



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Slavica M. Stojnev**

**ANALIZA EKSPRESIJE  
TRANSFORMIŠUĆEG FAKTORA RASTA  
BETA I ĆELIJSKIH RECEPTORA SMRTI  
U UROTELNOM KARCINOMU  
MOKRAĆNE BEŠIKE  
I NJIHOV PROGNOСТИČKI ZNAČAJ**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,  
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању  
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010, 93/2012,  
89/2013 и 99/2014)

**НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:**

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским и  
сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе,  
осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

Niš, 2019.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Slavica M. Stojnev**

**THE ANALYSIS OF EXPRESSION OF  
TRANSFORMING GROWTH FACTOR  
BETA AND CELL DEATH RECEPTORS  
IN UROTHELIAL BLADDER CANCER  
AND THEIR PROGNOSTIC SIGNIFICANCE**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2019.

## 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: Analiza ekspresije transformišućeg faktora rasta beta i ćelijskih receptora smrti u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i njihov prognostički značaj

Rezime: Karcinom mokraćne bešike je najčešća maligna neoplazma urinarnog trakta. Zbog potrebe za doživotnim cistoskopskim praćenjem i lečenjem rekurentne bolesti, karcinom bešike predstavlja značajno opterećenje za zdravstveni sistem. Urotelni karcinom čini preko 90% karcinoma mokraćne bešike. Deregulacija signalnih puteva transformišućeg faktora rasta beta (TGF- $\beta$ ) igra važne uloge u nastanku i progresiji kancera. Aktivacija TGF- $\beta$  i ćelijskih receptora smrti uključuje zajedničke signalne puteve u aktivaciji kaspaza i indukciji apoptoze. Značaj ekspresije TGF- $\beta$  i receptora smrti u urotelnom karcinomu mokraćne bešike još uvek nije u potpunosti rasvetljen. U ovoj studiji je imunohistohemijski analizirana ekspresija TGF- $\beta$ 1 i ćelijskih receptora smrti DR4, DR5 i FAS na parafinskim uzorcima 647 urotelnih karcinoma bešike dobijenih transuretralnom resekcijom. Analizirana je i ekspresija Smad4, koji ima centralnu ulogu prenosioca signala u klasičnoj TGF- $\beta$  kaskadi, i EZH2, epigenetskog regulatora uključenog u TGF- $\beta$ 1 signalizaciju. Ispitivana je asocijacija ekspresije markera sa kliničko-patološkim parametrima i preživljavanjem pacijenata. Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 u urotelnom karcinomu značajno je povezana sa visokim histološkim gradusom i uznapredovalim patološkim stadijumom tumora, dok redukcija ili gubitak ekspresije receptora smrti značajno korelira sa mišićno-invazivnom bolešću. Visoka ekspresija Smad4 značajno je udružena sa pojavom recidiva. Kancer-specifični mortalitet direktno je povezan sa visokom TGF- $\beta$ 1 i EZH2 ekspresijom, a inverzno sa

ekspresijom DR4, FAS i Smad4. Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 povezana je sa kraćim ukupnim preživljavanjem pacijenata, dok je visoka ekspresija DR4 i FAS u tumorskim ćelijama udružena sa manje agresivnim fenotipom tumora i dužim ukupnim preživljavanjem pacijenata. Ova studija identifikovala je ekspresiju TGF- $\beta$ 1, FAS i EZH2 kao nezavisne prognostičke faktore u urotelnom karcinomu mokraćne bešike, gde visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 i EZH2 u tumoru ukazuje na kraće preživljavanje i lošiju prognozu, a visoka ekspresija receptora smrti FAS ima protektivni uticaj i udružena je sa dužim preživljavanjem. Produblivanje saznanja o kompleksnim ulogama i značaju TGF- $\beta$  i receptora smrti i analiza njihove ekspresije u urotelnom karcinomu mokraćne bešike mogla bi da ima važan uticaj na prognostičku stratifikaciju pacijenata i odlučivanje o njihovom lečenju.

Naučna  
oblast:

Medicinske nauke

Naučna  
disciplina:

Patologija

Ključne reči:

Urotelni karcinom mokraćne bešike, transformišući faktor rasta beta, receptori smrti, imunohistohemija, ukupno preživljavanje, prognoza

UDK:

616.62-006.6:616-076-037(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 analysis of expression of transforming growth factor beta and cell death receptors in urothelial bladder cancer and their prognostic significance

Abstract: Bladder cancer is the most frequent malignant tumor of the urinary tract. It represents a significant burden to the healthcare system due to necessity of lifelong cystoscopic controls, and management of recurrent disease. More than 90% of bladder cancers are urothelial carcinomas. Dysregulation of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) signaling pathways plays important role in tumor development and progression. Activation of TGF- $\beta$  and cell death receptors involves common pathways in the activation of caspases and induction of apoptosis. The significance of immunohistochemical expression of TGF- $\beta$  and death receptors in urothelial bladder cancer has not been fully elucidated. This study comprised 647 urothelial bladder cancers obtained by transurethral resection that were immunohistochemically analyzed to the expression of TGF- $\beta$ 1 and death receptors DR4, DR5, and FAS. The expression of Smad4, a protein with the central role in TGF- $\beta$  canonical pathway signal transmission, and EZH2, an epigenetic regulator involved in TGF- $\beta$  signalization, was also analyzed. Association assessment between the markers' expression and clinicopathological parameters and follow-up data was performed. High TGF- $\beta$ 1 expression in urothelial cancer was significantly associated with high tumor grade and advanced stage, while the reduction/loss of death receptors' expression correlated to muscle-invasive disease. High Smad4 expression was associated with tumor recurrence. Cancer-specific mortality was directly linked to high TGF- $\beta$ 1 and EZH2 expression, and inversely to DR4, FAS, and Smad4 expression. High TGF- $\beta$ 1 was associated with shorter overall

survival of the patients, while high expression of DR4 and FAS in tumor cells correlated with less aggressive phenotype of the tumor, and longer overall survival. The present study identified the expression of TGF- $\beta$ 1, FAS, and EZH2 as independent prognostic factors in urothelial bladder cancer, where high TGF- $\beta$ 1 and EZH2 expression indicates shorter survival and poor prognosis, while high FAS receptor expression imparts protective aspect and is linked to longer overall survival. Further insight into knowledge about complex roles and significance of TGF- $\beta$  and death receptors, as well as the analysis of their expression in urothelial bladder cancer, may have important implications for prognostic stratification of the patients and in deciding about their clinical management.

Scientific  
Field:

Medical sciences

Scientific  
Discipline:

Pathology

Key Words:

Urothelial bladder cancer, transforming growth factor beta, death receptors, immunohistochemistry, overall survival, prognosis

UDC:

616.62-006.6:616-076-037(043.3)

CERIF  
Classification:

B520 General pathology, pathological anatomy  
B 200 Citology, oncology, cancerology

Creative  
Commons  
License Type:

**CC BY-NC-ND**

---

## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija urađena je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja OII75092, čiji je rukovodilac Prof. dr Ljubinka Janković Veličković.*

*Čast mi je da izrazim veliku ličnu zahvalnost svom mentoru, Prof. dr Ljubinki Janković Veličković, na dragocenoj pomoći, izvanrednim savetima i strpljenju, kako u izradi ove disertacije, tako i u dosadašnjem akademskom i stručnom radu i usavršavanju.*

*Srdačno se zahvaljujem Prof. dr Sanji Radojević Škodrić na divnoj saradnji, mudrim savetima i razumevanju.*

*Zahvalnost dugujem Šefu Katedre za patologiju Medicinskog fakulteta u Nišu, Prof. dr Maji Jovičić Milentijević za profesionalnu pomoć, usmeravanje i podršku.*

*Posebno se zahvaljujem Prof. dr Miljanu Krstiću, na bezrezervnoj podršci, nesebičnoj pomoći i iskrenom prijateljstvu. Uz izraz divljenja iskonskoj čestitosti i dobroti, zahvaljujem se na velikom razumevanju, investiciji vremena i truda u neprocenjivi doprinos oblikovanju mog stručnog i akademskog puta.*

*Zahvalna sam kolegici dr Ani Ristić–Petrović, što je sa mnom podelila i teške i zabavne momente u toku praktične izrade ove disertacije.*

*Iskrenu zahvalnost dugujem pokojnom Akademiku Vladisavu Stefanoviću, koji je nesebično delio svoj originalni pristup istraživanju i svojom naučnom i ličnom autentičnom mudrošću oplemenio sve nas koji smo imali privilegiju i čast da od njega učimo.*

*Posebno se zahvaljujem i svojim kolegama i prijateljima sa Šiga instituta medicinskih nauka u Japanu za gostoprimstvo, produktivnu saradnju i inspiraciju za formiranje teme istraživanja. Hvala im što su svojim ljudskim kvalitetima i naučnim elanom pokazali da postoji i može drugačije.*

*Sa posebnim zadovoljstvom zahvaljujem se dragim i iskrenim prijateljima, među kojima najpre mojoj Ani i Ireni, koji su me neiscrpnom energijom i vedrinom hrabрили i hrabre da istrajem.*

*Posebno se od srca zahvaljujem mojoj najmilijoj sestri Ljubici, najdražim roditeljima, sestrici Mariji i teti, za ogromnu ljubav, beskrajnu toplinu i podršku, koja mi uvek daje snage da idem napred.*

