocita, sa povećanom mitotskom aktivnošću dijagnoza više ide u prilog CIS nego urotelnoj displaziji. Od genetskih promena prisutne su alteracije hromozoma 9 i mutacije *TP53* (67).

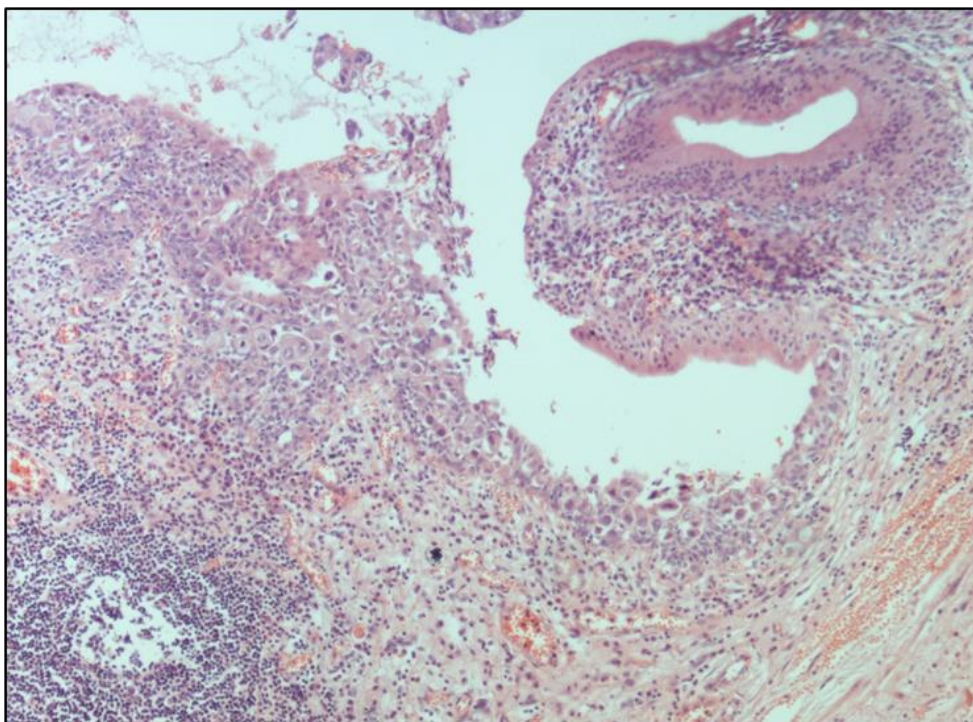
1.6.1.2.3 Urotelni in situ karcinom (*Carcinoma in situ - CIS*)

Carcinoma in situ (CIS) je ravna lezija koja se karakteriše HG citološkom atipijom čitavom debljinom urotela bez probijanja bazalne membrane i bez invazije u laminu propriju.

Neinvazivne HG papilarne lezije ne treba poistovetiti sa CIS. CIS ne-papilarna, HG intraurotelna neoplazija, često multifokalna. De novo se retko viđa, ali se može videti u okolini invazivnog UKMB. Klinički se prezentuje kao cistitis, često sa hematurijom. 20-80% pacijenata sa CIS razvije invazivni UKMB ukoliko se ne leče, i trebalo bi napomeniti prisustvo CIS u patohistološkom izvreštaju. Na dalju prognozu utiču multifokalnost, zahvatanje prostatičnog dela uretre i odgovor na BCG terapiju. Terapija je intravezikalna BCG ili intravezikalna hipertermija i mitomicyn-C, parcijalna ili totalna cistektomija. Endoskopski se uočava kao eritematozna, granulirana ili kaldrmasta mukoza, koja može zahvatiti veće površine mukoze MB, uretera i uretre. Mikroskopski se uočava kao zaravnjena lezija koja se sastoji od ćelija sa velikim, iregularnim, hiperhromatskim, jedrima, prominentnim pleomorfizmom, visokim nukleo-citoplazmatskim indeksom, mitozama u srednjim i višim slojevima epitela. Atipija ne mora biti prisutna čitavom debljinom urotela, epitel može biti ogoljen a može biti prisutna kancerizacija urotela sa padžetoidnim širenjem. Ćelije mogu biti velike pleomorfne, velike bez pleomorfizma, male, klinaste, poređane u zadebljanom ili denudiranom urotelu. U poređenju sa veličinom limfocita jedra atipičnih ćelija su pet puta veća (u normalnom urotelu su dva puta veća). Gubitak polariteta, preklapanje jedara, iregularno zadebljanje urotela, ćelije gube kohezivnost i mogu biti prisutne u citologiji urina (68).



Slika 4. Mikrofotografija *cystitis glandularis* i urotelne displazije u Brunovim gnezdima (engl. *von Brunn's nests*) (HE, uvećanje x100)



Slika 5. Mikrofotografija *cystitis glandulari et follicularis* i *carcinoma in situ*, okolina infiltrativnog urotelnog karcinoma mokraćne bešike (HE, uvećanje x100)

1.6.2 Infiltrativni urotelni karcinom mokraćne bešike

Infiltrativni UKMB je izuzetan zbog svojih raznolikih morfoloških manifestacija. Neki od ovih obrazaca su toliko karakteristični da predstavljaju specifične varijante UKMB (69). Infiltrativni UKMB se može prezentovati širokim spektrom arhitekturnih obrazaca, uključujući gnezda varijabilne veličine, glatkih ivica, trabekule, trake, klastere i pojedinačne tumorske ćelije. Postoji često mešovita histološka slika, naročito u većim tumorima (70). U većim tumorskim gnezdima, tumorske ćelije pokazuju stratifikovanu arhitekturu sa jedrima poređanim okomito do bazalne membrane, sa delimičnim sazrevanjem prema centru, rekapitulirajući strukturu urotela. U većini tumora, ipak, nema sazrevanja ćelija, niti histoloških karakteristika normalnog urotela. Način rasta tumora i invazija okolnog tkiva imaju prognostički značaj, a infiltrativne trake ćelija i invazija pojedinačnim tumorskim ćelijama imaju najgoru prognozu. Većina invazivnih UKMB su HG. Značajne razlike u ishodu su ustanovljene između LG i HG invazivnih tumora i tumorski gradus bi trebalo naznačiti u patohistološkom izveštaju (71). Upečatljiv je nuklearni pleomorfizam, sa hiperhromatskim jedrima promenljive veličine i oblika. Nuklearne konture su nepravilne. Mitoze su brojne i mogu se uočiti atipične mitotske figure. Citoplazma je bleđa, eozinofilna i umereno obilna, a može biti i oskudna ili bazofilna. Ponekad može imati skvamoidan izgled, koji bi trebalo razlikovati od prave skvamozne diferencijacije. Citoplazmatski mucini nisu vidljivi na rutinskom HE bojenju, ali se specijalnim bojenjima na mucine mogu detektovati u čak 60% HG UKMB. Prisustvo rasutih tumorskih ćelija koje sadrže mucine ili histoheмиjski detektovan mucin ne dokazuju glandularnu diferencijaciju. U citoplazmi može biti akumuliran i glikogen, koji daje svetloćelijski (*engl. clear cell*) izgled tumorskim ćelijama. Stromalni odgovor može biti dezmodoplastičan i naglašen kod infiltrativnih UKMB, a inače nije tipičan za urotelne karcinome. Može se videti i proliferacija miofibroblasta, osealna metaplazija i miksoidna reaktivna stroma (72). Retrakcioni artefakti mogu biti prisutni kod tumora sa ranom invazijom subepitelnog tkiva i ne bi je trebalo pogrešno protumačiti kao limfovaskularnu invaziju (73). Neki invazivni UKMB izazivaju ekstenzivan limfocitno - plazmocitni zapaljenski odgovor, ali za tip stromalnog odgovora nije nađen prognostički značaj u UKMB (74).

1.6.2.1 Imunohistoheмиjski profil infiltrativnog UKMB

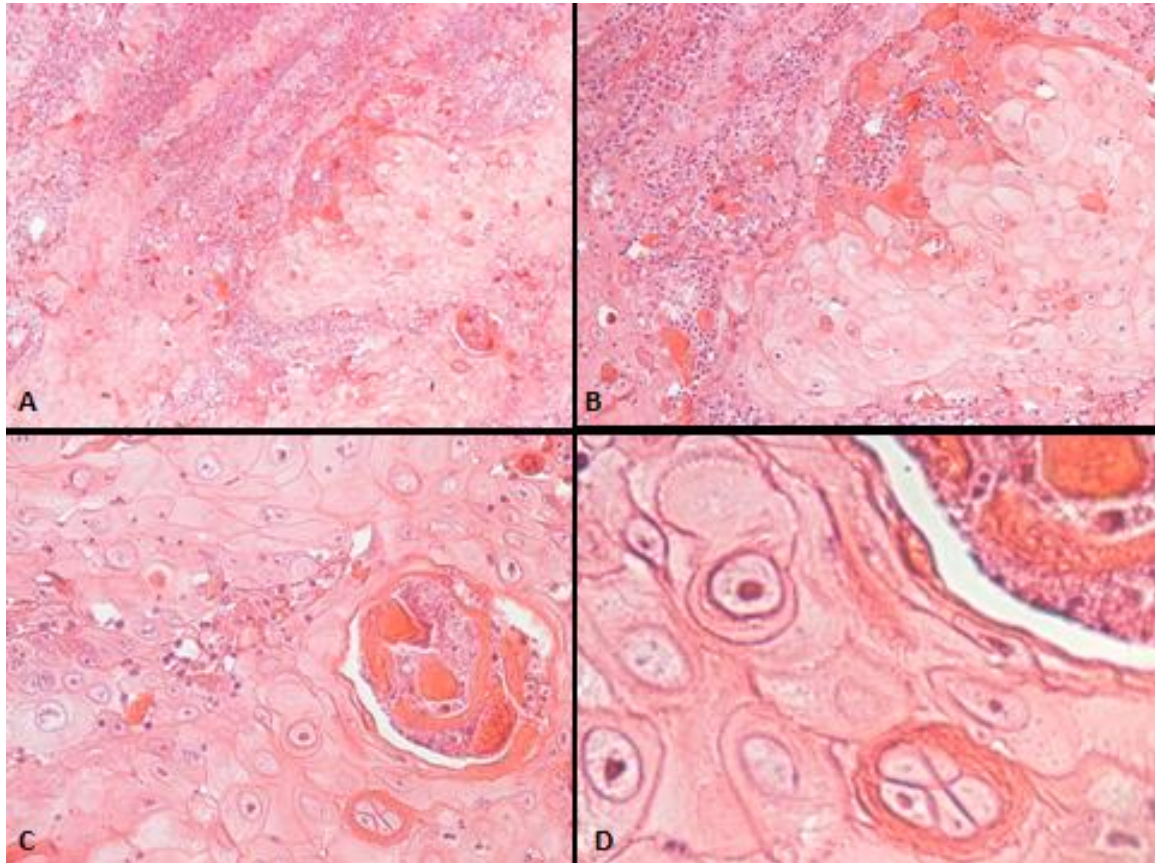
Infiltrativni HG UKMB ponekad je teško razlikovati od loše diferentovanog adenokarcinoma prostate. Uroplakin III je specifičan marker, ali niske senzitivnosti (19-60%). Uroplakin II ima istu specifičnost, a veću senzitivnost (63-77%) (75). GATA3 se eksprimira u

70-90% UKMB. Iako nuklearna ekspresija GATA3 opada sa dediferencijacijom, smatra se da je koristan marker u diferencijalnoj dijagnozi urotelnih neoplazmi. UKMB eksprimira CK7 (u 100%) i CK20 (67%). Oko 50% UKMB pokazuje koekspresiju CK7 i CK20. U 14% HG UKMB se ne eksprimira ni CK7 ni CK20. CKHMW i CK5/6 se ekspimiraju u velikom broju HG UKMB. p63 se koristi za diferencijalnu dijagnozu od čistog skvamocelularnog KMB (76).

1.6.2.2 Urotelni karcinom mokraćne bešike sa divergentnom diferencijacijom

UKMB je karakterističan po izuzetnoj sklonosti divergentnoj diferencijaciji, uključujući skvamoznu, glandularnu, sitnoćelijsku/neuroendokrinu, trofoblastnu i diferencijaciju u pravcu endodermalnog sinusa. Tumori sa prepoznatljivim urotelnim elementima se klasifikuju kao urotelni karcinomi sa divergentnom diferencijacijom i trebalo bi naglasiti u kom procentu su prisutne divergentne komponente.

Skvamozna diferencijacija je definisana prisustvom intercelularnih mostova i/ili keratinizacijom, i najčešći je tip divergentne diferencijacije, koji se javlja u 40% invazivnih UKMB (77). Nije nađena povezanost skvamozne diferencijacije i HPV infekcije, mada je HPV16 detektovan u bazalnom sloju UKMB (78). Karcinomi MB koji nastaju na terenu neurogene MB, hronične kateterizacije ili prethodne ginekološke ekspozicije su retki primeri karcinoma bešike koji su povezani sa HPV infekcijom i histološki imaju bazaloidne karakteristike (79). Skvamozna diferencijacija u biopsijskom materijalu dobijenom TUR-om je povezana sa lokalno uznapredovalom bolešću i dovodi do smanjenog odgovora na zračnu i hemioterapiju.



Slika 6. Mikrofotografija skvamozne divergentne diferencijacije u urotelnom karcinomu mokraćne bešike (HE, A: uvećanje x100, B: uvećanje x200, C: uvećanje x200, D: uvećanje x400)

Najnovije studije sa sekvencioniranjem gena su identifikovale *basal/squamous-like*, luminalni i *p53-like* karcinome kao tri podtipa invazivnog UKMB. Bazalni podtip je povezan sa lošim odgovorom na hemioterapiju i smanjenim UKMB-specifičnim preživljavanjem. Bazalni podtip ima skvamoidnu morfologiju i tumori eksprimiraju CK5, ali ne i CK20 (80).

Glandularna diferencijacija je definisana prisustvom žlezdanih formacija u tumoru i viđa se u 6-18% UKMB. Uglavnom ima enterični izgled sa žlezdolikim strukturama, koje su nalik na one koje se viđaju u tipičnom adenokarcinomu kolona. Mogu se uočiti polja mucinoznog adenokarcinoma sa ili bez *signet ring* ćelija. Ređe je prisutna koloidno-mucinozna diferencijacija koja se karakteriše gnezdima tumorskih ćelija, koje plivaju u ekstracelularnom mucinu. Opisana je i forma glandularne diferencijacije viloznog izgleda. Izuzetno retko, može se videti *Müllerian* diferencijacija, koja se uočava kao svetloćelijski (engl. *clear cell*) adenokarcinom (81).

U poljima glandularne diferencijacije tumori eksprimiraju CDX2 i CK20, dok na urotelne markere mogu biti fokalno/difuzno pozitivni, ili da budu kompletno negativni.

Glandularnu diferencijaciju treba razlikovati od pseudoglandularnih prostora koji su česti u UKMB. Prognostički značaj glandularne diferencijacije ostaje neizvestan, iako su Damrauer i saradnici zaključili da UKMB sa glandularnom diferencijacijom ima slabiji odgovor na hemioterapiju (82).

Trofoblastna diferencijacija je veoma retka i karakteriše se džinovskim ćelijama nalik sinciciotrofoblastu. β -subjedinica humanog horiogonadotropina (β hCG) može se IHC detektovati u čak 35% slučajeva iako nema morfološki uočljive trofoblastne diferencijacije. Ekspresija β hCG korelira sa HG i višim stadijumom. Povišeni serumski nivoi β hCG su prisutni u čak 70% pacijenata sa metastatskim UKMB (83). Pojačana sekrecija β hCG korelira sa lošim odgovorom na radioterapiju i hemioterapiju i merenje serumskog β hCG se koristi za praćenje ovih pacijenata (84).

Sitnoćelijski karcinom MB može biti prisutan zajedno sa konvencionalnim UKMB, skvamocelularnim, adenokarcinomom ili sarkomatoidnim karcinomom. Prisustvo sitnoćelijskog karcinoma treba napisati u patohistološkom izveštaju jer je ovo relevantno u vođenju terapije. Ovi tumori su svrstani u kategoriju neuroendokrinih tumora te je i terapija drugačija u odnosu na UKMB (85).

1.6.2.3 Nested varijanta urotelnog karcinoma mokraćne bešike

Nested UKMB je invazivna histološka varijanta, blage citomorfologije (86). Tipičan obrazac rasta je diskretno konfluentna proliferacija malih tumorskih plaža ispod urotela. Baza lezije je iregularna i infiltrativna. Jedra su sa blagom atipijom ili bez atipije. Mogu se uočiti mitotske figure. Stroma je miksoidna, fokalno dezoplastična ili nema uopšte stromalnog odgovora. *Nested* varijanta može biti prisutna sa klasičnim tipom UKMB, ali je češće prisutan kao čista *nested* varijanta. Diferencijalne dijagnoze su nefrogeni adenom, von Brunova gnezda sa reaktivnom atipijom, *cystitis cystica et cystitis glandularis*, invertni papilom, *nephrogena metaplasia*, *carcinoid* tumor, paraganglioma. Ponekad je atipija minimalna, ali ukoliko su ove plaže prisutne u muskularis propriji to je dovoljno za dijagnozu UKMB jer se von Brunova gnezda ne viđaju duboko u zidu MB (87). *Nested* UKMB se razlikuje od benignih mimikera prisustvom mutacije *TERT* promotera. Tumorske ćelije su IHC pozitivne na GATA3, CK HMW (34PE12), p63, CK7 i CK20 (88). Ima istu prognozu kao klasični UKMB, ali se dijagnostikuje u višem stadijumu (89).

1.6.2.4 Mikrocistični urotelni karcinom mokraćne bešike

Mikrocistični UKMB je varljivo benignog izgleda i često se prezentuje sa visokim stadijumom. Okruglaste i ovalne mikrociste dijametra 1-2mm, obložene blagim, denudiranim epitelom, a intraluminalno mogu biti prisutne sekrecije i mikrokalifikati. Stromalni odgovor često izostaje. U trenutku dijagnoze uglavnom je već invadirao detrusorni mišić. Mikrocistična varijanta UKMB eksprimira GATA3, S100P, CK7, CK20, p63, CK HMW, uroplakin III, MUC5AC i thrombomodulin. Diferencijalno dijagnostički treba ga razlikovati od *cystitis cystica et cystitis glandularis* i adenokarcinoma prostate (Gleason score 3+3), ali je IHC negativan na PSA. Nema razlike u preživljavanju u odnosu na klasični UKMB (90).

1.6.2.5 1.5.2.4 Mikropapilarni urotelni karcinom mokraćne bešike

Mikropapilarni UKMB čini 0.6-2.2% svih UKMB. Češći je kod muškaraca i javlja se posle šezdesete godine. Histološki podseća na serozni papilarni karcinom jajnika. Karakteriše se malim tumorskim gnezdima, često u lakunarnim prostorima bez vaskularizovane vezivno-ktivne strome u centru. Tumorske ćelije imaju periferno orjentisana jedra sa atipijom i gradira se kao HG UKMB. Prisutne su citoplazmatske vakuole i distorzija nuklearnih kontura, što sve morfološki pravi prstenaste forme. Limfovaskularna invazija je česta, a konkomitantni CIS je prisutan u preko 50% slučajeva (91). Mikropapilarni UKMB je IHC pozitivan na GATA3, S100P, uroplakin II, uroplakin III, thrombomodulin, CK7, CK20, p63 i CK HMW. Prekomerna ekspresija MUC1, CA-125 i HER2 je nespecifična, ali se ovi markeri ipak ekspimiraju u nekim slučajevima mikropapilarnog UKMB. MUC1 ekspresija dominira u grupi ćelija tumora okrenutih ka stromi, što ukazuje na preokret normalne orijentacije ćelija u tumoru. Mikropapilarni UKMB je često prisutan zajedno sa klasičnom ili drugim histološkim varijantama UKMB. Pacijenti sa ovom histološkom varijantom UKMB u pT1 stadijumu imaju veći rizik od UKMB specifičnog mortaliteta i imaju bolji ishod ukoliko se podvrgnu ranoj radikalnoj cistektomiji. Uglavnom ima lošu prognozu, česte metastaze u limfnim nodusima i lošu stopu preživljavanja uprkos terapiji (92). Neke studije su pokazale da je intravezikalna terapija neefikasna kod mikropapilarnog UKMB i preporučuju ranu radikalnu cistektomiju već u pT1 stadijumu. Ipak, je sve više individualnijeg pristupa u lečenju sa tendencijom očuvanja MB što duže (93). Ukoliko je mikropapilarna komponenta prisutna u neinvazivnom UKMB, tumor se klasifikuje prema klasičnoj varijanti UKMB. Neinvazivni UKMB sa mikropapilarnom morfologijom nema lošu prognozu, a opisane su i varijante neinvazivnog UKMB i CIS sa *micropapillary-like* izgledom (94).

Karcinomi sa mikropapilarnom histologijom se javljaju u plućima, dojci, pankreasu, kolorektumu i pljuvačnim žlezdama. Klinička korelacija je neophodna, a imunoprofil CK7+, CK20+ i uroplakin III+ ide u prilog karcinomu porekla MB. Mikropapilarni UKMB često eksprimira FoxA1, marker luminalnog fenotipa. Luminalni podtip je dominantna osobina jer i UKMB sa oskudnim poljima mikropapilarnog rasta spada u luminalne tumore. Često su nosioci „divljeg tipa” p53 i mutacija *TERT* promotera, što uglavnom ukazuje na rezistentnost na hemioterapiju (95). FISH-om detektovana *ERBB2* (*HER2*) amplifikacija je česta u mikropapilarnom UKMB i ima prediktivni značaj, ukazujući na kraće UKMB specifično preživljavanje, a takođe, pruža i potencijalnu mogućnost za *target* terapiju (96).

1.6.2.6 Urotelni karcinom mokraćne bešike nalik limfoepiteliomu

Ova retka varijanta histološki podseća na limfoepiteliom nazofarinksa, ali se ne dovodi u vezu sa EBV infekcijom. Češće se javlja kod muškaraca, starije životne dobi. Može biti čista forma ili da bude prisutan sa drugim histološkim varijantama. Iako je prvi simptom hematurija, u trenutku dijagnoze već je lokalno uznapredovala bolest, pT2-3 (97).

Histološki se tumor sastoji od gnezda, traka, klastera ili pojedinačnih nediferentovanih, tumorskih ćelija sa velikim, pleomorfnim jedrima i prominentnim jedarcima, nejasnih međućelijskih granica i sincicijalnim izgledom. U pozadini se nalazi prominentan limfoidni infiltrat sastavljen od T i B limfocita, sa dominacijom CD3+T limfocita, plazma ćelija, histiocita, povremeno neutrofila i/ili eozinofila i izuzetno retko sa dominacijom eozinofila u zapaljenskom infiltratu. IHC profil tumorskih ćelija: CKAE1/AE3+, CK7+, p63+, GATA3+. Ovo se može pogrešno protumačiti kao limfoproliferativni proces ili ozbiljan hronični cistitis, a IHC analiza na CK može pomoći u postavljanju tačne dijagnoze. Čista histološka varijanta UKMB nalik limfoepiteliomu ima povoljnu prognozu, nizak metastatski potencijal i dobar odgovor na imuno i hemioterapiju, a ukoliko je samo komponenta klasičnog UKMB ne utiče na prognozu (98).

1.6.2.7 Plazmacitoidni/Signet ring cell/ Difuzni urotelni karcinom mokraćne bešike

Plazmacitoidni UKMB je retka, agresivna histološka varijanta UKMB sastavljena od tumorskih ćelija koje podsećaju na plazma ćelije i/ili monocite. Makroskopski se prezentuje kao edematozna sluzokoža, često bez lezije na površini. Histološki se karakteriše prisustvom pojedinačnih, diskohezivnih malignih ćelija, uronjenih u rastresitu ili miksoidnu stromu. Tumorske ćelije imaju jasnu, svetlu ili eozinofilnu citoplazmu i centralno ili periferno lokalizovana uvećana, hiperhromatska jedra sa sitnim nukleolusima. Pojedine ćelije mogu

sadržati citoplazmatske vakuole, sa ili bez intracitoplazmatskih mucina, dajući tumorskim ćelijama „*signet ring*” izgled. Za razliku od mucinoznih adenokarcinoma sa „*signet ring*” ćelijama, ova varijanta UKMB nije povezana sa produkcijom ekstracelularnih mucina, što je vrlo koristan parameter za razlikovanje ove histološke varijante UKMB od slabo kohezivnog adenokarcinoma želuca. Citološka atipija može biti minimalna, a može biti i prisutan kao komponenta HG tumora. Pokazuje jedinstven obrazac širenja duž snopova nerava, koji je opisan kao infiltracija „duž rukava kaputa“. Imunohistohemijski se može dokazati urotelno poreklo jer su IHC tumorske ćelije pozitivne na CKAE1/AE3, CK7, CK20, p63, GATA3 i uroplakin III. MUM1 je negativan, kao i ostali limfoidni markeri. Gubitak ekspresije *E-cadherina* je odgovoran za upadljivu diskohezivnost tumorskih ćelija i viđa se u preko 70% slučajeva plazmacitoidnog UKMB (99). Klinički se prezentuju u odmaklom stadijumu sa dubokom infiltracijom celog zida MB i perivezikalnog masnog tkiva. Postoji veliki rizik od peritonealnog širenja i neoplastični proces je uglavnom prisutan na hirurškim marginama operativnog materijala dobijenog radikalnom cistektomijom. Uprkos odličnom odgovoru na hemioterapiju, klinički ishod je loš, sa čestim recidivima i kratkim vremenom preživljavanja (100). Diferencijalne dijagnoze uključuju limfoidne reakcije, limfom, multipli mijelom, difuzni tip adenokarcinoma želuca, paragangliom, neuroendokrini karcinom, melanom i rabdomiosarkom.

1.6.2.8 Sarkomatoidni urotelni karcinom mokraćne bešike

Sarkomatoidna varijanta UKMB se češće javlja kod muškaraca, preko 65 godine života, a faktori rizika su zračna terapija i terapija ciklofosamidom. U trenutku dijagnoze sarkomatoidni UKMB je već uznapredovala bolest i stoga ima lošu prognozu. Prema podacima iz literature prisustvo sarkomatoidnih elemenata u trenutku dijagnoze ukazuje na prisutne udaljene metastaze. Patološki stadijum je najbolji prediktor preživljavanja.

Makroskopski, sarkomatoidni karcinomi su veliki i polipoidni, sa poljima hemoragije i nekroze i često sa prisutnim tumorskim ćelijama na hirurškim resekcionim marginama. Sarkomatoidna komponenta može biti prisutna zajedno sa urotelnim, skvamoznim i glandularnim karcinomom MB. Čist sarkomatoidni UKMB je neoplazma koja se morfološki i IHC odlikuje i epitelnom i mezenhimnom diferencijacijom. Heterologni elementi mogu biti prisutni i trebalo bi ih procentualno naglasiti u patohistološkom izveštaju. Postoje brojni morfološki i molekularni dokazi da je sarkomatoidni karcinom zajednički, konačni put dediferencijacije svih oblika epitelnih tumora MB (101). Mezenhimna komponenta se

uglavnom sastoji od atipičnih, vretenastih ili pleomorfnih tumorskih ćelija i najčešće predstavlja nediferentovani vretenasto-ćelijski HG sarkom. Mnogobrojni tipovi mezenhimalne diferencijacije mogu biti prisutni. Najčešće prisutni heterologni elementi histološki pripadaju osteosarkomu, hondrosarkomu, rabdomiosarkomu, leiomiosarkomu, liposarkomu i angiosarkomu. Stroma može biti miksoidna i obilna, ili pak naglašeno hipocelularna i sklerozirana. Imunohistohemijski, prisutna je fokalna pozitivnost na CK i PAX8, ali je GATA3 uglavnom negativan u sarkomatoidnom UKMB. Imunoprofil vretenasto-ćelijske komponente je vimentin+, EMA+, SMA+, AE1/AE3+, p63+, GATA3+, CK7+. Tumorske ćelije epitelne komponente ekspimiraju vimentin u 80% slučajeva (102). *TERT* mutacije su prisutne u 35% sarkomatoidnih UKMB. Prema studiji iz 2017, svi pacijenti nosioci *TERT* mutacije su egzistirali unutar dve godine od operacije (103).

1.6.2.9 Džinovsko ćelijski urotelni karcinom mokraćne bešike

Pleomorfnu džinovsko-ćelijski karcinom je retka i agresivna forma UKMB, prepoznata u važećoj WHO klasifikaciji tumora urinarnog trakta. Povezuje se sa lošom prognozom i otkriva se u poodmaklom stadijumu bolesti. Džinovsko ćelijski UKMB se uglavnom viđa zajedno sa klasičnim UKMB. Histološki obrazac rasta varira od infiltrišućeg sa rasutim pleomorfnim ćelijama do solidnih, ekspanzivnih gnezda sa mestimično diskohezivnim ćelijama. Opisana je i hipocelularna, varijantna sa sklerozirajućom stromom. Pleomorfna podvarijanta džinovskog ćelijskog UKMB se sastoji od bizarnih džinovskih, multinuklearnih tumorskih ćelija i podseća na džinovsko-ćelijski karcinom pluća, i odlikuje se brojnim tipičnim i atipičnim mitotskim figurama. Infiltracija mišićnog sloja i opsežne nekroze su skoro uvek prisutne. IHC profil tumorskih ćelija džinovskog ćelijskog UKMB je CK7+, EMA+, p63+, GATA3+, βHCG- (102).

1.6.2.10 Urotelni karcinom mokraćne bešike bogat lipidima (engl. Lipid-rich UKMB)

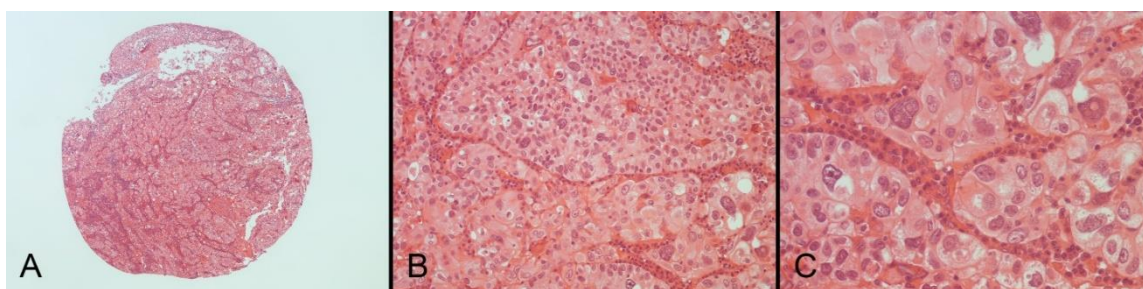
UKMB bogat lipidima se karakteriše prisustvom velikih lipoblastolikih ćelija sa jednom ili više citoplazmatskih, naizgled praznih, vakuola, koje potiskuju jedro i histološki podsećaju na ćelije liposarkoma. Elektronskom mikroskopijom je potvrđen lipidni sadržaj vakuola. Često je udružen sa klasičnim UKMB, dijagnostikuje se u odmaklom stadijumu i ima lošu prognozu. IHC bojenja dokazuju urotelno poreklo (104).

1.6.2.11 Svetlo-ćelijski (engl. clear cell)/bogat glikogenom (engl. glycogen-rich) urotelni karcinom mokraćne bešike

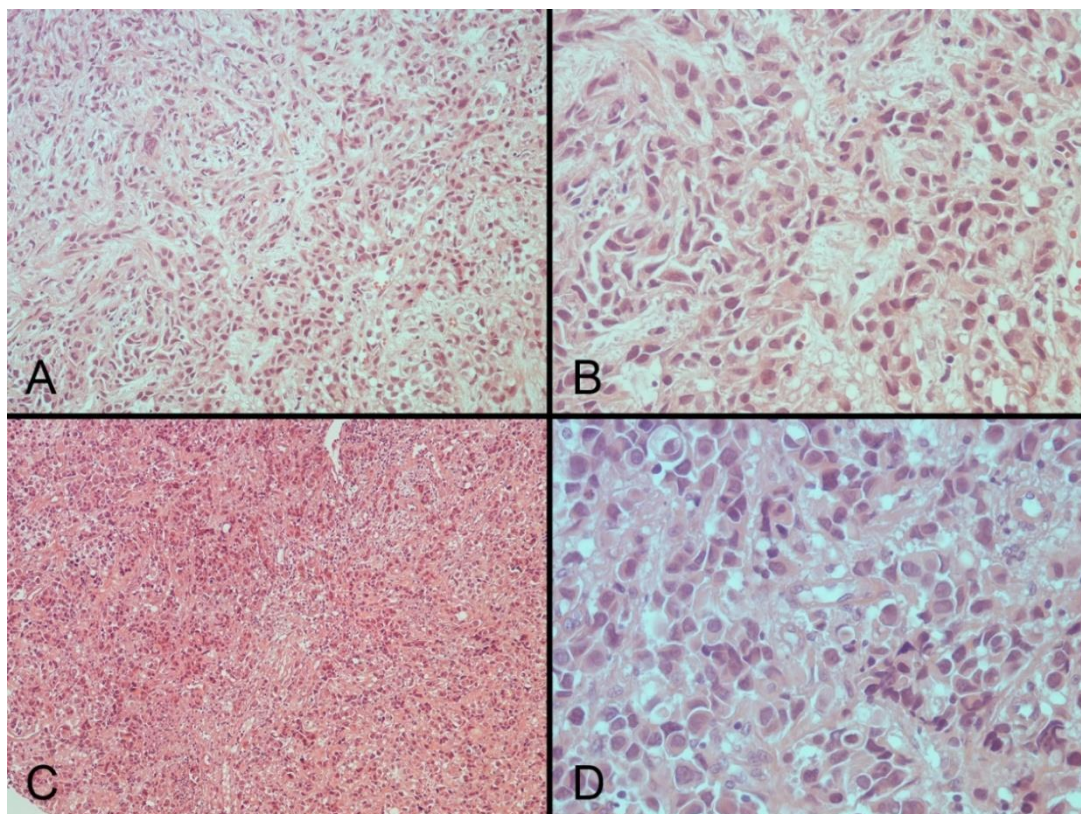
Ova izuzetno retka histološka varijanta UKMB (opisano 25 slučajeva) se sastoji od tumorskih ćelija čija je citoplazma bogata glikogenom, te podseća na svetloćelijski karcinom bubrega. Klinički tok je isti kao i kod klasičnog UKMB i često se viđaju zajedno. Dve trećine UKMB imaju svetloćelijske fokuse, u kojima su tumorske ćelije sa obilnom, svetlom citoplazmom ispunjenom glikogenom. Prisustvo glikogena se može potvrditi histohemijskim PAS (periodic acid–Schiff) bojenjem. U okolnom epitelu može biti prisutan konkomitantni CIS. Diferencijalno dijagnostički treba ga razlikovati od svetlo-ćelijskog *Müllerian* adenokarcinoma MB, i metastatskog svetloćelijskog karcinoma poreklom bubrega ili prostate, i PEComa MB. IHC profil tumorskih ćelija je isti kao kod klasičnog UKMB i podrazumeva ekspresiju GATA3, S100P, p63, thrombomodulin, CK7 i CK20 (105).

1.6.2.12 Nediferentovani (loše diferentovani) karcinom mokraćne bešike

Loše diferentovani tumori su izuzetno retki tumori, loše prognoze. Ova kategorija obuhvata spektar tumora mešovite morfologije i u nju se svrstavaju nediferentovani sitnoćelijski karcinom, sarkomatoidni karcinom, džinovsko-ćelijski karcinom, uključujući i karcinom sa osteoklastolikim džinovskim ćelijama i nediferentovani karcinom, *NOS* (engl. *Not otherwise specified*). Pojedini patolozi smatraju da je bolje ovaj entitet promeniti u dediferentovani UKMB (102).



Slika 7. Mikrofotografija *high grade* infiltrativnog urotelnog karcinoma mokraćne bešike (HE, A: uvećanje x40, B: uvećanje x100, C: uvećanje x200)



Slika 8. Mikrofotografija *high grade* infiltrativnog urotelnog karcinoma mokraćne beške (HE, A: uvećanje x100, B: uvećanje x200, C: uvećanje x100, B: uvećanje x200)

1.6.2.13 Genetski profil infiltrativnog urotelnog karcinoma mokraćne beške

Genetski dokazi ukazuju da invazivni urotelni tumori nastaju kroz najmanje dva molekularna puta, kojim tumori progrediraju ili preko HG papilarnih tumora ili preko CIS lezija (106). Tumori niskog gradusa često recidiviraju, ali retko progrediraju. Postoje upadljive genetske razlike između LG i HG tumora i obuhvataju višestruke hromozomske alteracije, aktivirajuće mutacije u onkogenima i deaktivirajuće mutacije u tumor supresornim genima. Tumori MB imaju monoklonalno ili oligoklonalno poreklo, i verovatno nastaju na terenu premalignih urotelnih lezija (107). Sledstveno, multifokalni i metahroni tumori imaju nasleđene mutacije, ali takođe sadrže nove, jedinstveno stečene mutacije. Sekvencioniranjem gena identifikovane su mutacije *p53*, *TERT*, *FGFR3*, *PIK3CA*, *RBI* i *HRAS* (116). Telomerazna aktivnost je važna za inicijaciju UKMB i *TERT* kodira katalitičku subjedinicu telomeraze, koja je odgovorna za elongaciju telomeraza na krajevima hromozoma (108). *TERT* mutacije su među najbolje proučenim u UKMB, ali nisu povezane sa kliničkim ishodom. Sekvencioniranjem celog genoma utvrđena je heterogena paleta mutacija u UKMB. Identifikovani su veliki hromozomski rearanžmani i fuzije gena. Rekurentna genska fuzija *FGFR3-TACC3* aktivira *FGFR3* (109).

1.7 TNM stadiranje urotelnog karcinoma mokraćne bešike

1.7.1 T kategorija

Cistoskopija je inicijalni korak u UKMB stadiranju. Ukoliko je tumor identifikovan izvodi se kompletna transuretralna resekcija (TUR) UKMB, a ukoliko to nije izvodljivo uzima se biopsijski uzorak. Dobijeni uzorak se obrađuje na patologiji da bi se postavila definitivna, patohistološka dijagnoza. Stadiranje TUR uzorka je neophodno radi donošenja odluke o daljem lečenju pacijenta. Adekvatna TUR podrazumeva resekciju svih vidljivih tumora i uzorkovanje detrusornog mišića da bi se procenila dubina invazije i zahvaćenost mišićnog sloja (110).

Tabela 1. TNM stadiranje: T kategorija

T - primarni tumor
Tx - primarni tumor ne može biti procenjen
T0 - primarni tumor ne može biti dokazan
Ta - neinvazivni papilarni karcinom
Tis - <i>Carcinoma in situ</i> 'flat' lezija
T1 - Tumor invadira subepitelno vezivno tkivo T1mi T1a T1b T1c
T2 - Tumor invadira mišićni sloj (<i>lat. muscularis propria</i>)
T2a - Tumor superficijalno invadira muskularis propriju (unutrašnji sloj)
T2b - Tumor duboko invadira muskularis propriju (spoljašnji sloj)
T3 - Tumor invadira perivezikalno tkivo
T3a - Mikroskopski
T3b - Makroskopski (ekstravezikalna masa)
T4 - Tumor invadira okolne strukture
T4a - Tumor invadira stromu prostate, semene kesice, uterus, ili vaginu
T4b - Tumor invadira pelvični zid ili abdominalni zid

1.7.1.1 Mikroinvazivni karcinom (pT1mi)

U novijoj literaturi granična (*cut-off*) vrednost za mikroinvazivni karcinom (pT1mi) je smanjena na 0,5mm, što je ekvivalentno jednom polju na najvećem uvećanju (engl. *high power field*- HPF). Dubina invazije veća od 0,5mm je korelirala sa gorim ishodom (111). *Lopez-Beltran* i saradnici su za mikroinvazivnost predložili da granična vrednost bude 20 infiltrativnih tumorskih ćelija u lamini propriji umesto linearnog merenja (112). *Lawless* i saradnici su ukazali da UKMB u kome je prisutna invazija samo vezivnotkivne strome papile i fokalna invazija baze imaju bolju prognozu u poređenju sa tumorima sa širokobaznom subepitelnom invazijom (113).

Ne računajući mikroinvazivne tumore pT1 stadijum ostaje heterogena grupa sa varijabilnom stopom recidiva i progresijom. Stratifikacija u okviru pT1 tumora zavisi od invazije u odnosu na muskularis mukoze ili se meri linearna dubina invazije, a granična vrednost je 3 mm. Muskularis mukoza se nalazi u sredini ili gornjoj polovini lamine proprije i sastoji se od tankih, talasastih glatko mišićnih snopova, što je često povezano sa velikim krvnim sudovima tankih zidova. Dubina invazije u submukoze iznad muskularis mukoze je pT1a, u muskularis mukoze je pT1b, a ispod muskularis mukoze/vaskularnog pleksusa je pT1c. U 6% radikalnih cistektomija muskularis mukoza je neprepoznatljiva, a u biopsijskim uzorcima je varijabilno prisutna (15–83%). I dalje je u mnogim slučajevima mikrostadiranje u pT1 stadijumu nemoguće na osnovu ovih kriterijuma. U nekim studijama nije uočena prognostička vrednost određivanja dubine invazije lamine proprije. U najvećoj studiji do sad na 587 pT1 pacijenata sa prosečnim vremenom praćenja 35 meseci, značajno kraće vreme bez recidiva, i gore vreme preživljavanja do progresije i UKMB-specifično preživljavanje utvrđeno je kod pacijenata koji su imali invaziju ispod muskularis mukoze (114). Linearno određivanje dubine invazije u pT1 UKMB određuje se okularnim mikrometrom merenjem od bazalne membrane do najdublje lokalizovane invazivne tumorske ćelije. Najšire usvojena granična vrednost za substadiranje pT1 je 1mm. Pokazano je da goru prognozu imaju tumori kod kojih je invazija >1mm u poređenju sa tumorima kod kojih je invazija ≤1mm (115).

Važno je razlikovati tumorsku invaziju tankih, diskontinualnih mišićnih vlakana *muscularis mucosae* (pT1) od invazije debljih, kompaktnijih snopova *muscularis propriae* (pT2). Masno tkivo je prisutno kroz ceo zid MB i zbog toga infiltracija masnog tkiva nije pouzdan kriterijum za procenu dubine invazije. Dodatne nasumične (random) biopsije se često uzimaju da bi se procenilo stanje okolne sluzokože i prisustvo/odsustvo CIS. Cistoskopija sa reTUR-om je najbolja opcija za kliničko praćenje pacijenata. Citološki pregled urina je

limitirane dijagnostičko-prognostičke mogućnosti. Pozitivna citologija urina ukazuje na prisustvo tumora negde u urinarnom traktu, dok negativna citologija na malignitet ne isključuje prisustvo tumora. Preporuka je da se TUR ponovi nakon 2-6 nedelja ukoliko je incijalna resekcija bila inkompletna, kada u prvom TUR nije uzorkovan mišićni sloj i ukoliko je dijagnoza na prvom TUR bila HG/Ta ili HG/T1 (116).