*Slavica Stojnev, Niš, 2019.*

# Sadržaj

---

<b>1. Uvod</b> .....	13
<b>2. Pregled literature</b> .....	16
2.1. Karcinom mokraćne bešike .....	16
2.1.1. Epidemiologija i etiologija karcinoma mokraćne bešike .....	16
2.1.2. Urotelni karcinom mokraćne bešike – histopatološka svojstva.....	18
2.1.2.1. Gradiranje urotelnog karcinoma.....	18
2.1.2.2. Stadiranje urotelnog karcinoma.....	26
2.1.2.3. Histološke varijante urotelnog karcinoma .....	39
2.1.3. Genomski pejzaž i molekularna karakterizacija urotelnog karcinoma.....	47
2.1.3.1. Molekularna klasifikacija urotelnog karcinoma mokraćne bešike .....	52
2.1.4. Klinička prezentacija i dijagnostika karcinoma mokraćne bešike.....	56
2.1.4.1. Urinarni markeri .....	56
2.1.5. Lečenje karcinoma mokraćne bešike.....	57
2.1.5.1. Lečenje ne–mišićno–invazivnog karcinoma mokraćne bešike.....	57
2.1.5.2. Lečenje mišićno–invazivnog i metastatskog karcinoma mokraćne bešike .....	59
2.2. Transformišući faktor rasta beta – TGF- $\beta$ .....	64
2.2.1. Kanonski signalni put TGF- $\beta$ ; SMAD4 – prenosilac signala i transaktivator gena u odgovoru na TGF- $\beta$ .....	65
2.2.2. Alternativni signalni putevi TGF- $\beta$ .....	68
2.2.3. Uloge TGF- $\beta$ u kanceru.....	70
2.2.3.1. Efekti TGF- $\beta$ signalizacije na nivou tumorske mikrookoline .....	72
2.2.3.2. Epitelno–mezenhimna tranzicija (EMT) .....	74
2.2.3.3. TGF- $\beta$ ciljana terapija – inhibitori TGF- $\beta$ puta u terapiji kancera .....	75
2.2.4. TGF- $\beta$ u urotelnom karcinomu mokraćne bešike.....	77
2.3. Apoptoza u urotelnom karcinomu mokraćne bešike .....	81
2.3.1. Mitohondrijalni (unutrašnji) put apoptoze u kanceru .....	81
2.3.2. Put receptora smrti – spoljašnji put apoptoze u kanceru .....	83
2.3.2.1. Recetori smrti DR4 i DR5 .....	84
2.3.2.2. FAS.....	88
2.3.2.3. Ostali receptori smrti .....	89
2.4. Transformišući faktor rasta beta i apoptoza .....	90
2.4.1. Uloga TGF- $\beta$ u indukciji apoptoze putem receptora smrti.....	92
2.5. Epigenetska regulacija u kanceru .....	95



2.5.1. Epigenetske promene u urotelnom karcinomu mokraćne bešike .....	95
2.5.1.1. Aberantna DNK metilacija .....	96
2.5.1.2. Remodelovanje hromatina i modifikacije histona .....	97
2.5.1.3. Nekodirajuće RNK .....	100
<b>3. Hipoteza i cilj istraživanja.....</b>	<b>102</b>
<b>4. Materijali i metode.....</b>	<b>105</b>
4.1. Pacijenti i histopatološka analiza.....	105
4.1.1. Demografsko–epidemiološke i kliničke karakteristike pacijenata .....	105
4.1.2. Histopatološka analiza.....	106
4.2. Imunohistohemijska analiza .....	107
4.2.1. Konstrukcija tkivnih mikronizova .....	107
4.2.2. Imunohistohemijsko bojenje .....	108
4.2.3. Interpretacija i scoring imunohistohemijskih bojenja .....	109
4.3. Statistička obrada podataka .....	110
<b>5. Rezultati.....</b>	<b>111</b>
5.1. Kliničko – patološke karakteristike pacijenata.....	111
5.2. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike .....	116
5.2.1. Povezanost ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa kliničko–patološkim karakteristikama .....	116
5.2.2. Asocijacija ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa preživljavanjem pacijenata .....	119
5.3. Ekspresija Smad4 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike .....	121
5.3.1. Povezanost ekspresije Smad4 sa kliničko–patološkim karakteristikama .....	121
5.3.2. Asocijacija ekspresije Smad4 sa preživljavanjem pacijenata.....	124
5.4. Ekspresija ćelijskih receptora smrti u urotelnom karcinomu mokraćne bešike .....	126
5.4.1. Povezanost ekspresije DR4, DR5 i FAS sa kliničko–patološkim karakteristikama.....	126
5.4.2. Asocijacija ekspresije DR4, DR5 i FAS sa preživljavanjem pacijenata .....	135
5.5. Ekspresija epigenetskog utišivača EZH2 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike .....	139
5.5.1. Povezanost ekspresije EZH2sa kliničko–patološkim karakteristikama .....	139
5.5.2. Asocijacija ekspresije EZH2 sa preživljavanjem pacijenata .....	142
5. 6. Analiza međusobne korelacije ekspresije markera.....	144
5.6.1. Korelacija TGF- $\beta$ 1 i ćelijskih receptora smrti u urotelnom karcinomu mokraćne bešike.....	144
5. 7. Multivarijantna analiza.....	148
<b>6. Diskusija.....</b>	<b>150</b>
6.1. Analiza ekspresije TGF- $\beta$ 1 i značaj TGF- $\beta$ signalizacije u urotelnom karcinomu .....	152
6.2. TGF- $\beta$ 1, ćelijski receptori smrti i apoptoza.....	161
6.3. EZH2 i Smad4 interakcija – epigenetska regulacija TGF- $\beta$ signalizacije i ekspresije receptora smrti.....	168

<b>7. Zaključak.....</b>	<b>173</b>
<b>8. Literatura.....</b>	<b>176</b>
<b>Biografija autora.....</b>	<b>209</b>

## Lista skraćenica

AJCC	Američki udruženi komitet za rak (engl. American Joint Committee on Cancer)
APO-1	Apoptotski antigen 1 (engl. apoptosis antigen 1), FAS, CD95
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
β-HCG	Beta–humani horionski gonadotropin
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
CK	Citokeratin
DDR	Geni reparacije oštećene DNK (engl. DNA damage repair)
DISC	Signalni kompleks koji indukuje smrt (engl. Death-inducing signaling complex)
DNK	Dezoksiribonukleiska kiselina
DPC4	Gen koji kodira sintezu Smad4 (engl. Deleted in Pancreatic Cancer-4)
DR4	Receptor smrti 4 (engl. death receptor 4), TRAIL receptor 1
DR5	Receptor smrti 5 (engl. death receptor 5), TRAIL receptor 2
EMT	Epitelno – mezenhimna tranzicija
EZH2	Pojačivač zeste homologa 2 (engl. Enhancer of zeste homolog 2)
FADD	Fas-u pridruženi protein sa smrtnim domenom (engl. Fas-associated protein with death domain)
FAS	FS-7-pridružen površinski antigen (engl. FS-7-associated surface antigen)
FASL	Fas ligand
FGFR3	Fibroblastni faktor rasta 3 (engl. Fibroblast growth factor 3)
H&E	Hematoksilin–eozin, standardno histopatološko bojenje
HPF	Polje velikog (mikroskopskog) uvećanja (engl. high power field)
HG	Visok histološki gradus (engl. high grade)
ISUP	Internacionalno Udruženje za Urološku Patologiju
lncRNA	Duge nekodirajuće RNK (engl. long non-coding RNA)
LG	Nizak histološki gradus (engl. low grade)
LOH	Gubitak heterozigotnosti hromozomskih alela (engl. loss of heterozygosity)
MAPK	Mitogenom aktivirana protein kinaza
MIBC	Mišićno-invazivni karcinom bešike (engl. muscle-invasive bladder cancer)
miR	Mikro RNK
MMP	Matriks metaloproteinaza
NGS	Sekvencioniranje sledeće generacije (engl. next generation sequencing)
NF-kB	Nuklearni faktor kapa B (engl. Nuclear Factor - Kappa–B)

NMIBC	Ne-mišićno-invazivni karcinom mokraćne bešike (engl. non-muscle-invasive bladder cancer)
PAS	Perjodna kiselina i Šifov reagens (engl. Periodic acid-Schiff)
RTK	Receptor tirozin kinaza
PD-L1	Ligand 1 receptora programirane smrti (engl. programmed death ligand 1)
PI3K	Fosfatidilinozitol-3-kinaza (fosfoinozimid-3-kinaza)
PUNLMP	Papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala
RNK	Ribonukleinska kiselina
ROS	Reaktivne vrste kiseonika (engl. reactive oxygen species)
R-SMAD	Receptorom–regulisani Smad proteini
SARA	Protein udružen sa TGF- $\beta$ receptorom koji vezuje Smad (engl. Smad anchor for receptor activation)
siRNA	Mala interferišuća RNK (engl. small interfering RNA)
SNP	Polimorfizam jednog gena (engl. single nucleotide polymorphism)
SMAD	Homologi familije gena SMA ("small" worm phenotype) <i>Caenorhabditis elegans</i> i MAD ("Mothers Against Decapentaplegic") <i>Drosophila</i> .
TCGA	Atlas kancerskog genoma (engl. The Cancer Genome Atlas)
TERT	Reverzna transkriptaza telomeraze, katalitička subjedinica enzima telomeraze
TGF- $\beta$	Transformišući faktor rasta beta
TGFBR1	Receptor 1 za transformišući faktor rasta beta
TGFBR2	Receptor 2 za transformišući faktor rasta beta
TNF- $\alpha$	Faktor nekroze tumora alfa (engl. tumor necrosis factor $\alpha$ )
TRAIL	Sa TNF-om povezan apoptoza-indukujući ligand (engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand)
TUR	Transuretralna resekcija
VEGF	Vaskularni endotelni faktor rasta (engl. vascular endothelial growth factor)
WHO	Svetska Zdravstvena Organizacija (engl. World Health Organization)

# 1. Uvod

---

Karcinom mokraćne bešike je najčešća maligna neoplazma urinarnog trakta i deveti po učestalosti maligni tumor u svetu. Zbog potrebe za doživotnim praćenjem, cistoskopskim kontrolama i lečenjem rekurentne bolesti, u odnosu na druge maligne bolesti karcinom bešike predstavlja značajno ekonomsko opterećenje za zdravstveni sistem.

Urotelni karcinom čini preko 90% karcinoma mokraćne bešike. Obuhvata dva različita entiteta sa posebnim molekularnim svojstvima i kliničkim ponašanjem: ne-mišićno-invazivni (superficialni) i mišićno-invazivni urotelni karcinom. Superficialni tumori bešike, ograničeni na mukozu ili sa infiltracijom subepitelnog vezivnotkivnog sloja, odlikuju se čestom pojavom recidiva (50-70%), dok je progresija retka, a petogodišnje preživljavanje je oko 90%. Mišićno invazivni urotelni karcinom se najčešće dijagnostikuje *de novo* i karakteriše se čestim razvojem metastatske bolesti, sa dužinom preživljavanja 12-15 meseci. Nedavnim studijama genomske ekspresije utvrđeno je da urotelni karcinom obuhvata brojne molekularne podtipove, stratifikovane na osnovu kompleksnog mutacionog pejzaža sa alteracijama u mnogobrojnim genima i signalnim putevima, koji prevazilaze tradicionalnu podelu na osnovu gradusa i stadijuma bolesti. Nova saznanja o molekularnim karakteristikama i heterogenosti urotelnog karcinoma otvaraju nove mogućnosti za prognozu, praćenje bolesti i personalizovanu terapiju. Analiza ekspresije biomarkera je savremeni princip u istraživanju tumora čiji rezultati bi mogli imati značaj u identifikaciji pacijenata sa visokim rizikom od progresije i definisanju specifičnih molekularnih ciljeva u inovativnom i efikasnom terapijskom pristupu koji se označava kao target terapija.

Transformišući faktor rasta beta (TGF- $\beta$ ) je multifunkcionalni citokin i plejotropni faktor rasta, sa brojnim ključnim ulogama u ćelijskoj proliferaciji, diferencijaciji, migraciji, adheziji, imunskom odgovoru i ćelijskoj smrti. U ranim fazama karcinogeneze TGF- $\beta$  je moćni inhibitor tumorskog rasta. Međutim, tokom tumorske progresije, povećana ekspresija TGF- $\beta$  u ćelijama tumora, kao i parakrino u stromalnim ćelijama, intenzivno je uključena u tumorsku invaziju i metastaziranje. Pored dobro opisane uloge u epitelno-mezenhimnoj tranziciji, TGF- $\beta$  je jedan od najpotentnijih regulatora apoptoze.

Apoptoza je genetski kontrolisan mehanizam ćelijske smrti koji ima fundamentalnu ulogu u tumorskoj progresiji. Inicijacija apoptoze je precizno regulisana sa dva aktivaciona puta – unutrašnjim (mitohondrijalnim) i spoljašnjim putem, koji se pokreće vezivanjem liganda za

receptore smrti na površini ćelije. Dok je ekspresija ključnih molekula mitohondrijalnog puta apoptoze detaljno ispitivana u karcinomu urotela, veoma mali broj studija je istraživao ekspresiju receptora smrti. Opisano je šest ćelijskih receptora smrti, transmembranskih proteina koji pripadaju superfamiliji faktora tumorske nekroze. Dok stimulacija nekih receptora smrti dominantno dovodi do aktivacije gena u inflamaciji i imunomodulaciji, osnovna uloga DR4 (TRAILR1), DR5 (TRAILR2) i FAS (CD95) jeste indukcija apoptoze. Primarni efekat aktivacije ovih receptora odgovarajućim ligandom je pokretanje nishodne signalne kaskade koja dovodi do apoptotske smrti ćelije. Ekspresija DR4, DR5 i FAS ispitivana je u nekim neoplazmama, pre svega u kolorektalnom i karcinomu pluća, ali su literaturni podaci o njihovoj ekspresiji u urotelnom karcinomu veoma oskudni. Rezultati malobrojnih studija ukazali su povezanost smanjene imunohistohemijske ekspresije receptora smrti u tumorskim ćelijama sa mortalitetom od kancera bešike.

TGF- $\beta$  stimuliše ekspresiju liganda za receptore smrti (TRAIL i FASL), interakcijom sa promotorskim sekvencama njihovih gena. TRAIL apoptozu pokreće preko svojih receptora DR4 i DR5 i jedan je od najistraživanijih antikancerskih agenasa, jer indukuje apoptozu u tumorskim ćelijama in vitro i in vivo, ali ne i u normalnim ćelijama. FASL svoje funkcije ostvaruje preko receptora smrti FAS, čija aktivacija primarno indukuje spoljašnji put apoptoze. Smanjena ekspresija FAS receptora u tumoru, koja nastaje u kooperaciji sa povećanom ekspresijom TGF- $\beta$  u samom tumoru i tumorskoj mikrookolini, jedan je od osnovnih mehanizama tumorskog izbegavanja imunološkog nadzora, koja olakšava progresiju i metastaziranje.

Uprkos dugom kliničkom iskustvu sa Bacillus Calmette–Guérin (BCG) u lečenju karcinoma bešike, tek nedavno je utvrđeno da se dejstvo BCG delom ostvaruje indukcijom sekrecije TRAIL koji se vezuje za receptore smrti i pokreće apoptozu kancerskih ćelija. Utvrđeno je da ekspresija receptora smrti povećava senzitivnost na dejstvo određenih hemioterapijskih agenasa. Agonisti DR4 i DR5 receptora i inhibitori FAS liganda imaju antitumorske efekte dobro dokumentovane in vitro i in vivo i sada su u fazi kliničkih ispitivanja. Sinergistički efekat hemioterapije i signalizacije receptora smrti u indukciji apoptoze ima veliki klinički potencijal u lečenju urotelnog karcinoma.

TGF- $\beta$  signalizacija odvija se pomoću intracelularnih posrednika iz Smad familije, koji stvaraju komplekse sa zajedničkim medijatorom Smad4 i translokacijom u jedro regulišu ekspresiju gena. Novije studije ukazale su da dejstvo TGF- $\beta$  uključuje i epigenetske mehanizame regulacije. Nedavno je utvrđeno da su mutacije u hromatin remodelujućim

genima mnogo češće u karcinomu bešike nego u drugim solidnim tumorima. EZH2 je jedan od najznačajnijih epigenetskih regulatora koji bi potencijalno mogao biti uključen u TGF- $\beta$  signalizaciju u urotelnom karcinomu.

Komplikovani signalni putevi TGF- $\beta$  i kompleksan odnos sa ekspresijom receptora smrti doprineli su oskudnosti studija na humanom materijalu. S obzirom na to da ovi molekuli imaju važne funkcije u progresiji tumora, a da dobijaju sve veću pažnju kao potencijalne mete antikancerske terapije, cilj ovog istraživanja je pokušaj rasvetljenja saznanja o svojstvima i značaju ekspresije i međusobnom odnosu TGF- $\beta$  i receptora smrti u urotelnom karcinomu mokraćne bešike.

## 2. Pregled literature

---

### 2.1. Karcinom mokraćne bešike

#### 2.1.1. Epidemiologija i etiologija karcinoma mokraćne bešike

Karcinom mokraćne bešike je jedan od čestih malignih tumora na globalnom nivou (1). To je deveti najčešće dijagnostikovani maligni tumor na svetu, sa najvišim stopama incidence kod muškaraca u Južnoj i Zapadnoj Evropi, Severnoj Americi, kao i u pojedini zemljama Severne Afrike i Zapadne Azije. U toku 2012. godine dijagnostikovano je oko 430.000 novih slučajeva, dok je preko 165.000 ljudi umrlo od kancera bešike (2). Od toga, broj novoobolelih u Evropi bio je oko 150.000, a umrlih od kancera oko 53.000, što Evropu svrstava u deo sveta sa najvišim stopama incidence i mortaliteta (1). Najveća stopa incidence je u Španiji (36.7/100.000), Italiji (33.2/100.000) i Danskoj (27.4/100.000). Incidenca je u opadanju od sredine šezdesetih godina kod muškaraca iz Zapadne i Severne Evrope, isključujući baltičke zemlje, ali je u porastu u Južnoj, Centralnoj i Istočnoj Evropi (1, 3).