Na operativnom materijalu dobijenom radikalnom cistektomijom neophodno je napraviti razliku između invazije mišićnog sloja (pT2b) i mikroskopske invazije perivezikalnog masnog tkiva (pT3a), s obzirom na to da granica između ova dva sloja zida MB nije jasno definisana (117).

1.7.2 N kategorija

Disekcija pelvičnih limfnih nodusa je integralni deo radikalne cistektomije za UKMB, i uključuje zajedničke ilijačne i/ili niže paraaortalne i parakavalne limfne noduse, i vađenje većeg broja pozitivnih limfnih nodusa je povezano sa boljim preživljavanjem i manjim pelvičnim recidivom, čak i u odsustvu pozitivnih limfnih nodusa (118). Svi dostavljeni limfni nodusi moraju biti mikroskopski pregledani jer pN stadijum, prognoza i dalje lečenje zavise od tačnog broja i lokalizacije pozitivnih limfnih nodusa.

U patohistološkom izveštaju se treba izjasniti u skladu sa važećom pTNM klasifikacijom:

- pN0 - nema metastaza u regionalnim limfnim nodusima;
- pN1 - metastaza u jednom limfnom nodusu male karlice (hipogastrični, opturatorni, spoljašnji ilijačni ili presakralni);
- pN2 - metastaze u više limfnih nodusa male karlice (hipogastrični, opturatorni, spoljašnji ilijačni ili presakralni);
- pN3 - metastaza u zajedničkim ilijačnim limfnim nodusima (4, 119).

1.7.3 M kategorija

Kod pacijenata sa pT1 ili višim stadijumom bolesti preporučeno je M stadiranje pre odluke o radikalnoj cistektomiji u skladu sa važećom TNM klasifikacijom:

- M0: nema udaljenih metastaza;
- M1a: metastaza u neregionalnim limfnim nodusima
- M1b: Druge udaljene metastaze (4, 119).

1.8 Terapija urotelnog karcinoma mokraćne bešike

Cistoskopija sa bimanualnim pregledom pod anestezijom je urološka procedura kojom se determiniše veličina tumora i prisustvo ekstravezikalne ekstenzije ili invazije okolnih organa. Nakon totalne transuretralne resekcije low grade (LG) tumora trebalo bi uraditi selektovane i random biopsije i citologiju urina da bi se isključio CIS u okolnom urotelu. Preporuka za praćenje pTa LG UKMB je cistoskopija sa citologijom urina na tri meseca u prve tri godine, a nakon toga jednom godišnje. Snimanje gornjeg urinarnog trakta trebalo bi sprovesti na svake dve godine.

TUR mora biti dovoljno duboka i da sadrži mišićni sloj da bi se adekvatno stadirao biopsijski uzorak. Biopsijski uzorci bi trebalo da budu dovoljno veliki, sa što manje toplotnih artefakata, ili se mogu uzeti “*cold cup*” biopsije da bi se izbeglo korišćenje kautera. TUR se radi resektoskopom, elektrokauterom ili laserom. Bešika se irigira sa sterilnom vodom u cilju da se minimizira implantacija ćelija.

Intravezikalna BCG terapija je indicovana ukoliko je na više mesta lokalizovan pTa, ukoliko je rekurentan pTa i u pT1 stadijumu. BCG terapija se primenjuje jednom nedeljno u periodu od šest nedelja. Kontraindikovana je kod imunokompromitovanih pacijenata, nakon traumatske kateterizacije ili ukoliko je hematurija aktivna. U navedenim slučajevima lečenje treba odložiti. Mitomicin C i interleukin- α su opcije za drugu liniju intravezikalne terapije. Pacijenti sa velikim, multifokalnim, loše diferentovanim UKMB i prisutnim CIS su na povećanom riziku za recidiv i onda je indicovana BCG ili intravezikalna hemioterapija. Pacijentima sa CIS bi trebalo uzeti multiple random biopsije i biopsije iz prostatičnog dela uretre. Ukoliko je prisutan CIS, rizik od progresije u mišićno invazivnu i metastatsku bolest je veliki (po nekim autorima i 80%) te se standardno preporučuje radikalna cistektomija, bez obzira na pT stadijum. Radioterapija se ne indikuje kod CIS jer nije radiosenzitivan i ne reaguje na radioterapiju. Za pacijente sa visokim gradusom, fokalnom bolešću i funkcionalnom bešikom, može se razmatrati intravezikalno aplikovanje hemioterapeutika. Ukoliko je resekcija nekompletna, stadijum se ne može odrediti, ako nema muskularis proprije u biopsijskom uzorku i ukoliko je prisutna limfovaskularna invazija predložena terapija je parcijalna ili radikalna cistektomija. Pacijenti kojima bolest recidivira, a i dalje su na terapiji BCG-om ili nije prošlo više od šest meseci od poslednje BCG terapije su kandidati za agresivnije terapijske modalitete, sistemska hemoterapiju ili radikalnu cistektomiju (120).

Radikalna cistektomija je zlatni standard sa 5-godišnjim preživljavanjem od 40 do 80% za mišićno-invazivne UKMB. Radikalna cistektomija sa pelvičnom limfadenektomijom (zajednički ilijačni, spoljašnji ilijačni, hipogastrični i opturatorni limfni nodusi) je tretman izbora iako i parcijalna cistektomija može biti terapijska opcija u pojedinim slučajevima (solitarna lezija u regiji podložnoj za resekciju sa čistim marginama i bez prisustva CIS). Kod muškaraca mokraćna bešika (MB) se uklanja sa pelvičnim peritoneumom, ostacima uretera, prostatom i semenim kesicama. Kod žena se često radi proširena cistektomija i MB se uklanja zajedno sa uterusom, adneksama, svodom vagine i uretrom.

Dva tipa urinarne diverzije nakon cistektomije su:

- Inkontinentna diverzija se češće primenjuje kod starijih od 65, oslabljenim pacijentima, a urin je izveden iz distalnog ileuma za koji su ureteri anastomozirani. Ostomija se kreira vezivanjem za distalni kraj ileuma do prednjeg trbušnog zida.
- Kod diverzije sa zadržavanjem urina se postavljaju ortotopski rezervoari napravljeni od creva i imaju ulogu nove bešike koja je povezana za membranozni deo muške uretre. Otprilike 80% pacijenata ima relativno normalnu urinarnu kontrolu. 10% pacijenata iskusiće hiperkontinenciju i zahtevaće intermitentnu kateterizaciju zarad pražnjenja nove bešike.
- Drugi tip rezervoara su stomalni rezervoari, koji zahtevaju intermitentnu kateterizaciju. Stomalni rezervoari su napravljeni od dela creva sa konstruisanim sfinkter mehanizmom, koji uključuju cekoependikostomiju, cekoileostomiju (*Indiana pouch*) i ileostomiju (*Kock pouch*). Tip urinarne derivacije ne utiče na onkološki ishod (121).

1.8.1 Hemioterapija

Neo-adjuvantna hemoterapija pre radikalne cistektomije poboljšava stopu preživljavanja za 5%. Adjuvantna hemioterapija ima manji učinak, ali se primenjuje u individualnim slučajevima i kod visoko rizičnih pacijenata (pT3/T4, pozitivni limfni nodusi).

1.8.2 Radioterapija

Spoljašnja usmerena radijaciona terapija (engl. *External Beam Radiation Therapy* (EBRT)) se može primeniti kod selektovanih pacijenata kod kojih se ide na očuvanje mokraćne bešike ili kod kojih je zbog starosti, komorbiditeta ili uznapredovale bolesti hirurška operacija kontraindikovana. Petogodišnja stopa preživljavanja sa primenjenom samo EBRT je 20-40%, a taj je procenat nešto veći u kombinaciji sa hemioterapijom.

1.8.3 Kombinovana hemioterapija i radioterapija

Sistemska konkurentna hemioterapija i EBRT, nakon TUR se preporučuju kod pacijenata koji nisu kandidati za hiruršku operaciju. Hipofrankcionisana konkurentna hemioterapija i EBRT su dobar terapijski modalitet za starije pacijente.

Trimodalna terapija za očuvanje mokraćne bešike podrazumeva agresivni TUR praćen indukcionom hemio-radioterapijom. Ukoliko ne dođe do kompletne remisije trebalo bi razmotriti radikalnu cistektomiju (122).

1.8.4 Terapija uznapredovale i metastatske bolesti

Hemioterapija prve linije:

- gemcitabin – cisplatin
- *Intensified MVAC Dose-intense MVAC + GCSF*
- karboplatin – gemcitabin
- novi lekovi i kliničke studije

Hemioterapija druge linije:

- paklitaksel – karboplatin
- docetaksel
- ifosfamid

Indikacije za neoadjuvantnu hemioterapiju:

1. Patohistološki stadijum T2-T4a
2. Odsustvo metastaza u limfnim nodusima i ostalim organima
3. Prisustvo samo urotelne histologije (bez prisustva divergentne diferencijacije)
4. Kandidati za radikalnu cistektomiju

Indikacije za adjuvantnu hemioterapiju:

1. Patohistološki stadijum T2b, T3, T4a
2. Prisustvo metastaza u limfnim nodusima

Prilikom izbora terapijskog protokola trebalo bi razmotriti:

- Cilj terapije (lokalna kontrola bolesti, simptomatska terapija, palijativna terapija),
- Godine starosti i performans status,
- Bubrežnu funkciju,
- Stanje koštane srži,
- Prethodna terapija,
- Prisustvo komorbiditeta,

- Izvodljivost,
- Dostupnost kliničkih trajala (123).

1.8.5 Najnovije terapijske strategije

Rezultati kliničkih ispitivanja ciljane terapije za sada nisu ohrabrujući i nijedna od novih terapija nije odobrena za uznapredovale urotelne karcinome. Nedavna klinička ispitivanja uključuju antiangiogena monoklonalna antitela. Target inhibitori tirozin kinaze usmereni na VEGFR2, PDGFR, EGFR, FGFR3, HER2 i mTOR. Dostupni su brojni lekovi, koji ciljaju angiogenezu i VEGF signalni put. Lečenje uznapredovalog UKMB bevacizumabom (VEGF antitelo) i ramucirumabom (VEGFR2 antitelo), u kombinaciji sa hemioterapijom pokazalo je obećavajuće rezultate u završnim fazama kliničkih trajala. U toku su kliničke studije ispitivanja sunitiniba, sorafeniba i pazopaniba, koji deluju kroz manipulaciju VEGF receptora. Najnovije strategije sa vakcinom su u fazi testiranja (124).

Bevacizumab je usmeren na VEGF ligand. Sunitinib i sorafenib ciljano deluju na VEGFR. Da bi se u budućnosti povećao uspeh ciljane antiangiogene terapije, nove terapijske strategije se baziraju na kombinaciji višestrukih inhibitora usmerenih protiv više različitih meta i signalnih puteva. U ispitavanju je targetizovana terapija sa inhibitornim, monoklonalnim antitelom usmerenim na ekstracelularne domene EGFR. Primena Erb-B-1 i Her-2/neu nije dala obećavajuće rezultate. Prekomerna ekspresija FGFR3 je utvrđena u UKMB, što može biti značajno za primenu personalizovane ciljane terapije (125). FGFR inhibitori su vrlo efikasni mali molekuli za lečenje pacijenata sa UKMB, koji nose FGFR mutacije ili translokacije. EGFR inhibitori mogu biti efikasni kod UKMB pacijenata koji nisu primali sistemsku hemioterapiju i kod kojih se prekomerno ekspimiraju EGFR ili ERBB2 (126). Trastuzumab konjugovan sa citotoksičnim agensom DM1 postigao je ohrabrujuće rezultate kod pacijenata sa ERBB2 pozitivnim UKMB (127). Za razliku od karcinoma dojke, većina ERBB2 pozitivnih UKMB nije povezano sa amplifikacijom ERBB2 gena. Osim toga, mTOR inhibitori u kombinaciji sa MEK inhibitorima i inhibitorima ćelijskog ciklusa (PLK1 i CDK4) doprinose boljem odgovoru na hemioterapiju. Najnovija imunoterapija sa antiCTLA4 i anti-POL1 je dala pozitivne preliminarne rezultate u terapiji UKMB (128).

Fiziološki i protektivni odgovor HIF signalnog puta je neophodan u ishemičnim, hipoksičnim i inflamatornim stanjima. Farmakološki ispitani aktivatori HIF su inhibitori prolilhidroksilaza (engl. *prolyl-hydroxylase inhibitors*). Potencijalna terapija budućnosti je targetizovana primena HIF inhibitora kao antikancerskih terapeutika. HIF1 α je često

detektovan u kancerskom tkivu i geni koje HIF1 reguliše utiču na fenotip tumora. HIF inhibitori u terapiji karcinoma ciljaju HIF signalni put na različitim nivoima: smanjuju HIF mRNA na proteinskom nivou ili inhibiraju vezivanje DNK (129).

I pored svih molekularnih terapija, najviše se onkoloških trajala bazira na poboljšanju hemioterapijskih protokola. Rezultati II faze ispitivanja cisplatine, gemcitabina i gefitiniba kao prve linije lečenja za uznapredovali UKMB su vrlo obećavajući i ukazuju na bolji odgovor na terapiju kroz povećanu stopu preživljavanja.

1.9 Neoangiogeneza i signalni put vaskularnog faktora rasta

1.9.1 Neoangiogeneza

Angiogeneza je strogo kontrolisani, višestepeni, dinamični i privremeni proces regulisan mnogobrojnim faktorima rasta, citokinima, enzimima, proteinima ekstracelularnog matriksa (ECM) i drugim medijatorima. U fiziološkim uslovima, u tkivu se održava stabilan balans između pro-angiogenih i anti-angiogenih faktora. U tumorima, ravnoteža se narušava i pomera ka pro-angiogenim faktorima, takozvani angiogeni prekidač (engl. *angiogenic switch*) je aktiviran i počinje stvaranje nove vaskulature (130). Najčešći mehanizam tumorske neoangiogeneze je kapilarno nicanje novih kapilara. U ovom procesu matični krvni sud inicijalno dilatira, postaje permeabilniji i bazalna membrana se delimično degradira na mestima gde je proangiogeni stimulus najjači. Endotelne ćelije migriraju u okolno tkivo formirajući pupoljak sa pukotinastim otvorom koji održava vezu sa matičnim krvnim sudom. Periciti oblažu novoformirani kapilar i pružaju mu dodatnu potporu. Moguća je i inkorporacija postojećih krvnih sudova (*vessel co-option*) u rastući tumor što kasnije rezultuje separacijom novonastalog krvnog suda od tkiva domaćina. Lumen krvnog suda biva podeljen formiranjem transluminalnih endotelnih mostova koji na kraju podele postojeći krvni sud na dva. Važna karakteristika ovakvog tipa vaskularizacije je nezavisnost od proliferacije endotelnih ćelija tako da su anti-angiogene terapije, koje targetuju mitotsku aktivnost endotelnih ćelija beskorisne u tumorima kod kojih dominira ovaj način neoangiogeneze (131).

Tumorska neoangiogeneza počiva na istim principima kao i angiogeneza u fiziološkim uslovima, ali se novonastala tumorska vaskulatura po mnogo čemu razlikuje. Tumorska vaskulatura se karakteriše različitim strukturnim i funkcionalnim abnormalnostima, kao npr. odsustvo arterijskih/venskih specifikacija, povećana propustljivost, nedostatak pericita, infiltracija zidova krvnih sudova tumorskim ćelijama. Novonastala kapilarna mreža je

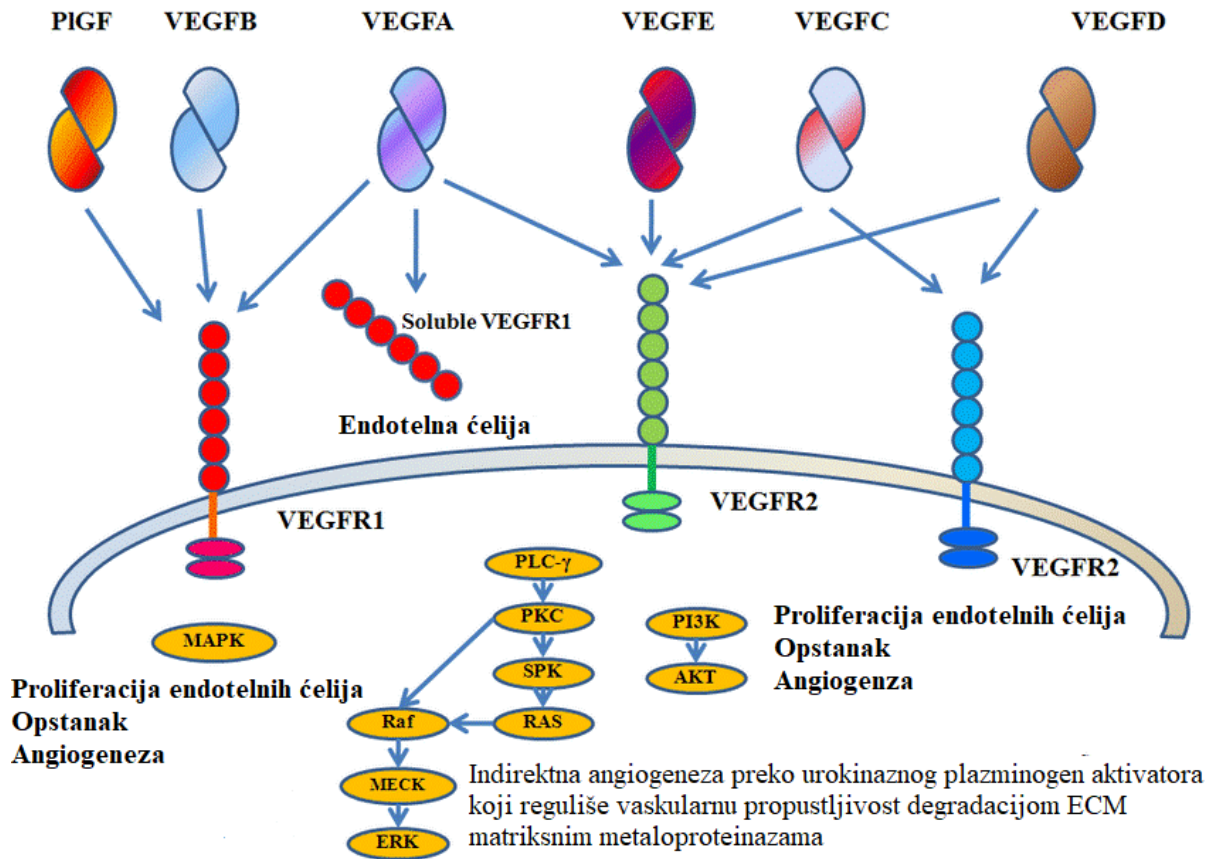
kompleksna i sastavljena od krvnih sudova, izvijuganog izgleda, kapilari su neujednačenih dijametara, prisutni su abnormalni šantovi, forme sa slepim krajevima organizovane u haotične lavirinte i insuficijentnog krvnog protoka. Brzo rastući tumori su često hipoksični bez obzira na bogatu vaskularizaciju upravo zbog dezorganizovane kapilarne mreže (132).

1.9.2 Vaskularni faktor rasta (VEGF) signalni put

Angiogeneza je normalan, fiziološki proces tokom rasta i razvoja organizma i zarastanja rana. Angiogeneza je i patološki proces koji je izražen u fazi intenzivnog rasta tumora, lokalnog širenja neoplastičnog procesa i metastaziranja. Savremeno poimanje neoangiogeneze definiše kao formiranje novih krvnih sudova, kojima nedostaje razvijena medija, nastalih kao odgovor na dejstvo angiogenih faktora, koji se oslobađaju iz ishemijskih tkiva, tkiva koja se naglo razvijaju i/ili iz izrazito metabolički aktivnih tkiva. Tumorski rast i metastaziranje zavise od neoangiogeneze i limfangiogeneze, a aktiviraju ih hemijski signali koje dobijaju od tumorskih ćelija u fazi rapidnog rasta tumora. Tumorske ćelije ne mogu da prežive bez vaskularne podrške i ukoliko ne pokrenu neoangiogenezu nekrotišu ili pokreću apoptozu. Tumorska neoangiogeneza počinje lokalnim oštećenjem bazalne membrane. Nastaje trenutna destrukcija bazalne membrane praćena hipoksijom. U hipoksiji se oslobađaju velike količine hipoksija inducibilnog faktora rasta 1 alfa (HIF1 α) što je stimulus za povećano stvaranje VEGF (133). Aktivirane angiogenim faktorima endotelne ćelije migriraju, intenzivno proliferišu i stabilizuju novostvorenu kapilarnu mrežu u zavisnosti od mikrookoline. U normalnim okolnostima endotelne ćelije se dele na oko 1000 dana, dok je u tumorima višestruko skraćen ovaj vremenski period. Angiogeneza je stimulisana kada tumorskom tkivu nedostaju nutritijenti i kiseonik. Do sada su identifikovani brojni proteini, aktivatori angiogeneze: vaskularni endotelni faktor rasta (*vascular endothelial growth factor*-VEGF), bazični fibroblastni faktor rasta (bFGF), angiogenin, transormišući faktor rasta alfa (TGF alfa), transformišući faktor rasta beta (TGF beta), faktor tumorske nekroze (TNF), endotelni faktor rasta iz trombocita, *granulocyte colony-stimulating factor*, *placental growth factor*, interleukin-8, *hepatocyte growth factor*, i *epidermal growth factor* (134). Pod uticajem citokina i hipoksije pojavljuju se članovi VEGF familije u tumorskom tkivu i okolnoj stromi. Hipoksija pokreće pojačanu ekspresiju VEGF i njegovih receptora preko HIF1 α (135). Tumorske ćelije aktivno učestvuju u formiranju novih krvnih sudova produkujući velike količine VEGF. Kada se tumorske ćelije susretnu sa endotelnim ćelijama vežu se za receptore eksprimiranim na spoljašnjoj površini endotelnih ćelija. Vezivanje VEGF za njegove receptore

(VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VEGFR4) aktivira proteinsku kaskadu sa ciljem da se signal prenese do jedra endotelne ćelije. Signal u jedru pokreće ekspresiju gena za sintezu produkata neophodnih za rast postojećih i nastajanje novih endotelnih ćelija. VEGF-om aktivirane endotelne ćelije stvaraju matriksne metaloproteinaze, koje razgrađuju ekstracelularni matriks omogućavajući migraciju i deobu endotelnih ćelija. Novonastala vaskulatura je strukturno i funkcionalno abnormalna i krvni sudovi su nezreli i permeabilni, veoma propustljivi i za velike molekule, nemaju pericite i bazalnu membranu, dijametar krvnih sudova je manji, gustina mikrovaskulature je heterogena (136). Zbog ovakve vaskularizacije tumor je nejednako snabdeven krvlju, nastaje hipoksija i acidoza, degenerativne promene u tumoru i uočavaju se fokusi nekroze (137). Zbog neujednačene neoangiogeneze nejednaka je difuzija hemioterapeutika. Ordiniranje anti-VEGF terapije u kombinaciji sa hemioterapijom i radioterapijom povećava ukupno preživljavanje onkoloških pacijenata. Značajna korelacija između ekspresije VEGF i prognoze ustanovljena je u kolorektalnom karcinomu, karcinomu dojke, karcinomu pluća, skvamocelularnom karcinomu glave i vrata, Kapoši sarkomu i malignom mezoteliomu. Ove studije su pokazale da nivoi angiogenih faktora u tkivu reflektuju agresivnost i da imaju prediktivnu vrednost u identifikaciji rizičnih pacijenata sa lošom prognozom (138).

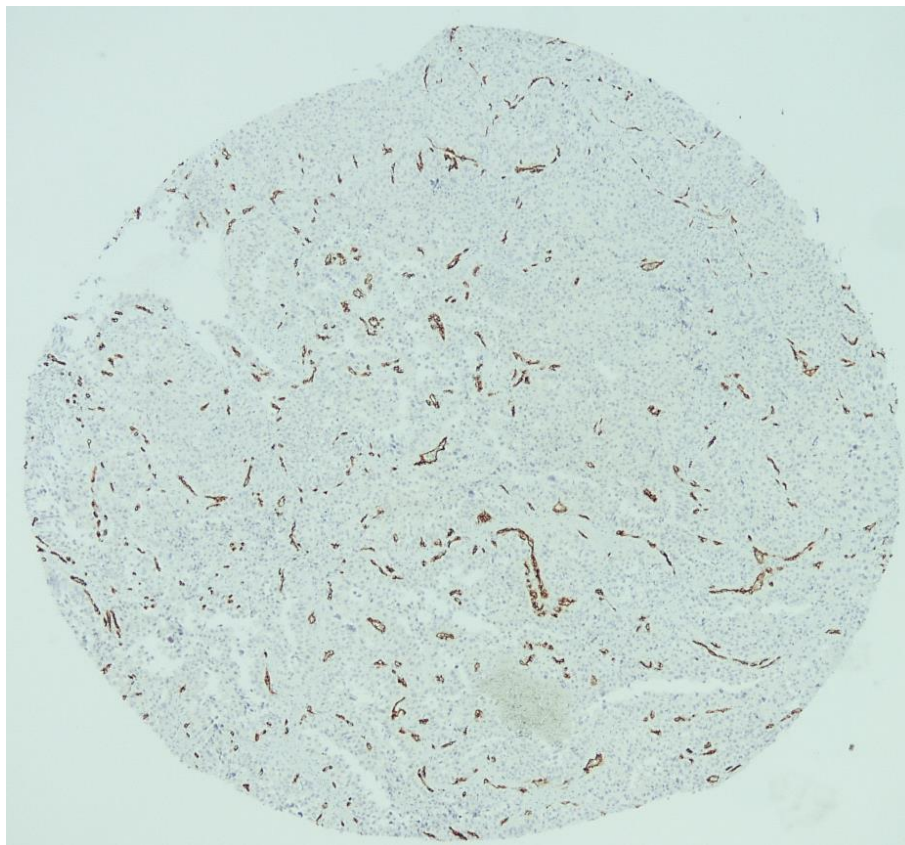
Novoformirani krvni sudovi sazrevaju pod uticajem citokina i faktora rasta. U VEGF familiji proteina, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C i VEGF-E delovanjem na odgovarajuće receptore uzrokuju angiogenezu, a VEGF-C i VEGF-D su uključeni u limfangiogenezu. VEGF-A se prekomerno stvara u hipoksiji i veoma je potentan i specifičan mitogen za vaskularne endotelne ćelije i može stimulisati čitavu kaskadu događaja u angiogenezi. VEGF-A je najvažniji prilikom formiranja novih krvnih sudova, a svoje dejstvo ostvaruje vezujući se za VEGFR2. Nakon vezivanja, brojne tirozinske VEGFR2 rezidue podležu fosforilaciji i vezuju se za efektorne molecule na ćelijama. VEGFR1 može da se heterodimerizuje sa VEGFR2 vodeći ka autofosforilaciji, aktiviranju VEGFR2 i angiogenezi 9. U ćelijskoj kulturi ćelije koje eksprimiraju oba receptora i VEGFR1 i VEGFR2 značajno bolje migriraju od ćelija sa samo jednim receptorom na ćelijskoj membrani. VEGFR2 može da heterodimerizuje i sa VEGFR3, a receptori unakrsno komuniciraju (engl. *cross-talk*) i međusobno i sa brojnim koreceptorima iz drugih signalnih puteva (139).



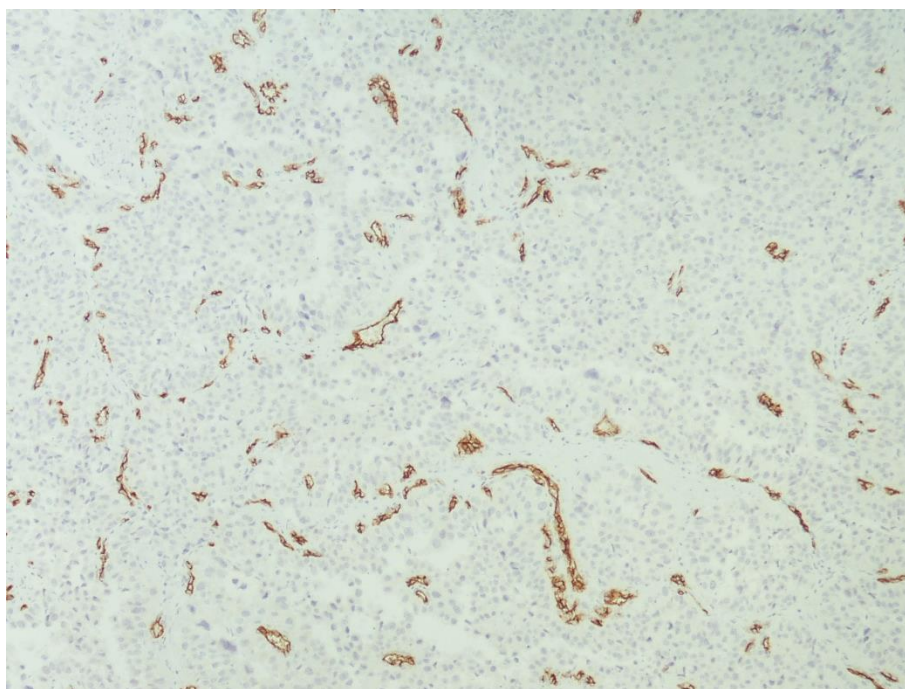
Slika 9. VEGF familija proteina i receptori (Preuzeto i prerađeno od Sanguanraks D, 2012)

Gustina malih krvnih sudova (engl. *microvessel density* - MVD) je najobjektivniji pokazatelj aktivnosti angiogeneze u tkivu. Angiogeneza je heterogena u različitim tumorima i u različitim delovima istog tumora. Izražena je na invazivnom frontu tumora, gde je i ustanovljena veća ekspresija VEGF i VEGFR1, i u hipoksičnim delovima tumora, u kojima je ustanovljena visoka ekspresija HIF1 α .

Stepen angiogeneze u tumoru se procenjuje određivanjem MVD. MVD se procenjuje u tzv. vrućim tačkama (engl. *hot spots*). Vruće tačke su polja u tumoru u kojima je najizraženija ekspresija CD34 endotelnog IHC markera (141).



Slika 10. Mikrofotografija MVD na 2mm² u urotelnom karcinomu mokraćne bešike (IHC, CD34, x40)



Slika 11. Mikrofotografija MVD (polje izražene angiogeneze - *hot spot*) u urotelnom karcinomu mokraćne bešike (IHC, CD34, uvećanje x200)

1.10 Hipoksija i signalni put hipoksija inducibilnog faktora 1 alfa

1.10.1 Hipoksija

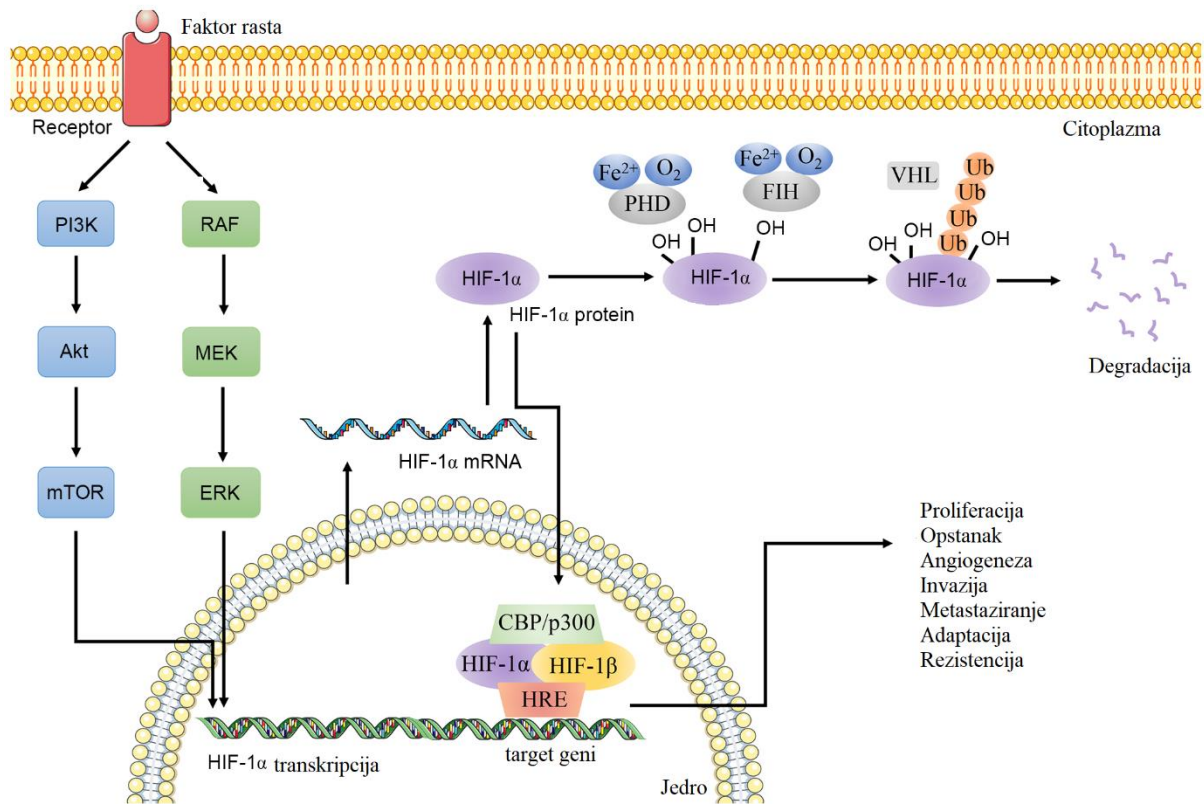
Hipoksija je stanje u kome je snabdevanje kiseonikom insuficijentno i jedna je od zajedničkih karakteristika tumorske mikrosredine. Hipoksija izaziva pojačanu regulaciju hipoksija inducibilnih faktora (HIF). HIF familija obuhvata tri transkripcijska faktora (HIF1, HIF2 i HIF3), koji u hipoksijskim okolnostima aktiviraju ekspresiju brojnih proangiogenih faktora i suprimiraju antiangiogene faktore. Najbolje proučeni faktor je HIF1, heterodimerični transkripcijski faktor, sastavljen od dve subjediniće HIF1 α i HIF1 β . Ekspresija HIF1 β je kontinuirana i ostaje stabilna, dok se ekspresija HIF1 α u normooksničnim uslovima smanjuje, a HIF1 α subjedinića razgrađuje. Kada koncentracija kiseonika padne, sledi hidroksilacija HIF1 α , koja prevenira njegovu degradaciju, što rezultuje akumulacijom HIF1 α u ćeliji. U hipoksičnim ćelijama HIF1 reguliše ekspresiju proangiogenih faktora: VEGF, VEGF receptora, angiopietin 1, angiopietin 2, trombocitni faktor rasta, placentalni faktor rasta, metaloproteinaze matriksa (135).

1.10.2 Hipoksija inducibilni faktor 1 alfa (HIF1 α) signalni put

HIF1 α je identifikovan prilikom istraživanja najpotentnijeg molekularnog odgovora na hipoksiju, hematopoetskog hormona rasta, eritropoetina (EPO). Kada se nivo kiseonika u krvi smanji produkcija EPO u fibroblastima se ubrzava. Studije su pokazale da su promene u genskoj ekspresiji za sintezu EPO i direktno i indirektno regulisane HIF signalnim putem. Ćelije kontinuirano sintetišu i razgrađuju HIF protein. HIF posredovani signalni putevi utiču na metaboličku adaptaciju, eritropoiezu, angiogenezu, ćelijski rast i diferencijaciju, opstanak i apoptozu (136). U normooksiji HIF1 α nije neophodan, te se ubrzo nakon stvaranja razgrađuje ubikvitin-proteazomnim sistemom. Hipoksija obustavlja degradaciju HIF1 α preko ovog sistema što rezultuje translokacijom HIF1 α iz citosola u jedro. U jedru HIF1 α dimerizuje i konstitutivno eksprimira HIF1 β subjediniću, formirajući stabilni heterodimerični HIF1. HIF1 aktivira nishodne gene vezujući se za hipoksija reaktivne elemente u promoterima gena. Identifikovano je oko 100 HIF1 α nishodnih gena koji učestvuju u kancerogenezi, tumorskoj progresiji, ćelijskoj proliferaciji, migraciji, invaziji, metastaziranju i angiogenezi.

Hipoksija je prisutna u tumorskoj mikrookolini, a pokrenuta je brojnim stimulusima, kao što su hronična inflamacija, prisustvo medijatora, ushodna ekspresija HIF1 α . Ključni

nishodni geni HIF1 α dokazano imaju uticaj na biološke aktivnosti tumorskih ćelija. Nishodni efektor HIF1 α , VEGF, aktivira angiogenezu (137).

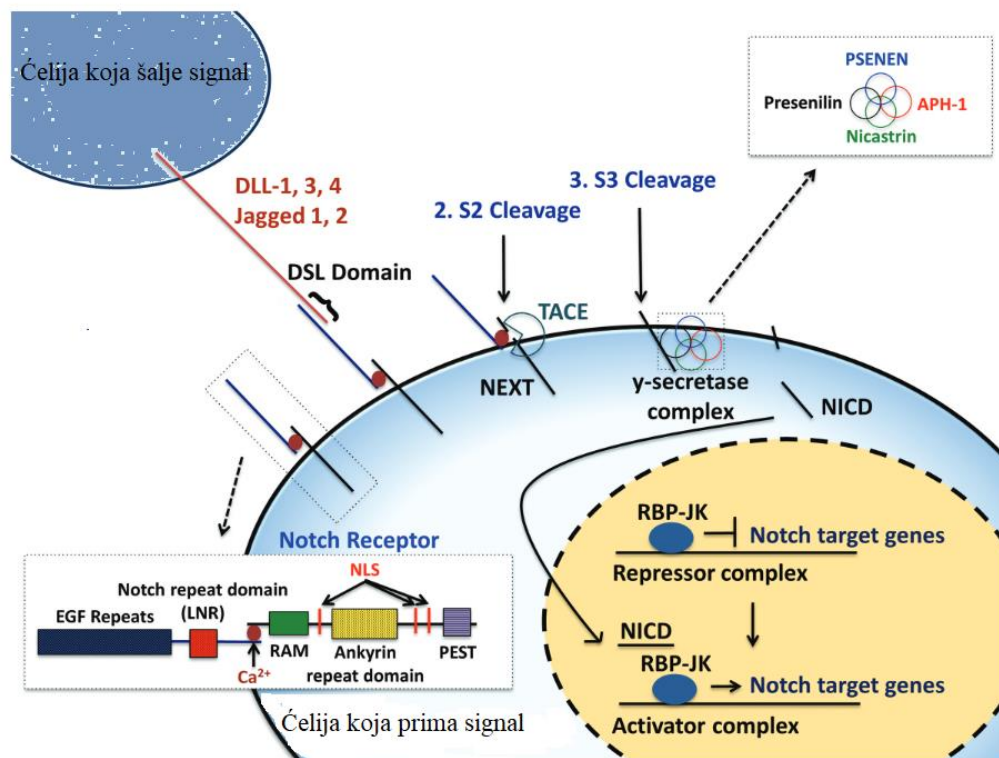


Slika 12. Uloga HIF1 α u hipoksiji (Preuzeto i prerađeno od Zhang Q, 2021)

1.11 NOTCH signalni put

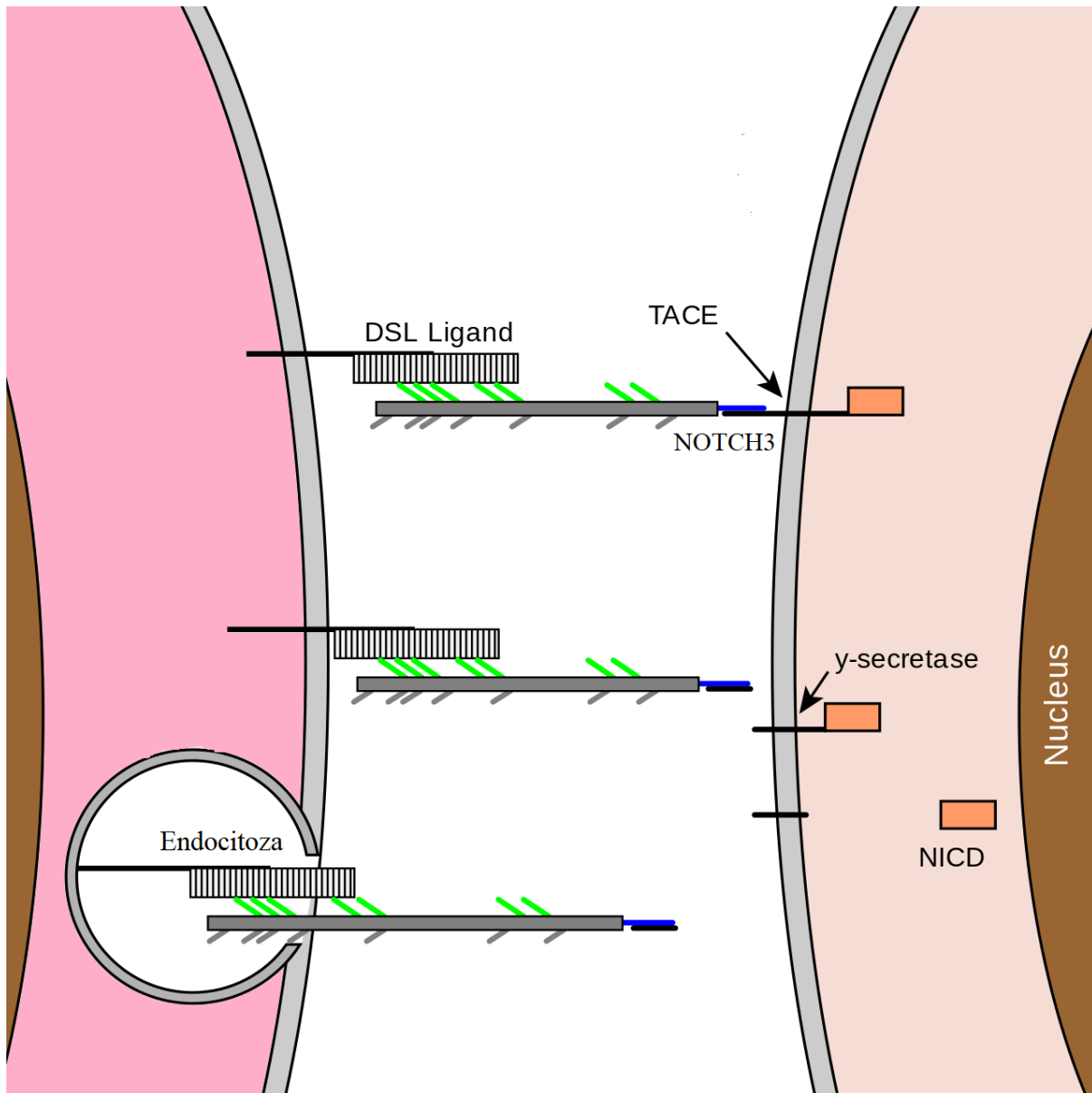
Formiranje krvnih sudova podrazumeva nekoliko ćelijskih procesa: proliferaciju, migraciju i diferencijaciju, koji moraju biti koordinisani između susednih endotelnih ćelija da bi se formirala funkcionalna vaskularna mreža. Tokom angiogenog bujanja specijalizovane vodeće ćelije (engl. *tip cells*) slede uputstva za navođenje i ekstenzivno migriraju u avaskularne delove tkiva dok vezujuće endotelne ćelije (engl. *trailing stalk cells*) moraju ostati vezane za zid matičnog krvnog suda. VEGF i Notch signalni put imaju glavne uloge u upravljanju ovim ćelijskim dešavanjima. Notch signalni put se biohemijski i molekularno razlikuje od VEGF puta. VEGF proteini su difuzibilni za razliku od Notch receptora i liganada koji su vezani za ćelijsku membranu, limitirajući prosleđivanje signala susednim ćelijama. Geni *Notch* signalnog puta kodiraju jednoprolazne transmembranske proteine koji se mogu aktivirati interakcijom sa familijom liganada. Opisano je pet Notch liganda: Jagged1, Jagged2, Delta-

like 1 (DLL1), Delta-like 3 (DLL3) i Delta-like 4 (DLL4) i četiri Notch receptora: NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 i NOTCH4 (139). Notch receptori su veliki transmembranski proteini koji na svojoj spoljašnjoj površini sadrže epidermalnom faktoru rasta slične ponovke, neophodne za vezivanje liganada. Sintetišu se kao proteinski prekursori kojima je neophodno proteolitičko cepanje u Goldžijevom aparatu, a naknadno cepanje nastaje nakon vezivanja liganda. Ligandom indukovano cepanje oslobađa Notch intracelularni domen koji se translocira u jedro. VEGF i Notch mogu funkcionisati kooperativno prilikom pobuđivanja diferencijacije endotelnih ćelija, ali mogu delovati i antagonistički tokom angiogeneze. Skorašnja istraživanja su ukazala na važnu ulogu Notch signala u određivanju kako će endotelne ćelije reagovati na VEGF. Notch ligand DLL4 koji se eksprimira na vodećim ćelijama (engl. *tip cells*) ograničava angiogenezu aktiviranjem Notch signalnog puta u nemigrirajućim endotelnim ćelijama vezanim za matični krvni sud. Aktivacija Notch pokreće ekspresiju hemokinskog receptora CXCR4a, što omogućava pogodnim vodećim ćelijama da migriraju. Naknadno, Notch signalni put smanjuje CXCR4a ekspresiju i prevenira prekomerni rast krvnih sudova. Inicijalna migracija i bujanje endotelnih ćelija je ograničeno na svega nekoliko ćelija jer bi u protivnom došlo do velike propustljivosti krvnih sudova i krvarenja (126).