Kancer mokraćne bešike je na 13. mestu među uzrocima smrti od malignih bolesti. Stope mortaliteta su u opadanju, posebno u najrazvijenijim zemljama. Izuzetak su zemlje koje prolaze brzu ekonomsku tranziciju, uključujući Centralnu i Južnu Ameriku, neke zemlje Centralne, Južne i Istočne Evrope i Baltičke zemlje. Najveće stope mortaliteta su kod pacijenata muškog pola u Istočnoj i Južnoj Evropi (oko 8/100.000) i zemljama Baltika. U Evropi stope mortaliteta su u opadanju, izuzev u nekoliko zemalja našeg okruženja (Slovenija, Hrvatska i Bugarska) i zemljama Baltika, gde se beleži diskretan rast (1, 3, 4). Najveće stope incidence među ženama su u Danskoj, Norveškoj i Švajcarskoj, a najveća stopa mortaliteta, iako u opadanju, je među Dankinjama (1).

Iako razlike u polnoj distribuciji veoma variraju između zemalja, stopa incidence je značajno veća kod muškaraca nego kod žena. Muškarci obolevaju četiri puta češće od žena, dok je stopa mortaliteta 3,6 puta viša u muškom polu. U Evropi čak 80% obolelih je muškog pola. Poslednjih godina zabeležen je trend opadanja ili stabilne incidence u muškom polu, dok broj obolelih raste među osobama ženskog pola (1, 4). Razlike u preživljavanju i stopi mortaliteta od karcinoma bešike, posebno između zemalja različitog nivoa razvoja i ekonomske snage, delimično se mogu objasniti razlikama u zdravstvenim sistemima različitih zemalja, pristupu ustanovama za dijagnozu i lečenje i protokolima za kliničko zbrinjavanje obolelih (5).



U centralnoj Srbiji karcinom mokraćne bešike nalazi se na visokom četvrtom mestu vodećih lokalizacija u oboljevanju od malignih tumora kod muškaraca, sa 6,6%, dok je u populaciji žena na osmom mestu, i obuhvata 2,9% slučajeva oboljevanja od svih malignih tumora. Samo u toku 2015. godine bilo je 1315 novodijagnostikovanih slučajeva oboljevanja, a od toga muškarci su činili 72.7%. Stopa incidencije oboljevanja na 100.000 stanovnika od karcinoma mokraćne bešike je u centralnoj Srbiji 37,7, a u Nišavskom okrugu 32,1 za muškarce, a 13,4 u centralnoj Srbiji i 9,6 u Nišavskom okrugu za žene. Među vodećim lokalizacijama u umiranju od malignih bolesti kod muškaraca, mokraćna bešika je na 7. mestu (3,6% smrti od malignih bolesti), dok se kod žena ne nalazi u prvih deset vodećih lokalizacija po smrtnosti. U toku 2015. godine od karcinoma mokraćne bešike umrlo je preko 400 osoba. Stopa mortaliteta na 100.000 stanovnika za muškarce u centralnoj Srbiji je 15,7, a u Nišavskom okrugu 11,6 (6).

Pušenje je glavni faktor rizika za razvoj kancera mokraćne bešike (7, 8). Pušači imaju 2,5 puta veći rizik za nastanak karcinoma bešike. Pušenje cigareta je odgovorno za oko 50% tumora i povezano je sa najmanje 40% smrti od karcinoma mokraćne bešike. Globalno kretanje incidence ove bolesti u značajnoj meri odražava prevalencu pušenja. Polne i geografske razlike u incidenci najvećim delom su uslovljene razlikama u navici pušenja. Trenutna slika oboljevanja od karcinoma odslikava prevalenciju pušenja od pre 20 ili 30 godina, jer je prirodna istorija bolesti takva da je karcinogeneza dugotrajan proces (9). U nekim populacijama glavni faktor rizika i uzročnik karcinoma bešike je infekcija trematomom *Shistosoma haematobium*. Šistozomijaza pogađa više od 260 miliona ljudi i endemska je u 78 zemalja sveta, uglavnom na Srednjem Istoku i u Africi (10). Karcinom bešike se u ovim područjima gde je urogenitalna šistozomijaza endemska javlja kod mlađih pacijenata, u 40-im i 50-im godinama, a najčešći histološki tip je skvamocelularni karcinom, za razliku od ostatka sveta, gde je glavni i dominantni histološki tip karcinoma urotelni (tranziciocelularni) karcinom. Međutim, u endemskim područjima se beleži pad skvamocelularnog karcinoma, a raste učestalost urotelnog, verovatno kao odraz smanjenja šistozomijazne infekcije, a porasta uticaja pušenja (11).

Okupacioni rizici za nastanak karcinoma mokraćne bešike uključuju ekspoziciju aromatičnim aminima, anilinskim bojama, benzidinima i drugim hemikalijama i odgovorni su za nastanak 1-7% tumora mokraćne bešike (12, 13). Ovim karcinogenima su uglavnom izloženi radnici u proizvodnji farbi i boja, gume i aluminijuma.

Nasledni genetski faktori takođe imaju ulogu u karcinogenezi karcinoma mokraćne bešike (7, 14). Polimorfizmi gena za enzime uključene u metabolizam karcinogena mogu predstavljati značajan faktor rizika za nastanak tumora. N-acetiltransferaza 2 je ključni enzim u metabolizmu aromatičnih amina, a njena varijanta koja sporo acetiluje povećava osetljivost na duvanski dim, policiklične aromatične ugljovodonike i druge okupacione karcinogene. Upotreba leka pioglitazon kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 povećeva rizik za nastanak karcinoma bešike, međutim ovo povećanje nije statistički značajno, te, iako je lek klasifikovan kao supstanca sa mogućim karcinogenim efektom na mokraćnu bešiku, značaj ovog leka na oboljevanje od karcinoma bešike u opštoj populaciji je veoma limitiran (15).

Karcinom mokraćne bešike je najskuplji maligni tumor za lečenje i kliničko zbrinjavanje od dijagnoze do smrti, delom zbog svoje visoke godišnje incidence, koju dominantno čini ne-mišićno-invazivni karcinom bešike, koji je udružen sa visokim doživotnim rizikom od recidiva, čak do 60-70%, i zahteva nadzor u obliku čestih cistoskopskih kontrola, citologije i intravezikalne hemoterapije ili imunoterapije. Progresija u mišićno-invazivnu bolest udružena je sa verovatnoćom od 50% tokom 5 godina preživljavanja (7, 16).

### **2.1.2. Urotelni karcinom mokraćne bešike – histopatološka svojstva**

Urotelni karcinom predstavlja većinu malignih tumora mokraćne bešike. Na prezentaciji oko 75% pacijenata ima superficijalni karcinom (ne-mišićno-invazivni karcinom, NMIBC), a oko 25% se prezentuje sa mišićno-invazivnom (MIBC) ili metastatskom bolešću. Oko 50% superficijalnih tumora su niskog histološkog gradusa, dok je velika većina mišićno invazivnih karcinoma visokog gradusa (17).

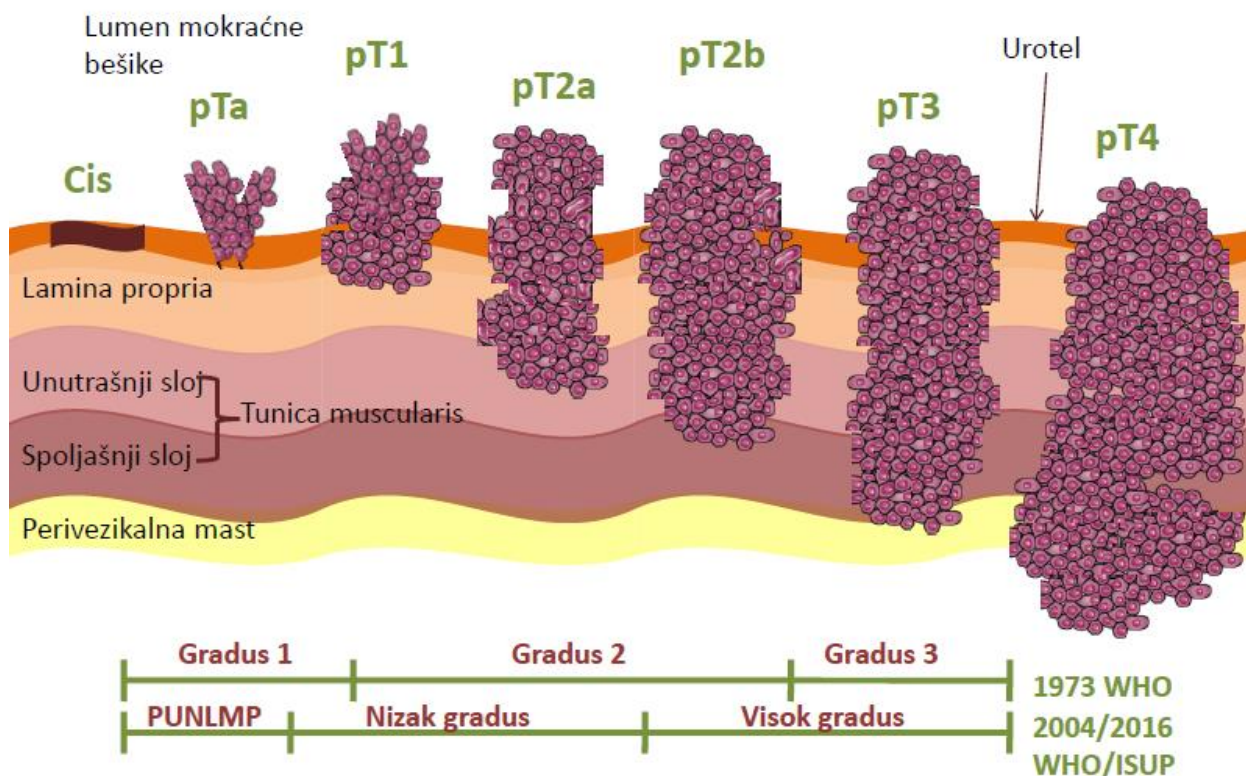
#### **2.1.2.1. Gradiranje urotelnog karcinoma**

Određivanje histološkog gradusa urotelnog karcinoma ima ključni značaj u stratifikaciji tumora u različite prognostičke grupe, što omogućava procenu rezultata lečenja i optimalan pristup zbrinjavanju pacijenata (18). U superficijalnom, ne-mišićno-invazivnom urotelnom karcinomu histološki gradus je najznačajniji prognostički faktor (19). Svetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization* – WHO) je 1973. godine uvela numerički sistem gradiranja koji je bio baziran na ćelijskoj anaplaziji (20). Od tada je sistem gradiranja u nekoliko navrata pretrpeo modifikacije, da bi i danas bio na snazi sistem koji je WHO definisala 2004. godine. Time je zamenjena kategorija numeričkog gradiranja (gradus 1, 2 i 3), čija je reproducibilnost bila zadovoljavajuće visoka, ali je kategorija klasifikovana kao urotelni karcinom Gradus 2 obuhvatala tumore veoma različitog biološkog potencijala i

prognostičkih svojstava. U novom gradusnom sistemu urotelni karcinom se na osnovu citološke i arhitekturne atipije deli na tumore niskog i visokog gradusa, a uvedena je i nova kategorija – papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala (PUNLMP) (21, 22). Ovaj sistem je eliminisao ili, u najmanju ruku, značajno smanjio neodređenost dijagnostičkih kategorija iz sistema od 1973. godine, pre svega kategorije tumora Gradus 2 (G2) i granične grupe G1/2 i G2/3. Na krajevima spektra gradusni sistemi iz 1973. i 2004. godine dobro koreliraju (Slika 1), dok se oko 40% tumora koji su ranije označavani kao Gradus 2 po novoj klasifikaciji svrstava u kategoriju tumora visokog gradusa (19). Sistem gradiranja iz 2016. godine je u osnovi veoma sličan onom iz 2004. godine, a najznačajniji pomak u odnosu na sistem iz 1973. godine jeste ukidanje neodređenih kategorija gradiranja (G1/2 i G2/3) i podela tumora u homogene grupe (17).

Prognoza pacijenata sa urotelnim karcinomom u velikoj meri zavisi od tačnog određivanja tumorskog gradusa. Bez obzira na to koji se sistem za gradiranje koristi, studije su potvrdile da je histološki gradus značajan i nezavisni prediktor progresije bolesti i pojave recidiva (23-25). Međutim, reproducibilnost rezultata određivanja histološkog gradusa i dalje može predstavljati problem, uprkos pojednostavljenom sistemu gradiranja, jer histološke razlike između pojedinih tipova tumora mogu biti veoma suptilne, a konsenzusa među patolozima nema. Pouzdani sistem klasifikacije koji je jasan i patolozima i urolozima osigurava da agresivni tumori ne budu potcenjeni, a manje agresivni preterano lečeni (18). Evropsko udruženje urologa (European Association of Urology – EAU) preporučuje korišćenje obe klasifikacije, i one iz 1973. (WHO), i klasifikacije 2004/2016 (WHO/ISUP) (26). U patologiji je, međutim, za univerzalnu upotrebu preporučen sistem gradiranja WHO iz 2016. godine, koji bi trebalo da bude prihvaćen i rutinski primenjivan širom sveta.

Prema sistemu WHO iz 2016. godine (17) pTa i pT1 tumori gradiraju se u tumore niskog gradusa (*low grade* – LG) i tumore visokog gradusa (*high grade* – HG). S druge strane, svi tumori koji invadiraju mišićni sloj (*musculus detrusor vesicae urinariae*) smatraju se tumorima visokog gradusa (HG). Sistem iz 2016. godine uveo je termin *neinvazivni tumori*, kako bi se preciznije diferencirali neinvazivni tumori (LG i HG papilarni karcinomi) od invazivnih urotelnih karcinoma.



**Slika 1. Određivanje histološkog gradusa i patološkog stadijuma tumora mokraćne bešike.** Prikazani su stadijumi tumora bešike u skladu sa TNM sistemom. Gradiranje tumora po sistemu Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO) iz 1973. godine je modifikovano i uvedena je nova podela 2004. godine, u skladu sa kriterijumima WHO/ISUP (Internacionalno Udruženje za Urološku Patologiju), koja je zadržana i u Klasifikaciji iz 2016. godine (17, 21). Osnovna razlika je u klasifikaciji papilarnih tumora. Dok su u staroj klasifikaciji papilarni urotelni tumori podeljeni na numeričke graduse 1, 2 i 3, u novom sistemu papilarne neoplazme obuhvataju: papilarnu urotelnu neoplazmu niskog malignog potencijala (PUNLMP), ekvivalentnu gradusu 1, papilarni urotelni karcinom niskog gradusa i papilarni urotelni karcinom visokog gradusa. (Modifikovano iz reference (27)).

#### **2.1.2.1.1 Urotelne lezije niskog histološkog gradusa**

##### **Papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala (PUNLMP)**

Kategorija PUNLMP je uvedena u klasifikaciju tumora bešike po prvi put 1998. godine (28) i zadržala se u kasnijim sistemima klasifikacije (17, 21). Ova kategorija je od velikog značaja jer ne nosi odrednicu „kancer“, što je posebno važno za mlađe pacijente, kod kojih se PUNLMP uglavnom i dijagnostikuje. Ovakvim imenovanjem tumora izbegava se stigma

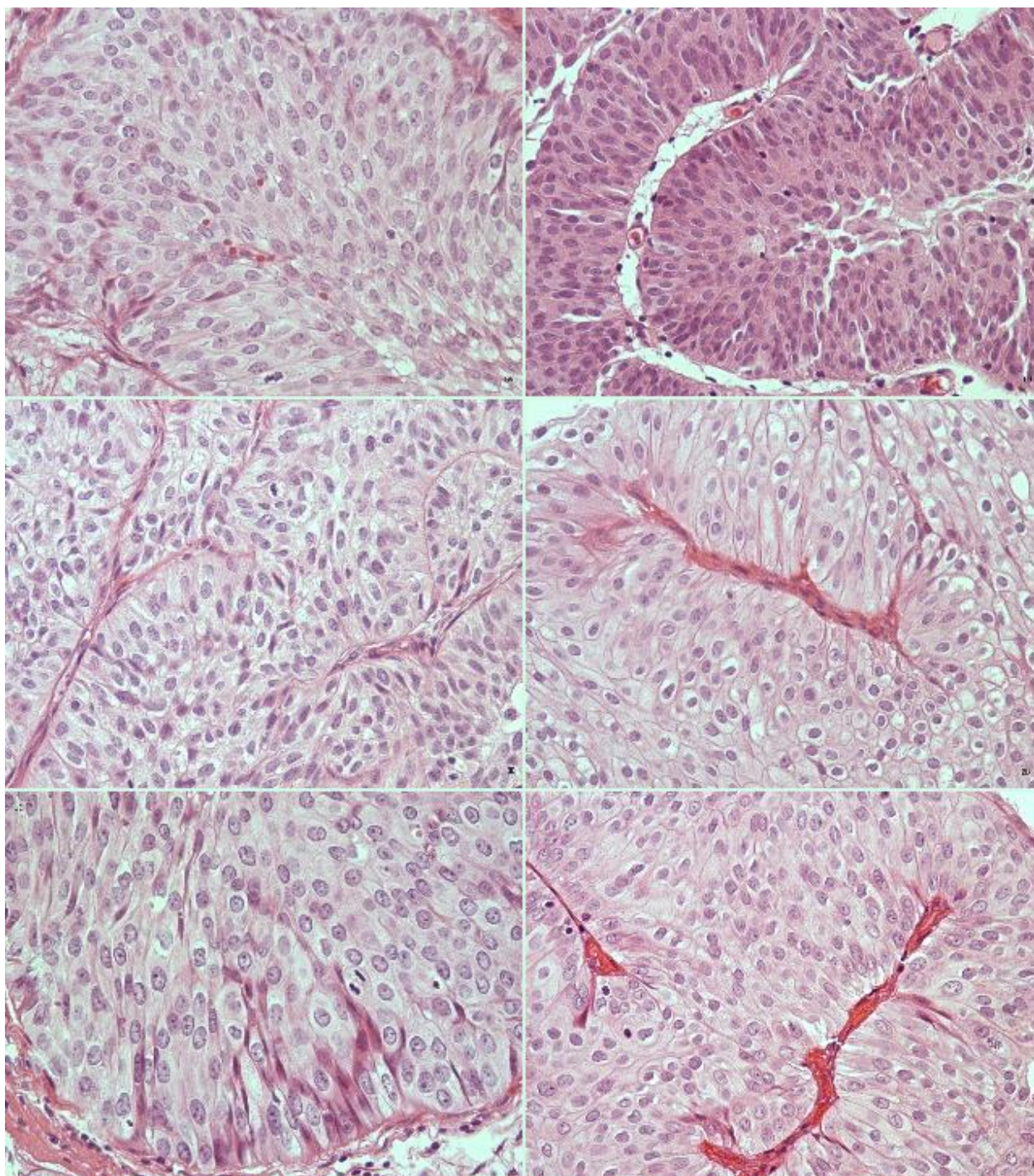
dijagnoze kancera sa svim svojim psihosocijalnim i finansijskim posledicama. Ukoliko se poštuju veoma strogi kriterijumi za dijagnozu, ova kategorija obuhvata veoma ograničenu grupu tumora. PUNLMP je egzofitična lezija papilarne građe, gde su papile tanke, bez fuzionisanja, pokrivene uglavnom normalnim i regularno polarizovanim urotelnim ćelijama, bez elemenata atipije ili sa minimalnom citološkom atipijom. Jedra tumorskih ćelija mogu biti blago uvećana, a postoji i diskretno povećanje broja atipičnih ćelija u odnosu na normalan urotel. Površne „umbrella“ ćelije su uglavnom prisutne. Mitoze su samo izuzetno prisutne i to isključivo u bazalnim slojevima. Nekroze nisu prisutne.