Slika 13. NOTCH signalni put (Preuzeto i prerađeno od Capaccione K, 2013)

Notch signalni put se aktivira nakon vezivanja liganda za najbliži Notch receptor između susednih ćelija (139). Nakon aktivacije, Notch receptori podležu seriji proteolitičkih cepanja metaloproteinazama, konvertujućim enzimom faktora nekroze α (*tumor necrosis factor- α -converting enzyme* - TACE) i γ -sekretaznim kompleksom. Prvo cepanje je posredovano TACE-om, što dovodi do cepanja receptora na ekstracelularnom domenu. Oslobođeni ekstracelularni domen ulazi u ćeliju trans-endocitozom. Drugo cepanje izazvano γ -sekretaznim kompleksom oslobađa Notch intracelularni domen u citoplazmu, koji se premešta u jedro privučen jedarnim signalima (140). Inhibicija γ -sekretaze bi sprečila cepanje Notch receptora što bi blokiralo prenos signala, a inhibitori γ -sekretaze se uveliko ispituju za potrebe onkološke terapije (141). Već je utvrđeno da Notch signalni put igra važnu ulogu u održavanju ravnoteže uključenu u proliferaciju ćelija, preživljavanje, apoptozu i diferencijaciju u fiziološkim uslovima. Disfunkcija Notch signala sprečava diferencijaciju i uvodi nediferentovane ćelije u malignu transformaciju (142).



Slika 14. Aktivacija Notch signalnog puta (Preuzeto i prerađeno od Yao K , 2006)

Receptori i ligandi Notch signalnog puta imaju prognostički značaj u nekim karcinomima (143). Funkcije Notch su ili onkogene ili tumor supresorne, što zavisi od ćelijskog tipa i tkivnog konteksta. Notch signali deluju anti-proliferativno u mnogim tipovima tumora, npr. u karcinomima kože, hepatocelularnom karcinomu, medularnom karcinomu štitne žlezde, karcinomu cerviksa i sitnoćelijskom karcinomu pluća (144). Naučni dokazi sugerišu da je Notch signalna mreža deregulisana u malignitetima sa ushodnom regulacijom ekspresije Notch receptora i liganada, kao što su u karcinom dojke, pluća, kolona, glave i vrata, bubrega, pankreasa, akutna mijeloidna leukemija, Hodgkin limfom i difuzni krupno ćelijskom B-limfom. Kompleksnost Notch signalnog puta ogleda se u unakrsnim razgovorima (engl. *cross-*

talk) sa brojnim onkogenim signalnim putevima, kao što su NF- κ B, Akt, *Sonic hedgehog* (Shh), mTOR, Ras, Wnt, i receptorima: estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor - EGFR*) i faktor rasta trombocita (engl. *platelet derived growth factor - PDGF*) (145).

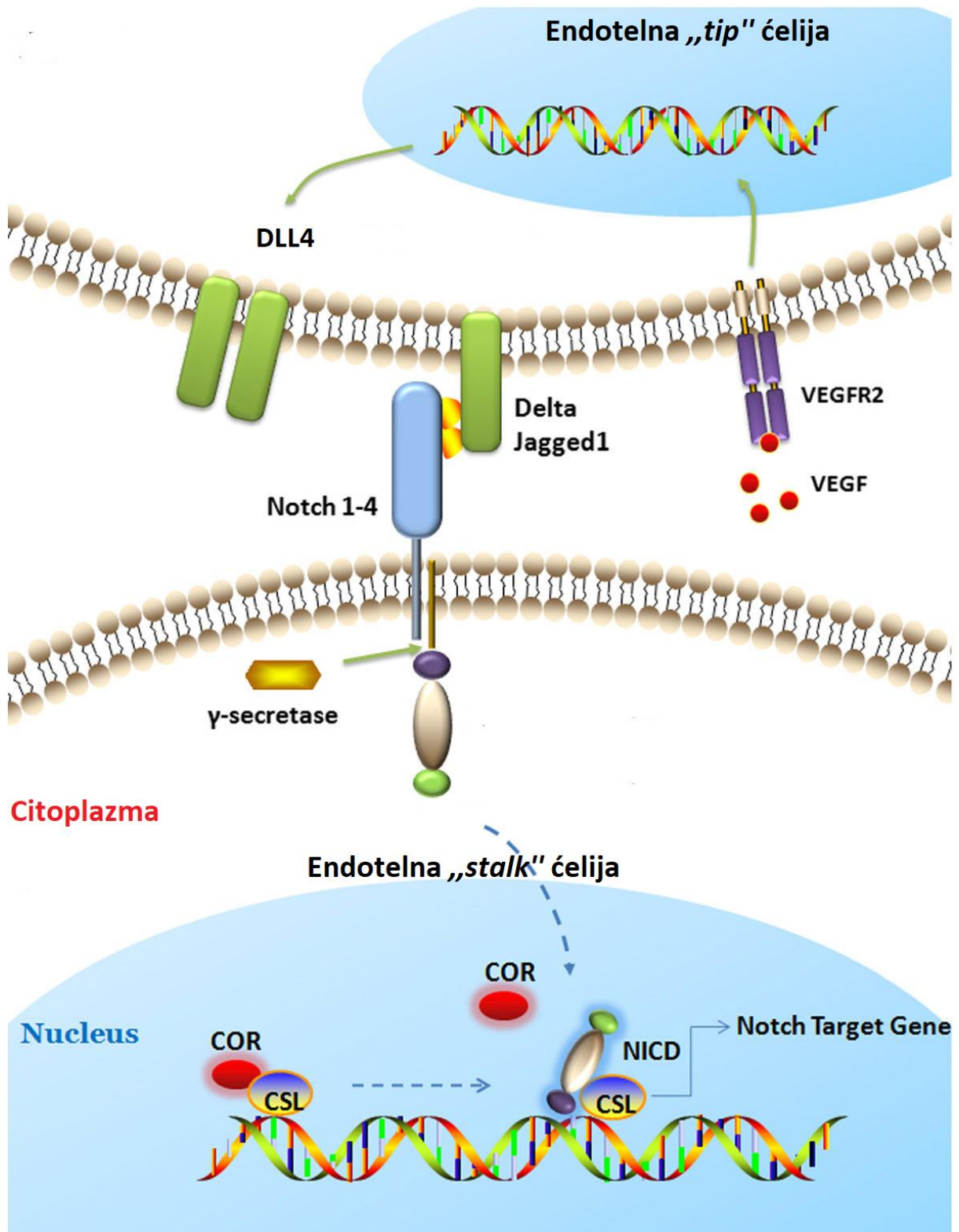
1.12 Notch signalni put i HIF1 α signalni put

Notch signalni put je usko povezan sa ćelijskom proliferacijom, diferencijacijom, atezijom i apoptozom. Nezaobilazan je signalni put u kancerogenezi i progresiji tumora (146). HIF1 α može aktivirati Notch signalni put u različitim tipovima kancerskog tkiva, a interakcija Notch i HIF1 α predmet je mnogih istraživanja (147). Uzajamna interakcija HIF1 α i drugih molekula delimično može determinisati da li će Notch hipoksijski odgovor biti onkogen ili tumor supresivan (148). Notch signali su neophodni za konvertovanje hipoksijskog stimulusa u epitelno-mezenhimnu tranziciju (EMT), što povećava motilitet i invazivnost tumorskih ćelija. Hipoksija korelira sa pokretanjem metastatskog procesa, stvaraju se metastatski klonovi tumorskih ćelija koje beže iz hipoksijske sredine. Početni koraci u metastaziranju uključuju proces sličan EMT (149). EMT modifikuje ćelije od epitelne, nepokretne morfologije u migratorni fenotip, sklon invaziji u druga tkiva (150). EMT je praćena specifičnim promenama u genskoj ekspresiji, kao što je nishodna regulacija E-kaderina, ćelijskog atezionog molekula.

Kada tumor preraste kapacitet snabdevanja kiseonikom dostupne vaskulature, niski nivoi kiseonika pokreću odgovor na hipoksiju u ćeliji. Niski nivoi kiseonika inaktiviraju prolyl hidroksilaze, koje u normooksiji učestvuju u HIF1 α hidroksilaciji, čineći ga pogodnim supstratom za ubikvitilaciju von Hippel–Lindau E3 ubiquitin ligaznim kompleksom. Sledi proteozomalna HIF1 α degradacija (151). Rezultat navedenih reakcija su veoma niski stabilni nivoi HIF1 α tokom normoksije i akumulacija HIF1 α u hipoksiji. Kada se stabilizuje u hipoksiji, HIF1 α dimerizuje sa HIF1 β i aktivira nishodne gene uključene za kanonični hipoksični odgovor (152). Notch signalni put je neophodni posrednik između hipoksije i EMT u tumorskim ćelijama. Aktivacija liganda dovodi do dva proteolitička rascepa na transmebranskom Notch receptoru i konačnom oslobađanju Notch intracelularnog domena, koji predstavlja aktivnu formu receptora. U jedru intracelularni domen Notch receptora reaguje sa DNK-vezujućim proteinom CSL i reguliše ekspresiju nishodnih gena. Postoje brojni naučni dokazi da je u HIF1 α /VEGF/Notch/EMT osovini tumorskih ćelija, Notch kritični posrednik u prenošenju hipoksičnih stimulusa u EMT. Za hipoksijom indukovani motilitet i invazivnost

tumorskih ćelija neophodna je Notch signalizacija, koja oponaša hipoksiju do realizacije EMT. Hipoksija pokreće nishodni Notch odgovor u tumorskim ćelijama, a uočeno je da Notch signalizacija postaje dominantna u ćelijskim linijama različitih tumora, kao i u UKMB (153).

Angiogeneza i molekuli povezani sa ovim procesom su predmet istraživanja još od naučnih dokaza da urin pacijenata sa UKMB stimuliše migraciju i proliferaciju endotelnih ćelija. Ekspresija VEGF i VEGFR1, i gustina malih krvnih sudova (MVD) direktni su pokazatelji angiogenih aktivnosti u tumoru. HIF1 α se aktivira u tkivnoj hipoksiji i učestvuje u stimulaciji neoangiogeneze. Najnovija istraživanja istakla su važnost uloge Notch signalnog puta u procesu angiogeneze, a IHC ekspresija NOTCH3 receptora ispitivana je u svega nekoliko aktuelnih studija koje su dale oprečne rezultate. NOTCH3 se aktivira u hipoksiji, a NOTCH3-HIF1 α interakcija dovodi do hiposkijom indukovanih promena u tumorskim ćelijama. Analiza i JAGGED1 (JAG1), transmembranskog liganda za Notch signale, doprinelo bi boljem razumevanju povezanosti hipoksije, neoangiogeneze i Notch signalnog puta. Ovom studijom su obuhvaćeni najvažniji markeri angiogeneze i hipoksije i analizirana je njihova ekspresija u UKMB, procenjen je njihov prognostički značaj, što je od izuzetne važnosti u kliničkom praćenju i personalizovanom pristupu pacijentima sa UKMB.



Slika 15. Uloga Notch signalnog puta u neoangiogenezi (Preuzeto i prerađeno od Xie Q, 2017)

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja je:

- Ispitati povezanost IHC ekspresije HIF1 α , VEGF, VEGFR1, NOTCH3, JAG1, i morfometrijski određene gustine CD34 pozitivnih malih krvnih sudova sa kliničko-patološkim parametrima, i utvrditi njihov prognostički značaj u praćenju pacijenata sa UKMB.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- Analizirati imunohistohemijsku ekspresiju VEGF u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i ispitati povezanost ekspresije sa patohistološkim karakteristikama tumora (patološki gradus, patološki stadijum, prisustvo divergentne diferencijacije u tumoru, prisustvo konkomitantnog CIS) i demografskim i kliničkim podacima pacijenata, uključujući ukupno preživljavanje i dužinu preživljavanja bez recidiva bolesti;
- Analizirati imunohistohemijsku ekspresiju VEGFR1 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i ispitati povezanost ekspresije sa patohistološkim karakteristikama tumora (patološki gradus, patološki stadijum, prisustvo divergentne diferencijacije u tumoru, prisustvo konkomitantnog CIS) i demografskim i kliničkim podacima pacijenata, uključujući ukupno preživljavanje i dužinu preživljavanja bez recidiva bolesti;
- Analizirati imunohistohemijsku ekspresiju HIF1 α u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i ispitati povezanost ekspresije sa patohistološkim karakteristikama tumora (patološki gradus, patološki stadijum, prisustvo divergentne diferencijacije u tumoru, prisustvo konkomitantnog CIS) i demografskim i kliničkim podacima pacijenata, uključujući ukupno preživljavanje i dužinu preživljavanja bez recidiva bolesti;
- Analizirati imunohistohemijsku ekspresiju NOTCH3 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i ispitati povezanost ekspresije sa patohistološkim karakteristikama tumora (patološki gradus, patološki stadijum, prisustvo divergentne diferencijacije u tumoru, prisustvo konkomitantnog CIS) i demografskim i kliničkim podacima pacijenata, uključujući ukupno preživljavanje i dužinu preživljavanja bez recidiva bolesti;

- Analizirati imunohistohemijsku ekspresiju JAG1 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i ispitati povezanost ekspresije sa patohistološkim karakteristikama tumora (patološki gradus, patološki stadijum, prisustvo divergentne diferencijacije u tumoru, prisustvo konkomitantnog CIS) i demografskim i kliničkim podacima pacijenata, uključujući ukupno preživljavanje i dužinu preživljavanja bez recidiva bolesti;
- Odrediti gustinu CD34 pozitivnih malih krvnih sudova (MVD) u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i utvrditi povezanost MVD sa patohistološkim karakteristikama tumora (patološki gradus, patološki stadijum, prisustvo divergentne diferencijacije u tumoru, prisustvo konkomitantnog CIS) i demografskim i kliničkim podacima pacijenata, uključujući ukupno preživljavanje i dužinu preživljavanja bez recidiva bolesti;
- Ispitati međusoban odnos i udruženost ekspresije HIF1 α , VEGF, VEGFR1, NOTCH3 i JAG1 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike;
- Ispitati uticaj ekspresije HIF1 α , VEGF, VEGFR1, NOTCH3 i JAG1 na MVD u urotelnom karcinomu mokraćne bešike;
- Ispitati povezanost ekspresije HIF1 α , VEGF, VEGFR1, NOTCH3 i JAG1, i morfometrijski određenog MVD sa pojavom recidiva urotelnog karcinoma mokraćne bešike i vremenom do pojave recidiva (dužina preživljavanja bez recidiva bolesti);
- Ispitati povezanost ekspresije HIF1 α , VEGF, VEGFR1, NOTCH3 i JAG1, i morfometrijski određenog MVD sa dužinom preživljavanja pacijenata od momenta postavljanja dijagnoze urotelnog karcinoma mokraćne bešike.

3 MATERIJAL I METODE

Studija je obuhvatila 613 uzoraka UKMB dijagnostikovanih u Centru za patologiju i patološku anatomiju Univerzitetskog Kliničkog centra u Nišu, u periodu od 2006 do 2010 godine. Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Istraživanje je dobilo odobrenje Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (br. 12-15637-2/6).

Inkluzioni kriterijumi: U istraživanje su bili uključeni pacijenti sa patohistološkom dijagnozom UKMB klasifikovani u patološki pTa, pTis, pT1, pT2a, pT2b, pT3a ili pT3b stadijum, odnosno 0a, 0is, I, II ili IIIA klinički stadijum bolesti, prema važećoj TNM klasifikaciji (115).

Ekskluzioni kriterijumi: Iz istraživanja su isključeni pacijenti sa patohistološkom dijagnozom UKMB klasifikovani u pT4a i pT4b patološki stadijum, odnosno IIIB, IVA i IVB klinički stadijum bolesti.

3.1 Karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike

Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 613 pacijenata sa UKMB starosti $66,58 \pm 9,80$ godina, sa odnosom muškaraca i žena 3,3:1. Od toga, 475 (77,5%) pacijenata je bilo sa superficijalnim karcinomom, dok je kod 138 (22,5%) pacijenata bila prisutna invazivna bolest. Superficijalni UKMB je dijagnostikovao kod pacijenata mlađe životne dobi ($p < 0,001$), koji su u većem procentu bili izloženi karcinogenima ($p < 0,01$), a bolest se najpre manifestovala bezbolnom hematurijom ($p < 0,01$). Kod invazivnih tumora češće je bio prisutan visok gradus (HG) ($p < 0,001$), kao i divergentna diferencijacija ($p < 0,001$), glandularna ($p < 0,01$) ili skvamozna diferencijacija ($p < 0,001$), odnosno CIS ($p < 0,001$). Superficijalni tumori su najčešće lečeni kombinacijom TUR i intravezikalnom instilacijom BCG (TUR+BCG) (60,0%), dok su invazivni tumori najčešće lečeni radioterapijom (33,3%) i/ili radikalnom cistektomijom (30,4%).

Tabela 2. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike

	Superficialni	Mišićno- invazivni	t* ili χ^2 ** (p)
Starost (godine)	65,95±10,28	68,77±7,58	3,530 (0,000)*
Pol (muški)	360 (75,8%)	111 (80,4%)	1,049 (0,302)**
Pušenje	165 (66,8%)	48 (66,7%)	0,000 (1,000)**
Izloženost karcinogenima	43 (9,1%)	3 (2,2%)	6,332 (0,005)**
Pozitivna porodična anamneza	55 (11,6%)	14 (10,1%)	0,100 (0,760)**
UKMB u porodičnoj anamnezi	15 (3,2%)	3 (2,2%)	0,100 (0,776)**
Endemsko područje za BEN	61 (12,8%)	13 (9,4%)	0,879 (0,303)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom	412 (86,7%)	105 (76,1%)	8,394 (0,003)**
Dizurija kao prvi simptom	44 (9,3%)	30 (21,7%)	14,527 (0,000)**
pT stadijum			
pTa	191 (40,2%)		
pT1	284 (59,8%)		
pT2		104 (75,4%)	
pT3		22 (15,9%)	
pT4		12 (8,7%)	
Gradus (HG)	140 (29,5%)	123 (89,1%)	152,930 (0,000)**
Divergentna diferencijacija	42 (8,8%)	30 (21,7%)	15,937 (0,000)**
Glandularna diferencijacija	5 (1,1%)	7 (5,1%)	7,030 (0,007)**
Mikrocistična diferencijacija	9 (1,9%)	0 (0,0%)	1,506 (0,220)**
Skvamozna diferencijacija	29 (6,1%)	24 (17,4%)	15,845 (0,000)**
Carcinoma in situ	19 (4,0%)	18 (13,0%)	13,867 (0,000)**
Terapija			
TUR	107 (22,5%)	9 (6,5%)	256,214 (0,000)**
TUR+BCG	285 (60,0%)	8 (5,8%)	
Parcijalna cistektomija	5 (1,1%)	5 (3,6%)	
Radikalna cistektomija	26 (5,5%)	42 (30,4%)	
Hemioterapija	15 (3,2%)	5 (3,6%)	
Radioterapija	21 (4,4%)	46 (33,3%)	
Hemioterapija + radioterapija	10 (2,1%)	15 (10,9%)	
Radikalna cistektomija + hemioterapija/radioterapija	6 (1,3%)	8 (5,8%)	

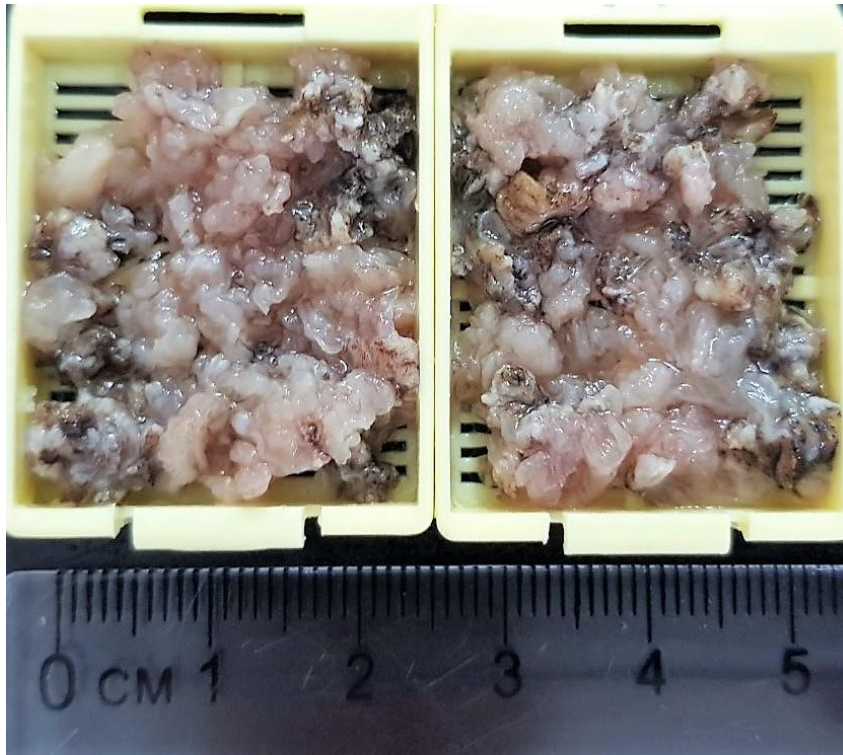
* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnjev U-test

Pacijenti su praćeni do 5 godina nakon inicijalne dijagnoze, prosečno tokom 44 (24-60) meseci, pri čemu su događajima smatrani pojava recidiva i smrt. Recidiv se javio kod ukupno 221 pacijenata (36,1%), maksimalno tri recidiva. Od ukupnog broja, 256 pacijenata (41,8%) je umrlo, od toga u 178 slučajeva (69,5%) smrt je direktno bila povezana sa UKMB.

U studiji je ispitivano i 74 uzoraka UKMB, koji su prikupljeni iz endemskih, hipoendemskih i graničnih naselja za BEN. Od 74 uzoraka povezanih sa BEN naseljima, superficijalnih je bilo 61 (12,8%), a mišićno-invazivnih 13 (9,4%). Endemska i hipoendemska naselja za BEN u Nišavskom okrugu (Donja Trnava, Mezgraja, Nozrina; Gornja Trnava, Moravac, Lužane, Pukovac – Doljevac) i Jablaničkom okrugu (Brestovac, Kutleš, Lipovica). Granična naselja za BEN (veći broj bubrežnih bolesnika i na dijalizi) u Nišavskom okrugu (sela u okolini Niša: Trupale, Vrtište, Donja Toponica, Gornja Toponica, Medoševac, Popovac, Donje Međurovo, Pasi Poljana, Čokot; sela u okolini Doljevca: Kočane, Belotinac, Grljane, Knežica, Merošina, Mramor, Gradište; sela u okolini Aleksinca: Tešica, Žitkovac, Draževac, Donje Suhotno, Katun, Trujane, Rutevac, Bobovište, Bradarac, Čićina, Prčilovica, Deligrade) i Jablaničkom okrugu (sela u okolini Leskovca: Bobojevce, Rudare, Kumarevo, Veliko Trnjane, Brejanovce, Belanovce, Bobište, Donje Brijanje, Živkovo, Bratmilovce, Manojlovce, Pečenjevce, Čekmin, Bradince, Donji Bunibrod, Navalin, Zoljevo).

3.2 Laboratorijska obrada i patohistološka analiza

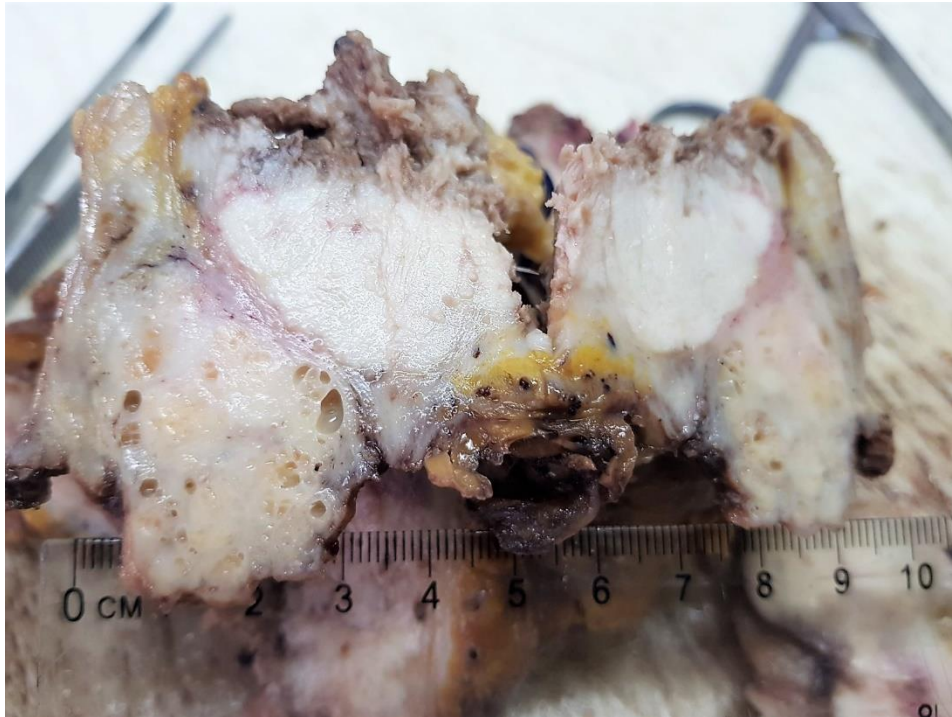
Uzorci dobijeni TUR-om/parcijalnom/radikalnom cistektomijom na Klinici za urologiju UKC Niš stavljeni su u posude sa 10% rastvorom formaldehida. Nakon fiksacije u formalinu, tkivni uzorci su obrađivani i kalupljeni u parafinu. Histološki preseki su bojani klasičnom hematoksilin-eozin (HE) metodom i mikroskopskim analiziranjem je postavljena patohistološka dijagnoza. Nakon pregleda svih HE histoloških preseka, na kalupu su markirana najreprezentativnija polja veličine 2mm. Kriterijumi na osnovu kojih su odabrana najreprezentativnija polja UKMB uzorka su: polje sa najviše malih krvnih sudova, najviše mitoza, EMT ukoliko je prisutna u tumoru, polje sa višim gradusom ukoliko su prisutne i LG i HG komponente, urotelna komponenta kod UKMB sa divergentnom diferencijacijom.



Slika 16. Biopsijski uzorci urotelnog karcinoma mokraćne beške dobijeni transuretralnom resekcijom



Slika 17. Hirurški preparat, radikalna cistoprostatektomija

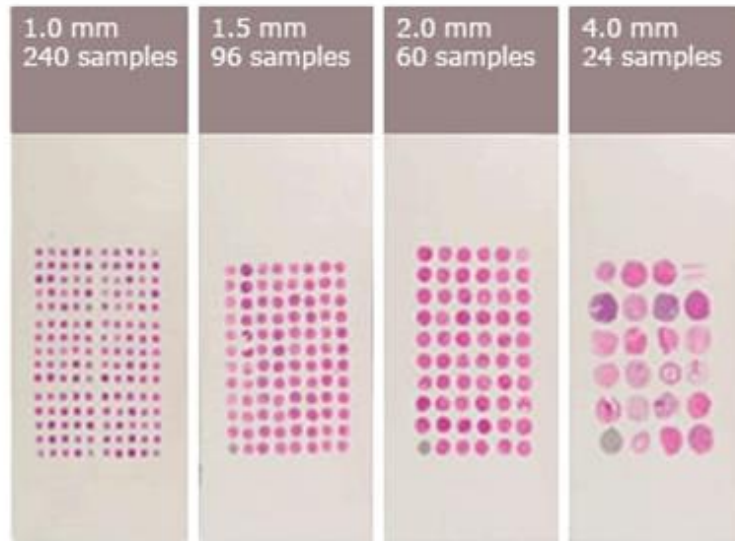


Slika 18. Hirurški preparat, radikalna cistoprostatektomija

Od postojećih parafinskih blokova su konstruisani mikroareji, iglenim vađenjem obeleženog tkiva prečnika 2mm i unošenjem tkiva u *Arraymold Paraffin Tissue Microarray*. Konstruisano je dvanaest novih parafinskih blokova, koji sadrže po 60 uzoraka najreprezentativnijih polja UKMB. Napravljeni su histološki presecci od konstruisanih tkivnih mikroareja i obojeni klasičnom HE i imunohistohemijskom metodom.



Slika 19. Šematski prikaz konstrukcije mikroareja



Slika 20. Mikroarej pločice sa različitom veličinom i brojem tkivnih uzoraka

3.3 Imunohistohemija

Imunohistohemija je metoda u laboratorijskoj dijagnostici koja se bazira na vezivanju antitela za ciljani antigen. Monoklonalna antitela reaguju sa jednim, a poliklonalna sa više epitopa na molekulu antigena. Imunohistohemija se u patologiji rutinski primenjuje u identifikaciji i klasifikaciji neoplazmi, detekciji metastaza i mutacija, a za pojedine neoplazme ima prognostički i terapijski značaj.

3.3.1 Imunohistohemijska metoda

Mikroarejski parafinski blokovi su sečeni na debljinu do 4 μ m, stavljeni na staklene pločice, zatim deparafinisani u ksilolu, četiri puta po 3 minuta. Rehidratacija u seriji alkohola (100%, 95%, 75%) trajala je po 3 minuta. Pločice su odlagane najpre u destilovanu vodu na 30 minuta, a zatim su potopljene u rastvor citratnog pufera i zagrevane u mikrotalasnoj rerni 30 minuta, uz dodavanje vode zbog isparavanja. Nakon hlađenja pločica i ispiranja u fosfatnom puferu-PBS, pločice su nakapavane 3% rastvorom vodonik peroksida u metanolu, čime je blokirano delovanje endogene peroksidaze. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu-PBS, aplikovano je 100 μ l primarnog antitela pločice su odlagane u vlažnu komoru u trajanju od 60 minuta.

Korišćena su sledeća primarna antitela:

- HIF1 α , clone ID:EP1215Y, Epitomics, zečje monoklonalno antitelo, razblaženje 1:250;

- VEGF (A-20), clone ID:sc-152, Santa Cruz Biotechnology, zečje poliklonalno antitelo, razblaženje 1:500;
- VEGFR1 (N-term), clone ID:Y103, Epitomics, zečje monoklonalno antitelo, razblaženje 1:250;
- CD34, clone ID:ab110643, Abcam, zečje monoklonalno antitelo, spremno za upotrebu;
- NOTCH3, clone ID:ab23426, Abcam, zečje poliklonalno antitelo, razblaženje 1:250;
- JAGGED1, clone ID:ab7771, Abcam, zečje poliklonalno antitelo, razblaženje 1:100.

Nakon inkubacije primarnog antitela, pločice su ispirane u fosfatnom puferu-PBS, dva puta po 5 minuta. Aplikovano je sekundarno antitelo (*EnVision*) i pločice su odlagane u vlažnu komoru na 30 minuta i ispirane u fosfatnom puferu-PBS, dva puta po 5 minuta. Aplikovano je tercijarno antitelo (*EnVision*) i pločice su odlagane u vlažnu komoru na 30 minuta. Pranje u PBS, dva puta po 5 minuta. Vizualizacija reakcije pod svetlosnim mikroskopom nakapavanjem diaminobenzamina (DAB) do pojave braon bojenja. Nakon detaljnog ispiranja pločice su stavljanje u hematoksilin, vodu, seriju rastućih alkohola (75%, 95%, 100%) i ksilol.

NOTCH3 bojenje je sprovedeno u polu-automatskom IHC dijagnostičkom sistemu (Ventana Inc.), a korišćeno je zečje, poliklonalno NOTCH3 antitelo (ab23426, Abcam, Cambridge, UK) u koncentraciji 5 µg/ml.

3.3.2 Imunohistohemijska analiza

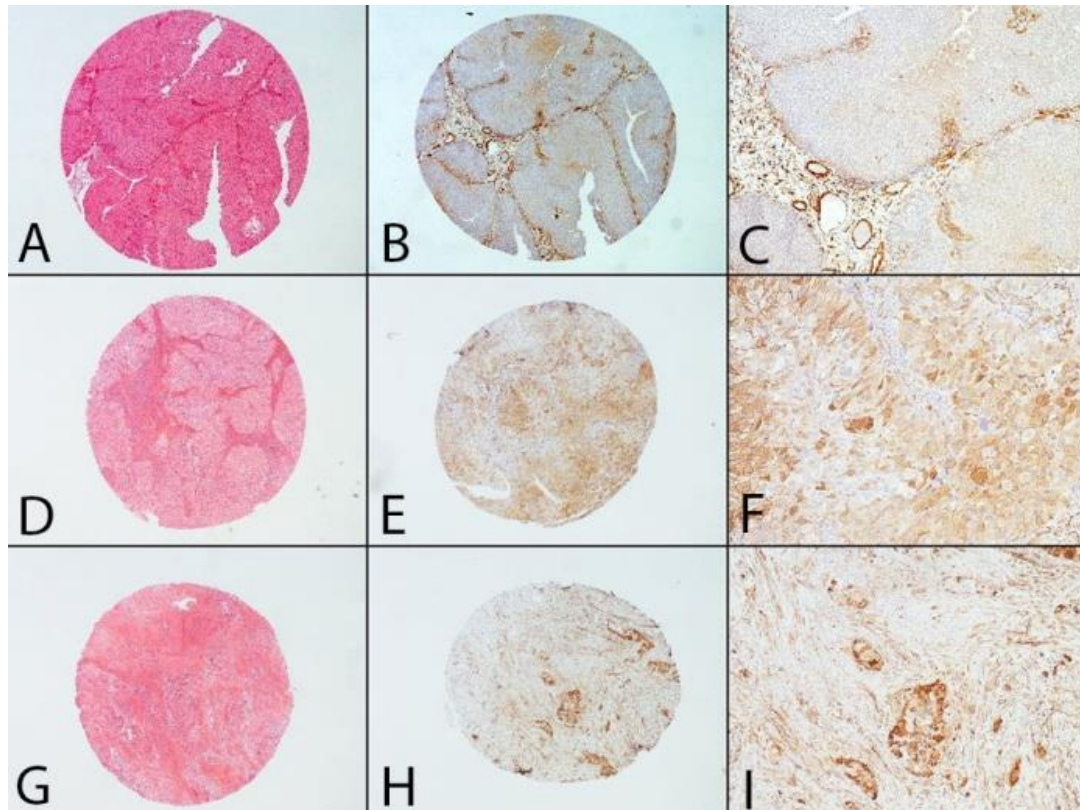
Nakon primenjene IHC procedure i montiranja pločica, pod svetlosnim mikroskopom (*Olympus, Japan*) je analizirana ekspresija HIF1 α , VEGF, VEGFR1, NOTCH3 i JAGGED1. U programu *ImageJ* su analizirane digitalne fotografije i određena je gustina malih krvnih sudova (MVD), koja predstavlja srednju vrednost izbrojanih malih krvnih sudova i CD34 pozitivnih endotelnih ćelija, u pet najvaskularizovanijih polja u tumoru (155-159).

Nuklearna ekspresija je procenjivana za HIF1 α i JAGGED1, citoplazmatska za VEGF, VEGFR1 i JAGGED1 i membranska za NOTCH3 i CD34.

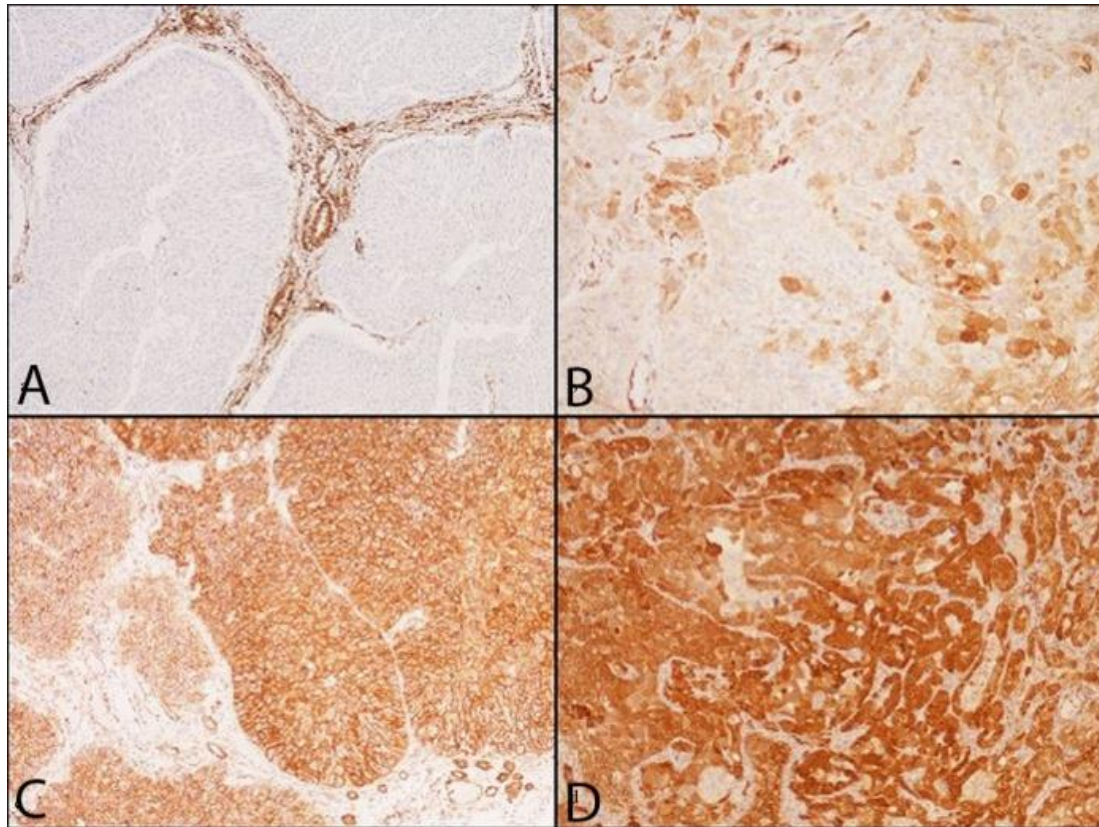
Ekspresija markera, koji se eksprimiraju u citoplazmi i/ili na membrani je procenjivana prema:

- Intenzitetu bojenja (0-bez ekspresije/bojenja, 1-slaba ekspresija, 2-umerena ekspresija, 3-jaka ekspresija);
- Procentu obojenih tumorskih ćelija (0 – nema pozitivnih ćelija, 1 – do 20% pozitivnih ćelija, 2 – više od 20% a manje od 50% of pozitivnih ćelija, 3 – više od 50% a manje od 80% pozitivnih ćelija, 4 – više od 80% pozitivnih ćelija.

- Zbir intenziteta bojenja i procenta obojenih tumorskih ćelija predstavljao je IHC skor:
 - 0-2 = nema ekspresije (0); 3-4 = bojenje slabog intenziteta - slaba ekspresija (1); 5 = umerena ekspresija (2); 6-7 = bojenje jakog intenziteta – jaka ekspresija (3).
 - Uzorci sa IHC skorom 0 i 1 smatrani su za negativne slučajeve (odsutna/niska ekspresija analiziranog markera), dok su uzorci sa IHC skorom 2 i 3 smatrani za pozitivne (visoka ekspresija analiziranog markera).