PUNLMP se ne može smatrati benignom lezijom, jer postoji značajan rizik za pojavu recidiva, a postoji i mali rizik od progresije bolesti, iako je on veoma nizak, 8-10% (29-31). Razlika između PUNLMP i pTa LG tumora je pre svega morfološka, iako neki autori smatraju da ove lezije spadaju u istu grupu zbog sličnog kliničkog ponašanja (18). PUNLMP i pTa LG razlikuju se i na molekularnom nivou. PUNLMP odlikuje se prekomernom ekspresijom proteina FGFR3 i CK20, dok pTa niskog gradusa pokazuje niži nivo ekspresije određenih mikro-RNK (miR-125b) (32, 33). Još uvek ne postoje jasne smernice i neophodne su dalje studije da bi se odredila dužina vremena praćenja i intervala kontrole. Svakako se preporučuje dugoročno praćenje.

### **Neinvazivni papilarni urotelni karcinom niskog gradusa (pTa LG)**

Neinvazivni papilarni urotelni karcinom niskog gradusa histološki se karakteriše urednim izgledom i u citološkom i arhitekturnom smislu, tj. uredno aranžiranim papilama (17, 34). Uvek postoji blagi, ali određeni stepen atipije, izvesni citološki dearanžman, sa varijacijama u polaritetu ćelija, veličini i obliku jedara, kao i distribuciji hromatina (Slika 2). Najmaanje minimalna nuklearna atipija koja je uvek prisutna predstavljena je nepravilno zgrudvanim hromatinom i nuklearnom hiperhromazijom. Mitoze su retke i prisutne u donjoj polovini urotela. Na tangencijalnim i kosim presecima analiza histoarhitektonike može biti otežana. Međutim, kada su u istoj leziji prisutne zone različitih gradusa, tumor se uvek gradi u skladu sa najvišim uočenim gradusom. Histološke razlike između PUNLMP i pTa LG mogu biti veoma diskretne, ali se intraobserverska i interobserverska reproducibilnost poboljšavaju sa vremenom i iskustvom, s obzirom na to da je PUNLMP relativno sveži entitet u uropatologiji (18). Urotelni karcinom niskog gradusa može da reidivira i može da progredira u invazivni karcinom, iako retko, u oko 10% slučajeva (34). Ovi tumori retko predstavljaju pretnju po život pacijenta.





**Slika 2. Patohistološki izgled urotelnog papilarnog karcinoma niskog histološkog gradusa (H&E, originalno uvećanje x400)**

#### ***2.1.2.1.2. Urotelne lezije visokog histološkog gradusa***

##### **Neinvazivni papilarni urotelni karcinom visokog gradusa (pTa HG)**

Lezije visokog gradusa često se mogu prepoznati već na najmanjem mikroskopskom uvećanju, jer ih karakteriše u manjoj ili većoj meri deorganiziran histološki izgled, sa

citonuklearnom i arhitekturnom dezorganizacijom. Urotelni karcinomi visokog gradusa sadrže ćelije koje mogu biti diskohezivne, sa velikim hiperhromnim jedrima i često prominentnim nukleolusima. Postoji arhitekturni dearanžman i gubitak polariteta ćelija. Spektar pleomorfizma je širok, od umerenog do izraženog, ali uvek bar neke od tumorskih ćelija pokazuju jasnu anaplaziju. Iako stepen pleomorfizma u lezijama visokog gradusa varira, konsenzus je da se ovi tumori ne dele dalje u dve grupe. Mitotske figure su česte, uključujući i atipične. Mogu se videti i intraepitelne nekroze. Debljina urotela može značajno da varira, papile su fuzionisane i pokazuju anarhični rast (18, 34).

Tumori visokog gradusa su agresivne neoplazme. Ovi tumori imaju mnogo veći stepen progresije u odnosu na LG tumore, veću stopu incidence invazije, i mogu biti svih stadijuma, pTa-pT4. Urotelni karcinomi pT2-4 generalno se klasifikuju kao tumori visokog gradusa (17, 21). HG tumori pokazuju visoku stopu progresije, 50-65%, kao i recidiviranja 14,8-80,7% (35, 36).

### **Carcinoma in situ (CIS)**

*Carcinoma in situ* ili „flat“ urotelni karcinom definiše se kao prisustvo citološki malignih ćelija unutar ravnog urotela, bez razvoja papilarnih proliferata, i smatra se lezijom visokog gradusa (34). CIS ima varijabilne karakteristike i obuhvata mikromorfološki spektar od atipije koja zahvata celu debljinu epitela do rasutih malignih ćelija u inače normalnom epitelu (pagetoidno širenje). Opisano je pet osnovnih morfoloških tipova CIS-a (37) čija je zajednička karakteristika HG citološka atipija, s tim da unutar iste lezije može i često postoji više od jednog tipa. Tipovi CIS-a su: a) CIS velikih pleomorfni ćelija, najčešći tip, sa ćelijama obilne citoplazme i pleomorfni jedara, b) CIS velikih ćelija bez pleomorfizma, c) sitnoćelijski CIS, bez neuroendokrine diferencijacije, sa ćelijama relativno oskudne citoplazme i minimalnim pleomorfizom, d) viseći (engl. clinging) CIS sa denudiranim urotelom i obično jednim slojem ćelija; e) kancerizacija urotela, sa pedžetoidnim širenjem kroz urotel (klasteri ili pojedinačne atipične ćelije), podrastanje ispod normalnog urotela tj. zamena bazalnog sloja atipičnim ćelijama, ili prerastanje atipičnih ćelija preko urotela. Neoplastične ćelije CIS-a su često diskohezivne i zato se lako ljušte u urin. Kada je ćelijsko ljuštenje (engl. shedding) izraženo, dolazi do denudacije urotela, sa malim brojem CIS ćelija koje se drže za bazalnu membranu (clinging CIS) (37).

Makroskopski, CIS se obično manifestuje kao zona crvenila i granuliranosti mukoze, ili kao zadebljanje urotela koje ne stvara evidentnu intraluminalnu masu. CIS je često multifokalan,



može da zahvati značajan deo površine urotela bešike, da se širi u uretere ili uretru. CIS je često prisutan u okolnoj mukozu oko urotelnih karcinoma visokog gradusa. Ukoliko se ne leči, u 50-75% slučajeva CIS progredira u mišićno invazivni karcinom.

### **Invazivni urotelni karcinom**

Invazivni urotelni karcinom može da bude udružen sa papilarnim urotelnim karcinomom, obično visokog gradusa, ili sa CIS. Sepen invazije zida, odnosno proširenosti bolesti (stadijum) u momentu postavljanja dijagnoze najvažniji je faktor koji određuje prognozu bolesti. Skoro svi mišićno-infiltrativni urotelni karcinomi su visokog histološkog gradusa, tako da gradiranje infiltrativne komponente nije od ključnog značaja, kao što je to slučaj u neinvazivnim papilarnim tumorima (Slika 3).