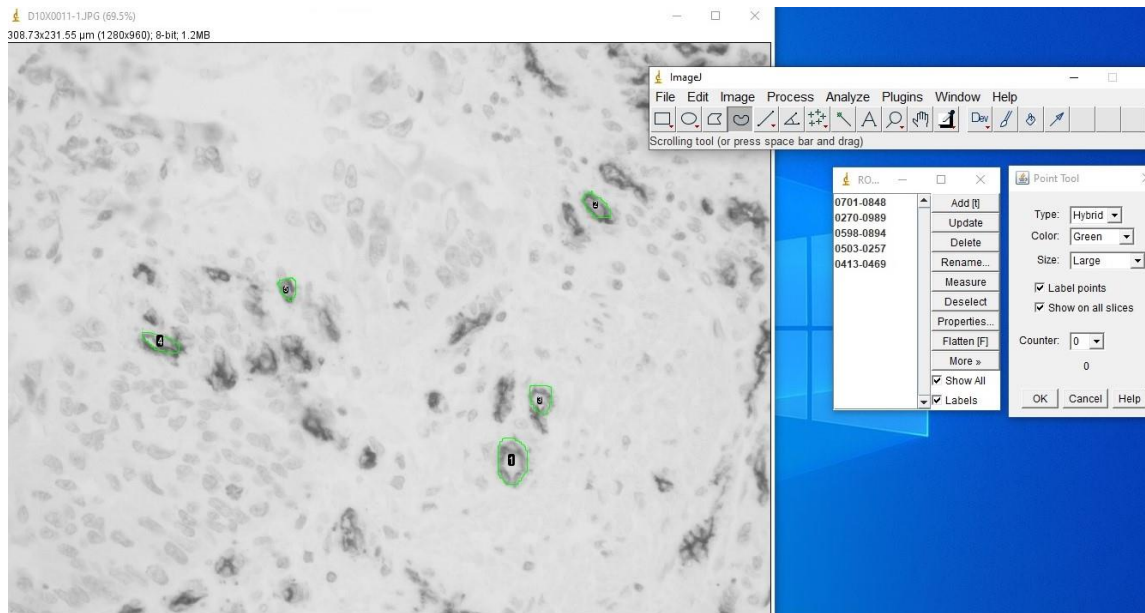


Slika 21. Procena IHC ekspresije NOTCH3 u UKMB pTa (A: HE, uvećanje x40, B: IHC, CD34, uvećanje x40, C: IHC, CD34, uvećanje x100), pT1 (D: HE, uvećanje x40, E: IHC, CD34, uvećanje x40, F: IHC, CD34, uvećanje x200) i pT2 (G: HE, uvećanje x40, H: IHC, CD34, uvećanje x40, I: IHC, CD34, uvećanje x200)



Slika 22. Mikrofotografija heterogene IHC ekspresije NOTCH3 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike (IHC, A: tumorske ćelije ne eksprimiraju NOTCH3, pozitivna unutrašnja kontrola - jaka NOTCH3 ekspresija na membrani endotelnih ćelija, uvećanje x100, B: heterogena NOTCH3 ekspresija u tumoru, uvećanje x200, C: umerena, difuzna NOTCH3 ekspresija u tumoru, uvećanje x100, D: jaka, difuzna ekspresija NOTCH3, uvećanje x200)

U ImageJ programu analizirane su digitalne mikrofotografije uzoraka UKMB bojjenih na CD34. Određena je gustina malih krvnih sudova (MVD), koja predstavlja srednju vrednost izbrojanih malih krvnih sudova i CD34 pozitivnih endotelnih ćelija, u pet najvaskularizovanih polja u tumoru (engl. *hot spots*).

Slika 23. Određivanje MVD u *ImageJ* programu

3.4 Statistička analiza

Na osnovu literaturnih podataka izvršen je proračun veličine reprezentativnog uzorka (160). Korišćenjem odgovarajućeg statističkog programa (MedCalc Statistical Software, v. 19.0.3, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija) izračunat je ukupan studijski uzorak za analizu preživljavanja pacijenata, uz prihvaćene vrednosti verovatnoće greške prvog tipa $\alpha=0,05$ i snage studije od 0,8, koji iznosi minimalno 117, sa predviđenim odnosom grupa 2:1. Statistička obrada je izvršena u softverskom paketu SPSS (Statistical Package for Social Sciences, v. 16.0; Čikago, SAD), na nivou statističke značajnosti $p<0,05$. Povezanost ekspresije markera sa kliničko-patološkim parametrima je analizirana χ^2 -testom i Fišerovim testom egzaktno verovatnoće, za kategorijske promenljive, odnosno Studentovim t-testom ili Man-Vitnijiem U-testom, u zavisnosti od normalnosti raspodele, za linearne promenljive. Prediktivna vrednost kliničko-patoloških karakteristika za ekspresiju markera je analizirana univarijantnom i multivarijantnom binarnom logističkom regresionom analizom. Univarijantnom i multivarijantnom Cox-regresionom analizom su određeni prediktori ukupne dužine preživljavanja i dužine preživljavanja bez recidiva bolesti.

Statistička analiza je izvršena u Statističkom paketu za socijalne nauke (*Statistical Package for Social Sciences (SPSS)*, verzija 21.0, Čikago, SAD). Normalnost raspodele ispitivanih promenljivih je određivana na osnovu više osobina raspodele (asimetrija, spljoštenost, prisustvo ekstremnih vrednosti, Šapiro-Vilkov test). Kontinuirane promenljive su

predstavljene srednjom vrednošću sa standardnom devijacijom ili medijanom sa interkvartilnim opsegom, u zavisnosti od normalnosti raspodele. Kategorijske promenljive su predstavljene apsolutnom i relativnom vrednošću. Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Razlike u kontinuiranim promenljivim između ispitivanih grupa su testirane korišćenjem parametrijskih (Studentov t-test, ANOVA) i neparametrijskih testova (Mann-Vitnijev U-test, Kruskal-Valisov test). Povezanost između kontinuiranih promenljivih je određivana na osnovu Spirmanovog koeficijenta korelacije. Veza između kategorijskih promenljivih je testirana pomoću χ^2 -testa nezavisnosti sa korekcijom neprekidnosti po Jejtisu ili na osnovu Fišerovog tačnog pokazatelja verovatnoće.

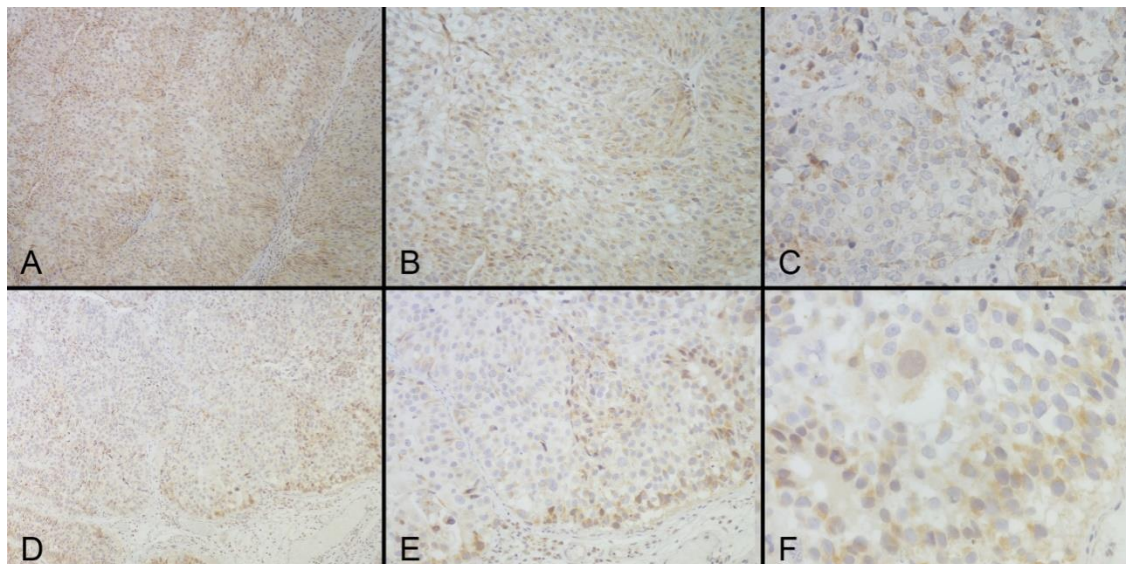
Metode regresione analize (binarne logističke, standardne linearne i Cox), univarijantne i multivarijantne, su korišćene sa ciljem određivanja nezavisnih prediktora zavisnih promenljivih. Za grafički prikaz rezultata Cox-regresione analize konstruisane su Kaplan-Majerove krive.

Statistička značajnost je određivana na nivou $p < 0,05$.

4 Rezultati

4.1 VEGF i VEGFR1

Pozitivna ekspresija VEGF je bila prisutna u 418 (68,2%) uzoraka (Slika 21). Pozitivna ekspresija je češća kod nepušača ($p < 0,05$) i kod pacijenata sa endemskog područja za BEN ($p < 0,01$) (Tabela 3).



Slika 24. Mikrofotografija heterogene, citoplazmatske IHC ekspresije VEGF u urotelnom karcinomu mokraćne bešike. A: jaka, difuzna VEGF ekspresija, uvećanje x100, B: uvećanje x200, C: umerena, VEGF ekspresija u pojedinačnim tumorskim ćelijama, uvećanje x200, D: heterogena VEGF ekspresija, uvećanje x100, E: uvećanje x200, F: uvećanje x400

Univarijantna binarna logistička regresiona analiza je izdvojila dva prediktora pozitivne ekspresije VEGF: pacijente koji nisu pušači i one sa endemskog područja za BEN. U multivarijantnom modelu koji predviđa ekspresiju VEGF sa udelom od 2,4-3,4% ($\chi^2=7,785$, $p < 0,05$), jedini nezavisni prediktor pozitivne ekspresije je odsustvo pušenja kao etiološkog

faktora ($p < 0,05$) – nepušači imaju 1,7 puta veću verovatnoću VEGF negativnih tumora (Tabela 4).

Tabela 3. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike u odnosu na prisustvo pozitivne ekspresije VEGF

	Negativna	Pozitivna	t* ili χ^2 ** ili Z*** (p)
Starost (godine)	66,47±9,84	66,63±9,80	0,191 (0,849)*
Pol (muški)	159 (81,5%)	312 (74,6%)	3,177 (0,065)**
Gradus (HG)	79 (40,5%)	184 (44,0%)	0,532 (0,431)**
Stadijum (invazivni)	47 (24,1%)	91 (21,8%)	0,292 (0,534)**
pT stadijum	60 (30,8%)	131 (31,3%)	0,452 (0,651)***
	pT1	196 (46,9%)	
	pT2	69 (16,5%)	
	pT3	14 (3,3%)	
	pT4	8 (1,9%)	
Divergentna diferencijacija (da)	29 (14,9%)	43 (10,3%)	2,272 (0,107)**
Glandularna diferencijacija (da)	4 (2,1%)	8 (1,9%)	0,000 (1,000)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	3 (1,5%)	6 (1,4%)	0,000 (1,000)**
Skvamozna diferencijacija (da)	23 (11,8%)	30 (7,2%)	3,029 (0,065)**
Carcinoma in situ (da)	8 (4,1%)	29 (6,9%)	1,418 (0,204)**
Pušenje (da)	79 (74,5%)	134 (62,9%)	3,798 (0,044)**
Izloženost karcinogenima (da)	14 (7,2%)	32 (7,7%)	0,002 (1,000)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	167 (85,6%)	350 (83,7%)	0,237 (0,633)**
Dizurija kao prvi simptom (da)	21 (10,8%)	53 (12,7%)	0,295 (0,595)**
Pozitivna porodična anamneza (da)	16 (8,2%)	53 (12,7%)	2,236 (0,131)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	7 (3,6%)	11 (2,6%)	0,158 (0,608)**
Endemsko područje za BEN (da)	13 (6,7%)	61 (14,6%)	7,142 (0,005)**
Terapija	TUR	83 (19,9%)	2,181 (0,949)**
	TUR+BCG	200 (47,8%)	
	Parcijalna cistektomija	6 (1,4%)	
	Radikalna cistektomija	44 (10,5%)	
	Hemioterapija	12 (2,9%)	
	Radioterapija	45 (10,8%)	
	Hemioterapija + radioterapija	18 (4,3%)	
	Radikalna cistektomija + hemioterapija/radioterapija	10 (2,4%)	

* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnijev U-test

Tabela 4. Binarna logistička regresiona analiza prediktora pozitivne ekspresije VEGF

	Univarijantna		Multivarijantna	
	OR (95% CI za OR)	p	OR (95% CI za OR)	p
Pušenje (da)	0,580 (0,345-0,973)	0,039	0,582 (0,346-0,979)	0,042
Endemsko područje za BEN (da)	2,392 (1,281-4,468)	0,006	2,072 (0,913-4,701)	0,081

Pozitivna ekspresija VEGFR1 je bila prisutna u 417 (68,0%) uzoraka (Slika 22). Pozitivna ekspresija je češća kod mlađih pacijenata ($p < 0,05$), kod LG UKMB ($p < 0,001$), nižeg pT stadijuma ($p < 0,001$), UKMB bez divergentne diferencijacije ($p < 0,01$), naročito bez skvamozne diferencijacije ($p < 0,01$). Takođe, UKMB sa pozitivnom ekspresijom su češće lečeni sa TUR ili TUR+BCG, a ređe parcijalnom cistektomijom, radikalnom cistektomijom ili radioterapijom ($p < 0,01$) (Tabela 5).

Tabela 5. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike u odnosu na prisustvo pozitivne ekspresije VEGFR1

	Negativna ekspresija	Pozitivna ekspresija	t* ili χ^2 ** ili Z*** (p)
Starost (godine)	67,98±9,46	65,9±9,90	2,438 (0,015)*
Pol (muški)	153 (78,1%)	318 (76,3%)	0,153 (0,682)**
Gradus (HG)	104 (53,1%)	159 (38,1%)	11,533 (0,001)**
Stadijum (invazivni)	64 (32,7%)	74 (17,7%)	16,142 (0,000)**
pT stadijum			4,355 (0,000)***
pTa	45 (23,0%)	146 (35,0%)	
pT1	87 (44,4%)	197 (47,2%)	
pT2	44 (22,4%)	60 (14,4%)	
pT3	14 (7,1%)	8 (1,9%)	
pT4	6 (3,1%)	6 (1,4%)	
Divergentna diferencijacija (da)	33 (16,8%)	39 (9,4%)	6,501 (0,010)**
Glandularna diferencijacija (da)	4 (2,0%)	8 (1,9%)	0,000 (1,000)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	4 (2,0%)	5 (1,2%)	0,201 (0,477)**
Skvamozna diferencijacija (da)	26 (13,3%)	27 (6,5%)	6,948 (0,008)**
Carcinoma in situ (da)	17 (8,7%)	20 (4,8%)	2,884 (0,069)**
Pušenje (da)	80 (71,4%)	133 (64,3%)	1,379 (0,214)**
Izloženost karcinogenima (da)	12 (6,1%)	34 (8,2%)	0,527 (0,415)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	160 (81,6%)	357 (85,6%)	1,311 (0,233)**
Dizurija kao prvi simptom (da)	29 (14,8%)	45 (10,8%)	1,655 (0,183)**
Pozitivna porodična anamneza (da)	23 (11,7%)	46 (11,0%)	0,014 (0,786)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	8 (4,1%)	10 (2,4%)	0,801 (0,305)**
Endemsko područje za BEN (da)	20 (10,2%)	54 (12,9%)	0,706 (0,355)**
Terapija			18,999 (0,008)**
TUR	28 (14,3%)	88 (21,1%)	
TUR+BCG	82 (41,8%)	211 (50,6%)	
Parcijalna cistektomija	6 (3,1%)	4 (1,0%)	
Radikalna cistektomija	30 (15,3%)	38 (9,1%)	
Hemioterapija	6 (3,1%)	14 (3,4%)	
Radioterapija	30 (15,3%)	37 (8,9%)	
Hemioterapija + radioterapija	9 (4,6%)	16 (3,8%)	
Radikalna cistektomija + hemioterapija/radioterapija	5 (2,6%)	9 (2,2%)	

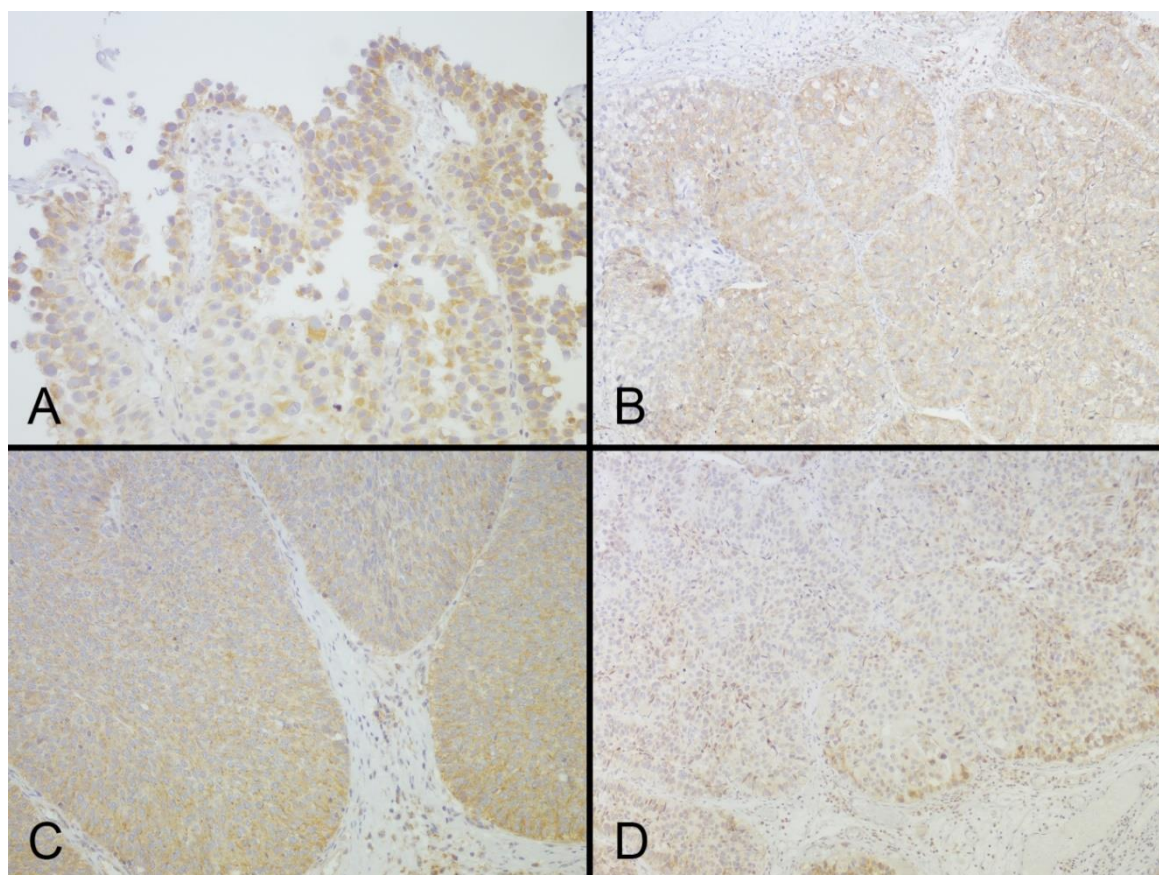
* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnijev U-test

Univarijantna binarna logistička regresiona analiza je izdvojila 6 prediktora pozitivne ekspresije VEGFR1: mlađe pacijente, niži pT stadijum, LG UKMB, UKMB bez divergentne ili skvamozne diferencijacije. U multivarijantnom modelu koji predviđa ekspresiju VEGFR1

sa udelom od 4,4-6,2% ($\chi^2=27,825$, $p<0,001$), jedini nezavisni prediktor pozitivne ekspresije je niži pT stadijum ($p<0,01$) – sa svakim višim pT stadijumom verovatnoća pozitivnosti se smanjuje 1,4 puta (Tabela 6).

Tabela 6. Binarna logistička regresiona analiza prediktora pozitivne ekspresije VEGFR1

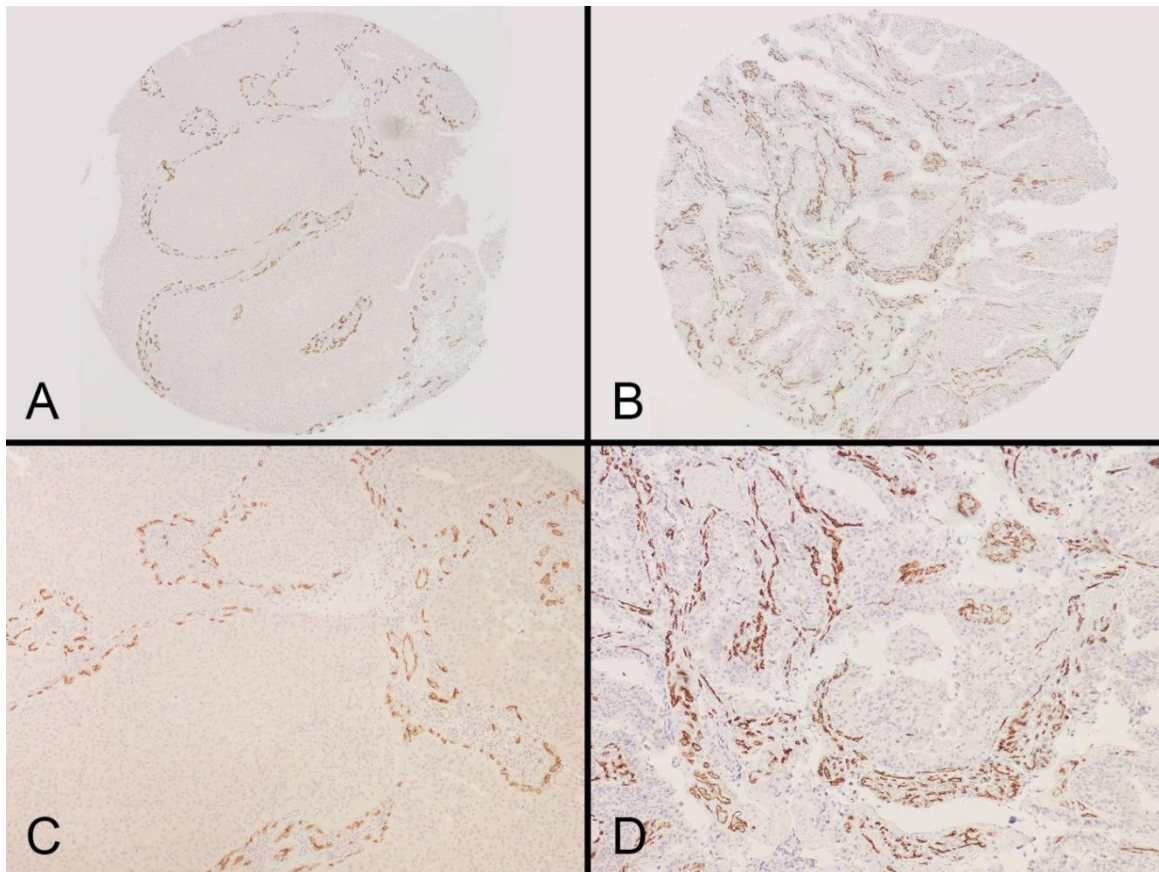
	Univarijantna		Multivarijantna	
	OR (95% CI za OR)	p	OR (95% CI za OR)	p
Starost (godine)	0,978 (0,961-0,996)	0,016	0,984 (0,966-1,002)	0,085
Gradus (HG)	0,545 (0,387-0,768)	0,001	0,881 (0,572-1,358)	0,566
Stadijum (invazivni)	0,445 (0,301-0,657)	0,000		
pT stadijum (pTa-pT4)	0,648 (0,536-0,784)	0,000	0,708 (0,560-0,896)	0,004
Divergentna diferencijacija (da)	0,510 (0,310-0,839)	0,008		
Skvamozna diferencijacija (da)	0,453 (0,257-0,799)	0,006	0,590 (0,328-1,062)	0,079



Slika 25. Mikrofotografija heterogene IHC ekspresije VEGFR1 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike (IHC, A: uvećanje x100, B: uvećanje x200, C: umerena, difuzna VEGFR1 ekspresija, uvećanje x100, D: jaka VEGFR1 ekspresija na invazivnom frontu tumora, uvećanje x200)

4.2 Gustina malih krvnih sudova

Prosečna gustina malih krvnih sudova na površini od 2mm^2 je iznosila 122 (95-180) (Slika 23). Veća gustina malih krvnih sudova je uočena kod žena ($p<0,05$), invazivnih tumora ($p<0,05$), UKMB sa divergentnom diferencijacijom ($p<0,05$), pre svega glandularnom diferencijacijom ($p<0,05$) i prisutnim *carcinoma in situ* ($p<0,01$) (Tabela 7).



Slika 26. Mikrofotografija CD34 pozitivnih endotelnih ćelija u urotelnom karcinomu mokraćne bešike (IHC, A: uvećanje x40, B: uvećanje x40, C: *hot spot*, uvećanje x200, D: *hot spot*, uvećanje x200)

Veća MVD je bila povezana sa pozitivnom ekspresijom JAG1 na membrani/citoplazmi ($p<0,01$), a negativnom jedarnom ekspresijom JAG1 ($p<0,01$) (Tabela 8).

Tabela 7. Gustina malih krvnih sudova na 2mm² u odnosu na osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike

		MVD na 2mm ²	ρ^* ili Z^{**} ili χ^{2***} (p)
Starost (godine)			0,123 (0,105)*
Pol	muški	120,0 (91,0-170,0)	2,437 (0,015)**
	ženski	155,0 (112,5-241,0)	
Gradus	LG	114,5 (91,0-160,0)	1,842 (0,065)**
	HG	135,0 (96,75-192,5)	
Stadijum	superficialni	117,0 (91,0-160,0)	2,366 (0,018)**
	mišićno-invazivni	145,0 (106,5-206,5)	
pT stadijum	pTa	115,0 (91,0-160,0)	0,141 (0,063)*
	pT1	117,5 (90,2-161,5)	
	pT2	145,0 (11,0-209,0)	
	pT3	131,0 (94,0-183,0)	
	pT4	257,5 (210,0-257,5)	
Divergentna diferencijacija	ne	120,0 (91,8-165,5)	2,033 (0,042)**
	da	162,5 (104,8-214,2)	
Glandularna diferencijacija	ne	120,0 (94,0-172,0)	2,262 (0,024)**
	da	200,0 (162,5-256,5)	
Mikrocistična diferencijacija	ne	122,0 (94,8-180,0)	0,796 (0,426)**
	da	213,5 (107,0-213,5)	
Skvamozna diferencijacija	ne	121,0 (94,5-171,5)	0,853 (0,393)**
	da	130,0 (97,0-210,0)	
Carcinoma in situ	ne	118,0 (91,0-176,0)	2,808 (0,005)**
	da	148,0 (123,0-305,0)	
Pušenje	ne	121,0 (104,0-167,0)	0,326 (0,744)**
	da	122,0 (96,5-180,5)	
Izloženost karcinogenima	ne	122,5 (94,8-180,2)	0,875 (0,382)**
	da	114,5 (94,2-141,0)	
Bezbolna hematurija kao prvi simptom	ne	116,5 (85,0-201,0)	0,428 (0,669)**
	da	122,0 (97,0-172,5)	
Dizurija kao prvi simptom	ne	122,0 (97,0-180,0)	0,451 (0,652)**
	da	116,5 (85,0-205,5)	
Pozitivna porodična anamneza	ne	122,0 (95,0-180,0)	0,269 (0,788)**
	da	105,0 (92,5-184,0)	
UKMB u porodičnoj anamnezi	ne	122,0 (95,8-180,0)	1,522 (0,128)**
	da	83,0 (72,0-83,0)	
Endemsko područje za BEN	ne	122,0 (95,0-180,0)	0,248 (0,804)**
	da	115,0 (89,0-170,0)	
Terapija	TUR	120,0 (85,0-177,5)	7,669 (0,363)***
	TUR+BCG	115,0 (91,0-162,0)	
	Parcijalna cistektomija	141,5 (102,0-141,5)	
	Radikalna cistektomija	127,0 (102,2-170,8)	
	Hemioterapija	95,0 (66,0-147,0)	
	Radioterapija	155,0 (101,0-222,0)	
	Hemioterapija + radioterapija	145,0 (103,0 (244,5)	
	Radikalna cistektomija +hemio/radioterapija	139,0 (99,2-172,0)	

* Spirmanov test korelacije; ** Man-Vitnjev U-test; *** Kruskal-Valisov test

Tabela 8. Gustina malih krvnih sudova na 2mm² u odnosu na ekspresiju analiziranih IHC markera

	Negativan	Pozitivan	Z (p)*
JAG1 C/M	112,5 (89,8-145,5)	137,0 (99,2-200,2)	2,686 (0,007)
JAG1 N	146,0 (100,5-208,5)	114,0 (89,0-157,0)	2,729 (0,006)
JAG1 C/M i N	120,0 (91,8-174,0)	127,0 (95,5-183,5)	0,395 (0,693)
JAG1 C/M ili N	137,5 (99,8-176,0)	120,0 (92,5-180,0)	0,659 (0,510)
NOTCH3	118,0 (100,5-194,5)	127,0 (92,0-180,0)	0,157 (0,875)
HIF1α	120,0 (92,0-164,0)	128,0 (101,5-190,0)	1,080 (0,280)
VEGF	112,0 (75,0-155,0)	129,0 (100,0-180,0)	1,927 (0,054)
VEGR1	138,5 (101,0-189,2)	117,5 (90,2-163,5)	1,761 (0,078)

* Man-Vitnijev U-test

Univarijantnom standardnom linearnom regresionom analizom su izdvojeni prediktori veće gustine malih krvnih sudova: ženski pol, visok gradus tumora, prisustvo divergentne diferencijacije i *carcinoma in situ*, kao i ekspresija JAG1 na membrani/ citoplazmi i u jedru. Kao nezavisni prediktori u multivarijantnom modelu (F=5,033, p<0,001) koji predviđa 12,5% varijanse u gustini, dobijeni su ženski pol (p<0,05) i *carcinoma in situ* (p<0,05) (Tabela 9).

Tabela 9. Linearna regresiona analiza prediktora gustine malih krvnih sudova

	Univarijantna		Multivarijantna	
	B (95% CI za B)	p	B (95% CI za B)	p
Pol (ženski)	40,146 (6,023-74,269)	0,021	42,701 (9,043-76,359)	0,013
Gradus (HG)	29,688 (4,362-55,015)	0,022	19,322 (-7,978-46,622)	0,164
Divergentna diferencijacija (da)	38,584 (2,822-74,345)	0,035	27,780 (-8,209-63,769)	0,129
<i>Carcinoma in situ</i> (da)	61,911 (21,541-102,282)	0,003	46,957 (5,507-88,408)	0,027
JAG1 C/M (pozitivna ekspresija)	32,966 (7,300-58,631)	0,012	19,909 (-5,983-45,801)	0,131
JAG1 N (pozitivna ekspresija)	-33,525 (-59,933—7,117)	0,013	-21,892 (-48,243-4,458)	0,103

4.3 HIF1 α

Pozitivna ekspresija HIF1 α je bila prisutna u 202 (33,0%) uzoraka. Pozitivna ekspresija je bila povezana sa ženskim polom (p<0,01), LG UKMB (p<0,001), superficijalnim UKMB (p<0,001), odnosno nižim pT stadijumom (p<0,01), češće bezbolnom hematurijom (p<0,05), a ređe dizurijom kao prvim simptomom (p<0,05) i odsustvom izloženosti karcinogenima kao etiološkim faktorom (p<0,05). Takođe, ređe je kod ovih pacijanta bila rađena radikalna cistektomija sa/bez radioterapije/hemioterapije (p<0,01) (Tabela 10).

Tabela 10. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bežike u odnosu na prisustvo pozitivne ekspresije HIF1 α

	Negativna ekspresija	Pozitivna ekspresija	t* ili χ^2 ** ili Z*** (p)
Starost (godine)	67,04 \pm 9,64	65,65 \pm 10,08	1,647 (0,100)*
Pol (muški)	332 (80,8%)	139 (68,8%)	10,235 (0,002)**
Stadijum (invazivni)	108 (26,3%)	30 (14,9%)	9,491 (0,001)**
pT stadijum			3,117 (0,002)***
pTa	118 (28,7%)	73 (36,1%)	
pT1	185 (45,0%)	99 (49,0%)	
pT2	77 (18,7%)	27 (13,4%)	
pT3	19 (4,6%)	3 (1,5%)	
pT4	12 (2,9%)	0 (0,0%)	
Divergentna diferencijacija (da)	42 (10,2%)	30 (14,9%)	2,375 (0,109)**
Glandularna diferencijacija (da)	9 (2,2%)	3 (1,5%)	0,079 (0,759)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	3 (0,7%)	6 (3,0%)	3,278 (0,066)**
Skvamozna diferencijacija (da)	31 (7,5%)	22 (10,9%)	1,522 (0,171)**
Carcinoma in situ (da)	30 (7,3%)	7 (3,5%)	2,867 (0,071)**
Pušenje (da)	140 (66,4%)	73 (67,6%)	0,009 (0,900)**
Izloženost karcinogenima (da)	25 (6,1%)	21 (10,4%)	3,035 (0,072)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	337 (82,0%)	180 (89,1%)	4,664 (0,025)**
Dizurija kao prvi simptom (da)	59 (14,4%)	15 (7,4%)	5,491 (0,012)**
Pozitivna porodična anamneza	43 (10,5%)	26 (12,9%)	0,564 (0,415)**
UKMB u porodičnoj anamnezi	11 (2,7%)	7 (3,5%)	0,084 (0,615)**
Endemsko područje za BEN (da)	47 (11,4%)	27 (13,4%)	0,311 (0,511)**
Terapija			22,428 (0,002)**
TUR	75 (18,2%)	41 (20,3%)	
TUR+BCG	180 (43,8%)	113 (55,9%)	
Parcijalna cistektomija	8 (1,9%)	2 (1,0%)	
Radikalna cistektomija	59 (14,4%)	9 (4,5%)	
Hemioterapija	13 (3,2%)	7 (3,5%)	
Radioterapija	44 (10,7%)	23 (11,4%)	
Hemioterapija + radioterapija	19 (4,6%)	6 (3,0%)	
Radikalna cistektomija + hemioterapija/radioterapija	13 (3,2%)	1 (0,5%)	

* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnijev U-test

Univarijantom binarnom logističkom regresionom analizom je izdvojeno sedam nezavisnih promenljivih: ženski pol, LG UKMB, niži pT stadijum, mikrocistična diferencijacija i bezbolna hematurija kao prvi simptom bolesti, a ne dizurične tegobe. U multivarijantnom modelu ($\chi^2=35,854$, $p<0,001$), koji predviđa 5,7-7,9% varijanse u ekspresije, izdvojena su dva nezavisna prediktora. Ženski pol je povezan sa 1,9 puta većom verovatnoćom pozitivne ekspresije ovog markera ($p<0,05$). Uzorci u kojim je bila prisutna mikrocistična diferencijacija su imali 4,2 puta veću verovatnoću da će biti HIF1 α pozitivni ($p<0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11. Binarna logistička regresiona analiza prediktora pozitivne ekspresije HIF1 α

	Univarijantna		Multivarijantna	
	OR (95% CI za OR)	p	OR (95% CI za OR)	p
Pol (ženski)	1,905 (1,295-2,801)	0,001	1,869 (1,257-2,779)	0,002
Gradus (HG)	0,494 (0,347-0,704)	0,000	0,656 (0,40-1,025)	0,064
Stadijum (invazivni)	0,489 (0,313-0,764)	0,002		
pT stadijum (pTa-pT4)	0,685 (0,557-0,843)	0,000	0,832 (0,642-1,080)	0,167
Mikrocistična diferencijacija (da)	4,163 (1,030-16,821)	0,045	4,229 (1,033-17,317)	0,045
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	1,797 (1,080-2,989)	0,024	1,291 (0,508-3,278)	0,591
Dizurija kao prvi simptom (da)	0,479 (0,264-0,867)	0,015	0,682 (0,228-2,038)	0,493

4.4 NOTCH3

Pozitivna ekspresija NOTCH3 je uočena u 368 (61,6%) uzoraka (Slike 24, 25). Pozitivna ekspresija je bila povezana sa većom starošću bolesnika ($p < 0,001$), HG UKMB ($p < 0,001$), većim pT stadijumom ($p < 0,01$), i odsustvom izloženosti karcinogenima kao etiološkim faktorom ($p < 0,05$) (Tabela 12).

Identifikovana su četiri potencijalna prediktora pozitivne ekspresije NOTCH3: veća starost, HG, prisustvo CIS i odsustvo ekspozicije karcinogenima u anamnezi. U multivarijantnom modelu ($\chi^2=24,882$, $p < 0,001$) koji predviđa 4,1-5,5% varijanse u ekspresiji, izdvojena su dva nezavisna prediktora. Sa svakih 10 godina starosti, verovatnoća pozitivne ekspresije NOTCH3 u tumoru se povećava 1,2 puta ($p < 0,05$). Pozitivna NOTCH3 ekspresija je 1,7 puta verovatnija u HG UKMB ($p < 0,01$) (Tabela 13).