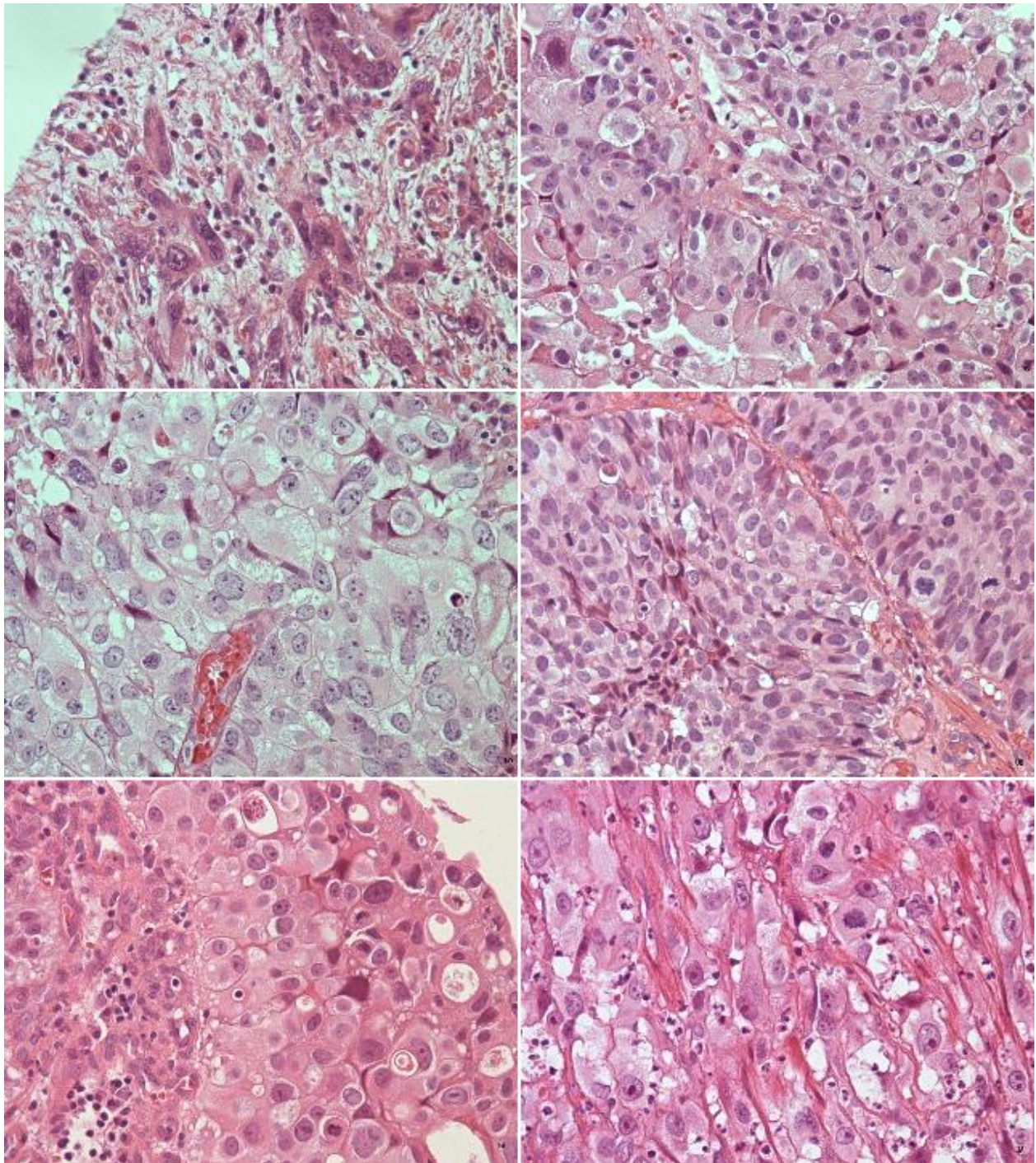
Oko 80% tumora visokog gradusa (HG) su invazivni karcinomi (34). Agresivni tumori šire se u zid bešike, a u uznapređovalom stadijumu invadiraju okolne organe (prostatu, semene kesice, uretere, retroperitoneum), mogu formirati fistulozne komunikacije sa vaginom i rektumom. Oko 40% ovih duboko invazivnih tumora daje limfogene metastaze u regionalne limfne noduse. Hematogena diseminacija zahvata najčešće jetru, pluća i kostnu srž.

#### ***2.1.2.1.3. Urotelni papilarni karcinomi sa gradusnom heterogenošću***

U istom urotelnom tumoru neretko se mogu naći dva različita gradusa, u 3-43% lezija (38, 39). WHO klasifikacija iz 2004 godine (21) preporučuje da se histološki heterogene lezije gradiraju na osnovu najvišeg gradusa koji je viđen na histološkim presecima tumora. Međutim, trenutno nema opšteprihvaćenih preporuka za opis ovih lezija, niti se aktuelna klasifikacija WHO izjašnjava precizno o ovoj temi (17). Mali broj studija istraživao je ponašanje ovakvih mikstnih lezija, i zajednički zaključak je da se LG tumori sa manje od 10% HG komponente klinički ponašaju veoma slično kao čiste LG lezije, nešto češće recidiviraju od LG tumora, ali razlika u vremenu do progresije i u stopi progresije bolesti statistički se ne razlikuje značajno od urotelnih tumora koji su čiste LG neoplazme (39, 40), te su sugerisani arbitrarni kriterijumi da se ignoriše nalaz visokog histološkog gradusa, ukoliko on čini manje od 5%, odnosno 10% tumora. Međutim, nedavno objavljena studija koja je analizirala papilarne urotelne karcinome sa gradusnom heterogenošću ukazala je da u ovim tumorima, čak i u onim delovima koji su histološki LG, postoje molekularne promene koje su markeri progresije, poput homozigotne delecije *CDKN2A* gena u mutiranom *FGFR3* putu, povećane Ki67 proliferativne aktivnosti ili pozitivne ekspresije p53 (41). Ovakvi rezultati ukazuju da se genomske izmene dešavaju u ranoj fazi tumorskog rasta, pre nego što se mogu uočiti



odgovarajuće histološke promene, te idu u prilog konvencionalnoj odluci da se tumoru dodeli najviši gradus koji se detektuje u tumoru sa gradusnom heterogenošću.



**Slika 3. Patohistološki izgled urotelnog karcinoma visokog histološkog gradusa (H&E, originalno uvećanje x400)**

U slučaju tumora sa graničnom histologijom, dodatni parametri mogu biti od pomoći u donošenju odluke o gradusu, kao što su urinarna citologija, multifokalnost, veličina lezije, prethodna istorija bolesti, rekurentna bolest. Ukoliko je prisutan CIS, tumor se smatra HG

lezijom. S obzirom na to da ne postoje nedvosmisleni kriterijumi za prijavljivanje tumora mešovutih gradusa, a pre nego što neki od predloženih arbitrarnih kriterijuma ne budu validirani i formalizovani u vidu univerzalnih preporuka i smernica, patolozi bi trebalo da zabeleže procenat i opišu sve morfološke aspekte lezija sa gradusnom heterogenošću (18).

#### **2.1.2.1.4. Molekularno gradiranje**

Urotelni karcinomi često predstavljaju heterogene ćelijske populacije, a u određivanju gradusa uvek postoji ograničenje kako intra- tako i interobserverske reproducibilnosti. Molekularni markeri mogu doprineti tačnijem histološkom gradiranju urotelnog karcinoma, što poboljšava selekciju modaliteta lečenja pacijenta, iako njihova upotreba još uvek nije deo standardne kliničke prakse (42-45).

Mutacije *FGFR3* i *TP53* ključne su alteracije u genetskom razvoju urotelnih neoplazmi i karakterišu dva različita, međusobno isključiva genetska puta u patogenezi urotelnog karcinoma (46). Mutacije *FGFR3* jedan su od najčešćih događaja u urotelnoj karcinogenezi, i snažno su povezane sa tumorima niskog gradusa, neinvazivnim stadijumom bolesti i ređom pojavom recidiva (47, 48). Mutacije *FGFR3* nađene su u čak 84% G1 tumora (48). Nasuprot tome, mutacije gena *TP53* su povezane sa tumorima visokog histološkog gradusa, uznapređovalim stadijumom i čestim recidivima (Slika 4).