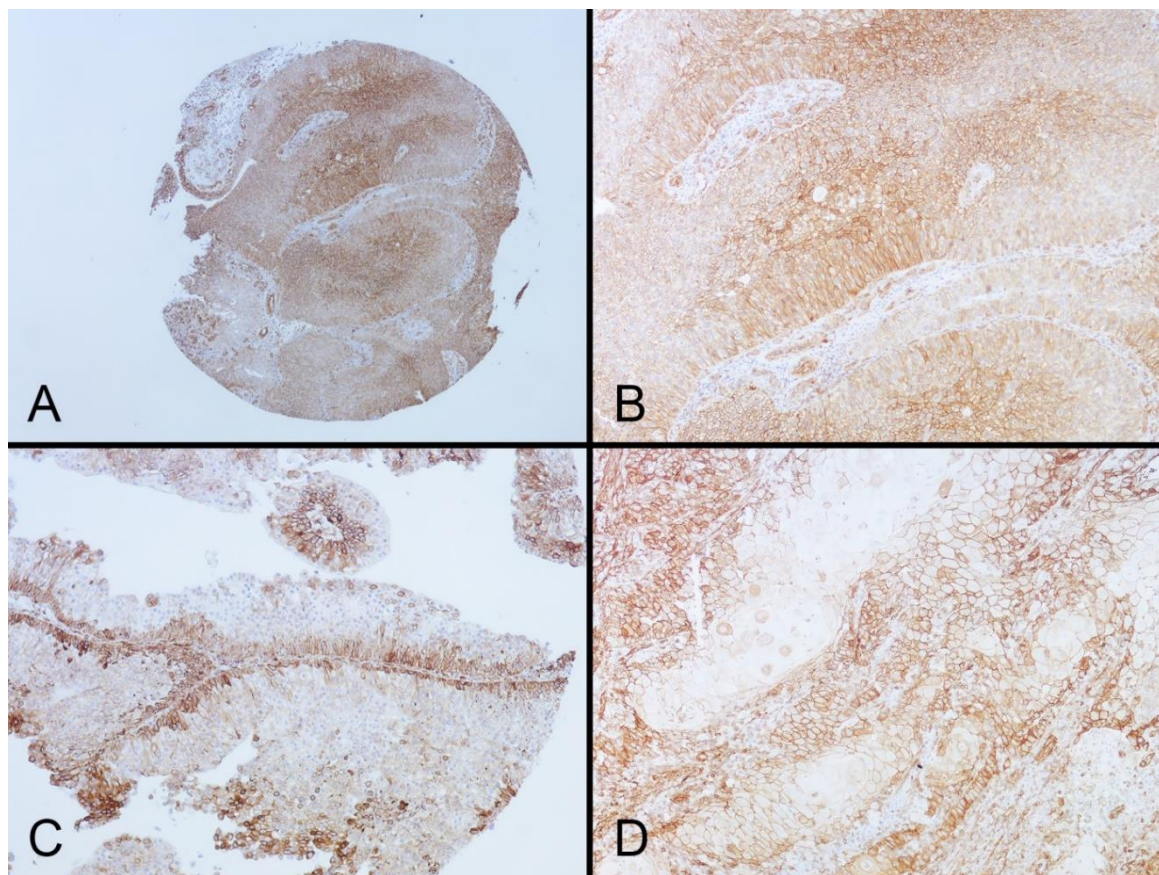
Tabela 12. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike u odnosu na prisustvo pozitivne ekspresije NOTCH3

	Negativna ekspresija	Pozitivna ekspresija	t* ili χ^2 ** ili Z*** (p)
Starost (godine)	64,90±10,04	67,58±9,59	3,256 (0,001)*
Pol (muški)	171 (74,7%)	285 (77,4%)	0,458 (0,488)**
Gradus (HG)	74 (32,3%)	180 (48,9%)	15,238 (0,000)**
Stadijum (invazivni)	48 (21,0%)	86 (23,4%)	0,342 (0,545)**
pT			2,763 (0,006)***
pT _a	93 (40,6%)	94 (25,5%)	
pT ₁	88 (38,4%)	188 (51,1%)	
pT ₂	31 (13,5%)	70 (19,0%)	
pT ₃	11 (4,8%)	11 (3,0%)	
pT ₄	6 (2,6%)	5 (1,4%)	
Divergentna diferencijacija (da)	21 (9,2%)	49 (13,3%)	1,960 (0,150)**
Glandularna diferencijacija (da)	4 (1,7%)	8 (2,2%)	0,004 (1,000)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	3 (1,3%)	6 (1,6%)	0,000 (1,000)**
Skvamozna diferencijacija (da)	14 (6,1%)	38 (10,3%)	2,643 (0,100)**
Carcinoma in situ (da)	8 (3,5%)	28 (7,6%)	3,524 (0,051)**
Pušenje (da)	80 (72,1%)	128 (63,4%)	2,061 (0,134)**
Izloženost karcinogenima (da)	24 (10,5%)	21 (5,7%)	3,956 (0,038)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	195 (85,2%)	310 (84,2%)	0,034 (0,816)**
Dizurija kao prvi simptom (da)	27 (11,8%)	44 (12,0%)	0,000 (1,000)**
Pozitivna porodična anamneza (da)	22 (9,6%)	45 (12,2%)	0,7288 (0,353)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	7 (3,1%)	11 (3,0%)	0,000 (1,000)**
Endemsko područje za BEN (da)	31 (13,5%)	42 (11,4%)	0,412 (0,444)**
Terapija			13,158 (0,068)**
TUR	44 (19,2%)	72 (19,6%)	
TUR+BCG	124 (54,1%)	163 (44,3%)	
Parcijalna cistektomija	4 (1,7%)	5 (1,4%)	
Radikalna cistektomija	21 (9,2%)	46 (12,5%)	
Hemioterapija	6 (2,6%)	14 (3,8%)	
Radioterapija	20 (8,7%)	43 (11,7%)	
Hemioterapija + radioterapija	3 (1,3%)	19 (5,2%)	
Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	7 (3,1%)	6 (1,6%)	

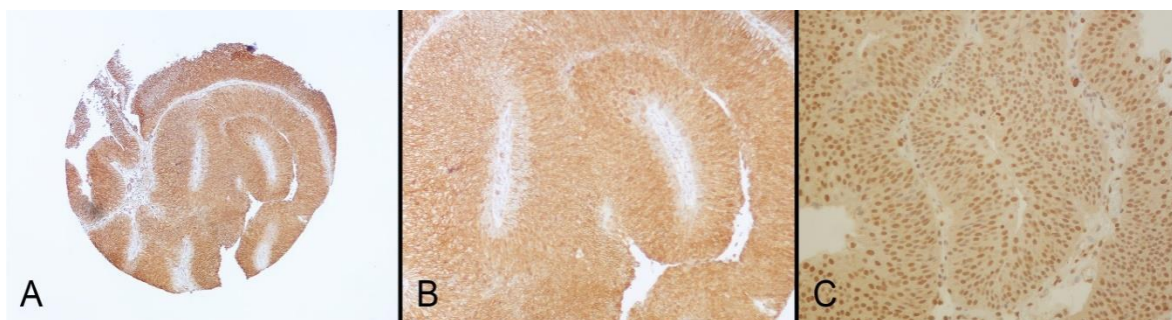
* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnjev U-test

Tabela 13. Binarna logistička regresiona analiza prediktora pozitivne ekspresije NOTCH3

	Univarijantna		Multivarijantna	
	OR (95% CI za OR)	p	OR (95% CI za OR)	p
Starost (godine)	1,028 (1,011-1,046)	0,001	1,020 (1,003-1,039)	0,024
Gradus (HG)	2,005 (1,421-2,829)	0,000	1,733 (1,204-2,495)	0,003
Carcinoma in situ (da)	2,275 (1,018-5,082)	0,045	1,492 (0,645-3,449)	0,350
Ekspozicija karcinogenima (da)	0,517 (0,281-0,92)	0,034	0,692 (0,366-1,307)	0,256



Slika 27. Mikrofotografija heterogene NOTCH3 ekspresije u urotelnom karcinomu mokraćne bešike, IHC. A: uvećanje x40, B: uvećanje x200, C: *low grade* papilarni UKMB, pTa, uvećanje x200, D: niska ekspresija u fokusima skvamozne diferencijacije, *high grade* UKMB, pT1, uvećanje x200)

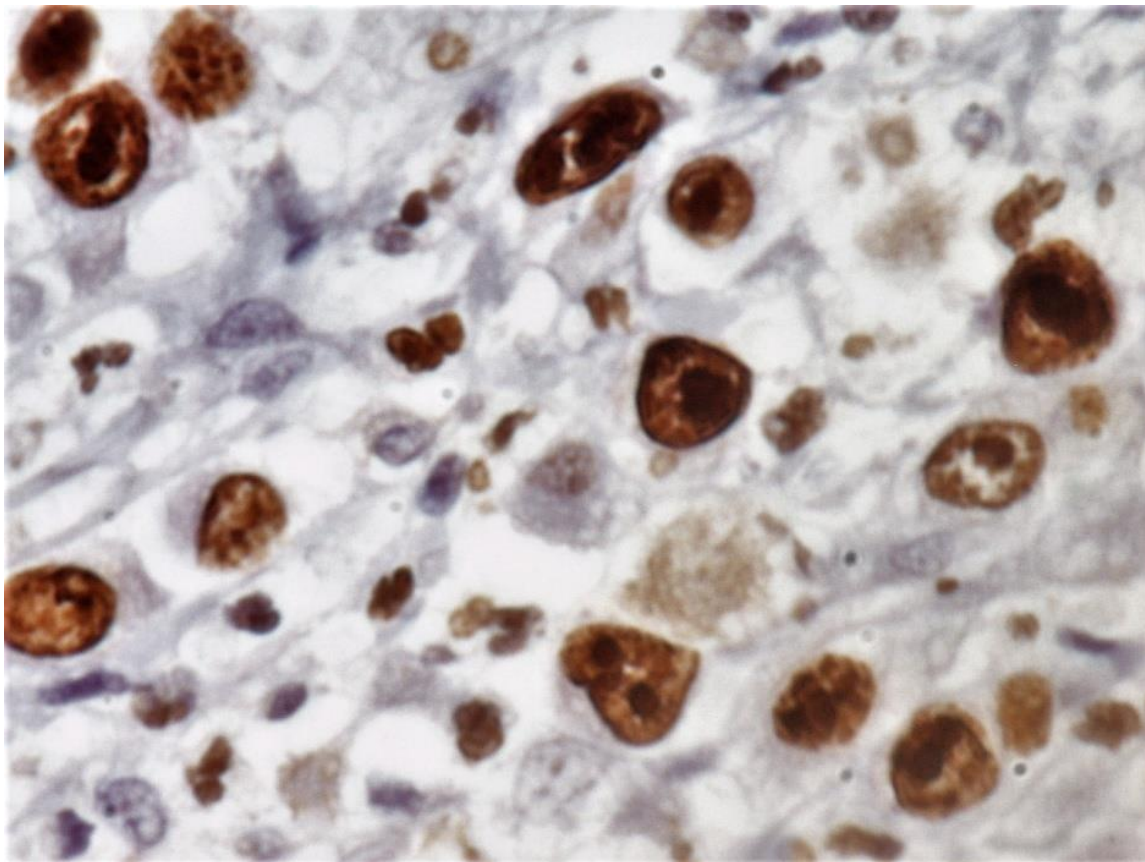


Slika 28. A: Mikrofotografija NOTCH3 pozitivnog urotelnog karcinoma mokraćne bešike (IHC, uvećanje x40); B: IHC, NOTCH3, uvećanje x100; C: Visoka jedarna ekspresija HIF1 α u istom uzorku urotelnog karcinoma mokraćne bešike, uvećanje x100)

4.5 JAG1

Imunohistohemijaska ekspresija JAG1 je određivana kao membransko-citoplazmatska ili kao jedarna ekspresija (Slika 26). Membransko-citoplazmatska ekspresija JAG1 je bila

prisutna u 338 (55,5%) uzoraka, a jedarna u 489 (80,4%) slučajeva. Kod svega 36 pacijenata (5,9%) nije uočena ni membransko-citoplazmatska ni jedarna ekspresija JAG1, dok je 254 (41,8%) uzoraka imalo pozitivnu ekspresiju i na membrani/citoplazmi i u jedru. Pozitivna membransko-citoplazmatska ekspresija JAG1 je bila povezana sa starijom životnom dobi pacijenata ($p<0,05$) i višim pT stadijumom ($p<0,05$). Nasuprot tome, jedarna ekspresija nije bila statistički povezana ni sa jednom karakteristikom pacijenata odnosno tumora. Pozitivna ekspresija JAG1 i u membrani/citoplazmi i jedru je bila češća u invazivnim tumorima ($p<0,05$). Nasuprot tome potpuno odsustvo JAG1 ekspresije (i na membrani/citoplazmi i u jedru) je bilo češće u UKMB sa divergentnom diferencijacijom ($p<0,05$) (Tabele 14-17).



Slika 29. Pozitivna nuklearna ekspresija JAG1 u infiltrativnom, *high grade* urotelnom karcinomu mokraćne bešike, pT3 stadijum (IHC, uvećanje x400)

Metodom univarijantne binarne logističke regresije ($\chi^2=4,614$, $p<0,05$) je utvrđeno da je jedini statistički značajan prediktor pozitivne ekspresije JAG1 na membrani/citoplazmi starost pacijenata sa udelom od 0,8-1,0% gde se sa svakih 10 godina veće starosti pacijenta povećava verovatnoća 1,2 puta (OR=1,018 (1,002-1,035), $p<0,05$). Kod invazivnih tumora je 1,5 puta ($p<0,05$) veća verovatnoća da će biti pozitivna ekspresija JAG1 i na membrani/citoplazmi i u

jedru ($\chi^2=4,918$, $p<0,05$, $R^2=0,8-1,1\%$). Prisustvo divergentne diferencijacije 2,7 puta ($p<0,05$) povećava vjerojatnoću potpuno negativne ekspresije JAG1 u tumorskim ćelijama ($\chi^2=5,290$, $p<0,05$, $R^2=0,9-2,4\%$).

Tabela 14. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike u odnosu na membransko/citoplazmatsku ekspresiju JAG1

	Negativna ekspresija	Pozitivna ekspresija	t* ili χ^{2***} ili Z*** (p)
Starost (godine)	65,60±9,82	67,31±9,71	2,152 (0,032)*
Pol (muški)	210 (77,5%)	259 (76,6%)	0,024 (0,847)**
Gradus (HG)	105 (38,7%)	157 (46,4%)	3,334 (0,059)**
Stadijum (invazivni)	54 (19,9%)	84 (24,9%)	1,811 (0,173)**
pT	95 (35,1%)	95 (28,1%)	2,014 (0,044)***
stadijum	122 (45,0%)	159 (47,0%)	
pT1	41 (15,1%)	63 (18,6%)	
pT2	9 (3,3%)	13 (3,8%)	
pT3	4 (1,5%)	8 (2,4%)	
pT4			
Divergentna diferencijacija (da)	34 (12,5%)	37 (10,9%)	0,234 (0,612)**
Glandularna diferencijacija (da)	5 (1,8%)	7 (2,1%)	0,000 (1,000)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	5 (1,8%)	4 (1,2%)	0,112 (0,521)**
Skvamozna diferencijacija (da)	25 (9,2%)	27 (8,0%)	0,158 (0,662)**
Carcinoma in situ (da)	14 (5,2%)	23 (6,8%)	0,450 (0,495)**
Pušenje (da)	83 (65,4%)	128 (67,7%)	0,100 (0,715)**
Izloženost karcinogenima (da)	17 (6,3%)	29 (8,6%)	0,840 (0,355)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	234 (86,3%)	279 (82,5%)	1,364 (0,219)**
Dizurija kao prvi simptom (da)	28 (10,3%)	46 (13,6%)	1,222 (0,261)**
Pozitivna porodična anamneza (da)	33 (12,2%)	36 (10,7%)	0,213 (0,607)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	9 (3,3%)	9 (2,7%)	0,056 (0,639)**
Endemsko područje za BEN (da)	29 (10,7%)	44 (13,0%)	0,561 (0,452)**
Terapija			6,267 (0,509)**
TUR	55 (20,3%)	60 (17,8%)	
TUR+BCG	128 (47,2%)	162 (47,9%)	
Parcijalna cistektomija	5 (1,8%)	5 (1,5%)	
Radikalna cistektomija	24 (8,9%)	44 (13,0%)	
Hemioterapija	10 (3,7%)	10 (3,0%)	
Radioterapija	31 (11,4%)	36 (10,7%)	
Hemioterapija + radioterapija	9 (3,3%)	16 (4,7%)	
Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	9 (3,3%)	5 (1,5%)	

* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnijev U-test

Tabela 15. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike u odnosu na jedarnu ekspresiju JAG1

	Negativna ekspresija	pozitivna ekspresija	t* ili χ^{2***} ili Z*** (p)
Starost (godine)	67,65±9,32	66,26±9,88	1,392 (0,164)*
Pol (muški)	94 (790%)	374 (76,5%)	0,213 (0,628)**
Gradus (HG)	58 (48,7%)	204 (41,7%)	1,649 (0,180)**
Stadijum (invazivni)	26 (21,8%)	112 (22,9%)	0,015 (0,903)**
pT stadijum			
pTa	28 (23,5%)	162 (33,1%)	1,328 (0,184)***
pT1	65 (54,6%)	215 (44,0%)	
pT2	17 (14,3%)	87 (17,8%)	
pT3	6 (5,0%)	16 (3,3%)	
pT4	3 (2,5%)	9 (1,8%)	
Divergentna diferencijacija (da)	16 (13,4%)	55 (11,2%)	0,261 (0,525)**
Glandularna diferencijacija (da)	3 (2,5%)	9 (1,8%)	0,012 (0,711)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	4 (3,4%)	5 (1,0%)	2,165 (0,079)**
Skvamozna diferencijacija (da)	9 (7,6%)	43 (8,8%)	0,061 (0,855)**
Carcinoma in situ (da)	11 (9,2%)	26 (5,3%)	1,9441 (0,132)**
Pušenje (da)	52 (74,3%)	158 (64,5%)	1,931 (0,151)**
Izloženost karcinogenima (da)	12 (10,1%)	34 (7,0%)	0,931 (0,248)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	95 (79,8%)	417 (85,3%)	1,744 (0,161)**
Dizurija kao prvi simptom (da)	19 (16,0%)	55 (11,2%)	1,577 (0,161)**
Pozitivna porodična anamneza (da)	11 (9,2%)	58 (11,9%)	0,417 (0,520)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	2 (1,7%)	16 (3,3%)	0,381 (0,548)**
Endemsko područje za BEN (da)	17 (14,3%)	56 (11,5%)	0,484 (0,431)**
Terapija			
TUR	15 (12,6%)	100 (20,4%)	8,150 (0,320)**
TUR+BCG	64 (53,8%)	226 (46,2%)	
Parcijalna cistektomija	1 (0,8%)	8 (1,6%)	
Radikalna cistektomija	9 (7,6%)	59 (12,1%)	
Hemioterapija	5 (4,2%)	15 (3,1%)	
Radioterapija	15 (12,6%)	52 (10,6%)	
Hemioterapija + radioterapija	6 (5,0%)	19 (3,9%)	
Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	4 (3,4%)	10 (2,0%)	

* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnjev U-test

Tabela 16. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike u odnosu na prisustvo negativne ekspresije JAG1 i na membrani/citoplazmi i u jedru

	Negativna ekspresija	pozitivna ekspresija	t* ili χ^{2***} ili Z*** (p)
Starost (godine)	67,42±8,35	66,49±9,88	0,548 (0,584)*
Pol (muški)	28 (77,8%)	441 (77,0%)	0,000 (1,000)***
Gradus (HG)	18 (50,0%)	244 (42,6%)	0,488 (0,391)**
Stadijum (invazivni)	11 (30,6%)	127 (22,2%)	0,924 (0,303)**
pT stadijum			
pT _a	7 (19,4%)	183 (31,9%)	1,690 (0,091)***
pT ₁	18 (50,0%)	263 (45,9%)	
pT ₂	8 (22,2%)	96 (16,8%)	
pT ₃	2 (5,6%)	20 (3,5%)	
pT ₄	1 (2,8%)	11 (1,9%)	
Divergentna diferencijacija (da)	9 (25,0%)	62 (10,8%)	5,307 (0,027)**
Glandularna diferencijacija (da)	2 (5,6%)	10 (1,7%)	0,955 (0,155)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	2 (5,6%)	7 (1,2%)	1,900 (0,094)**
Skvamozna diferencijacija (da)	6 (16,7%)	46 (8,0%)	2,225 (0,113)**
Carcinoma in situ (da)	3 (8,3%)	34 (5,9%)	0,051 (0,474)**
Pušenje (da)	9 (56,3%)	202 (67,3%)	0,416 (0,416)**
Izloženost karcinogenima (da)	2 (5,6%)	44 (7,7%)	0,020 (1,000)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	34 (94,4%)	479 (83,6%)	2,241 (0,099)**
Dizurija kao prvi simptom (da)	1 (2,8%)	73 (12,7%)	2,285 (0,109)**
Pozitivna porodična anamneza (da)	3 (8,3%)	66 (11,5%)	0,098 (0,787)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	1 (2,8%)	17 (3,0%)	0,000 (1,000)**
Endemsko područje za BEN (da)	4 (11,1%)	69 (12,0%)	0,000 (1,000)**
Terapija			
TUR	5 (13,9%)	110 (19,2%)	6,862 (0,443)**
TUR+BCG	15 (41,7%)	275 (48,0%)	
Parcijalna cistektomija	0 (0,0%)	10 (1,7%)	
Radikalna cistektomija	5 (13,9%)	63 (11,0%)	
Hemioterapija	3 (8,3%)	17 (3,0%)	
Radioterapija	5 (13,9%)	62 (10,8%)	
Hemioterapija + radioterapija	1 (2,8%)	24 (4,2%)	
Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	2 (5,6%)	12 (2,1%)	

* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnjev U-test

Tabela 17. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka karcinoma mokraćne bešike u odnosu na prisustvo pozitivne ekspresije JAG1 i na membrani/citoplazmi i u jedru

	Negativna ekspresija	pozitivna ekspresija	t* ili χ^2 ** ili Z*** (p)
Starost (godine)	66,10±9,84	67,12±9,70	1,269 (0,205)*
Pol (muški)	276 (78,0%)	192 (75,6%)	0,346 (0,496)**
Gradus (HG)	145 (41,0%)	117 (46,1%)	1,369 (0,214)**
Stadijum (invazivni)	69 (19,5%)	69 (27,2%)	4,536 (0,031)**
pT stadijum			
pTa	116 (32,8%)	74 (29,1%)	1,764 (0,078)***
pT1	169 (47,7%)	111 (43,7%)	
pT2	50 (14,1%)	54 (21,3%)	
pT3	13 (3,7%)	9 (3,5%)	
pT4	6 (1,7%)	6 (2,4%)	
Divergentna diferencijacija (da)	41 (11,6%)	30 (11,8%)	0,000 (1,000)**
Glandularna diferencijacija (da)	6 (1,7%)	6 (2,4%)	0,083 (0,569)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	7 (2,0%)	2 (0,8%)	0,736 (0,317)**
Skvamozna diferencijacija (da)	28 (7,9%)	24 (9,4%)	0,273 (0,557)**
Carcinoma in situ (da)	22 (6,2%)	15 (5,9%)	0,000 (1,000)**
Pušenje (da)	126 (69,6%)	84 (62,7%)	1,365 (0,227)**
Izloženost karcinogenima (da)	27 (7,6%)	19 (7,5%)	0,000 (1,000)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	295 (83,3%)	217 (85,4%)	0,345 (0,501)**
Dizurija kao prvi simptom (da)	46 (13,0%)	28 (11,0%)	0,369 (0,530)**
Pozitivna porodična anamneza (da)	41 (11,6%)	28 (11,0%)	0,007 (0,897)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	10 (2,8%)	8 (3,1%)	0,000 (0,813)**
Endemsko područje za BEN (da)	42 (11,9%)	31 (12,2%)	0,000 (0,900)**
Terapija			
TUR	65 (18,4%)	50 (19,7%)	12,170 (0,095)**
TUR+BCG	177 (50,0%)	113 (44,5%)	
Parcijalna cistektomija	6 (1,7%)	3 (1,2%)	
Radikalna cistektomija	28 (7,9%)	40 (15,7%)	
Hemioterapija	12 (3,4%)	8 (3,1%)	
Radioterapija	41 (11,6%)	26 (10,2%)	
Hemioterapija + radioterapija	14 (4,0%)	11 (4,3%)	
Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	11 (3,1%)	3 (1,2%)	

* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnijev U-test

4.6 Međusobna povezanost ekspresije analiziranih IHC markera (JAG1, NOTCH3, HIF1 α , VEGF, VEGFR1)

Među uzorcima sa pozitivnom membransko/citoplazmatskom ekspresijom JAG1, češća je bila pozitivnost VEGF ($p < 0,01$), a ređa nuklearna pozitivna ekspresija JAG1 ($p < 0,001$) i VEGFR1 ($p < 0,01$). Uzorci sa negativnom ekspresijom JAG1 i u jedru i membrani/citoplazmi su češće imali negativan VEGF ($p < 0,01$). Pozitivna ekspresija VEGFR1 je bila povezana sa pozitivnom ekspresijom NOTCH3 ($p < 0,05$), HIF1 α ($p < 0,001$) i VEGF ($p < 0,001$). Pored toga, pozitivna ekspresija NOTCH3 je češće bila udružena sa pozitivnom ekspresijom HIF1 α ($p < 0,05$) (Tabela 18).

Tabela 18. Povezanost ekspresije pojedinačnih IHC markera (u tabeli su prikazane vrednosti χ^2 -testa sa verovatnoćom)

	JAG1 N	NOTCH3	HIF1α	VEGF	VEGFR1
JAG1 C/M	11,571 (0,000)	0,235 (0,610)	0,611 (0,387)	7,490 (0,005)	7,673 (0,005)
JAG1 N		0,151 (0,671)	0,939 (0,327)	0,025 (0,826)	2,878 (0,079)
JAG1 C/M i N		0,043 (0,798)	0,660 (0,382)	2,600 (0,094)	1,934 (0,158)
JAG1 C/M ili N		0,000 (0,859)	2,501 (0,099)	6,858 (0,009)	0,000 (0,855)
NOTCH3			4,001 (0,040)	3,137 (0,068)	5,045 (0,022)
HIF1α				3,241 (0,065)	11,106 (0,001)
VEGF					40,326 (0,000)

4.7 Recidivantnost karcinoma mokraćne bežike

Tokom perioda praćenja, recidiv se javio kod ukupno 221 pacijenata (36,1%). Najveći broj pacijenata (59,3%) je imao samo jedan recidiv. Najveći broj zabeleženih recidiva je iznosio tri, i to kod 57 pacijenata (25,8%). U prvoj godini nakon dijagnoze recidiv se javio kod 146 (23,8%) pacijenata, a u prve dve godine kod 192 (31,3%) pacijenta. Prosečno vreme pojave prvog recidiva je bilo nakon 9 (5-18) meseci.

Pojava recidiva u prvoj godini nakon dijagnoze je bila češća kod mladih pacijenata ($p < 0,01$), LG UKMB ($p < 0,001$), nižeg pT stadijuma ($p < 0,05$) i pacijenata kod kojih je bezbolna hematurija prvi simptom bolesti ($p < 0,05$). Recidivi su bili češći kod pacijenata lečenih sa TUR, a ređi kod pacijenata lečenih sa TUR+BCG, radioterapijom i radikalnom cistektomijom ($p < 0,01$). Prosečno javljanje recidiva u prvoj godini je bilo nakon 6 (4-9) meseci (Tabela 19).

Pojava recidiva u prvoj godini nakon dijagnoze je bila češća kod UKMB koji ne ekspimiraju NOTCH3 ($p < 0,05$) (Tabela 20).

Univarijantnom binarnom logističkom regresionom analizom je izdvojen niz prediktora pojave recidiva u prvoj godini: mlađa životna dob, LG, superficijalni tumori, hematurija kao prvi simptom UKMB, kao i odsustvo ekspresije NOTCH3. U multivarijantnom modelu koji predviđa pojavu recidiva sa udelom od 4,0-6,0% ($\chi^2=24,263$, $p < 0,001$), utvrđena su tri nezavisna prediktora pojave recidiva u prvoj godini nakon dijagnoze. Sa svakih 10 godina starosti, rizik od pojave recidiva u prvoj godini se smanjuje 1,3 puta ($p < 0,01$). LG UKMB 1,6 puta češće daju recidiv već u prvoj godini ($p < 0,05$). Kod pacijenata kod kojih se karcinom najpre manifestovao bezbolnom hematurijom verovatnoća je 1,8 puta veća ($p < 0,05$) (Tabela 21).

Tabela 19. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike u odnosu na pojavu recidiva u prvoj godini nakon dijagnoze

	Ne	Da	t* ili χ^2 ** ili Z*** (p)
Starost (godine)	67,31±9,39	64,25±10,73	3,101 (0,002)*
Pol (muški)	361 (77,3%)	110 (75,3%)	0,142 (0,653)**
Gradus (HG)	218 (46,7%)	45 (30,8%)	10,782 (0,001)**
Stadijum (invazivni)	114 (24,4%)	24 (16,4%)	3,609 (0,053)**
pT			
pTa	139 (29,8%)	52 (35,6%)	1,964 (0,049)***
stadijum			
pT1	214 (45,8%)	70 (47,9%)	
pT2	86 (18,4%)	18 (12,3%)	
pT3	18 (3,9%)	4 (2,7%)	
pT4	10 (2,1%)	2 (1,4%)	
Divergentna diferencijacija (da)	54 (11,6%)	18 (12,3%)	0,011 (0,770)**
Glandularna diferencijacija (da)	9 (1,9%)	3 (2,1%)	0,000 (1,000)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	8 (1,7%)	1 (0,7%)	0,257 (0,694)**
Skvamozna diferencijacija (da)	39 (8,4%)	14 (9,6%)	0,088 (0,616)**
Carcinoma in situ (da)	32 (6,9%)	5 (3,4%)	1,739 (0,164)**
Pušenje (da)	166 (69,5%)	47 (58,8%)	2,633 (0,099)**
Izloženost karcinogenima (da)	31 (6,6%)	15 (10,3%)	1,627 (0,152)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	385 (82,4%)	132 (90,4%)	4,763 (0,019)**
Dizurične tegobe kao prvi simptom (da)	62 (13,3%)	12 (8,2%)	2,225 (0,111)**
Pozitivna porodična anamneza (da)	51 (10,9%)	18 (12,3%)	0,102 (0,653)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	13 (2,8%)	5 (3,4%)	0,014 (0,779)**
Endemsko područje za BEN (da)	53 (11,3%)	21 (14,4%)	0,700 (0,313)**
Terapija			
TUR	101 (21,6%)	93 (63,7%)	22,290 (0,002)**
TUR+BCG	200 (42,8%)	15 (10,3%)	
Parcijalna resekcija	7 (1,5%)	3 (2,1%)	
Radikalna cistektomija	56 (12,0%)	12 (8,2%)	
Hemioterapija	15 (3,2%)	5 (3,4%)	
Radioterapija	56 (12,0%)	11 (7,5%)	
Hemioterapija + radioterapija	20 (4,3%)	5 (3,4%)	
Radikalna cistektomija + hemioterapija/radioterapija	12 (2,6%)	2 (1,4%)	

* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnijev U-test

Tabela 20. Ekspresija analiziranih IHC markera i gustina malih krvnih sudova u odnosu na pojavu recidiva u prvoj godini nakon dijagnoze

	Ne	Da	χ^2 * ili Z** (p)
JAG1 C/M (pozitivna ekspresija)	256 (55,2%)	82 (56,6%)	0,038 (0,848)*
JAG1 N (pozitivna ekspresija)	376 (81,2%)	113 (77,9%)	0,560 (0,402)*
JAG1 C/M i N (pozitivna ekspresija)	198 (42,8%)	56 (38,6%)	0,618 (0,387)*
JAG1 C/M i N (negativna ekspresija)	30 (6,5%)	6 (4,1%)	0,698 (0,419)*
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	292 (64,3%)	76 (53,1%)	5,276 (0,018)*
HIF1 α (pozitivna ekspresija)	152 (32,5%)	50 (34,2%)	0,079 (0,762)*
VEGF (pozitivna ekspresija)	315 (67,5%)	103 (70,5%)	0,359 (0,542)*
VEGR1 (pozitivna ekspresija)	312 (66,8%)	105 (71,9%)	1,110 (0,265)*
MVD na 2mm ²	121,5 (92,5-180,0)	122,0 (101,2-174,2)	0,192 (0,848)**

* χ^2 -test; ** Man-Vitnijev U-test

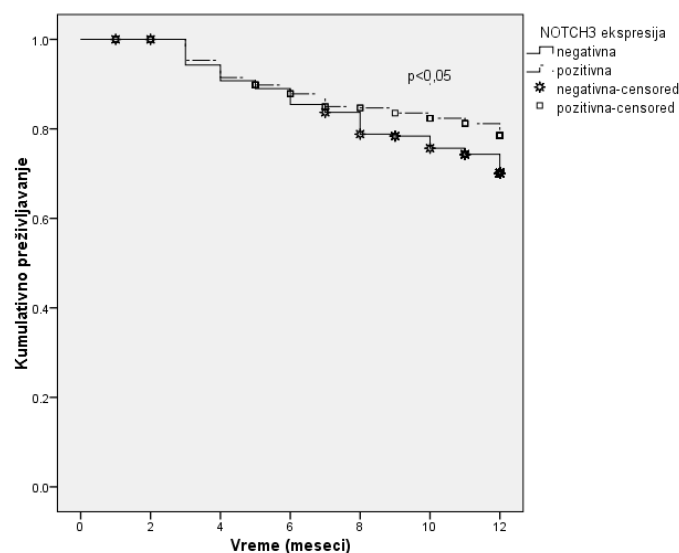
Tabela 21. Binarna logistička regresiona analiza prediktora pojave recidiva u prvoj godini

	Univarijantna		Multivarijantna	
	OR (95% CI za OR)	p	OR (95% CI za OR)	p
Starost (godine)	0,969 (0,951-0,988)	0,001	0,975 (0,956-0,994)	0,009
Gradus (HG)	0,509 (0,343-0,756)	0,001	0,639 (0,422-0,965)	0,033
Stadijum (invazivni)	0,609 (0,375-0,990)	0,046		
Bezbolna hematurija kao 1. simptom (da)	2,008 (1,102-3,660)	0,023	1,844 (1,001-3,398)	0,050
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	0,629 (0,430-0,921)	0,017	0,724 (0,489-1,073)	0,108

Univarijantnom Cox-regresionom analizom jednogodišnjeg preživljavanja bez recidiva dobijeni su sledeći prediktori: starija životna dob, visok gradus tumora, odsustvo bezbolne hematurije kao prvog simptoma i pozitivna ekspresija NOTCH3 (Slika 26). Kao nezavisni prediktori u multivarijantnom modelu ($\chi^2=21,302$, $p<0,01$) kraćeg jednogodišnjeg preživljavanja bez recidiva, dobijeni su mlađa životna dob ($p<0,01$) i bezbolna hematurija kao prvi simptom ($p<0,05$) (Tabela 22).

Tabela 22. Cox-regresiona analiza jednogodišnjeg preživljavanja bez recidiva

	Univarijantna		Multivarijantna	
	HR (95% CI za HR)	p	HR (95% CI za HR)	p
Starost (godine)	0,974 (0,959-0,990)	0,001	0,978 (0,962-0,994)	0,007
Gradus (HG)	0,596 (0,419-0,847)	0,004	0,721 (0,502-1,037)	0,078
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	1,841 (1,061-3,194)	0,030	1,756 (1,011-3,050)	0,046
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	0,703 (0,506-0,977)	0,036	0,795 (0,568-1,112)	0,180



Slika 30. Kaplan-Majerova kriva jednogodišnjeg preživljavanja bez recidiva u odnosu na ekspresiju NOTCH3

Pojava recidiva u prve dve godine nakon dijagnoze je bila češća kod mlađih pacijenata ($p < 0,01$) LG UKMB ($p < 0,01$), superficijalnih tumora ($p < 0,01$), odnosno nižeg pT stadijuma ($p < 0,01$), koji su bili izloženi karcinogenima ($p < 0,01$), imali hematuriju kao prvi simptom ($p < 0,01$) i pozitivnu UKMB porodičnu anamnezu ($p < 0,05$). Takođe, recidivi su bili češći kod pacijenata lečenih sa TUR, a ređi kod pacijenata lečenih sa TUR+BCG, radioterapijom i radikalnom cistektomijom ($p < 0,001$). Prosečno javljanje recidiva u prve dve godine je bilo nakon $9,6 \pm 6,3$ meseci (Tabela 23).

Pojava recidiva u prve dve godine nakon dijagnoze nije bila u statistički značajnoj vezi ni sa jednim ispitivanim IHC markerom niti sa gustinom malih krvnih sudova (Tabela 24).

Tabela 23. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike u odnosu na pojavu recidiva u prve dve godine nakon dijagnoze

	Ne	Da	t* ili χ^2 ** ili Z*** (p)
Starost (godine)	67,33±9,31	64,95±10,64	2,659 (0,008)*
Pol (muški)	324 (77,0%)	147 (76,6%)	0,000 (0,918)**
Gradus (HG)	198 (47,0%)	65 (33,9%)	8,816 (0,003)**
Stadijum (invazivni)	110 (26,1%)	28 (14,6%)	9,424 (0,002)**
pT			2,850 (0,004)***
pTa	122 (29,0%)	69 (35,9%)	
pT1	189 (44,9%)	95 (49,5%)	
pT2	83 (19,7%)	21 (10,9%)	
pT3	17 (4,0%)	5 (2,6%)	
pT4	10 (2,4%)	2 (1,0%)	
Divergentna diferencijacija (da)	49 (11,6%)	23 (12,0%)	0,000 (0,893)**
Glandularna diferencijacija (da)	9 (2,1%)	3 (1,6%)	0,026 (0,762)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	8 (1,9%)	1 (0,5%)	0,912 (0,286)**
Skvamozna diferencijacija (da)	34 (8,1%)	19 (9,9%)	0,346 (0,443)**
Carcinoma in situ (da)	26 (6,2%)	11 (5,7%)	0,001 (1,000)**
Pušenje (da)	150 (69,8%)	63 (60,6%)	2,270 (0,128)**
Izloženost karcinogenima (da)	23 (5,5%)	23 (12,0%)	7,155 (0,007)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	344 (81,7%)	173 (90,1%)	6,413 (0,008)**
Dizurične tegobe kao prvi simptom (da)	57 (13,5%)	17 (8,9%)	2,303 (0,109)**
Pozitivna porodična anamneza (da)	43 (10,2%)	26 (13,5%)	1,148 (0,270)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	8 (1,9%)	10 (5,2%)	3,969 (0,036)**
Endemsko područje za BEN (da)	44 (10,5%)	30 (15,6%)	2,856 (0,082)**
Terapija			41,721 (0,000)**
TUR	98 (23,3%)	126 (65,6%)	
TUR+BCG	167 (39,7%)	18 (9,4%)	
Parcijalna resekcija	7 (1,7%)	3 (1,6%)	
Radikalna cistektomija	56 (13,3%)	12 (6,3%)	
Hemioterapija	13 (3,1%)	7 (3,6%)	
Radioterapija	51 (12,1%)	16 (8,3%)	
Hemioterapija + radioterapija	17 (4,0%)	8 (4,2%)	
Radikalna cistektomija + hemioterapija/radioterapija	12 (2,9%)	2 (1,0%)	

* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnjev U-test

Tabela 24. Ekspresija analiziranih IHC markera i gustina malih krvnih sudova u odnosu na pojavu recidiva u prvoj godini nakon dijagnoze

	Ne	Da	χ^2 * ili Z** (p)
JAG1 C/M (pozitivna ekspresija)	228 (54,5%)	110 (57,6%)	0,493 (0,539)*
JAG1 N (pozitivna ekspresija)	339 (81,3%)	150 (78,5%)	0,471 (0,442)*
JAG1 C/M i N (pozitivna ekspresija)	177 (42,4%)	77 (40,3%)	0,165 (0,658)*
JAG1 C/M i N (negativna ekspresija)	28 (6,7%)	8 (4,2%)	1,068 (0,269)*
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	262 (64,1%)	106 (56,4%)	2,893 (0,085)*
HIF1 α (pozitivna ekspresija)	140 (33,3%)	62 (32,3%)	0,020 (0,853)*
VEGF (pozitivna ekspresija)	283 (67,2%)	135 (70,3%)	0,447 (0,456)*
VEGR1 (pozitivna ekspresija)	285 (67,7%)	132 (68,8%)	0,028 (0,852)*
MVD na 2mm ²	120,0 (92,0-180,0)	127,0 (100,5-185,0)	0,709 (0,478)**

* χ^2 -test; ** Man-Vitnijev U-test

Univarijantnom binarnom logističkom regresionom analizom je izdvojen niz prediktora pojave recidiva u prve dve godine: mlađa životna dob, LG, superficijalni tumori, odnosno niži pT stadijum, izloženost karcinogenima, bezbolna hematurija kao prvi simptom bolesti, kao i pozitivna porodična anamneza specifična UKMB. U multivarijantnom modelu koji predviđa pojavu recidiva sa udelom od 5,0-7,1% ($\chi^2=31,613$, $p<0,001$), utvrđena su dva nezavisna prediktora pojave recidiva. Hematurija kao prvi simptom povećava verovatnoću 1,9 puta ($p<0,05$), dok pozitivna UKMB porodična anamneza povećava verovatnoću 2,8 puta ($p<0,05$) (Tabela 25).

Tabela 25. Binarna logistička regresiona analiza prediktora pojave recidiva u prve dve godine

	Univarijantna		Multivarijantna	
	OR (95% CI za OR)	p	OR (95% CI za OR)	p
Starost (godine)	0,976 (0,959-0,993)	0,006	0,985 (0,967-1,003)	0,099
Gradus (visok)	0,576 (0,404-0,822)	0,002	0,769 (0,507-1,166)	0,217
Stadijum (invazivni)	0,483 (0,306-0,762)	0,002	0,655 (0,387-1,110)	0,116
pT stadijum (pTa-pT4)	0,739 (0,602-0,908)	0,004		
Izloženost karcinogenima (da)	2,355 (1,286-4,314)	0,006	1,804 (0,959-3,392)	0,067
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	2,038 (1,195-3,477)	0,009	1,945 (1,122-3,373)	0,018
Pozitivna UKMB porodična anamneza (da)	2,837 (1,102-7,304)	0,031	2,752 (1,042-7,262)	0,041

Univarijantnom Cox-regresionom analizom dvogodišnjeg preživljavanja bez recidiva dobijeni su sledeći prediktori: starija životna dob, visok gradus tumora, odsustvo hematurije kao prvog simptoma i pozitivna ekspresija NOTCH3. Kao nezavisni prediktori u multivarijantnom modelu ($\chi^2=21,302$, $p<0,01$) kraćeg dvogodišnjeg preživljavanja bez recidiva, dobijeni su mlađa životna dob ($p<0,01$) i bezbolna hematurija kao prvi simptom ($p<0,05$) (Tabela 26).

Tabela 26. Cox-regresiona analiza dvogodišnjeg preživljavanja bez recidiva

	Univarijantna		Multivarijantna	
	HR (95% CI za HR)	p	HR (95% CI za HR)	p
Starost (godine)	0,974 (0,959-0,990)	0,001	0,978 (0,962-0,994)	0,007
Gradus (visok)	0,596 (0,419-0,847)	0,004	0,721 (0,502-1,037)	0,078
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	1,841 (1,061-3,194)	0,030	1,756 (1,011-3,050)	0,046
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	0,703 (0,506-0,977)	0,036	0,795 (0,568-1,112)	0,180

Pojava recidiva tokom celog perioda praćenja je bila češća kod pacijenata sa tumorima nižeg gradusa ($p < 0,01$) koji su superficijalni ($p < 0,001$), odnosno nižeg pT stadijuma ($p < 0,001$), kod pacijenata izloženih karcinogenima ($p < 0,001$), koji su imali bezbolnu hematuriju kao prvi simptom ($p < 0,01$). Takođe, recidivi su bili češći kod pacijenata lečenih sa TUR+BCG, a ređi kod pacijenata lečenih sa TUR, radioterapijom i radikalnom cistektomijom sa/bez radio/hemioterapije ($p < 0,001$) (Tabela 27).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji analiziranih IHC markera (JAG1, NOTCH3, HIF1 α , VEGF, VEGFR1) i gustine malih krvnih sudova u odnosu na pojavu recidiva (Tabela 28).

Univarijantnom binarnom logističkom regresionom analizom je izdvojen niz prediktora pojave recidiva tokom petogodišnjeg praćenja: LG UKMB, superficijalni tumori, odnosno niži pT stadijum, ekspozicija karcinogenima, hematurija kao prvi simptom UKMB, kao i u odnosu na TUR+BCG, kao najčešći vid terapije, manja verovatnoća recidiva je bila kod pacijenata lečenih sa TUR, radioterapijom ili radikalnom cistektomijom sa radio/hemoterapijom. U multivarijantnom modelu koji predviđa pojavu recidiva sa udelom od 10,2-14,0% ($\chi^2=65,939$, $p < 0,001$), nezavisni prediktori pojave recidiva su bezbolna hematurija kao prvi simptom i vid terapije. Pacijenti kod kojih je hematurija bila prvi simptom, verovatnoća pojave recidiva je 1,9 puta veća ($p < 0,05$). U odnosu na pacijente lečene sa TUR+BCG, pacijenti lečeni sa TUR imaju 3,8 puta manju verovatnoću recidiva ($p < 0,001$), a oni lečeni radikalnom cistektomijom 3,2 puta manju verovatnoću ($p < 0,01$) (Tabela 29).

Tabela 27. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike u odnosu na pojavu recidiva

	Ne	Da	t* ili χ^2 ** ili Z*** (p)
Starost (godine)	37,13±9,24	65,61±10,68	1,782 (0,076)*
Pol (muški)	302 (77,0%)	169 (76,5%)	0,004 (0,921)**
Gradus (HG)	186 (47,4%)	77 (34,8%)	8,662 (0,003)**
Stadijum (invazivni)	107 (27,3%)	31 (14,0%)	13,513 (0,000)**
pT			3,398 (0,001)***
pTa	111 (28,3%)	80 (36,2%)	
pT1	174 (44,4%)	110 (49,8%)	
pT2	80 (20,4%)	24 (10,9%)	
pT3	17 (4,3%)	5 (2,3%)	
pT4	10 (2,6%)	2 (0,9%)	
Divergentna diferencijacija (da)	48 (12,2%)	24 (10,9%)	0,145 (0,695)**
Glandularna diferencijacija (da)	9 (2,3%)	3 (1,4%)	0,252 (0,551)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	7 (1,8%)	2 (0,9%)	0,271 (0,500)**
Skvamozna diferencijacija (da)	34 (8,7%)	19 (8,6%)	0,000 (1,000)**
Carcinoma in situ (da)	22 (5,6%)	15 (6,8%)	0,168 (0,598)**
Pušenje (da)	137 (70,3%)	76 (61,3%)	2,357 (0,113)**
Izloženost karcinogenima (da)	19 (4,8%)	27 (12,2%)	10,024 (0,001)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	319 (81,4%)	198 (89,6%)	6,613 (0,008)**
Dizurične tegobe kao prvi simptom (da)	54 (13,8%)	20 (9,0%)	2,545 (0,094)**
Pozitivna porodična anamneza (da)	38 (9,7%)	31 (14,0%)	2,240 (0,111)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	8 (2,0%)	10 (4,5%)	2,250 (0,087)**
Endemsko područje za BEN (da)	41 (10,5%)	33 (14,9%)	2,259 (0,121)**
Terapija			52,713 (0,000)**
TUR	93 (23,7%)	23 (10,4%)	
TUR+BCG	146 (37,2%)	147 (66,5%)	
Parcijalna resekcija	7 (1,8%)	3 (1,4%)	
Radikalna cistektomija	55 (14,0%)	13 (5,9%)	
Hemioterapija	13 (3,3%)	7 (3,2%)	
Radioterapija	49 (12,5%)	18 (8,1%)	
Hemioterapija + radioterapija	17 (4,3%)	8 (3,6%)	
Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	12 (3,1%)	2 (0,9%)	

* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnijev U-test

Tabela 28. Ekspresija analiziranih IHC markera i gustina malih krvnih sudova u odnosu na pojavu recidiva

	Ne	Da	χ^2 * ili Z** (p)
JAG1 C/M (pozitivna ekspresija)	211 (54,2%)	127 (57,7%)	0,557 (0,445)*
JAG1 N (pozitivna ekspresija)	316 (81,4%)	173 (78,6%)	0,536 (0,397)**
JAG1 C/M i N (pozitivna ekspresija)	165 (42,5%)	89 (40,5%)	0,170 (0,669)*
JAG1 C/M i N (negativna ekspresija)	27 (6,9%)	9 (4,1%)	1,572 (0,210)*
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	245 (64,5%)	123 (56,7%)	3,225 (0,066)*
HIF1 α (pozitivna ekspresija)	132 (33,7%)	70 (31,7%)	0,173 (0,655)*
VEGF (pozitivna ekspresija)	262 (66,8%)	156 (70,6%)	0,752 (0,367)*
VEGR1 (pozitivna ekspresija)	260 (66,3%)	157 (71,0%)	1,235 (0,242)*
MVD na 2mm ²	120,0 (91,5-171,5)	130,0 (101,0-190,0)	1,107 (0,268)**

* χ^2 -test; ** Man-Vitnijev U-test

Tabela 29. Binarna logistička regresiona analiza prediktora pojave recidiva

	Univarijantna		Multivarijantna	
	OR (95% CI za OR)	p	OR (95% CI za OR)	p
Gradus (HG)	0,592 (0,421-0,832)	0,003	0,915 (0,596-1,406)	0,686
Stadijum (invazivni)	0,435 (0,280-0,675)	0,000	0,746 (0,409-1,360)	0,339
pT stadijum (pTa-pT4)	0,701 (0,574-0,856)	0,001		
Ekspozicija karcinogenima (da)	2,732 (1,482-5,039)	0,001	1,848 (0,973-3,512)	0,061
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	1,970 (1,194-3,252)	0,008	1,861 (1,101-3,146)	0,020
Terapija (vs. TUR)	0,246 (0,147-0,409)	0,000	0,260 (0,155-0,436)	0,000
TUR+BCG) parcijalna resekcija	0,426 (0,108-1,678)	0,222	0,579 (0,141-2,382)	0,449
radikalna cistektomija	0,235 (0,123-0,448)	0,000	0,316 (0,150-0,666)	0,002
hemioterapija	0,535 (0,207-1,379)	0,195	0,585 (0,219-1,564)	0,285
radioterapija	0,365 (0,203-0,656)	0,001	0,511 (0,251-1,040)	0,064
hemioterapija+ radioterapija	0,467 (0,196-1,117)	0,087	0,685 (0,266-1,769)	0,435
radikalna cistektomija+ radio/hemioterapija	0,166 (0,036-0,753)	0,020	0,216 (0,046-1,027)	0,054

Univarijantnom Cox-regresionom analizom izdvojeni su faktori rizika za nastanak recidiva: nepušači, ekspozicija karcinogenima, bezbolna hematurija kao prvi simptom i pojedini vidovi terapije u odnosu na TUR+BCG. Kao nezavisni prediktori u multivarijantnom modelu ($\chi^2=28,025$, $p<0,01$) dobijeno je da pušenje smanjuje verovatnoću 1,6 puta ($p<0,01$), kao i da lečenje sa TUR, u odnosu na TUR+BCG, smanjuje rizik 2,2 puta ($p<0,01$) (Tabela 30).

Tabela 30. Cox-regresiona analiza preživljavanja bez recidiva

	Univarijantna		Multivarijantna	
	HR (95% CI za HR)	p	HR (95% CI za HR)	p
Pušenje (da)	0,653 (0,455-0,939)	0,021	0,615 (0,426-0,888)	0,010
Izloženost karcinogenima (da)	1,725 (1,153-2,581)	0,008	1,506 (0,942-2,409)	0,087
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	1,684 (1,093-2,594)	0,018	1,788 (0,961-3,327)	0,066
Terapija (vs. TUR)	0,359 (0,231-0,558)	0,000	0,462 (0,264-0,806)	0,007
TUR+BCG) Parcijalna resekcija	0,909 (0,290-2,852)	0,870	1,595 (0,499-5,101)	0,431
Radikalna cistektomija	0,482 (0,273-0,851)	0,012	0,431 (0,173-1,074)	0,071
Hemioterapija	0,843 (0,395-1,801)	0,660	0,341 (0,084-1,394)	0,134
Radioterapija	0,58 (0,402-1,076)	0,095	1,025 (0,540-1,945)	0,939
Hemioterapija + radioterapija	0,830 (0,406-1,695)	0,608	1,201 (0,435-3,318)	0,723
Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	0,393 (0,097-1,590)	0,190	0,000	0,963

Tabela 31. Broj recidiva tokom perioda praćenja u odnosu na osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bežike

		Broj recidiva (N)				ρ^* ili Z^{**} ili χ^{2***} (p)
		0	1	2	3	
Starost (godine)		67,11±9,24	65,90±9,61	64,38±11,38	65,75±12,64	-0,041 (0,315)*
Pol (muški)		303 (77,1%)	105 (80,2%)	21 (65,6%)	42 (73,7%)	0,502 (0,616)**
Gradus (HG)		185 (47,1%)	57 (43,5%)	6 (18,8%)	15 (26,3%)	3,307 (0,001)**
Stadijum (invazivni)		106 (27,0%)	22 (16,8%)	5 (15,6%)	5 (8,8%)	3,691 (0,000)**
pT stadijum	pTa	111 (28,2%)	39 (29,8%)	17 (53,1%)	24 (42,1%)	-0,149 (0,000)*
	pT1	176 (44,8%)	70 (53,4%)	10 (31,3%)	28 (49,1%)	
	pT2	80 (20,4%)	15 (11,5%)	5 (15,6%)	4 (7,0%)	
	pT3	16 (4,1%)	5 (3,8%)	0 (0,0%)	1 (1,8%)	
	pT4	10 (2,5%)	2 (1,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Divergentna diferencijacija (da)		48 (12,2%)	16 (12,2%)	4 (12,5%)	4 (7,0%)	0,667 (0,505)**
Glandularna diferencijacija (da)		9 (2,3%)	3 (2,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1,302 (0,302)**
Mikrocistična diferencijacija (da)		7 (1,8%)	2 (1,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1,037 (0,300)**
Skvamozna diferencijacija (da)		34 (8,7%)	11 (8,4%)	4 (12,5%)	4 (7,0%)	0,021 (0,983)**
Carcinoma in situ (da)		22 (5,6%)	12 (9,2%)	0 (0,0%)	3 (5,3%)	0,268 (0,789)**
Pušenje (da)		136 (70,1%)	41 (62,1%)	13 (59,1%)	23 (62,2%)	1,533 (0,125)**
Izloženost karcinogenima (da)		20 (5,1%)	8 (6,1%)	6 (18,8%)	12 (21,1%)	3,813 (0,000)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)		320 (81,4%)	120 (91,6%)	28 (87,5%)	49 (86,0%)	2,357 (0,018)**
Dizurične tegobe kao prvi simptom (da)		54 (13,7%)	9 (6,9%)	3 (9,4%)	8 (14,0%)	1,354 (0,176)**
Pozitivna porodična anamneza (da)		38 (9,7%)	15 (11,5%)	5 (15,6%)	11 (19,3%)	1,970 (0,049)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)		8 (2,0%)	4 (3,1%)	1 (3,1%)	5 (8,8%)	2,143 (0,032)**
Endemsko područje za BEN (da)		41 (10,4%)	18 (13,7%)	5 (15,6%)	10 (17,5%)	1,786 (0,074)**
Terapija	TUR	93 (23,7%)	17 (13,0%)	4 (12,5%)	2 (3,5%)	74,248 (0,000)***
	TUR+BCG	148 (37,7%)	80 (61,1%)	20 (62,5%)	45 (78,9%)	
	Parcijalna resekcija	7 (1,8%)	1 (0,8%)	2 (6,3%)	0 (0,0%)	
	Radikalna cistektomija	54 (13,7%)	11 (8,4%)	1 (3,1%)	2 (3,5%)	
	Hemioterapija	13 (3,3%)	1 (0,8%)	3 (9,4%)	3 (5,3%)	
	Radioterapija	49 (12,5%)	15 (11,5%)	2 (6,3%)	1 (1,8%)	
	Hemioterapija + radioterapija	17 (4,3%)	4 (3,1%)	0 (0,0%)	4 (7,0%)	
	Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	12 (3,1%)	2 (1,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

* Spirmanov test korelacije; ** Man-Vitnijev U-test; *** χ^2 -test

Veći broj recidiva je bio povezan sa LG UKMB ($p < 0,001$), superficijalnim tumorima ($p < 0,001$), odnosno nižim pT stadijumom ($p < 0,001$), izloženošću karcinogenima ($p < 0,001$), bezbolnom hematurijom kao prvim simptomom ($p < 0,05$), pozitivnom porodičnom anamnezom ($p < 0,05$) i pozitivnom specifičnom porodičnom anamnezom za UKMB ($p < 0,05$) i vidom terapije – najviše kod lečenih sa TUR+BCG i hemioterapijom ($p < 0,001$) (Tabela 31).

Nije utvrđena statistički značajna povezanost između ekspresije analiziranih IHC markera (JAG1, NOTCH3, HIF1 α , VEGF, VEGFR1) i gustine malih krvnih sudova sa pojavom recidiva (Tabela 32).

Tabela 32. Broj recidiva tokom perioda praćenja u odnosu na analizirane IHC markere i gustinu malih krvnih sudova

	Broj recidiva (N)				Z* ili ρ^{**} (p)
	0	1	2	3	
JAG1 C/M (pozitivna)	212 (54,4%)	73 (56,2%)	19 (59,4%)	34 (59,6%)	0,845 (0,398)*
JAG1 N (pozitivna)	317 (81,5%)	99 (76,2%)	26 (81,3%)	47 (82,5%)	0,619 (0,536)*
JAG1 C/M i N (pozitivna)	166 (42,7%)	48 (36,9%)	15 (46,9%)	25 (43,9%)	0,343 (0,732)*
JAG1 C/M i N (negativna)	27 (6,9%)	6 (4,6%)	2 (6,3%)	1 (1,8%)	1,506 (0,132)*
NOTCH3 (pozitivna)	245 (64,3%)	75 (58,6%)	15 (48,4%)	33 (57,9%)	1,813 (0,070)*
HIF1α (pozitivna)	132 (33,6%)	43 (32,8%)	10 (31,3%)	17 (29,8%)	0,526 (0,599)*
VEGF (pozitivna)	263 (66,9%)	95 (72,5%)	21 (65,6%)	39 (68,4%)	0,722 (0,471)*
VEGR1 (pozitivna)	262 (66,7%)	94 (71,8%)	21 (65,6%)	40 (70,2%)	0,856 (0,392)*
MVD na 2mm²	120,0 (91,8-171,2)	121,0 (89,5-200,2)	152,0 (128,2-240,5)	128,5 (114,8-161,5)	0,097 (0,202)**

* Man-Vitnijev U-test; ** Spirmanov test korelacije

Univarijantnom standardnom linearnom regresionom analizom su izdvojeni prediktori većeg broja recidiva: LG UKMB, superficijalni tumori, odnosno niži pT stadijum, izloženost karcinogenima, pozitivna porodična anamneza i porodična anamneza specifična za UKMB. S obzirom na to da je pT stadijum imao veću prediktivnu vrednost od invazivnosti tumora, a specifična pozitivna porodična anamneza veću prediktivnu vrednost u odnosu na pozitivnu porodičnu anamnezu koja je uključivala i druge bolesti pored karcinoma mokraćne bešike, ove dve promenljive su isključene iz multivarijantnog modela. Kao nezavisni prediktori u multivarijantnom modelu ($F=10,543$, $p < 0,001$) koji predviđa 5,9% varijanse broja recidiva, dobijeni su izloženost karcinogenima ($p < 0,001$) i pozitivna porodična anamneza za UKMB ($p < 0,05$) (Tabeča 33).

Tabela 33. Standardna linearna regresiona analiza prediktora broja recidiva

	Univarijantna		Multivarijantna	
	B (95% CI za B)	p	B (95% CI za B)	p
Gradus (HG)	-0,287 (-0,437—0,136)	0,000	-0,143 (-0,327-0,041)	0,128
Stadijum (invazivni)	-0,331 (-0,510—0,152)	0,000		
pT stadijum (pTa-pT4)	-0,167 (-0,250—0,083)	0,000	-0,093 (-0,194-0,009)	0,075
Izloženost karcinogenima (da)	0,671 (0,389-0,952)	0,000	0,581 (0,299-0,862)	0,000
Pozitivna porodična anamneza (da)	0,274 (0,037-0,512)	0,024		
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	0,587 (0,142-1,032)	0,010	0,547 (0,113-0,982)	0,014

4.8 Ukupno preživljavanje

U periodu do 5 godina nakon uključivanja u istraživanje, umrlo je ukupno 256 (41,8%) pacijenta, od toga je u 178 slučajeva (69,5%), smrt bila direktna posledica UKMB. Smrt se prosečno javljala nakon 23,65±14,32 meseci.

Ukupan mortalitet je bio povezan sa starijom životnom dobi pacijenata ($p<0,001$), muškim polom ($p<0,05$), HG UKMB ($p<0,001$), invazivnim tumorima ($p<0,001$), odnosno višim pT stadijumom ($p<0,001$), tumorima sa divergentnom diferencijacijom ($p<0,001$), glandularnom ($p<0,05$) ili skvamoznom ($p<0,001$), ali bez mikrocistične diferencijacije ($p<0,05$), zatim odsustvo pušenja ($p<0,01$) ili izloženosti karcinogenima ($p<0,001$), dizuričnim tegobama kao 1. simptomom ($p<0,01$) i odsustvom pozitivne porodične anamneze ($p<0,01$). Takođe, smrtnost je bila veća kod pacijenata lečenih radikalnom cistektomijom, parcijalnom resekcijom, radioterapijom, hemioterapijom sa radioterapijom i radikalnom cistektomijom sa hemio/radioterapijom, a manja kod pacijenata lečenih sa TUR+BCG ($p<0,001$). Osim toga, preminuli pacijenti češće nisu imali recidive ($p<0,001$), odnosno u prvoj ($p<0,001$) ili prve dve godine ($p<0,001$) ili su imali manji broj recidiva ($p<0,001$) (Tabela 34).

Mortalitet je bio viši među pacijentima sa pozitivnom tumorskom ekspresijom NOTCH3 ($p<0,01$), odnosno manja kod tumora sa pozitivnom ekspresijom HIF1 α ($p<0,01$) i VEGFR1 ($p<0,05$) (Tabela 35).

Univarijantnom binarnom logističkom regresionom analizom je izdvojen niz prediktora mortaliteta: veća starost, muški pol, HG, invazivni tumori, odnosno viši pT stadijum, divergentna diferencijacija, glandularna ili skvamozna, odsustvo etioloških faktora kao što su pušenje ili ekspozicija karcinogenima, dizurične tegobe kao prvi simptom, negativna porodična anamneza, svi vidovi terapije u odnosu na TUR+BCG, odsustvo recidiva (uključujući i pojavu u prvoj ili prve dve godine nakon dijagnoze) ili manji broj recidiva, pozitivna ekspresija NOTCH3 i negativna ekspresija HIF1 α i VEGFR1, kao i veća gustina malih krvnih sudova. U

multivarijantnom modelu koji sa udelom od 42,8-57,9% predviđa pojavu smrtnog ishoda ($\chi^2=178,029$, $p<0,001$), izdvojeno je 6 nezavisnih prediktora mortaliteta. Sa svakih 10 godina veće starosti bolesnika, rizik se povećava 1,7 puta ($p<0,01$). Visok gradus tumora je povezan sa 3,5 puta većim rizikom ($p<0,001$). Sa svakim višim pT stadijumom rizik se povećava 2,2 puta ($p<0,01$). Nepušači su u 2,7 puta većem riziku od smrtnog ishoda ($p<0,01$). Recidivantnost smanjuje rizik 4,6 puta ($p<0,001$). U odnosu na lečenje sa TUR+BCG, kod pacijenata lečenih parcijalnom resekcijom rizik je 9,3 puta veći ($p<0,05$), radikalnom cistektomijom 6,2 puta veći ($p<0,01$), radioterapijom 8,1 puta veći ($p<0,01$) (Tabela 36).

Tabela 34. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike u odnosu na ukupan mortalitet

	Ne	Da	t* ili χ^{2***} ili Z*** (p)
Starost (godine)	63,89±10,47	70,33±7,30	8,971 (0,000)*
Pol (muški)	263 (73,7%)	208 (81,3%)	4,397 (0,033)**
Gradus (HG)	89 (24,9%)	174 (68,0%)	110,986 (0,000)**
Stadijum (invazivni)	24 (6,7%)	114 (44,5%)	120,016 (0,000)**
pT stadijum			
pTa	165 (46,2%)	26 (10,2%)	12,290 (0,000)***
pT1	168 (47,1%)	116 (45,3%)	
pT2	19 (5,3%)	85 (33,2%)	
pT3	3 (0,8%)	19 (7,4%)	
pT4	2 (0,6%)	10 (3,9%)	
Divergentna diferencijacija (da)	28 (7,8%)	44 (17,2%)	11,673 (0,001)**
Glandularna diferencijacija (da)	3 (0,8%)	9 (3,5%)	4,253 (0,034)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	9 (2,5%)	0 (0,0%)	4,923 (0,012)**
Skvamozna diferencijacija (da)	18 (5,0%)	35 (13,7%)	12,986 (0,000)**
Carcinoma in situ (da)	16 (4,5%)	21 (8,2%)	3,014 (0,060)**
Pušenje (da)	140 (72,5%)	73 (57,9%)	6,683 (0,008)**
Izloženost karcinogenima (da)	39 (10,9%)	7 (2,7%)	13,252 (0,000)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	308 (86,3%)	209 (81,6%)	2,086 (0,143)**
Dizurične tegobe kao prvi simptom (da)	32 (9,0%)	42 (16,4%)	7,095 (0,008)**
Pozitivna porodična anamneza (da)	51 (14,3%)	18 (7,0%)	7,145 (0,006)**
UKMB u porodičnoj anamnezi (da)	12 (3,4%)	6 (2,3%)	0,243 (0,629)**
Endemsko područje za BEN (da)	39 (10,9%)	35 (13,7%)	0,817 (0,317)**
Terapija			
TUR	68 (19,0%)	48 (18,8%)	206,013 (0,000)**
TUR+BCG	245 (68,6%)	48 (18,8%)	
Parcijalna resekcija	3 (0,8%)	7 (2,7%)	
Radikalna cistektomija	15 (4,2%)	53 (20,7%)	
Hemioterapija	12 (3,4%)	8 (3,1%)	
Radioterapija	8 (2,2%)	59 (23,0%)	
Hemioterapija + radioterapija	4 (1,1%)	21 (8,2%)	
Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	2 (0,6%)	12 (4,7%)	
Recidiv (da)	171 (47,9%)	50 (19,5%)	50,818 (0,000)**
Recidiv u prvoj godini (da)	108 (30,3%)	38 (14,8%)	18,668 (0,000)**
Recidiv u prve dve godine (da)	145 (40,6%)	47 (18,4%)	33,306 (0,000)**
Recidiv (N)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-0,0)	7,425 (0,000)***

* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnijev U-test

Tabela 35. Ekspresija analiziranih IHC markera i gustina malih krvnih sudova u odnosu na mortalitet

	Ne	Da	χ^2 * ili Z** (p)
JAG1 C/M (pozitivna ekspresija)	194 (54,8%)	144 (56,5%)	0,106 (0,741)*
JAG1 N (pozitivna ekspresija)	280 (79,1%)	209 (82,3%)	0,763 (0,352)*
JAG1 C/M i N (pozitivna ekspresija)	142 (40,1%)	112 (44,1%)	0,807 (0,359)*
JAG1 C/M i N (negativna ekspresija)	22 (6,2%)	14 (5,5%)	0,040 (0,732)*
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	200 (57,0%)	168 (68,3%)	7,357 (0,006)*
HIF1 α (pozitivna ekspresija)	134 (37,5%)	68 (26,6%)	7,635 (0,005)*
VEGF (pozitivna ekspresija)	237 (66,4%)	181 (70,7%)	1,089 (0,291)*
VEGFR1 (pozitivna ekspresija)	255 (71,4%)	162 (63,3%)	4,183 (0,035)*
MVD na 2mm ²	115,0 (90,5-160,0)	130,0 (100,0-201,0)	1,824 (0,068)**

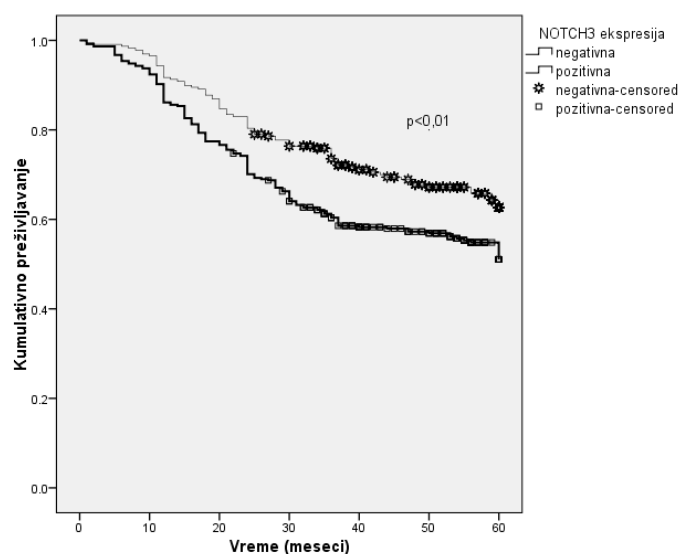
* χ^2 -test; ** Man-Vitnijev U-test

Tabela 36. Binarna logistička regresiona analiza prediktora mortaliteta

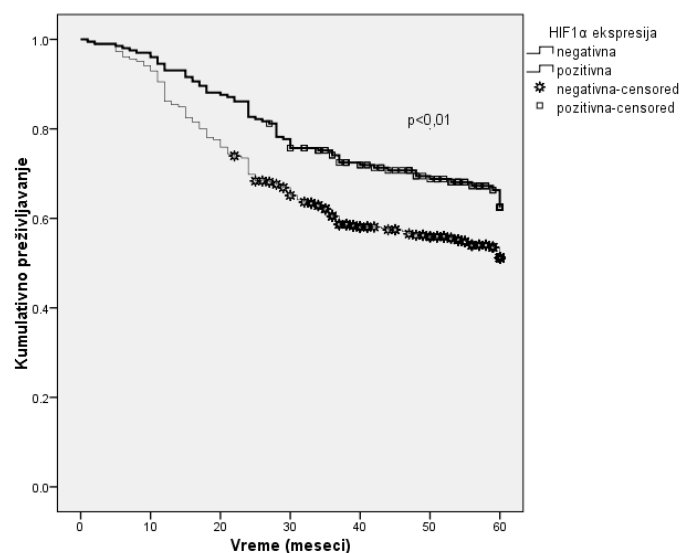
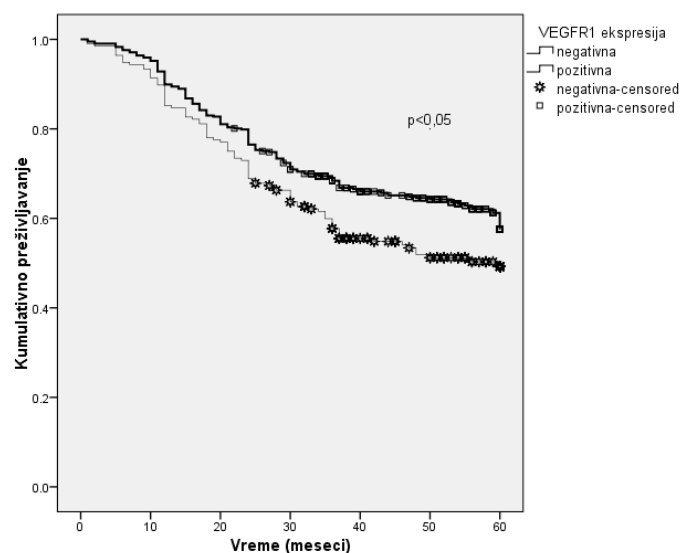
	Univarijantna		Multivarijantna		
	OR (95% CI za OR)	p	OR (95% CI za OR)	p	
Starost (godine)	1,080 (1,059-1,101)	0,000	1,055 (1,013-1,098)	0,010	
Pol (ženski)	0,646 (0,436-0,956)	0,029			
Gradus (HG)	6,390 (4,478-9,118)	0,000	3,501 (1,679-7,032)	0,001	
Stadijum (invazivni)	11,139 (6,879-18,038)	0,000			
pT stadijum (pTa-pT4)	4,255 (3,231-5,604)	0,000	2,218 (1,312-3,750)	0,003	
Divergentna diferencijacija (da)	2,439 (1,473-4,038)	0,001			
Glandularna diferencijacija (da)	4,300 (1,152-16,042)	0,030			
Skvamozna diferencijacija (da)	2,983 (1,648-5,398)	0,000	1,811 (0,631-5,196)	0,269	
Pušenje (da)	0,521 (0,324-0,838)	0,007	0,376 (0,183-0,775)	0,008	
Ekspozicija karcinogenima (da)	0,229 (0,101-0,521)	0,000			
Dizurične tegobe kao prvi simptom (da)	1,993 (1,220-3,258)	0,006			
Pozitivna porodična anamneza (da)	0,454 (0,258-0,797)	0,006	0,561 (0,220-1,430)	0,226	
Terapija	TUR	3,603 (2,225-5,834)	0,000	1,576 (0,700-3,550)	0,272
(vs.	Parcijalna resekcija	11,910 (2,974-47,693)	0,000	9,309 (1,053-82,309)	0,045
TUR+BCG)	Radikalna cistektomija	18,035 (9,402-34,594)	0,000	6,180 (1,864-20,491)	0,003
	Hemioterapija	3,403 (1,321-8,769)	0,011	0,272 (0,039-1,904)	0,190
	Radioterapija	37,643 (16,904-83,829)	0,000	8,052 (2,206-29,386)	0,002
	Hemioterapija+ radioterapija	26,797 (8,804-81,564)	0,000	1,639 (0,339-7,923)	0,539
	Radikalna cistektomija+ radio/hemioterapija	30,625 (6,641-141,231)	0,000	6,846 (0,633-74,022)	0,113
Recidiv (da)	0,264 (0,182-0,383)	0,000	0,215 (0,102-0,457)	0,000	
Recidiv u prvoj godini (da)	0,402 (0,266-0,607)	0,000			
Recidiv u prve dve godine (da)	0,329 (0,225-0,481)	0,000			
Recidiv (N)	0,437 (0,344-0,556)	0,000			
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	1,626 (1,155-2,289)	0,005			
HIF1 α (pozitivna ekspresija)	0,602 (0,424-0,855)	0,005			
VEGFR1 (pozitivna ekspresija)	0,689 (0,489-0,971)	0,033	1,434 (0,714-2,882)	0,311	
MVD na 2mm ²	1,004 (1,000-1,008)	0,040			

Tabela 37. Cox-regresiona analiza ukupnog preživljavanja

	Univarijantna		Multivarijantna		
	HR (95% CI za HR)	p	HR (95% CI za HR)	p	
Starost (godine)	1,051 (1,036-1,065)	0,000			
Pol (ženski)	0,711 (0,519-0,973)	0,033	0,732 (0,437-1,226)	0,236	
Gradus (HG)	4,433 (3,399-5,781)	0,000	2,639 (1,558-4,468)	0,000	
Stadijum (invazivni)	5,092 (3,957-6,552)	0,000			
pT stadijum (pTa-pT4)	2,181 (1,955-2,434)	0,000	1,500 (1,116-2,015)	0,007	
Divergentna diferencijacija (da)	1,976 (1,426-2,737)	0,000			
Glandularna diferencijacija (da)	2,518 (1,294-4,901)	0,007	0,417 (0,079-2,202)	0,303	
Skvamozna diferencijacija (da)	2,219 (1,552-3,173)	0,000	1,558 (0,896-2,709)	0,117	
Carcinoma in situ (da)	1,645 (1,051-2,763)	0,029	0,583 (0,295-1,151)	0,120	
Pušenje (da)	0,608 (0,427-0,866)	0,006	0,404 (0,256-0,638)	0,000	
Izloženost karcinogenima (da)	0,289 (0,136-0,613)	0,001			
Dizurične tegobe kao prvi simptom (da)	1,675 (1,203-2,333)	0,002			
Pozitivna porodična anamneza (da)	0,532 (0,330-0,859)	0,010			
Terapija (vs. TUR)	TUR+BCG	3,000 (2,010-4,476)	0,000	1,601 (0,911-2,816)	0,102
	Parcijalna resekcija	7,779 (3,518-17,200)	0,000	5,077 (1,691-15,245)	0,004
	Radikalna cistektomija	9,038 (6,102-13,387)	0,000	2,522 (1,334-4,769)	0,004
	Hemioterapija	2,955 (1,398-6,248)	0,005	0,464 (0,105-0,02,043)	0,310
	Radioterapija	10,561 (7,175-15,546)	0,000	2,627 (1,400-4,927)	0,003
	Hemioterapija + radioterapija	9,815 (5,852-16,461)	0,000	2,458 (0,956-6,317)	0,062
	Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	9,715 (5,142-16,461)	0,000	3,045 (0,819-11,313)	0,096
Recidiv (da)	0,305 (0,224-0,416)	0,000	0,289 (0,178-0,468)	0,000	
Recidiv u prvoj godini (da)	0,442 (0,313-0,624)	0,000			
Recidiv u prve dve godine (da)	0,369 (0,269-0,507)	0,000			
Recidiv (N)	0,470 (0,381-0,580)	0,000			
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	1,497 (1,144-1,958)	0,003	1,482 (0,952-2,308)	0,081	
HIF1 α (pozitivna ekspresija)	0,650 (0,493-0,858)	0,002			
VEGFR1 (pozitivna ekspresija)	0,736 (0,571-0,949)	0,018			
MVD na 2mm ²	1,003 (1,000-1,005)	0,023			



Slika 31. Kaplan-Majerova kriva ukupnog preživljavanja u odnosu na ekspresiju NOTCH3

Slika 32. Kaplan-Majerova kriva ukupnog preživljavanja u odnosu na ekspresiju HIF1 α 

Slika 33. Kaplan-Majerova kriva ukupnog preživljavanja u odnosu na ekspresiju VEGFR1

4.9 UKMB SPECIFIČNI MORTALITET

Od ukupno 256 umrlih (41,8%), u 178 slučajeva (69,5%) smrt je smatrana direktnom posledicom karcinoma mokraćne bešike. Ostali poznati uzroci smrti su bili: kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti (12,9%), druge maligne bolesti (6,2%), starost (7,0%) i trauma (1,6%). UKMB-specifična smrt je prosečno nastupala 19,5 (12,0-28,0) meseci nakon dijagnoze.

UKMB-specifičan mortalitet je bio povezan sa starijom životnom dobi pacijenata ($p < 0,001$), invazivnim tumorima ($p < 0,001$), odnosno višim pT stadijumom ($p < 0,001$), HG UKMB ($p < 0,001$), UKMB sa divergentnom diferencijacijom ($p < 0,001$), pre svega

skvamoznom ($p < 0,001$), sa CIS ($p < 0,05$), zatim odsustvom pušenja ($p < 0,01$) ili izloženosti karcinogenima ($p < 0,01$), kliničkom prezentacijom dizuričnim tegobama kao prvim simptomom ($p < 0,01$), a ne bezbolnom hematurijom ($p < 0,05$). Takođe, smrtnost je bila veća kod pacijenata lečenih radikalnom cistektomijom, parcijalnom resekcijom, radioterapijom, hemioterapijom sa radioterapijom i radikalnom cistektomijom sa hemio/radioterapijom, a manja kod pacijenata lečenih sa TUR ili TUR+BCG ($p < 0,001$). Osim toga, preminuli pacijenti češće nisu imali recidive ($p < 0,001$), odnosno u prvoj ($p < 0,001$) ili prve dve godine ($p < 0,001$), ili su imali manji broj recidiva ($p < 0,001$) (Tabela 38).

Tabela 38. Osnovne karakteristike pacijenata i uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne beške u odnosu na UKMB-specifični mortalitet

	Ne	Da	t* ili χ^2 ** ili Z*** (p)
Starost (godine)	65,34±10,52	69,62±6,93	5,922 (0,000)*
Pol (muški)	328 (75,4%)	143 (80,3%)	1,462 (0,207)**
Gradus (HG)	120 (27,6%)	143 (80,3%)	141,339 (0,000)**
Stadijum (invazivni)	37 (8,5%)	101 (56,7%)	465,722 (0,000)**
pT			
pTa	187 (43,0%)	4 (2,2%)	13,497 (0,000)***
stadijum			
pT1	211 (48,5%)	73 (41,0%)	
pT2	27 (6,2%)	77 (43,3%)	
pT3	5 (1,1%)	17 (9,6%)	
pT4	5 (1,1%)	7 (3,9%)	
Divergentna diferencijacija (da)	37 (8,5%)	35 (19,7%)	14,111 (0,000)**
Glandularna diferencijacija (da)	6 (1,4%)	6 (3,4%)	1,676 (0,117)**
Mikrocistična diferencijacija (da)	9 (2,1%)	0 (0,0%)	2,444 (0,065)**
Skvamozna diferencijacija (da)	25 (5,7%)	28 (15,7%)	14,700 (0,000)**
Carcinoma in situ (da)	20 (4,6%)	17 (9,6%)	4,625 (0,025)**
Pušenje (da)	161 (71,2%)	52 (55,9%)	6,301 (0,009)**
Izloženost karcinogenima (da)	41 (9,4%)	5 (2,8%)	7,042 (0,004)**
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	376 (96,4%)	141 (79,2%)	4,458 (0,028)**
Dizurija kao prvi simptom (da)	41 (9,4%)	33 (18,5%)	9,045 (0,003)**
Porodnična anamneza (da)	55 (12,6%)	14 (7,9%)	2,429 (0,093)**
UKMB u porodničnoj anamnezi (da)	13 (3,0%)	5 (2,8%)	0,000 (1,000)**
Endemsko područje za BEN (da)	49 (11,3%)	25 (14,0%)	0,677 (0,341)**
Terapija			
TUR	100 (23,0%)	21 (11,8%)	259,707 (0,000)**
TUR+BCG	272 (62,5%)	16 (9,0%)	
Parcijalna resekcija	4 (0,9%)	6 (3,4%)	
Radikalna cistektomija	25 (5,7%)	43 (24,2%)	
Hemioterapija	13 (3,0%)	7 (3,9%)	
Radioterapija	13 (3,0%)	54 (30,3%)	
Hemioterapija + radioterapija	6 (1,4%)	19 (10,7%)	
Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	2 (0,5%)	12 (6,7%)	
Recidiv (da)	184 (42,3%)	37 (20,8%)	24,431 (0,000)**
Recidiv u prvoj godini (da)	120 (27,6%)	26 (14,6%)	11,023 (0,001)**
Recidiv u prve dve godine (da)	157 (36,1%)	35 (19,7%)	15,095 (0,000)**
Recidiv (N)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-0,0)	5,287 (0,000)***

* Studentov t-test; ** χ^2 -test; *** Man-Vitnijev U-test

UKMB-specifični mortalitet je bio viši među pacijentima sa pozitivnom tumorskom ekspresijom NOTCH3 ($p < 0,01$), odnosno manja kod tumora sa pozitivnom ekspresijom VEGFR1 ($p < 0,05$) (Tabela 39).

Tabela 39. Ekspresija analiziranih IHC markera i gustina malih krvnih sudova u odnosu na UKMB-specifični mortalitet

	Ne	Da	χ^2 * ili Z** (p)
JAG1 C/M (pozitivna ekspresija)	238 (55,2%)	100 (56,2%)	0,016 (0,858)*
JAG1 N (pozitivna ekspresija)	347 (80,5%)	142 (80,2%)	0,000 (1,000)*
JAG1 C/M i N (pozitivna ekspresija)	178 (41,3%)	76 (42,9%)	0,079 (0,718)*
JAG1 C/M i N (negativna ekspresija)	24 (5,6%)	12 (6,7%)	0,136 (0,574)*
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	247 (58,0%)	121 (70,8%)	7,896 (0,004)*
HIF1α (pozitivna ekspresija)	152 (34,9%)	50 (28,1%)	2,383 (0,108)*
VEGF (pozitivna ekspresija)	289 (66,4%)	129 (72,5%)	1,852 (0,153)*
VEGFR1 (pozitivna ekspresija)	309 (71,0%)	108 (60,7%)	5,766 (0,013)*
MVD na 2mm²	118,0 (91,0-160,0)	131,5 (99,2-201,8)	1,652 (0,098)**

* χ^2 -test; ** Man-Vitnijev U-test

Univarijantnom binarnom logističkom regresionom analizom je izdvojen niz prediktora UKMB-specifičnog mortaliteta: veća starost, viši pT stadijum, visok gradus, prisustvo divergentne diferencijacije, pre svega skvamozne, prisustan *carcinoma in situ*, odsustvo pušenja ili ekspozicije karcinogenima kao etiološki faktori, dizurija kao prvi simptom, a ne bezbolna hematurija, svi vidovi terapije u odnosu na TUR+BCG, odsustvo recidiva (uključujući i pojavu u prvoj ili prve dve godine nakon dijagnoze) ili manji broj recidiva, pozitivna ekspresija NOTCH3 i negativna ekspresija VEGFR1, kao i veća gustina malih krvnih sudova. U multivarijantnom modelu koji sa udelom od 37,4-53,6% predviđa pojavu smrtnog ishoda ($\chi^2=146,792$, $p < 0,001$), izdvojeno je 7 nezavisnih prediktora mortaliteta. Visok gradus tumora je povezan sa 2,5 puta većim rizikom ($p < 0,05$). Invazivnost tumora nosi 3,9 puta veći rizik ($p < 0,01$). Prisustvo *carcinoma in situ* smanjuje rizik 5,0 puta ($p < 0,05$). Nepušači su u 3,3 puta većem riziku od smrtnog ishoda ($p < 0,01$). Sa svakim novim recidivom rizik se smanjuje 1,8 puta ($p < 0,01$). U odnosu na lečenje sa TUR+BCG, kod pacijenata lečenih parcijalnom resekcijom rizik je 10,7 puta veći ($p < 0,05$), radikalnom resekcijom 3,6 puta veći ($p < 0,05$), radioterapijom 13,4 puta veći ($p < 0,001$), a radikalnom cistektomijom sa hemio/radioterapijom 59,5 puta veći ($p < 0,05$). Pozitivna ekspresija NOTCH3 u tumoru povećava verovatnoću UKMB-specifičnog smrtnog ishoda 2,7 puta ($p < 0,05$) (Tabela 40).

Tabela 40. Binarna logistička regresiona analiza prediktora UKMB-specifičnog mortaliteta

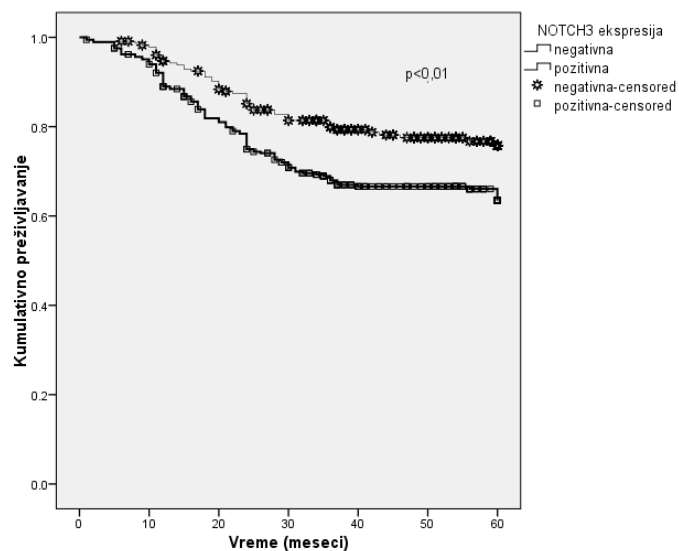
	Univarijantna		Multivarijantna	
	OR (95% CI za OR)	p	OR (95% CI za OR)	p
Starost (godine)	1,050 (1,029-1,071)	0,000	1,026 (0,984-1,070)	0,226
Gradus (visok)	10,725 (7,010-16,406)	0,000	2,524 (1,163-5,478)	0,019
Stadijum (invazivni)	14,110 (9,008-22,101)	0,000	3,935 (1,572-9,845)	0,003
pT stadijum (pTa-pT4)	5,090 (3,763-6,884)	0,000		
Divergentna diferencijacija (da)	2,633 (1,597-4,31)	0,000		
Skvamozna diferencijacija (da)	3,061 (1,730-5,418)	0,000	1,484 (0,527-4,179)	0,455
Carcinoma in situ (da)	2,191 (1,119-4,289)	0,022	0,202 (0,052-0,783)	0,021
Pušenje (da)	0,512 (0,310-0,845)	0,009	0,302 (0,140-0,651)	0,002
Ekspozicija karcionogenima (da)	0,278 (0,108-0,715)	0,008		
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	0,598 (0,380-0,942)	0,027		
Dizurija kao prvi simptom (da)	2,187 (1,331-3,593)	0,002	0,424 (0,119-1,505)	0,184
Terapij	TUR	2,072 (1,040-4,130)	1,003 (0,392-2,564)	0,995
a (vs.	Parcijalna resekcija	19,429 (5,083-74,256)	10,740 (1,052-109,605)	0,045
TUR+	Radikalna cistektomija	22,278 (11,476-43,248)	3,611 (1,249-10,443)	0,018
BCG)	Hemioterapija	6,974 (2,514-19,350)	1,102 (0,181-6,713)	0,916
	Radioterapija	53,802 (25,394-113,989)	13,433 (3,479-51,865)	0,000
	Hemioterapija+ radioterapija	41,016 (14,797-113,693)	2,620 (0,477-14,397)	0,268
	Radikalna cistektomija+ radio/hemioterapija	77,714 (16,308-370,338)	59,507 (3,334-1062,194)	0,017
Recidiv (da)	0,358 (0,238-0,539)	0,000		
Recidiv u prvoj godini (da)	0,449 (0,282-0,716)	0,001		
Recidiv u prve dve godine (da)	0,433 (0,285-0,658)	0,000		
Recidiv (N)	0,492 (0,376-0,643)	0,000	0,553 (0,357-0,856)	0,008
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	1,754 (1,197-2,569)	0,004	2,721 (1,194-6,201)	0,017
VEGFR1 (pozitivna ekspresija)	0,629 (0,437-0,906)	0,013	0,647 (0,313-1,339)	0,240
MVD na 2mm²	1,004 (1,000-1,007)	0,047		

Univarijantnom Cox-regresionom analizom izdvojeni su faktori rizika za smrtni događaj uzrokovan UKMB: veća starosna dob, muški pol, invazivni tumori, viši pT stadijum, HG UKMB, prisustvo divergentne diferencijacije, glandularne ili skvamozne, *carcinoma in situ*, odsustvo pušenja i izloženosti karcinogenima, negativna porodična anamneza, dizurija kao prvi simptom UKMB, odsustvo recidiva (u prvoj, prve dve ili pet godina nakon dijagnoze) ili manji broj recidiva, pozitivna ekspresija NOTCH3 (Slika 31), a negativna ekspresija HIF1 α (Slika 32) i VEGFR1 (Slika 33), kao i veća gustina malih krvnih sudova. Osim toga, svi vidovi lečenja u poređenju sa TUR+BCG skraćuju preživljavnje. Kao nezavisni prediktori u multivarijantnom modelu ($\chi^2=190,671$, $p<0,001$) dobijeni su visok gradus tumora (HR=3,1, $p<0,001$), viši T stadijum (HR=1,4, $p<0,05$), odsustvo *carcinoma in situ* (HR=2,2, $p<0,05$), nepušači (HR=2,3, $p<0,001$), odsustvo recidiva (HR=2,5, $p<0,001$), pozitivna ekspresija NOTCH3 (HR=1,8, $p<0,05$), kao i različiti vidovi terapije u odnosu na TUR+BCG – parcijalna resekcija (HR=8,4, $p<0,001$), radikalna cistektomija (HR=3,2, $p<0,01$), radioterapija (HR=4,6,

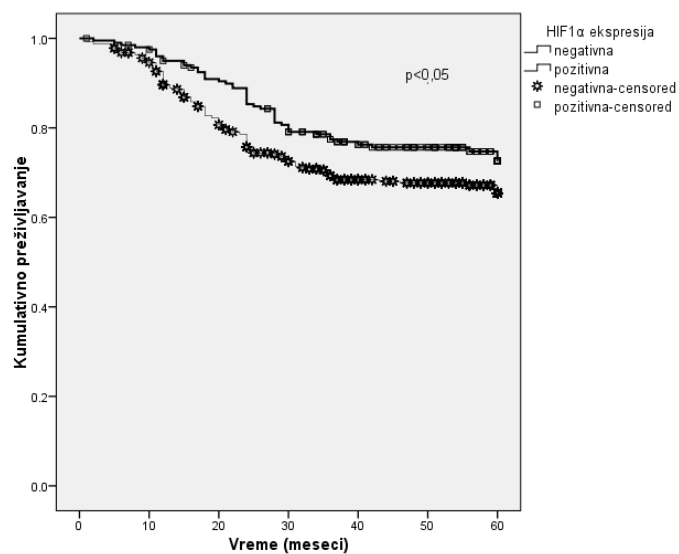
p<0,001), radioterapija+hemioterapija (HR=3,4, p<0,05) i radikalna cistektomija sa radio/hemioterapijom (HR=8,2, p<0,01) (Tabela 41).

Tabela 41. Cox-regresiona analiza UKMB-specifičnog preživljavanja

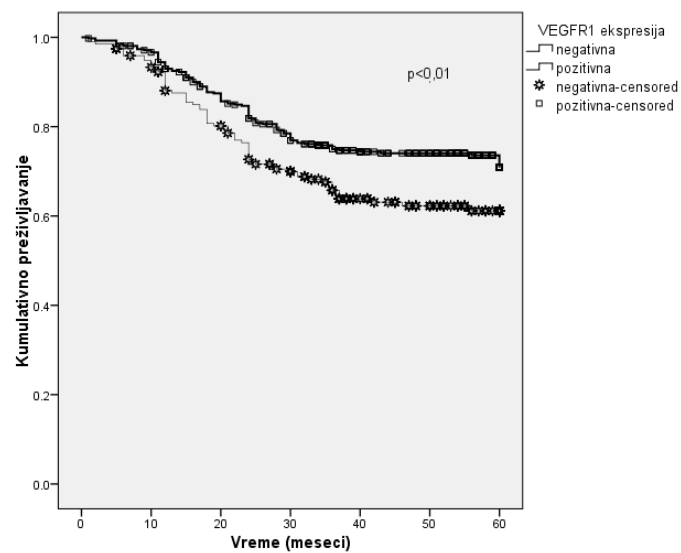
	Univarijantna		Multivarijantna		
	HR (95% CI za HR)	p	HR (95% CI za HR)	p	
Starost (godine)	1,041 (1,024-1,058)	0,000			
Gradus (HG)	8,126 (5,601-11,790)	0,000	3,060 (1,674-5,594)	0,000	
Stadijum (invazvni)	7,907 (5,845-10,697)	0,000			
pT stadijum (pTa-pT4)	2,522 (2,227-2,856)	0,000	1,414 (1,012-1,976)	0,042	
Divergentna diferencijacija (da)	2,241 (1,547-3,248)	0,000			
Glandularna diferencijacija (da)	2,336 (1,034-5,277)	0,041			
Skvamozna diferencijacija (da)	2,534 (1,691-3,798)	0,000			
Carcinoma in situ (da)	1,863 (1,129-3,074)	0,015	0,457 (0,210-0,993)	0,048	
Pušenje (da)	0,557 (0,370-0,839)	0,005	0,427 (0,272-0,669)	0,000	
Izloženost karcinogenima (da)	0,301 (0,124-0,733)	0,008			
Bezbolna hematurija kao prvi simptom (da)	0,653 (0,454-0,938)	0,021			
Dizurija kao prvi simptom (da)	1,889 (1,294-2,758)	0,001			
Terapija (vs. TUR)	TUR+BCG	2,274 (1,186-4,358)	0,013	1,463 (0,699-3,062)	0,312
	Parcijalna resekcija	15,028 (6,062-37,257)	0,000	8,369 (2,651-26,417)	0,000
	Radikalna cistektomija	16,190 (9,586-27,343)	0,000	3,181 (1,456-6,947)	0,004
	Hemioterapija	5,809 (2,469-13,670)	0,000	0,791 (0,177-3,535)	0,758
	Radioterapija	20,614 (12,390-34,294)	0,000	4,643 (2,322-9,245)	0,000
	Hemioterapija + radioterapija	18,814 (10,074-35,139)	0,000	3,354 (1,161-9,689)	0,025
	Radikalna cistektomija + hemio/radioterapija	20,665 (10,131-42,151)	0,000	8,187 (1,963-34,144)	0,004
Recidiv (da)	0,345 (0,240-0,496)	0,000	0,398 (0,237-0,668)	0,001	
Recidiv u prvoj godini (da)	0,444 (0,293-0,674)	0,000			
Recidiv u prve dve godine (da)	0,415 (0,287-0,602)	0,000			
Recidiv (N)	0,486 (0,378-0,623)	0,000			
NOTCH3 (pozitivna ekspresija)	1,666 (1,199-2,317)	0,002	1,761 (1,026-3,025)	0,040	
HIF1α (pozitivna ekspresija)	0,708 (0,511-0,982)	0,039	1,346 (0,829-2,184)	0,230	
VEGFR1 (pozitivna ekspresija)	0,671 (0,497-0,907)	0,009	0,733 (0,462-1,163)	0,187	
MVD na 2mm²	1,003 (1,000-1,005)	0,037			



Slika 34. Kaplan-Majerova kriva UKMB-specifičnog preživljavanja u odnosu na ekspresiju NOTCH3



Slika 35. Kaplan-Majerova kriva UKMB-specifičnog preživljavanja u odnosu na ekspresiju HIF1α



Slika 36. Kaplan-Majerova kriva UKMB-specifičnog preživljavanja u odnosu na ekspresiju VEGFR1

5 DISKUSIJA

Karcinom mokraćne bešike je deveti po učestalosti karcinom u svetu. Čest je malignitet starije populacije, a tri četvrtine pacijenata su muškarci. Urotelni karcinom je najčešći histološki tip i čini skoro 95% svih karcinoma mokraćne bešike. Papilarni tumori nastaju od hiperplastične promene, uglavnom su niskog histološkog gradusa sa intaktnom bazalnom membranom (pTa) ili sa invazijom subepitelnog tkiva, ali bez invazije mišićnog sloja (pT1). Klinički se prezentuju čestim recidivima i malom verovatnoćom progresije u visok histološki gradus. Infiltrativni, nepapilarni tumori se razvijaju na terenu teške displazije ili in situ karcinoma (CIS), karakterišu se visokim histološkim gradusom (HG) i afinitetom za penetraciju bazalne membrane i mišićnog sloja. Klinički pokazuju agresivno ponašanje i tendenciju ranom metastaziranju. Najvažniji faktori koji utiču na prognozu obolelih od karcinoma mokraćne bešike su stadijum bolesti, histološki gradus, histološka varijanta i prisustvo limfovaskularne invazije. Ipak, molekularna heterogenost karcinoma mokraćne bešike je jedan od razloga različite prezentacije tumora, na početku bolesti i u svakom sledećem recidivu, kao i varijabilnog odgovora na terapiju.

Neoangiogeneza je ključni proces tokom razvoja malignog oboljenja, progresije i pojave metastaza. Gustina malih krvnih sudova (MVD) direktan je pokazatelj angiogenih aktivnosti u tumoru, povezana je sa kliničko-patološkim karakteristikama i utiče na prognozu kod pacijenata sa UKMB. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) ima glavnu ulogu u formiranju novih krvnih sudova, obavljajući svoju funkciju vezivanjem za receptore (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VEGFR4). Visoki nivoi VEGF u serumu i urinu kod pacijenata sa neinvazivnim UKMB ukazuju na dubinu invazije, kraće vreme do sledećeg recidiva i goru prognozu. U ovom istraživanju VEGF se ekspimirao u 418 uzoraka, ali je njegovo prisustvo značajno povezano samo sa uzorcima iz BEN regija i nepušačima.

VEGFR1 je lažni receptor za VEGF, kompetitivno vezuje VEGF u odnosu na pravi VEGFR2 receptor, dok se VEGFR3 ekspimirira dominantno na endotelnim ćelijama limfatika, reaguje na stimulaciju VEGF, ali je ključni medijator u limfangiogenezi. VEGF signali koji su

najvažniji za migraciju i proliferaciju endotelnih ćelija mogu biti utišani ukoliko se aktivira NOTCH signalni put, koji limitirajući transkripciju VEGF receptora može kontrolisati nastajanje novih krvnih sudova. U tumorima u kojima se pojačano eksprimira VEGFR1, angiogeneza je limitirana uprkos pojačanom stvaranju VEGF. Tumori u kojima se pojačano ekspimiraju HIF1 α , VEGFR1, VEGF i NOTCH3, su hipoksični a angiogeni switch je u blokadi od strane lažnog VEGFR1 receptora i antiangiogene dominacije NOTCH3 receptora. Tumorske ćelije u početku uspevaju da opstanu u takvoj sredini, prelaze na anaerobni metabolizam, a kad ne uspeju da se adaptiraju na novonastale uslove mikrookoline, beže iz hipoksične sredine sticanjem EMT karakteristika. Proces EMT je jedinstveni proces u kome epitelne ćelije podležu izuzetnim morfološkim promenama i kaldrmasti epitelni izgled menjaju u elongirani, fibroblastni/mezenhimalni fenotip, što im omogućava pojačanu pokretljivost i invaziju (161). Tokom dobijanja EMT karakteristika, ćelije gube epitelne ćelijsko-ćelijske spojeve, nastaje reorganizacija citoskeleta i ekspimiraju se proteini promoteri ćelijsko-ćelijskih kontakata kao što su Ecadherin i γ -catenin, mezenhimalni markeri, kao što su vimentin, fibronectin, α -smooth muscle actin, N-cadherin i pojačava se aktivnost matriksnih metaloproteinaza što sve zbirno vodi u invazivniji fenotip (162). Tako nastaju najpre ćelije sa HG karakteristikama, invazivniji i na kraju metastatski klonovi. Prekomerna ekspresija VEGFR1 ukazuje na agresivniji klon tumorskih ćelija, pojavu recidiva i udaljenih metastaza, kao i kraće vreme preživljavanja pacijenata. U ovoj studiji je 417 UKMB ekspimiralo VEGFR1, a značajnije je bio pozitivan kod mlađih pacijenata, LG UKMB, pTa i pT1 stadijumima, UKMB bez divergentne diferencijacije i pacijenata koji su lečeni kombinacijom TUR i BCG. VEGFR1 se u ovom istraživanju izdvojio kao marker dobre prognoze što se delimično može objasniti time što VEGFR1 poseduje veći afinitet za vezivanje VEGF u odnosu na VEGFR2, i na taj način blokira potentnije receptore tako da angiogeni proces drži pod kontrolom i ne dozvoljava nekontrolisano bujanje i migraciju endotelnih ćelija, a samim tim ograničava rast i dalje širenje tumora. U studiji na 137 UKMB u pT1 stadijumu utvrđeno je da bolesnici sa HG UKMB i konkomitantnim CIS imaju ukupno manju stopu preživljavanja kao i manju ekspresiju VEGFR1. Bolesnici sa pozitivnim VEGFR1 imaju duži vremenski period bez recidiva i duže ukupno preživljavanje. Istraživanje je pokazalo da procena VEGFR1 ekspresije može biti dijagnostička dopuna za odabir bolesnika sa HG pT1 UKMB, kojima je neophodno intenzivnije praćenje, posebno ukoliko je prisutan i CIS (163).

Tkivna hipoksija otežava ćelijsku adaptaciju i klonsku selekciju, doprinosi genetskoj nestabilnosti i potencira epigenetske modifikacije, te se padu koncentracije kiseonika

opravdano daje uloga glavnog pokretača u procesu maligne transformacije. U takvoj hipoksijskoj mikrosredini povećana je ekspresija HIF1 α , koji je indirektno, aktivacijom preko 100 različitih gena, odgovoran za nastajanje agresivnijih tumorskih klonova, ćelijsku proliferaciju, migraciju i neoangiogenezu. Mnogi HIF1 α zavisni geni se u karcinomima više eksprimiraju nego u normalnim tkivima, naročito faktori rasta iz VEGF familije. Pojačano stvaranje HIF1 α je defanzivna reakcija tumorskih ćelija na hipoksiju. Prekomerna ekspresija HIF1 α dovodi do povećanog stvaranja VEGF. Rezultat je pojačana angiogeneza. Produkcijom veće količine VEGF od strane tumorskih ćelija podstaknuta je proliferacija endotelnih ćelija i konačno nicanje novih, mladih krvnih sudova. VEGF se vezuje za VEGFR1 u UKMB sa prekomernom ekspresijom VEGFR1. U takvoj mikrosredini, vezivanje VEGF za potentniji receptor VEGFR2 je ograničeno i svedeno na minimum. VEGFR2 je glavni receptor u procesu neoangiogeneze, a vezivanjem VEGF za VEGFR1 angiogeneza biva umerena ili atenuirana. HIF1 α direktno utiče na pojavu HG karakteristika u tumoru i invazivnijeg ponašanja, a sa druge strane indirektno može da limitira angiogenezu i otežava širenje tumora. U ovom istraživanju HIF1 α se izdvojio kao dobar prognostički marker, koji se pojačano eksprimira u papilarnim LG UKMB, nižeg pT stadijuma, prezentovanih bezbolnom hematurijom. Radijacija može indukovati HIF1 α kroz ubrzanu translaciju HIF1 α mRNA. Jonizujuća radijacija zahteva NO koji proizvode makrofagi u tumorskoj mikrookolini i stabilizuje HIF1 α kroz S-nitrozilaciju (164). Tumori koji ne ekspimiraju HIF1 α imaju smanjen rast i ne daju plućne metastaze. Pojačana ekspresija HIF1 α utiče na gubitak ekspresije E-cadherina, ćelijsko-ćelijskog adhezionog molekula što omogućava tumorskim ćelijama lakšu invaziju. Pozitivna ekspresija HIF1 α je učestalija u UKMB pacijenata ženskog pola, kod pacijenata koji nisu izloženi profesionalnim kancerogenima i kod pacijenata sa bezbolnom hematurijom, kao prvim simptomom UKMB. Ekspresija HIF1 α je povezana sa LG UKMB, superficijalnim UKMB i nižim pT stadijumom u trenutku dijagnoze. Radikalna cistektomija sa ili bez radioterapije/hemioterapije je značajno ređe neophodna kod UKMB u kojima se eksprimira HIF1 α .

Putem Notcha se šalju važni signali u ćelijskoj proliferaciji i diferencijaciji kako normalnih tako i tumorskih ćelija. Uloga Notch signalnog puta u kancerogenezi je vrlo kompleksna i determinisana je tipom tkiva, EMT i signalnim putevima koji su u tom trenutku aktivirani, tako da krajnji rezultat može biti ubedljivo proonkogen ili pak tumor supresoran. Otkriveno je četiri NOTCH receptora (NOTCH1-4), od kojih se NOTCH3 dovodi u vezu sa vaskulogenezom, hipoksijom i inflamacijom. Endotelni JAG1 može da modulira NOTCH3

signale potencirajući proangiogeni efekat, proliferaciju tumorskih ćelija i dediferencijaciju tumora. NOTCH3 se aktivira u hipoksiji, a NOTCH3-HIF1 α interakcija dovodi do hipoksijom indukovane rezistencije na radioterapiju. Prekomerna ekspresija NOTCH3 doprinosi rezistenciji na hemioterapiju, dok slaba ekspresija NOTCH3 ukazuje na dobar odgovor na protokole bazirane na cisplatinu. Zanimljivo je da se u UKMB Notch signalni put aktivira potpuno drugačije kod mišićno-invazivnih/infiltrativnih i superficijalnih tumora i ekspresiranje NOTCH3 receptora je potpuno suprotno, sa niskom aktivnošću u mišićno-invazivnim tumorima i vrlo visoke ekspresije u superficijalnim. Upoređujući ekspresiju NOTCH3 u urotelnom karcinomu i normalnom tkivu mokraćne bešike utvrđena je povećana ekspresija ovog proteina u tumorskim ćelijama, a prekomerna ekspresija je korelirala sa lošim ishodom bolesti. Naime, nagomilavanje NOTCH3 receptora na membrani tumorskih ćelija može biti koristan parametar za praćenje pacijenta. Lekovima (vorinostat; inhibitor histonske deacetilaze) indukovana acetilacija NOTCH3 sprečava ćelijsku proliferaciju i mogla bi biti efikasna target terapija kod mišićno-invazivnih tumora u kojima je prisutna pojačana ekspresija. Potpuna inaktivacija Notch signalnog puta u stratifikovanim epitelima dovodi do progresije tumora, a u UKMB do pojave invazivnijih ćelija, sarkomatoidnog fenotipa i polja sa divergentnom diferencijacijom. Veliki procenat UKMB ima deleciju dugog kraka hromozoma 9, gde su locirani *NOTCH1* i *JAGGED1*, a niski nivoi NOTCH1 i JAG1 povezani su sa kraćim ukupnim preživljavanjem. Smanjena ekspresija NOTCH1 i JAGGED1 dovodi se u vezu sa progresijom papilarnog HG UKMB, naročito u pT1 stadijumu. Ligand JAG1 gradi jaču vezu sa NOTCH3 receptorom, te se interakcija JAG1-NOTCH3 sve više ispituje u studijama koje se bave manipulacijama Notch signalnog puta (165-70). Pozitivna NOTCH3 ekspresija je povezana sa starijom životnom dobi pacijenata i anamnestičkim podatkom o odsustvu ekspozicije na profesionalne kancerogene. Ovo istraživanje je potvrđuje da je visoka ekspresija NOTCH3 učestalija u HG tumorima i UKMB sa konkomitantnim CIS. Ekspresija JAG1 liganda na membrani i u citoplazmi tumorskih ćelija UKMB je povezana sa starijom životnom dobi pacijenata i višim pT stadijumom UKMB. Iako je aberantna, jedarna ekspresija JAG1 liganda prisutna je u 80,4% UKMB, ali nije uočena značajna povezanost ni sa jednom karakteristikom UKMB pacijenata i tumora. Potpuno odsustvo JAG1 ekspresije je učestalije u UKMB sa divergentnom diferencijacijom. Ekspresija JAG1 na membrani i/ili citoplazmi, bez aberantne jedarne ekspresije, povezana je sa većom gustinom malih krvnih sudova. Gustina malih krvnih sudova u uzorku od 2mm² UKMB je značajno veća kod pacijentkinja u odnosu na pacijente muškog pola, infiltrativnih UKMB, UKMB sa divergentnom diferencijacijom, pre

svoga glandularnom diferencijacijom i prisutnim konkomitantnim CIS. Veća MVD korelira sa HG karakteristikama tumora, i ukazuje na agresivnije ponašanje iako nije nađena povezanost sa preživljavanjem. Prethodne studije su demonstrirale povezanost velike MVD sa HG, višim pT stadijumom i lošim ishodom bolesti (171, 172).

Međusobna povezanost ispitivanih signalnih puteva u UKMB ogleda se u povezanoj ekspresiji HIF1 α i VEGF, VEGF i JAG1, VEGFR1 i JAG1, VEGFR1 i NOTCH3, i HIF1 α i NOTCH3.

5.1 Prognostički faktori urotelnog karcinoma mokraćne bežike

Familijarna istorija bolesti nema prognostičku vrednost za neinvazivni UKMB (173). Najvažniji prognostički parametar za neinvazivni UKMB su histološki gradus i pojava recidiva. Kod HG UKMB recidivi se javljaju u 60% i stopa progresije u laminu propriju je 25%, a u muskularis propriju 5%. Multiple ili velike neoplazme (>5cm), prethodni recidivi, pridruženi CIS i kraći vremenski interval bez bolesti su faktori povezani sa većim rizikom od recidiva UKMB (174). U HG UKMB izrazita nuklearna anaplazija je udružena sa kraćim vremenom do recidiva i progresije. Multifokalne urotelne neoplazme, uključujući i lokalizacije van MB koreliraju sa stadijumom progresije i mortalitetom povezanim sa UKMB. Visok Ki-67 proliferativni indeks u kombinaciji sa ekspresijom p53, može prdvideti rizik za recidiv i progresiju, iako se IHC markeri ne rade u rutinskoj praksi (175, 176). Normalno se CK20 eksprimira samo u površnom (engl. *umbrella-cell*) sloju. Abnormalno CK20 bojenje čitave debljine epitela u UKMB korelira sa recidivom bolesti (177). Iako su molekularne studije poboljšale razumevanje biologije UKMB nijedan marker se nije pokazao dovoljno prognostičkim za ulazak u rutinsku kliničku praksu. S obzirom na poznate genetske razlike između invazivnog i neinvazivnog UKMB, svrstavanje pTa i pT1 neoplazmi u kategoriju površnih UKMB je verovatni uzrok promenljivih i oprečnih nalaza studije (178).

Ženski pol je povezan sa većim rizikom za recidiv bolesti, progresiju i mortalitet nakon primenjene terapije (179, 180). Podaci koji podržavaju androgenu regulaciju ćelijske metaboličke detoksikacije ukazuju na mogućnost pojave dva pogotka da bi se objasnila češća pojava UKMB kod muškaraca, i različita ekspresija odgovornih enzima za metabolizam kancerogena, uključujući i one u dimu cigareta. UKMB se mnogo češće javlja kod osoba muškog pola, što je potvrđeno i ovim istraživanjem na uzorku od 613 tumora. Seksualni steroidi kao potencijalni mehanizam za nastanak UKMB se mogu objasniti ekspresijom enzima

5 α -reduktaze, koja konvertuje testosteron u potentniji androgen dihidrotestosteron, koji je otkriven u UKMB. IHC analizom tkivnih mikroareja 224 uzoraka UKMB ustanovljeno je da se estrogen receptor (ER β izoforma) eksprimira u UKMB u 63%, a ekspresija je rasla sa višim pT stadijumom (181). Kod žena na povećanom riziku za UKMB je primećeno da imaju N-acetiltransferaza-2 spori fenotip acetilacije.

Nasuprot ER ekspresiji, ekspresija AR se smanjuje sa povećanjem pT stadijuma. Ekspresija AR je značajno niža u pT2 tumorima nego u pTa i pT1 tumorima, i u tumorima visokog gradusa u odnosu na LG tumore. Gubitak AR/ER α i povećanje ekspresije ER β su povezani sa UKMB visokog gradusa i višeg stadijuma. AR utiče na regulaciju BCG indukovane ekspresije IL-6 u ćelijama UKMB. Mitra i saradnici su utvrdili da nema specifičnih polnih razlika u vremenu preživljavanja bez recidiva, UKMB-specifičnom i ukupnom preživljavanju (182). U ovom istraživanju ženski pacijenti su se češće prezentovali u višem pT stadijumu sa HG tumorima, ali nije pokazan veći rizik za recidiv i progresiju bolesti u odnosu na pol. Rodno specifična anatomsko definicija je važna u pT4 stadijumu bolesti. pT4a kod muškaraca uključuje širenje tumora u prostatu, a kod žena ekstenziju u vaginu ili uterus. Tilki et al su u studiji na 583 lečenih radikalnom cistektomijom demonstrirali da je ženski pol nezavisno povezan sa značajno većim rizikom od recidiva bolesti (183). Nedavna meta analiza na 15 215 pacijenata sa HG pT1 UKMB je pokazala da je ženski pol povezan sa značajno većim rizikom od progresije bolesti, ali ne i sa rizikom od recidiva tumora ili karcinom-specifičnog preživljavanja (184). Prema podacima GLOBOCAN 2008 baze podataka povezanost polnih razlika i preživljavanja zabeležena je u nekim zemljama, dok u nekima nije nađena značajna povezanost (185). Nije nađena statistički značajna povezanost UKMB i izloženosti poznatim karcinogenima, kao što je profesionalna ekspozicija u industriji boja, lakova, metala, naftnih derivata (186).

5.2 Rizik za recidiv urotelnog karcinoma mokraćne bešike

Prognostička vrednost indeksa proliferacije je proučavana korišćenjem brojnih metodologija. Pokazano je da viši nivoi ćelijske proliferacije određivani konvencionalnim brojanjem mitozama, flow citometrijom, PCNA labeling-om, i određivanjem Ki-67 mitotskog indeksa koreliraju sa povećanim rizikom za recidiv. Mutacije FGFR3 su česte u neinvazivnim LG papilarnim UKMB i povezani su sa nižom stopom recidiva. Mutacije *P13K* gena su manje učestale i povezane su sa dužim vremenskim intervalom bez recidiva. *PTEN* delecije su

povezane sa povećanom stopom recidiva kod pTa UKMB (187). FISH studije u kojima su detektovane hromozomske alteracije u urinu su takođe pokazale sklonost recidivu nakon resekcije kod pacijenata sa normalnom citologijom urina.

U ovom istraživanju je prosečno vreme pojave prvog UKMB recidiva bilo nakon 9 meseci, a oko 60% pacijenata je imalo samo jedan recidiv. Pojava recidiva u prvoj godini nakon dijagnoze je bila češća kod mlađih pacijenata, pacijenata kod kojih je bezbolna hematurija prvi simptomom UKMB, LG UKMB i nižeg pT stadijuma. Recidivi su češći kod pacijenata lečenih samo TUR-om, a ređi kod pacijenata lečenih sa TUR i intravezikalnom instilacijom BCG, radioterapijom i radikalnom cistektomijom. Odsustvo ekspresije NOTCH3 ukazuje na pojavu recidiva u prvoj godini od dijagnoze UKMB. Prediktori jednogodišnjeg preživljavanja bez recidiva su starija životna dob, odsustvo bezbolne hematurije kao prvog simptoma UKMB i pozitivna ekspresija NOTCH3. Štaviše, naši rezultati su pokazali da je broj recidiva tokom perioda praćenja bio bolji prediktor preživljavanja specifičnog za UKMB u poređenju sa stanjem bez recidiva. Kao potencijalni prediktor preživljavanja, uključili smo ukupan broj recidiva. Otkrili smo da veći broj recidiva smanjuje rizik od smrti, svaki za 40%. Iako bi se očekivalo više recidiva kod pacijenata sa dužim preživljavanjem, pretpostavljamo da su recidivi bili razlog češće interakcije lekara i pacijenta i boljeg ukupnog lečenja, što je dovelo do dužeg preživljavanja. Među svim analiziranim parametrima, samo je incidencija recidiva bila povezana sa povećanim rizikom od novih recidiva. Slični nalazi su nedavno objavljeni (188). Veći broj recidiva tokom perioda praćenja povezan je sa nižim stadijumom tumora i pozitivnom porodičnom anamnezom.

Nije utvrđena statistički značajna povezanost ispitivanih IHC markera razlika u ekspresiji analiziranih IHC markera (JAG1, NOTCH3, HIF1 α , VEGF, VEGFR1) i gustine malih krvnih sudova u odnosu na pojavu recidiva.

5.3 Rizik za progresiju urotelnog karcinoma mokraćne bešike

Progresija bolesti je relativno retka kod LG UKMB, a podaci o prognostičkoj važnosti genetskih promena kod ovih tumora nedostaju. Molekularne promene koje su udružene sa povećanim rizikom za progresiju kod pTa UKMB obuhvataju akumulaciju p53, gubitak nuklearne p63 ekspresije, gubitak membranske ekspresije E-kaderina i *RB* delecije. Hromozomske alteracije 3p, 4p, Sp, 5q, 6q, 10q, 18q i LOH 16p13 su takođe prediktori progresije u mišićno invazivni UKMB (189, 190).

Ukupan mortalitet od UKMB je povezan je sa starijom životnom dobi pacijenata, muškim polom, invazivnim tumorima, odnosno višim pT stadijumom, HG UKMB, tumorima sa divergentnom diferencijacijom, glandularnom ili skvamoznom, i konkomitantnim CIS. Dodatne karakteristike UKMB koje ukazuju na povećani rizik od smrtnog događaja su veća gustina malih krvnih sudova, pozitivna ekspresija NOTCH3 i negativna ekspresija HIF1 α i VEGFR1. Recidivantnost UKMB smanjuje rizik od smrtnog ishoda približno 5 puta. Iako je mortalitet značajno niži kod pacijenata lečenih TUR-om i intravezikalnom instilacijom BCG u odnosu na sve druge terapijske modalitete, ovaj vid lečenja može biti dovoljan ukoliko se bolest nije proširila. UKMB specifični mortalitet je povezan sa starijom životnom dobi pacijenata, muškim polom, dizurijom kao prvim simptomom UKMB, odsustvom recidiva ili manjim brojem recidiva, invazivnim UKMB, odnosno višim pT stadijumom, HG UKMB, UKMB sa divergentnom diferencijacijom, pre svega skvamoznom, konkomitantnim CIS i većom MVD. UKMB specifični mortalitet je viši među pacijentima sa pozitivnom tumorskom ekspresijom NOTCH3, a niži kod tumora sa pozitivnom ekspresijom HIF1 α i VEGFR1. UKMB lečeni TUR-om i intravezikalnom instilacijom BCG imaju niži UKMB specifični mortalitet u odnosu na druge vidove terapije.

5.4 Prognostički značaj NOTCH3 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike

U hipoksičnom okruženju, Notch signalizacija je uključena u regrutovanje pericita, nicanje mladih krvnih sudova, grananje i konačno njihovo sazrevanje. Značajne studije su pokazale da aktivirani Notch put povećava mogućnost metastaza sa lošim ishodom na osnovu uključenosti u hipoksiju, perfuziju tumora i angiogenezu (191). Iako su Rampias i saradnici ukazali na novu tumor-supresornu Notch ulogu, studije su otkrile da nemaju svi NOTCH receptori istu uključenost u UKMB (192). Ekspresija NOTCH1 je smanjena u UKMB, što ukazuje na tumor-supresornu ulogu. Naprotiv, pokazano je da NOTCH2 deluje kao onkogen koji promovira ćelijsku proliferaciju, agresivnost, EMT i ranu pojavu metastaza (193). NOTCH3 se aktivira hroničnom hipoksijom i dominantno se eksprimira tokom angiogeneze tumora (194). Kod karcinoma jajnika prekomerna ekspresija NOTCH3 indukuje EMT, hemorezistenciju i povezana je sa lošim ukupnim preživljavanjem (195). Najnovije istraživanje je pokazalo da ekspresija NOTCH3 korelira sa UKMB-specifičnim mortalitetom (196). Zhang je sa kolegama otkrio da je visoka ekspresija NOTCH3 povezana sa lošim preživljavanjem

pacijenata, a smanjena NOTCH3 ekspresija sa boljim odgovorom na terapiju cisplatinom. Štaviše, Zhang i njegove kolege su sugerisali da će smanjenje ekspresije NOTCH3 korišćenjem inhibitora histon deacetilaze verovatno postati efikasna terapijska strategija za UKMB (197). NOTCH3 acetilacija/deacetilacija predstavlja ključni regulatorni prekidač u kontroli Notch signalizacije i može predstavljati pogodnu terapijsku metu u UKMB.

Preko 90% UKMB uzoraka u ovoj studiji je pokazalo određeni stepen ekspresije NOTCH3, što sugerise da NOTCH3 ima relevantnu ulogu u UKMB. Do sada najpouzdaniji prognostički parametri u patohistološkom izveštaju su histološki gradus, prisustvo limfovaskularne invazije i prateći CIS (163). Bez obzira na to što se UKMB sa divergentnom diferencijacijom ponašaju agresivnije, nije nađena statistička povezanost između divergentne diferencijacije i ekspresije NOTCH3. Intenzitet ekspresije NOTCH3 je procenjivan na semikvantitativni način čime je utvrđeno da stepen ekspresije NOTCH3 korelira sa tumorima viših pT stadijuma i veća pozitivnost bila je povezana sa većim rizikom od UKMB-specifičnog mortaliteta. NOTCH3 je identifikovan kao nezavisni prediktor lošeg ishoda. U skladu sa objavljenim podacima, utvrdili smo da je ekspresija NOTCH3 povezana sa godinama starosti, gradusom i pT stadijumom pacijenata za koje se pokazalo da su nezavisni prediktori kliničkog ishoda: specifičnog za UKMB, opšteg preživljavanja pacijenata i bez recidiva. Utvrđeno je da je bolje ukupno preživljavanje povezano sa pojavom recidiva i među pacijentima koji su lečeni TUR-om i intravezikalnom BCG. U skladu sa našim rezultatima, Thiel i saradnici su pokazali da BCG terapija smanjuje dugoročni rizik od recidiva i progresije kod visokorizičnih superficijalnih HG UKMB (198). Iako u ovoj studiji ekspresija NOTCH3 nije bila statistički značajan prediktor preživljavanja bez recidiva, naši rezultati pokazuju da ekspresija NOTCH3 može biti prognostički IHC marker za kliničko praćenje pacijenata sa UKMB, doprinoseći individualnijem pristupu odabirom pacijenata koji treba da se podvrgnu kontrolnoj cistoskopiji nakon kraćeg vremenskog interval (196).

Aktuelni terapijski protokoli se baziraju na tumorskoj regresiji, ciljano delujući na diferentovane tumorske ćelije koje čine glavni deo tumora ali poštedejući retke kancerske matične (*engl. stem*) ćelijske populacije. Kancerske matične ćelije čine malu populaciju samoodrživih tumorskih ćelija sa sposobnošću samoobnavljanja. Ključne su za hemiorezistentnost i metastaziranje jer ekspimiraju transportere za lekove i DNA *repair* mehanizme koji im omogućavaju da izbegnu citocidni efekat terapije. Najnovija istraživanja pokazala su da Notch signali učestvuju u stečenoj rezistenciji na hemioterapiju jer regulišu tumorsku matičnost (*engl. stemness*) i doprinose EMT fenotipu (199). Noviji terapijski pristup

je targetovanje Notch-a da bi se eliminisale kancerske stem ćelije i EMT ćelije koje su tipično rezistentne na lekove i osnova za recidiv bolesti. Kancerske matične ćelije čine malu populaciju samoodrživih tumorskih ćelija sa sposobnošću samoobnavljanja. Ključne su za hemio rezistentnost i metastaziranje jer eksprimiraju transportere za lekove i DNA *repair* mehanizme koji im omogućavaju da izbegnu citocidni efekat terapije (200). Eradikacija tumorskih stem ćelija je važan cilj onkološkog lečenja. Terapijskom manipulacijom Notch signalima bi se moglo citocidno delovati na diferentovane tumorske ćelije, a mogle bi biti uništene i kancerske matične ćelije, te bi se poboljšao učinak konvencionalne hemioterapije (201).

Dopuna patohistološkog izveštaja, uvođenjem pouzdanog panela imunohistohemijskih markera omogućila bi molekularnu klasifikaciju UKMB i personalizovan pristup u praćenju pacijenata i odabiru terapije. Pacijenti na povećanom riziku za recidiv i progresiju bolesti bili bi intenzivnije kontrolisani, ili pak ranije razmatrani za radikalnu cistektomiju, dok bi se kod pacijenata sa malim rizikom cistoskopije svele na minimum. Intenzivnijim praćenjem i trimodalnim pristupom u lečenju (TUR, BCG, radioterapija/hemioterapija) pT2 UKMB pacijenata, mogla bi se i duže očuvati funkcionalna MB i odložiti radikalna cistektomija.

6 ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ovog istraživanja, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Pozitivna ekspresija HIF1 α je učestalija u UKMB pacijenata ženskog pola, kod pacijenata koji nisu izloženi profesionalnim kancerogenima i kod pacijenata sa bezbolnom hematurijom, kao prvim simptomom UKMB. Ekspresija HIF1 α je povezana sa LG UKMB, superficijalnim UKMB i nižim pT stadijumom u trenutku dijagnoze. Radikalna cistektomija sa ili bez radioterapije/hemioterapije je značajno ređe neophodna kod UKMB u kojima se eksprimira HIF1 α .
- VEGF se učestalije eksprimira kod UKMB nepušača i u UKMB sa endemskog područja za BEN.
- VEGFR1 se učestalije eksprimira kod mlađih pacijenata, u stadijumima pTa i pT1, u LG UKMB, UKMB bez divergentne diferencijacije, naročito UKMB bez skvamozne diferencijacije. TUR i TUR u kombinaciji sa intravezikalnom instilacijom BCG su češće terapijske opcije za VEGFR1 pozitivne UKMB.
- Pozitivna NOTCH3 ekspresija je povezana sa starijom životnom dobi pacijenata i anamnestičkim podatkom o odsustvu ekspozicije na profesionalne kancerogene. Visoka ekspresija NOTCH3 je učestalija u HG tumorima i UKMB sa konkomitantnim CIS.
- Ekspresija JAG1 liganda na membrani i u citoplazmi tumorskih ćelija UKMB je povezana sa starijom životnom dobi pacijenata i višim pT stadijumom UKMB. Iako je aberantna, jedarna ekspresija JAG1 liganda prisutna u 80,4% UKMB, nije uočena značajna povezanost ni sa jednom karakteristikom UKMB pacijenata i tumora. Potpuno odsustvo JAG1 ekspresije je učestalije u UKMB sa divergentnom diferencijacijom.
- Međusobna povezanost ispitivanih signalnih puteva u UKMB ogleda se u povezanoj (asociranoj) ekspresiji HIF1 α i VEGF, VEGF i JAG1, VEGFR1 i JAG1, VEGFR1 i NOTCH3, i HIF1 α i NOTCH3.
- Gustina malih krvnih sudova u uzorku od 2mm² UKMB je značajno veća kod pacijentkinja u odnosu na pacijente muškog pola, invazivnih UKMB, UKMB sa divergentnom

diferencijacijom, pre svega glandularnom diferencijacijom i prisutnim konkomitantnim *in situ* karcinomom. Veća gustina malih krvnih sudova je povezana sa ekspresijom JAG1 na membrani i/ili citoplazmi i odsustvom ekspresije JAG1 u jedru.

- Prosečno vreme pojave prvog UKMB recidiva je nakon 9 meseci, a najveći broj pacijenata (59,3%) ima samo jedan recidiv. Pojava recidiva u prvoj godini nakon dijagnoze je češća kod mlađih pacijenata, pacijenata kod kojih je bezbolna hematurija prvi simptomom UKMB, LG UKMB i nižeg pT stadijuma. Recidivi su češći kod pacijenata lečenih samo TUR-om, a ređi kod pacijenata lečenih sa TUR i intravezikalnom instilacijom BCG, radioterapijom i radikalnom cistektomijom. Odsustvo ekspresije NOTCH3 ukazuje na pojavu recidiva u prvoj godini od dijagnoze UKMB. Prediktori jednogodišnjeg preživljavanja bez recidiva su starija životna dob, odsustvo bezbolne hematurije kao prvog simptoma UKMB i pozitivna ekspresija NOTCH3. Pojava recidiva u prve dve godine nakon dijagnoze UKMB je češća kod mlađih pacijenata, koji se prezentuju bezbolnom hematurijom, kao prvim simptomom bolesti, LG UKMB, nižeg pT stadijuma, pacijenata koji su profesionalno izloženi karcinogenima i imaju pozitivnu UKMB porodičnu anamnezu. Recidivi češće nastaju kod pacijenata lečenih samo TUR-om, a ređe nastaju kod pacijenata lečenih TUR-om i intravezikalnom instilacijom BCG, radioterapijom i radikalnom cistektomijom. Pojava recidiva u prve dve godine nakon dijagnoze nije u statistički značajnoj vezi ni sa jednim ispitivanim markerom, niti sa gustinom malih krvnih sudova. Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji, niti povezanost ispitivanih IHC markera i gustine malih krvnih sudova sa pojavom recidiva
- Nije utvrđena statistički značajna povezanost ispitivanih IHC markera razlika u ekspresiji analiziranih IHC markera (JAG1, NOTCH3, HIF1 α , VEGF, VEGFR1) i gustine malih krvnih sudova u odnosu na pojavu recidiva.
- Ukupan mortalitet od UKMB je povezan je sa starijom životnom dobi pacijenata, muškim polom, invazivnim tumorima, odnosno višim pT stadijumom, HG UKMB, tumorima sa divergentnom diferencijacijom, glandularnom ili skvamoznom, i konkomitantnim *in situ* karcinomom. Dodatne karakteristike UKMB koje ukazuju na povećani rizik od smrtnog događaja su veća gustina malih krvnih sudova, pozitivna ekspresija NOTCH3 i negativna ekspresija HIF1 α i VEGFR1. Recidivantnost UKMB smanjuje rizik od smrtnog ishoda približno 5 puta. Iako je mortalitet značajno niži kod pacijenata lečenih TUR-om i intravezikalnom instilacijom BCG u odnosu na sve druge terapijske modalitete, ovaj vid lečenja može biti dovoljan ukoliko se bolest nije proširila.

- UKMB specifični mortalitet je povezan sa starijom životnom dobi pacijenata, muškim polom, dizurijom kao prvim simptomom UKMB, odsustvom recidiva ili manjim brojem recidiva, invazivnim UKMB, odnosno višim pT stadijumom, HG UKMB, UKMB sa divergentnom diferencijacijom, pre svega skvamoznom, konkomitantnim CIS i većom MVD. UKMB specifični mortalitet je viši među pacijentima sa pozitivnom tumorskom ekspresijom NOTCH3, a niži kod tumora sa pozitivnom ekspresijom HIF1 α i VEGFR1. UKMB lečeni TUR-om i intravezikalnom instilacijom BCG imaju niži UKMB specifični mortalitet u odnosu na druge vidove terapije.

Prezentovana studija je identifikovala HIF1 α , VEGFR1, NOTCH3 i MVD kao nezavisne prognostičke parametre za ukupno preživljavanje i UKMB specifično preživljavanje pacijenata. Pozitivna ekspresija NOTCH3, veća gustina malih krvnih sudova (MVD) i odsustvo ekspresije HIF1 α i VEGFR1 ukazuju na kraće ukupno i UKMB-specifično preživljavanje. Molekularni učesnici HIF1 α , VEGF i NOTCH signalnih puteva i njihovo detektovanje u tkivu pokazuju snažan upliv hipoksije i angiogeneze u nastanak invazivnijih klonova UKMB. Prognostička vrednost ovih markera u praćenju pacijenata sa UKMB je velika i može doprineti individualnijem pristupu prilikom odluke o daljem lečenju. Na manipulaciji ispitivanih signalnih puteva se baziraju najnoviji terapijski modaliteti, čiji je krajnji cilj uvođenje personalizovane, ciljane, molekularne terapije u lečenje UKMB.

7 LITERATURA

1. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2004; 84:935–86.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clin* 2018; 68:394–424.
3. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin D, Piñeros M, Znaoret A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* 2021; 149:778– 89.
4. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part B: prostate and bladder tumours. *Eur Urol* 2016; 70:106-19.
5. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005; 66(6):4-34.
6. Mushtaq J, Thurairaja R, Nair R. Bladder Cancer. *Surgery* 2019; 37:529–37.
7. Aldousari S, Kassouf W. Update on the management of non-muscle invasive bladder cancer. *Can Urol Assoc J* 2010; 4(1):56-64.
8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 2019; 69:7–34.
9. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. Epidemiology of bladder cancer. *Med Sci* 2020; 8:15.
10. Phelan A, Lopez-Beltran A, Montironi R, Zhang S, Raspollini MR, Cheng M, et al. Inherited forms of bladder cancer: a review of Lynch syndrome and other inherited conditions. *Future Oncol* 2018; 14(3):277-90.
11. Beukers W, Hercegovic A, Zwarthoff E. HRAS mutations in bladder cancer at an early age and the possible association with the Costello Syndrome. *Eur J Hum Genet* 2014; 22:837–9.

12. Al-Zalabani A, Stewart K, Wesseliuss, A, Schols, A, Zeegers M. Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. *Eur J Epidemiology* 2016; 31:811–51.
13. Gu J, Wu X. Genetic susceptibility to bladder cancer risk and outcome. *Pers Med* 2011; 8:365–74.
14. Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci, M, Kogevinas M, Wet H, et al. NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes increase bladder cancer risk: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet* 2005; 366:649–59.
15. Casadei C, Dizman N, Schepisi G, Cursano MC, Basso U, Santini D, et al. Targeted therapies for advanced bladder cancer: new strategies with FGFR inhibitors. *Ther Adv Med Oncol* 2019; 11:1758835919890285.
16. Malats N, Bustos-Moreno A, Murta-Nascimento C, Fernandez F, Rivas, M, Puente D, et al. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol* 2005; 6:678–86.
17. Burger M, Catto J, Dalbagni G, Grossman B, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013; 63(2):234-41.
18. Rubenwolf PC, Eder F, Ebert AK, Hofslaedter F, Woodhouse CR, Roesch WH. Persistent histological changes in the exstrophic bladder after primary closure—a cause for concern? *J Urol* 2013; 189:671-7.
19. Colin P, Koenig P, Ouzzane A, Berthon N, Villers A, Biserte J, et al. Environmental factors involved in carcinogenesis of urothelial cell carcinomas of the upper urinary tract. *BJU Int* 2009; 104:1436-40.
20. Wong MC, Fung FD, Leung C, Cheung WW, Goggins WB, Ng AC. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep* 2018; 8:1129.
21. 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; 27:2090-100.
22. Reed O, Jubber I, Griffin J, Noon AP, Goodwin L, Hussain S, et al. Occupational bladder cancer: A cross section survey of previous employments, tasks and exposures matched to cancer phenotypes. *PLoS ONE* 2020; 15(10):e0239338.

23. Chen HI, Chi TC, Ko SY, Hsu YC, Lin IH, Chen A, et al. 4,4'- Methylenebis (2-chloroaniline) (MBOCA) may be highly toxic and a carcinogen based on an experimental study with mice. *Advances in Biological Chemistry* 2014; 4(03):203–13.
24. Tang H, Shi W, Fu S, Wang T, Zhai S, Song Y, et al. Pioglitazone and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Medicine* 2018; 7(4):1070–80.
25. Ponticelli C, Escoli R, Moroni G. Does cyclophosphamide still play a role in glomerular diseases? *Autoimmun Rev* 2018; 17(10):1022-7.
26. Mathews JD, Forsythe AV, Brady Z, Butler MW, Goergen SK, Byrnes GB, et al. Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. *BMJ* 2013; 346-60.
27. Gandomani HS, Tarazoj AA, Siri FH, Rozveh AK, Hosseini S, Borujeni NN, et al. Essentials of bladder cancer worldwide: incidence, mortality rate and risk factors *Biomed Res Ther* 2017; 4(9):1638-55.
28. Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, et al. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med* 2000; 342:1686–92.
29. Kurtlio P, Pukkala E, Kahelin H, Auvinen A, Pekkanen J. Arsenic concentrations in well water and risk of bladder and kidney cancer in Finland. *Environ Health Perspect* 1999; 107:705-10.
30. El-Mosalamy H, Salman TM, Ashmawey MA, Osama N. Role of chronic *E. coli* infection in the process of bladder cancer: an experimental study. *Infect Agent Cancer* 2012; 7:19.
31. Abdollahzadeh P, Madani S, Khazaei S, Sajadimajd S, Izadi B, Najafi F. Association between human papillomavirus and transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol J* 2017; 14(6):5047-50.
32. McCreddie M, Stewart JH, Day NE. Different roles for phenacetin and paracetamol in cancer of the kidney and renal pelvis. *Int J Cancer* 1993; 53:245-9.
33. Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993; 341(8842):387-91.

34. Li X, Wang H. Aristolochic acid nephropathy: what we know and what we have to do. *Nephrology (Carlton)* 2004; 9:109 -11.
35. Gillerot G, Jadoul M, Arlt VM, van Ypersele De, Strihou C, Schmeiser HH, et al. Aristolochic acid nephropathy in a Chinese patient: time to abandon the term “Chinese herbs nephropathy”? *Am J Kidney Dis* 2001; 38:e26.
36. De Broe M. Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy. *Kidney International* 2012; 81:513-5.
37. Stefanovic V, Jelakovic B, Cukuranovic R, Bukvic D, Nikolic J, Lukic L, et al. Diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy. Proposal by an International Panel. *Renal Fail* 2007; 29:867–90.
38. Stiborová M, Arlt V, Schmeiser H. Balkan endemic nephropathy: an update on its etiology. *Arch Toxicol* 2016; 90:2595–615.
39. Toncheva DI, Atanassova S, Gergov T, Todorovska EG, Roeva IG, Georgiev TH, et al. Genetic changes in uroepithelial tumors of patients with Balkan endemic nephropathy. *J Nephrol* 2002; 15:387–93.
40. Voice TC, McElmurry SP, Long DT, Dimitrov P, Ganey VS, Peptropoulos EA. Evaluation of the hypothesis that Balkan endemic nephropathy is caused by drinking water exposure to contaminants leaching from Pliocene coal deposits. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2006; 16:515–24.
41. Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA. Review on Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51:61–99.
42. Bui-Klimke T, Wu F. Evaluating weight of evidence in the mystery of Balkan endemic nephropathy. *Risk Anal* 2014; 34:1688–705.
43. Stefanovic V, Toncheva D, Polenakovic M. Balkan nephropathy. *Clin Nephrol* 2015; 83(7):64–9.
44. Pavlović NM. Balkan endemic nephropathy-current status and future perspectives. *Clin Kidney J* 2013; 6:257–65.
45. Stefanović V, Cukuranovic R, Miljkovic S, Marinkovic D, Toncheva D. Fifty years of Balkan endemic nephropathy: challenges of study using epidemiological method. *Ren Fail* 2009; 31:409–18.

46. Green DA, Rink M, Xylinas E, Matin SF, Stenzl A, Roupret M, et al. Urothelial carcinoma of the bladder and the upper tract: disparate twins. *J Urol* 2013; 89:1214-21.
47. Davis R, Jones JS, Barocas DA, Castle EP, Lang EK, Leveillee RJ, et al. American Urological Association. Diagnosis, evaluation and follow-up of asymptomatic microhematuria (AMH) in adults: AUA guideline. *J Urol* 2012; 188(6):2473-81.
48. Wallmerolh A, Wagner U, Moch H, Gasser TC, Sauter G, Mihatsch MJ. Patterns of metastasis in muscle-invasive bladder cancer (pT 2-4): An autopsy study on 367 patients. *Urol Int* 1999; 62:69-75.
49. Vikram R, Sandler CM, Ng CS. Imaging and staging of transitional cell carcinoma: part 1, lower urinary tract. *AJR Am J Roentgenol* 2009; 192:1481-7.
50. Bouchelouche K, Turkbey B, Choyke PL. PET/CT and MRI ,in Bladder Cancer. *J Cancer Sci Ther* 2012; S14.
51. Picozzi S, Casellato S, Bozzini G, Ralti D, Macchi A, Rubino B, et al. Inverted papilloma of the bladder: a review and an analysis of the recent literature of 365 patients. *Urol Oncol* 2013; 31:1584-90.
52. Magi-Galluzzi C, Epstein JI. Urothelial papilloma of the bladder: a review of 34 de nova cases. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:1615-20.
53. Herr HW, Donat SM, Reuter VE. Management of low grade papillary bladder tumors. *J Urol* 2007; 178(4):1201-5.
54. May M, Brookman-Amissah S, Roigas J, Hartmann A, Storkel S, Kristiansen G, et al. Prognostic accuracy of individual uropathologists in noninvasive urinary bladder carcinoma: a multicentre study comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation classifications. *Eur Urol* 2010; 57:850-8.
55. Gofrit ON, Pizov G, Shapiro A, Duvdevani M, Yutkin V, Landau EH, et al. Mixed high and low grade bladder tumours- are they clinically high or low grade? *J Urol* 2014; 191:1693-6.
56. Hansel DE, Amin MB, Comperal E, Cote RJ, Knuchel R, Monlironi R, et al. A contemporary update on pathology standards for bladder cancer: transurethral resection and radical cystectomy specimens. *Eur Urol* 2013; 63:321-32.
57. Amin MB, Trpkov K, Lopez-Beltran A, Grignon D. Members of the ISUP immunohistochemistry in Diagnostic Urologic Pathology Group. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the bladder lesions:

- report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol* 2014; 38:e20-34.
58. Nordentoft I, Lamy P, Birkenkamp-Demtroder K, Shumansky K, Vang S, Hornshøj H, et al. Mutational context and diverse clonal development in early and late bladder cancer. *Cell Rep* 2014; 7:1649-63.
59. Cheng L, Davidson DD, MacLennan GT, Williamson SR, Zhang S, Koch MO, et al. The origins of urothelial carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10:865-80.
60. Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:713-25.
61. van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boeve ER, Jbbsis AC, et al. FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64:1911-4.
62. Allory Y, Beukers W, Sagrera A, Flandez M, Marques M, Marquez M, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur Urol* 2014; 65:360-6.
63. Wang L, Feng C, Ding G, Ding Q, Zhou Z, Jiang H, et al. Ki67 and TP53 expressions predict recurrence of non muscle-invasive bladder cancer. *Tumour Biol* 2014; 35:2989-95.
64. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 2015; 15:25-41.
65. van Oers JM, Adam C, Denzinger S, Stoehr R, Bertz S, Zaak D, et al. Chromosome 9 deletions are more frequent than FGFR3 mutations in flat urothelial hyperplasias of the bladder. *Int J Cancer* 2006; 119:1212-5.
66. Readal N, Epstein JI. Papillary urothelial hyperplasia: relationship to urothelial neoplasms. *Pathology* 2010; 42:360-3.
67. Arias-Stella J, Shah A, Gupta N, Williamson S. CK20 and p53 Immunohistochemical staining patterns in urinary bladder specimens with equivocal atypia: correlation with outcomes. *Arch Pathol Lab Med* 2018; 142(1):64–9.
68. Nese N, Gupta R, Bui MH, Amin MB. Carcinoma in situ of the urinary bladder: review of clinicopathologic characteristics with an emphasis on aspects related to molecular diagnostic techniques and prognosis. *J Natl Compr Canc Netw* 2009; 7(1):48-57.

69. Amin MB. Histological variants of urothelial carcinoma: diagnostic, therapeutic and prognostic implications. *Mod Pathol* 2009; 22:S96-118.
70. Lopez-Beltran A, Cheng L. Histologic variants of urothelial carcinoma: differential diagnosis and clinical implications. *Hum Pathol* 2006; 37:1371-88.
71. Nishiyama N, Kitamura H, Maeda T, Takahashi S, Masumori N, Hasegawa T, et al. Clinicopathological analysis of patients with non-muscle-invasive bladder cancer: prognostic value and clinical reliability of the 2004 WHO classification system. *Jpn J Clin Oncol* 2013; 43:1124-31.
72. Samaratunga H, Fairweather P, Purdie D. Significance of stromal reaction patterns in invasive urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2005; 123:851-7.
73. Hansel DE, Amin MB, Comperal E, Cote RJ, Knuchel R, Monlironi R, et al. A contemporary update on pathology standards for bladder cancer: transurethral resection and radical cystectomy specimens. *Eur Urol* 2013; 63:321-32.
74. Cai T, Nesi G, Boddi V, Mazzoli S, Dal Canto M, Bartoletti R. Prognostic role of the tumor-associated tissue inflammatory reaction in transitional bladder cell carcinoma. *Oncol Rep* 2006; 16:329-34.
75. Smith SC, Mohanty SK, Kunju LP, Chang E, Chung F, Carvalho JC, et al. Uroplakin II out performs uroplakin III in diagnostically challenging settings. *Histopathology* 2014; 65:132-8.
76. McKenney JK, Amin MB. The role of immunohistochemistry in the diagnosis of urinary bladder neoplasms. *Semin Diagn Pathol* 2005; 22:69-87.
77. Kim SP, Frank I, Cheville JC, Thompson RH, Weight CJ, Thapa P, et al. The impact of squamous and glandular differentiation on survival after radical cystectomy for urothelial carcinoma. *J Urol* 2012; 188:405-9.
78. Alexander RE, Hu Y, Kum JB, Montironi R, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, et al. p16 expression is not associated with human papillomavirus in urinary bladder squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2012; 25:1526-33.
79. Blochin EB, Park KJ, Tickoo SK, Reuter VE, Al-Ahmadie H. Urothelial carcinoma with prominent squamous differentiation in the setting of neurogenic bladder: role of human papillomavirus infection. *Mod Pathol* 2012; 25:1534-42.
80. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, Su X, Siefker-Rad Ike A, Dinney C, et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2014; 11:400-10.

81. Oliva E, Amin MB, Jimenez R, Young RH. Clear cell carcinoma of the urinary bladder: a report and comparison of four tumors of mullerian origin and nine of probable urothelial origin with discussion of histogenesis and diagnostic problems. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:190-7.
82. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:3110-5.
83. Regalado JJ. Mixed micropapillary and trophoblastic carcinoma of bladder: report of a first case with new immunohistochemical evidence of urothelial origin. *Hum Pathol* 2004; 35:382-4.
84. Douglas J, Sharp A, Chau C, Head J, Drake T, Wheeler M, et al. Serum total hCG β level is an independent prognostic factor in transitional cell carcinoma of the urothelial tract. *Br J Cancer* 2014; 2;110(7):1759-66.
85. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 2016; 70(1):93-105.
86. Wasco MJ, Daignault S, Bradley D, Shah RB. Nested variant of urothelial carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 30 pure and mixed cases. *Hum Pathol* 2010; 41:163-71.
87. Volmar KE, Chan TY, De Marzo AM, Epstein JI. Florid von Brunn nests mimicking urothelial carcinoma: a morphologic and immunohistochemical comparison to the nested variant of urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:1243-52.
88. Paner GP, Annaiah C, Gulmann C, Rao P, Ro JY, Hansel DE, et al. Immunohistochemical evaluation of novel and traditional markers associated with urothelial differentiation in a spectrum of variants of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* 2014; 45:1473-82.
89. Beltran AL, Cheng L, Montironi R, Blanca A, Leva M, Roupret M, et al. Clinicopathological characteristics and outcome of nested carcinoma of the urinary bladder. *Virchows Arch* 2014; 465:199-205.
90. Venyo AK. Microcystic variant of urothelial carcinoma. *Adv Urol* 2013; 654751.
91. Comperal E, Roupret M, Yaxley J, Reynolds J, Varinot J, Ouza'id I, et al. Micropapillary urothelial carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathological analysis of 72 cases. *Pathology* 2010; 42:650-4.

92. Wang JK, Boorjian SA, Cheville JC, Kim SP, Tarrell RF, Thapa P, Frank I. Outcomes following radical cystectomy for micropapillary bladder cancer versus pure urothelial carcinoma: a matched cohort analysis. *World J Urol* 2012; 30(6):801-6.
93. Willis DL, Fernandez MI, Dickstein RJ, Parikh S, Shah JB, Pisters LL, Guo CC, Henderson S, Czerniak BA, Grossman HB, Dinney CP, Kamat AM. Clinical outcomes of cT1 micropapillary bladder cancer. *J Urol* 2015; 193(4):1129-34.
94. Amin A, Epstein JI. Noninvasive micropapillary urothelial carcinoma: a clinicopathologic study of 18 cases. *Hum Pathol* 2012; 43:2124–8.
95. Nguyen D, Taheri D, Springer S, Cowan M, Guner G, Mendoza Rodriguez MA, et al. High prevalence of TERT promoter mutations in micropapillary urothelial carcinoma. *Virchows Arch* 2016; 469(4):427-34.
96. Moktefi A, Pouessel D, Liu J, Sirab N, Maille P, Soyeux P, et al. Reappraisal of HER2 status in the spectrum of advanced urothelial carcinoma: a need of guidelines for treatment eligibility. *Mod Pathol*. 2018; 31(8):1270-81.
97. Tamas EF, Nielsen ME, Schoenberg MP, Epstein JI. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary tract: a clinicopathological study of 30 pure and mixed cases. *Mod Pathol* 2007; 20:828-34.
98. Williamson SR, Zhang S, Lopez-Beltran A, Shah RB, Montironi R, Tan PH, et al. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary bladder: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. *Am J Surg Pathol* 2011; 35(4):474-83.
99. Al-Ahmadie HA, Iyer G, Lee BH, Scott SN, Mehra R, Bagrodia A, et al. Frequent somatic CDH1 loss-of-function mutations in plasmacytoid variant bladder cancer. *Nat Genet* 2016; 48(4):356-8.
100. Dayyani F, Czerniak B, Sircar K, Munsell M, Millikan R, Dinney C, Siefker-Radtke A. Plasmacytoid urothelial carcinomas – a chemo-sensitive cancer with poor prognosis, and peritoneal carcinomatosis. *J Urol* 2013; 189(5):1656–61.
101. Cheng L, Zhang S, Alexander R, Maclennan GT, Hodges KB, Harrison BT, et al. Sarcomatoid carcinoma of the urinary bladder: the final common pathway of urothelial carcinoma dedifferentiation. *Am J Surg Pathol* 2011; 35(5):e34-46.
102. Lopez-Beltran A, Henriques V, Montironi R, Cimadamore A, Raspollini M, Cheng L. Variants and new entities of bladder cancer. *Histopathology* 2019; 74:77–96.

103. Wang X, Lopez-Beltran A, Osunkoya AO, Wang M, Zhang S, Davidson DD, et al. TERT promoter mutation status in sarcomatoid urothelial carcinomas of the upper urinary tract. *Future Oncol* 2017; 13(8):705-14.
104. Lopez-Beltran A, Amin MB, Oliveira PS, Montironi R, Algaba F, McKenney JK, et al. Urothelial carcinoma of the bladder, lipid cell variant: clinicopathologic findings and LOH analysis. *Am J Surg Pathol* 2010; 34:371-6.
105. Kramer MW, Abbas M, Pertschy S, Becker JU, Kreipe HH, Kuczyk MA, et al. Clear-cell variant urothelial carcinoma of the bladder: a case report and review of the literature. *Rare Tumors* 2012; 4:e48.
106. Goebell PJ, Knowles MA. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urol Oncol* 2010; 28:409-28.
107. Hoglund M. On the origin of syn- and metachronous urothelial carcinomas. *Eur Urol* 2007; 51:1185-93.
108. Gunes C, Rudolph K. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* 2013; 152:390-3.
109. Williams SV, Hurst CD, Knowles MA. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum Mol Genet* 2013; 22:795-803.
110. Ramirez-Backhaus M, Dominguez-Escrig J, Collado A, Rubio-Briones J, Solsona E. Restaging transurethral resection of bladder tumor for high-risk stage Ta and T1 bladder cancer. *Curr Urol Rep* 2012; 13:109-14.
111. Patriarca C, Hurle R, Moschini M, Freschi M, Colombo P, Colecchia M, et al. Usefulness of pT1 substaging in papillary urothelial bladder carcinoma. *Diagn Pathol* 2016; 11:6.
112. Lopez-Beltran A, Cheng L. Stage pT1 bladder carcinoma: diagnostic criteria, pitfalls and prognostic significance. *Pathology* 2003; 35:484–91.
113. Lawless M, Gulati R, Tretiakova M. Stalk versus base invasion in pT1 papillary cancers of the bladder: improved substaging system predicting the risk of progression. *Histopathology* 2017; 71:406–14.
114. Rouprêt M, Seisen T, Compérat E, Larré S, Mazerolles C, Gobet F, et al. Prognostic interest in discriminating muscularis mucosa invasion (T1a vs T1b) in nonmuscle invasive bladder carcinoma: French national multicenter study with central pathology review. *J Urol* 2013; 189(6):2069-76.

115. Martin-Doyle W, leow JJ, Orsola A, Chang SL, Bellmunl J. Improving selection criteria for early cystectomy in high grade T1 bladder cancer: a meta-analysis of 15,215 patients. *J Clin Oncol* 2015; 33:643-50.
116. Ramirez-Backhaus M, Dominguez-Escrig J, Collado A, Rubio-Briones J, Solsona E. Restaging transurethral resection of bladder tumor for high-risk stage Ta and T1 bladder cancer. *Curr Urol Rep* 2012; 13:109-14.
117. Ananhanarayanan V, Pan Y, Tretiakova M, Amin MB, Cheng L, Epstein JI, et al. Influence of histologic criteria and confounding factors in staging equivocal cases for microscopic perivesical tissue invasion (pT3a): an interobserver study among genitourinary pathologists. *Am J Surg Pathol* 2014; 38:167-75.
118. Wright JL, Lin OW, Porter MP. The association between extent of lymphadenectomy and survival among patients with lymph node metastases undergoing radical cystectomy. *Cancer* 2008; 112:2401-8.
119. Kandori S, Kojima T, Nishiyama H. The updated points of TNM classification of urological cancers in the 8th edition of AJCC and UICC. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2019; 1–5.
120. Bellmunt J, Albiol S, Kataja V. ESMO Guidelines Working Group. Invasive bladder cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2008; 19(2):47-8.
121. Sternberg CN, Donat SM, Bellmunt J, Millikan RE, Stadler W, De Mulder P, et al. Chemotherapy for bladder cancer: treatment guidelines for neoadjuvant chemotherapy, bladder preservation, adjuvant chemotherapy, and metastatic cancer. *Urology* 2007; 69(1):62-79.
122. Ploussard G, Daneshmand S, Efstathiou JA, Herr HW, James ND, Rödel CM, et al. Critical analysis of bladder sparing with trimodal therapy in muscle-invasive bladder cancer: a systematic review. *Eur Urol* 2014; 66(1):120-37.
123. Rouanne M, Loriot Y, Lebreton T, Soria JC. Novel therapeutic targets in advanced urothelial carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 98:106-15.
124. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 2009; 19:329–37.
125. Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 2003; 18:65-70.

126. Li JL, Harris AL. Notch signaling from tumor cells: a new mechanism of angiogenesis. *Cancer Cell* 2005; 8:1–3.
127. Weidemann A, Johnson R. Biology of HIF-1 α . *Cell Death and Differentiation* 2008; 15:621–7.
128. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11:293–9.
129. Warnecke C, Griethe W, Weidemann A, Jurgensen JS, Willam C, Bachmann S et al. Activation of the hypoxia-inducible factor pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors. *FASEB J* 2003; 17:1186–8.
130. Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol* 2004; 165(1):35-52.
131. Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, Tomaso E, Rakesh K. Cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* 2004; 427:695.
132. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2:213–9.
133. Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275:16986–92.
134. Miele L, Miao H, Nickoloff BJ. Notch signaling as a novel cancer therapeutic target. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6:313–23.
135. Wang G, Wang JJ, Fu XL, Guang R, To ST. Advances in the targeting of HIF-1 α and future therapeutic strategies for glioblastoma multiforme. *Oncol Rep* 2017; 37(2):657-70.
136. Ben Lassoued A, Beaufils N, Dales JP, Gabert J. Hypoxia-inducible factor-1 α as prognostic marker. *Expert Opin Med Diagn* 2013; 7:53-70.
137. Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia inducible factors HIF-1 alpha and HIF-2 alpha. *Mol Biol Cell* 2007; 18:4528–42.
138. Zhang Q, Han Z, Zhu Y, Chen J, LI W. Role of hypoxia inducible factor-1 in cancer stem cells. *Mol Med Rep* 2021; 23:17.

139. Fortini ME. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell* 2009; 16:633–47.
140. Sanguanraksa D, Ocharoenrat P. The role of vascular endothelial growth factor A polymorphisms in breast cancer. *Int J Mol Sci* 2012; 13:14845-64.
141. MVD
142. Capaccione K, Pine S. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis* 2013; 34(7):1420–30.
143. Miele L, Miao H, Nickoloff BJ. Notch signaling as a novel cancer therapeutic target. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6:313–23.
144. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:678–89.
145. Yao K, Rizzo P, Rajan P, Albain K, Rychlik K, Shah S, Miele L. Notch-1 and notch-4 receptors as prognostic markers in breast cancer. *Int J Surg Pathol* 2011; 19(5):607-13.
146. Dotto GP. Notch tumor suppressor function. *Oncogene* 2008; 27:5115–23.
147. Qiang L, Wu T, Zhang HW, Lu N, Hu R, Wang YJ, et al. HIF-1 α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. *Cell Death Differ* 2012; 19:284-94.
148. Sun Y, Qu H, Jing T, Wang J, Wang G, Zuo G, et al. Interactions between hypoxia-inducible factor-1 α and other molecules in cancer: a literature review. *Int J Clin Exp Med* 2019; 12(7):9158-66.
149. Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature* 2006; 441:444–50.
150. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial–mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172:973–81.
151. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 20:292(5516):468-72.
152. Bardos JI, Ashcroft M. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bio Essays* 2004; 26:262–9.
153. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(17):6392-7.

154. Xie Q, Cheng Z, Chen X, Lobe CG, Liu J. The role of Notch signalling in ovarian angiogenesis. *J Ovarian Res.* 2017 Mar 11;10(1):13.
155. Ristic-Petrovic A, Stojnev S, Stokanovic D, Conic I, Krstic M, Stojanovic S, et al. Predictive impact of angiogenesis and hypoxia related markers in urothelial bladder cancer. *Virchows Arch* 2016; 469(1):S15-S16. OFP-05-012. The XXXI International Congress of International Academy of Pathology and 28th Congress of the European Society of Pathology, September 25-29th 2016, Cologne, Germany.
156. Ristic-Petrovic A, Stojnev S, Stokanovic D, Krstic M, Velickov A, Kostic J, et al. Immunohistochemical evaluation of angiogenic activity in noninvasive (pTa) bladder cancer. *Virchows Arch* 2017; 471(1):S266.
157. Ristic-Petrovic A, Stojnev S, Stokanovic D, Potic-Floranovic M, Velickov A, Krstic M, et al. An immunohistochemical analysis of angiogenesis in bladder cancer occurring in settlements linked with Balkan endemic nephropathy. *Virchows Arch* 2018; 473(1):S185.
158. Ristic-Petrovic A, Stokanovic D, Stojnev S, Potic-Floranovic M, Djordjevic I, Jankovic-Velickovic Lj. An immunohistochemical analysis of HIF1 alpha and VEGFR1 in high grade T1 bladder cancer. *Virchows Arch* 2019; 475(1):S183.
159. Ristic-Petrovic A, Stojnev S, Stokanovic D, Potic Floranovic M, Djordjevic I, Jankovic Velickovic Lj. The significance of the NOTCH3 expression in the urothelial bladder cancer patients' follow-up. *Virchows Archiv* 2020; 477(1):S167.
160. Chai CY, Chen WT, Hung WC, Kang WY, Huang YC, Su YC, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α expression correlates with focal macrophage infiltration, angiogenesis and unfavourable prognosis in urothelial carcinoma. *J Clin Pathol* 2008; 61(5):658-64.
161. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139:871–90.
162. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:131–42.
163. Ristić-Petrović A, Stokanović D, Krtinić D, Potić-Floranović M, Stojnev S, Janković-Veličković Lj. An immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor receptor 1 in high grade T1 bladder cancer with concomitant carcinoma in situ. *Acta Med Median* 2019; 58(4):5-11.

-
164. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q et al. Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. *Mol Cell* 2007; 26:63–74.
 165. Hasan SS, Tsaryk R, Lange M, Wisniewski L, Moore JC, Lawson ND, et al. Endothelial Notch signalling limits angiogenesis via control of artery formation. *Nat Cell Biol* 2017; 19(8):928-40.
 166. Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275:16986–92.
 167. Siekmann AF, Covassin L, Lawson ND. Modulation of VEGF signalling output by the Notch pathway. *Bio Essays* 2008; 30:303–13.
 168. Kang HW, Kim WJ, Yun SJ. The role of the tumor microenvironment in bladder cancer development and progression. *Transl Cancer Res* 2017; 6(4):744-58.
 169. Tian Q, Xue Y, Zheng W, Sun R, Ji W, Wang X, et al. An overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α induces migration and invasion through Notch signaling. *Int J Oncol* 2015; 47:728-38.
 170. Goriki A, Seiler R, Wyatt AW, Contreras-Sanz A, Bhat A, Matsubara A, et al. Unravelling disparate roles of NOTCH in bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2018; 15:345–57.
 171. Juan H, Xuelei M, Xiangjun C, Xiaoxiao L, Zhang, Minmin B, et al. Microvessel density as a prognostic factor in bladder cancer: A systematic review of literature and meta-analysis. *Cancer Biomarkers* 2014; 14(6):505-14.
 172. Canoğlu, A., Göğüş, Ç., Bedük, Y. et al. Microvessel density as a prognostic marker in bladder carcinoma: Correlation with tumor grade, stage and prognosis. *Int Urol Nephrol* 36, 401–405 (2004).
 173. Egbers L, Grotenhuis AJ, Aben KK, Alfred Wiljes J, Kiemeneij LA, Vermeulen SH. The prognostic value of family history among patients with urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 2015; 136:1117-24.
 174. Kilinc MF, Sonmez NC, Dalkilic A, Arisan S, Guney S. Analysis of results of recurrence and progression rates of high grade Ta bladder cancer and comparison with results of high-grade T1. *Urologia* 2014; 81:237-41.
 175. Gonlero P, Gilio A, Fiorito C, Oderda M, Pacchioni D, Casella G, et al. Prognostic factors of 'high-grade' Ta bladder cancers according to the WHO 2004 classification:

- are these equivalent to 'high-risk' non-muscle-invasive bladder cancer? *Urol Int* 2014; 92:136-42.
176. Wang L, Feng C, Ding G, Ding Q, Zhou Z, Jiang H, et al. Ki67 and TP53 expressions predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *Tumour Biol* 2014; 35:2989-95.
177. Amin MB, Trpkov K, Lopez-Beltran A, Grignon D. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the bladder lesions: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol* 2014; 38:e20-34.
178. Kamat AM, Hegarty PK, Gee JR, Clark PE, Svatek RS, Hegarty N, et al. International Consultation on Urologic Disease-European Association of Urology Consultation on Bladder Cancer 2012. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Screening, diagnosis, and molecular markers. *Eur Urol* 2013; 63(1):4-15.
179. Palou J, Sylvester RJ, Faba OR, Parada R, Peña JA, Algaba F, et al. Female gender and carcinoma in situ in the prostatic urethra are prognostic factors for recurrence, progression, and disease-specific mortality in T1G3 bladder cancer patients treated with bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol* 2012; 62(1):118-25.
180. Boorjian SA, Zhu F, Herr HW. The effect of gender on response to bacillus Calmette-Guerin therapy for patients with non-muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder. *BJU Int* 2010; 106:357-61.
181. Dobruch J, Daneshmand S, Fisch M, Lotan Y, Noon A, Resnick M, et al. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol* 2016; 69(2):300-10.
182. Mitra AP, Skinner EC, Schuckman AK, Quinn DI, Dorff TB, Daneshmand S. Effect of gender on outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder: a critical analysis of 1,994 patients. *Urol Oncol* 2014; 32(52):e1-9.
183. Tilki D, Svatek RS, Karakiewicz PI, Isbarn H, Reich O, Kassouf W, et al. Characteristics and outcomes of patients with pT4 urothelial carcinoma at radical cystectomy: a retrospective international study of 583 patients. *J Urol* 2010; 183(1):87-93.

-
184. Martin-Doyle W, Leow JJ, Orsola A, Chang SL, Bellmunt J. Improving selection criteria for early cystectomy in high-grade T1 bladder cancer: a meta-analysis of 15,215 patients. *J Clin Oncol* 2015; 33:643–50.
 185. Donsky H, Coyle S, Scosyrev E, Messing EM. Sex differences in incidence and mortality of bladder and kidney cancers: national estimates from 49 countries. *Urol Oncol* 2014; 32(40):e23–31.
 186. Brown T, Slack R, Rushton L. Occupational cancer in Britain. Urinary tract cancers: bladder and kidney. *Br J Cancer* 2012; 107(1):S76–84.
 187. Cordes I, Kluth M, Zygis D, Rink M, Chun F, Eichelberg C, et al. PTEN deletions are related to disease progression and unfavourable prognosis in early bladder cancer. *Histopathology* 2013; 63:670-7.
 188. Osterman CK, Alanzi J, Lewis JD, Kaufman EL, Narayan V, Boursi B. Association between symptomatic versus asymptomatic recurrence and survival in bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2018; 16(3):235-9.
 189. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 2015; 15:25-41.
 190. Scosyrev E, Noyes K, Feng C, Messing E. Sex and racial differences in bladder cancer presentation and mortality in the US. *Cancer* 2009; 115:68–74.
 191. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:6392-7.
 192. Rampias T, Vgenopoulou P, Avgeris M, Polyzos A, Stravodimos K, Valavanis C, et al. A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. *Nat Med* 2014; 20(10):1199-205.
 193. Hayashi T, Gust KM, Wyatt AW, Goriki A, Jäger W, Awrey S, et al. Not all NOTCH is created equal: The oncogenic role of NOTCH2 in bladder cancer and its implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2016; 22(12):2981-92.
 194. Danza G, Di Serio C, Ambrosio MR, Sturli N, Lonetto G, Rosati F, et al. Notch3 is activated by chronic hypoxia and contributes to the progression of human prostate cancer. *Int J Cancer* 2013; 133:2577–86.
 195. Gupta N, Xu Z, El-Sehemy A, Steed H, Fu Y. Notch3 induces epithelial-mesenchymal transition and attenuates carboplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2013; 130:200–6.

196. Ristic Petrovic A, Stokanović D, Stojnev S, Potić Floranović M, Krstić M, Djordjević I, et al. The Association between NOTCH3 expression and the clinical outcome in the urothelial bladder cancer patients. *Bosn J Basic Med Sci* 2022; 22(4):523-30.
197. Zhang H, Liu L, Liu C, Pan J, Lu G, Zhou Z et al. Notch3 overexpression enhances progression and chemoresistance of urothelial carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8(21):34362-73.
198. Thiel T, Ryk C, Renström-Koskela L, Steineck G, Schumacher MC, Wiklund NP, et al. Intravesical BCG treatment causes a long-lasting reduction of recurrence and progression in patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *World J Urol* 2019; 37(1):155-63.
199. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105–11.
200. Wang Z, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH. Emerging role of Notch in stem cells and cancer. *Cancer Lett* 2009; 279:8–12.
201. Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi A, Banerjee S, Kong D, et al. Targeting Notch signaling pathway to overcome drug-resistance for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1806(2):258–67.

8 Značaj ekspresije markera hipoksije i neoangiogeneze u praćenju pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bešike

Najčešći tip karcinoma mokraćne bešike, u preko 90% slučajeva, je urotelni karcinom mokraćne bešike (UKMB). Sedam od deset slučajeva UKMB se detektuje u ranom stadijumu. Otprilike 70-80% novodijagnostikovanih UKMB se prezentuje neinvazivnim (pTa i pTis stadijumi) ili rano invazivnim tumorom (pT1 stadijum). Recidivira u 50-70% slučajeva, dok se invazija mišićnog sloja i progresija u pT2 stadijum javlja u 15-25% slučajeva. U ovoj studiji imunohistohemijski je ispitivana ekspresija HIF1 α , VEGF, VEGFR1, NOTCH3, JAGGED1, i morfometrijski određivana gustina CD34 pozitivnih malih krvni sudova (MVD) na 613 uzoraka UKMB. Analiziran je njihov međusobni odnos kao i povezanost sa kliničko-patološkim parametrima i preživljavanjem pacijenata. Prezentovana studija je identifikovala HIF1 α , VEGFR1, NOTCH3 i MVD kao nezavisne prognostičke parametre za ukupno preživljavanje i UKMB specifično preživljavanje pacijenata. Pozitivna ekspresija NOTCH3, veća gustina malih krvnih sudova (MVD) i odsustvo ekspresije HIF1 α i VEGFR1 ukazuju na kraće ukupno i UKMB-specifično preživljavanje. Molekularni učesnici HIF1 α , VEGF i NOTCH signalnih puteva i njihovo detektovanje u tkivu pokazuju snažan upliv hipoksije i angiogeneze u nastanak invazivnijih klonova UKMB. Prognostička vrednost ovih markera u praćenju UKMB pacijenata je velika i može doprineti individualnijem pristupu prilikom odluke o daljem lečenju, a u cilju odlaganja radikalne cistektomije i što dužeg očuvanja mokraćne bešike. Na manipulaciji ispitivanih signalnih puteva se baziraju najnoviji terapijski modaliteti, čiji je krajnji cilj uvođenje personalizovane, ciljane, molekularne terapije u lečenje UKMB.

Ključne reči: urotelni karcinom mokraćne bešike, angiogeneza, hipoksija, imunohistohemija, preživljavanje, prognoza

9 The significance of the hypoxia-related and neoangiogenesis marker expression in the urothelial bladder cancer patients' follow-up

The most common type of bladder cancer, in over 90% of cases, is urothelial bladder cancer. Seven out of ten cases of urothelial bladder cancer are detected at an early stage. Approximately 70-80% of newly diagnosed present with noninvasive (pTa and pTis stages) or early invasive tumors (pT1 stage). Relapses are frequent and occur in 50-70% of cases, while progression to muscle-invasive (pT2 stage) occurs in 15-25% of cases. In this study, the expression of HIF1 α , VEGF, VEGFR1, NOTCH3, JAGGED1, and morphometrically determined density of CD34 positive micro-vessels (MVD) on 613 urothelial bladder cancer samples were immunohistochemically examined. Their interrelationship, as well as, the relationship with clinical-pathological parameters and patient survival were analyzed. The presented study identified HIF1 α , VEGFR1, NOTCH3 and MVD as independent prognostic parameters for overall survival and bladder cancer specific patient survival. Positive expression of NOTCH3, higher density of micro-vessels (MVD) and absence of expression of HIF1 α and VEGFR1 indicate shorter overall and cancer-specific survival. Molecular participants in HIF1 α , VEGF and NOTCH signaling pathways and their detection in tissue show a strong influence of hypoxia and angiogenesis in the formation of more invasive bladder cancer clones. The prognostic value of these markers in the monitoring of bladder cancer patients is great and can contribute to a more individual approach when deciding on further treatment, in order to delay radical cystectomy and preserve the bladder for as long as possible. The latest therapeutic modalities are based on the manipulation of the examined signaling pathways, whose ultimate goal is the introduction of personalized, targeted, molecular therapy in the treatment of urothelial bladder cancer.

Keywords: urothelial bladder cancer, angiogenesis, hypoxia, immunohistochemistry, survival, prognosis

10 Biografija autora

Ana Ristić Petrović je klinički asistent na Katedri za Patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu i specijalista patologije u Centru za patologiju Univerzitetskog kliničkog centra Niš. Integrisane akademske studije medicine i specijalizaciju iz patologije završila je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu. U periodu od 2008. do 2012. bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Tokom 2011. godine bila je na dvomesečnom usavršavanju na Departmanu za patologiju Šiga Univerziteta Medicinskih nauka u Japanu. Dobitnik je više nagradnih stipendija za izlaganje radova na kongresima Evropskog udruženja patologa i Internacionalne Akademije patologa (2016-2020). Bila je istraživač na nekoliko naučno-istraživačkih projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i internih projekata Medicinskog fakulteta u Nišu. Dr Ana Ristić Petrović je od 2008. godine angažovana u izvođenju praktične nastave za sve studentske grupe na Katedri za Patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, najpre kao volonter, potom kao saradnik u nastavi, saradnik za naučno-istraživački rad i klinički asistent. U naučno-istraživačkom i kliničkom radu orjentisana je najviše prema uropatologiji. Autor je ili koautor oko 50 publikacija, od kojih su 16 radovi objavljeni u recenziranim međunarodnim medicinskim časopisima sa impakt faktorom. Član je Lekarske komore Srbije, Udruženja patologa i citologa Srbije i Evropskog Udruženja Patologa.

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом: **Значај експресије маркера хипоксије и неоангиогенезе у праћењу пацијената са уротелним карциномом мокраћне бешике**, која је одбрањена на Medicinskom факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 2022 године.

Потпис аутора дисертације:


Ана В. Ристић Петровић

Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**Значај експресије маркера хипоксије и неоангиогенезе у праћењу
пацијената са уротелним карциномом мокраћне бешике**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла
за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан
штампаном облику.

У Нишу, 2022 године.

Потпис аутора дисертације:


Ана В. Ристић Петровић

Изјава 3:

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Значај експресије маркера хипоксије и неоангиогенезе у праћењу пацијената са уротелним карциномом мокраћне бешике

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство **(CC BY)**
2. Ауторство – некомерцијално **(CC BY-NC)**
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде **(CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима **(CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прераде **(CC BY-ND)**
6. Ауторство – делити под истим условима **(CC BY-SA)¹**

У Нишу, 2022. године.

Потпис аутора дисертације:


Ана В. Ристић Петровић