#### **2.1.2.2. Stadiranje urotelnog karcinoma**

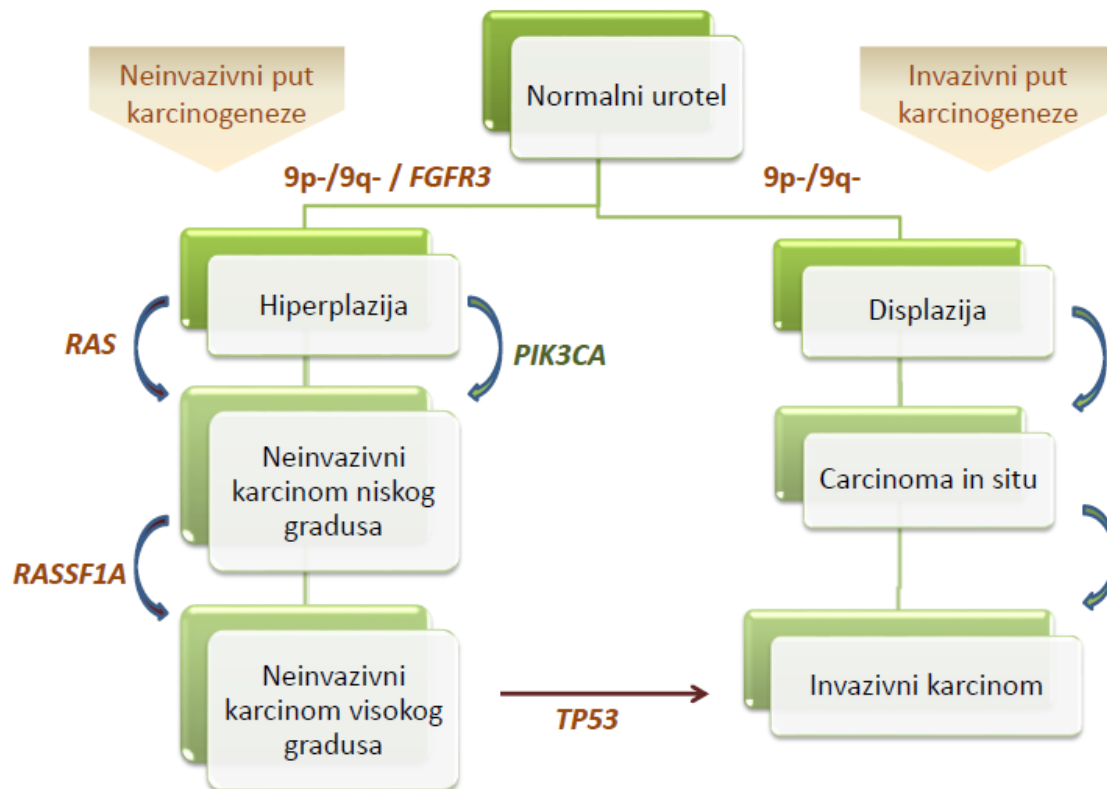
Određivanje patološkog stadijuma je zlatni standard u dijagnostici karcinoma mokraćne bešike. Patološki stadijum je daleko pouzdaniji i tačniji kriterijum od kliničkog stadiranja, koje uključuje bimanuelni pregled, cistoskopiju i radiografsko snimanje. Međutim, određivanje patološkog stadijuma je zahtevan proces, jer može biti ograničeno kvalitetom uzoraka dobijenih transuretralnom resekcijom. Veoma često je patološka interpretacija dubine invazije tumora otežana efektom kautera i distorzionim artefaktima (49). Na uzorcima dobijenim transuretralnom resekcijom najveća poteškoća za patologa je prepoznavanje fokalne, superficijalne invazije lamine proprije i diferencijacija invazije mišićnog sloja zida bešike (*tunica muscularis propria*) od invazije snopova glatkomišićnih vlakana sluznice (*lamina muscularis mucosae*), odnosno, diferencijacija stadijuma T1 od T2, što presudno utiče na dalje lečenje pacijenta (50, 51).

Stadijum karcinoma mokraćne bešike je najvažniji prognostički faktor kod invazivnog urotelnog karcinoma (19). Oko 75% tumora mokraćne bešike dijagnostikuje se kao ne-



mišićno-invazivna bolest (NMIBC). Od toga, 50-70% ima recidiv bolesti, a oko 10-15% razvije progresiju bolesti u karcinom sa invazijom mišićnog sloja (52).

Klasifikacija malignih tumora mokraćne bešike vrši se u skladu sa preporukama Internacionalne Unije protiv kancera (UICC) koja je 2017. godine objavila Osmo izdanje TNM klasifikacije malignih tumora, ili prema smernicama Priručnika za stadiranje, osmo izdanje, koji je nedavno objavio Američki udruženi komitet za rak (AJCC) (53). Vodeći autori i uropatolozi smatraju američko izdanje superiornim (54), jer sadrži preciznije smernice za gradiranje i stadiranje tumora i inkorporiralo je nova saznanja o karcinomu bešike koje TNM klasifikacija nije uzela u obzir, a još uvek je zadržala i opsolentni termin „tranziciocelularni karcinom“



**Slika 4. Model karcinogeneze u mokraćnoj bešici.** Gubitak heterozigotnosti na hromozomu 9 (LOH9) je najraniji poznati genetski događaj u karcinogenezi i dešava se u svim tumorima urotela, izuzev u urotelnim papilomima. LOH9 je prisutan u urotelnim karcinomima bilo kog gradusa i stadijuma. Tumori sa mutacijom *FGFR3* karakterišu se niskim malignim potencijalom. Za progresiju tumora neophodan je niz drugih genetskih alteracija, poput mutacije gena *PIK3CA* i/ili gubitak *RASSF1A*.

### 2.1.2.2.1. TNM klasifikacija i stadiranje karcinoma mokraćne bešike

Klasifikacija malignih tumora mokraćne bešike u našoj zemlji vrši se u skladu sa aktuelnim Osmim izdanjem TNM klasifikacije malignih tumora, koja je objavljena 2017. godine. Međunarodna oznaka malignih tumora mokraćne bešike je ICD-O-3 C67. Definisana je postupak određivanja T, N i M kategorije (Tabela 1 i 2) (55).

Za definisanje kategorije T, koja se odnosi na primarni tumor, primenjuju se fizički pregled, medicinski imidžing i endoskopija. Prema ovoj klasifikaciji, za dijagnozu tumora mokraćne bešike neophodna je histološka ili citološka potvrda bolesti. Odgovarajućoj T kategoriji se u slučaju postojanja višestrukih tumora dodaje sufiks *m*, dok se u slučaju prisustva *carcinoma in situ* može dodati sufiks *is*.

**Tabela 1. TNM klasifikacija malignih tumora mokraćne bešike**

#### **T – Primarni tumor**

TX Primarni tumor se ne može proceniti

T0 Nema dokaza primarnog tumora

Ta Neinvazivni papilarni karcinom

Tis *Carcinoma in situ*: ‘flat tumour’

T1 Tumor invadira subepitelno vezivno tkivo

T2 Tumor invadira mišićni sloj

T2a Tumor invadira superficijalnu muskulaturu (unutrašnju polovinu mišića)

T2b Tumor invadira duboki mišić (spoljašnju polovinu mišića)

T3 Tumor invadira perivezikalno tkivo:

T3a mikroskopski

T3b makroskopski (ekstravezikalna masa)

T4 Tumor invadira neku od sledećih struktura : stromu prostate, semene kesice, uterus, vaginu, pelvični zid, trbušni zid

T4a Tumor invadira stromu prostate, semene kesice, uterus ili vaginu

T4b Tumor invadira zid male karlice ili trbušni zid

#### **N – Regionalni limfni nodusi**

NX Regionalni limfni nodusi se ne mogu proceniti

N0 Bez metastaza u regionalnim limfnim nodusima

N1 Metastaze u jednom limfnom nodusu male karlice (hipogastrični, obturatorni, spoljni ilijačni ili presakralni)

N2 Metastaze u više nodusa male karlice (hipogastrični, obturatorni, spoljni ilijačni ili presakralni)

N3 Metastaze u zajedničkom ilijačnom limfnom nodusu / nodusima

#### **M – Udaljene metastaze**

M0 Bez udaljenih metastaza

M1 Metastaze su prisutne

M1a Neregionalni limfni nodusi

M1b Ostale lokalizacije udaljenih metastaza

Kategorija N, koja se odnosi na odsustvo ili prisustvo i stepen metastaza u regionalnim limfnim nodusima, određuje se metodama fizičkog pregleda i medicinskog imidžinga. Regionalnim limfnim nodusima smatraju se limfni čvorovi male karlice smešteni ispod

bifurkacija zajedničkih ilijačnih arterija. Lateralnost nodusa nema uticaja na klasifikaciju. Kategorija M definiše odustvo ili prisustvo udaljenih metastaza i verifikuje se klinički, fizičkim pregledom i metodama medicinskog imidžinga.

<b>Tabela 2. Stadijum malignih tumora mokraćne bešike</b>			
<b>Stadijum 0a</b>	Ta	N0	M0
<b>Stadijum 0is</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadijum I</b>	T1	N0	M0
<b>Stadijum II</b>	T2a, T2b	N0	M0
<b>Stadijum IIIA</b>	T3a, T3b, T4a	N0	M0
	T1, T2, T3, T4a	N1	M0
<b>Stadijum IIIB</b>	T1, T2, T3, T4a	N2, N3	M0
<b>Stadijum IVA</b>	T4b	N0	M0
	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a
<b>Stadijum IVB</b>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b

### **Stadijum pT0 karcinoma**

Patološki stadijum pT0 naznačava se kada nema rezidualnog urotelog karcinoma na uzorku dobijenom cistektomijem. To se tipično sreće u slučajevima biopsija dobijenim transuretralnom resekcijom (TUR) nakon dijagnoze mišićno invazivnog tumora mokraćne bešike i završetka neodajuvantne hemoterapije (56), kada je potrebno koristiti i modifikator „y“, a kod nekih pacijenata nakon radikalne cistektomije bez prethodne hemoterapije. Incidenca stadijuma pT0 je tradicionalno oko 10%, ali ona poslednjih godina raste, pre svega zbog primene neoadjuvantne hemoterapije koja značajno povećava šansu da pacijent postigne ovaj stadijum (57, 58). Postizanje stadijuma pT0 podrazumeva mnogo bolju prognozu za pacijenta, posebno kada je postignut kompletan patološki odgovor (pT0N0M0), jer ovi pacijenti imaju značajno bolje ukupno preživljavanje i preživljavanje bez recidiva u odnosu na pacijente kod kojih nije postignut kompletan odgovor (59). Klinički ishod za ove pacijente je varijabilan, petogodišnje preživljavanje ostaje 84%, verovatno zbog ekstravezikalnog širenja bolesti pre cistektomije (60). Metastaze u limfnim nodusima kod pT0 pacijenata su retke, ali moguće, i povezane su sa lošijom prognozom (57).

### **Stadijum pTa karcinoma**

Ovaj stadijum označava papilarne urotelne karcinome koji ne vrše invaziju lamine proprije mukoze (Slika 5). Histološki gradus je najvažniji prognostički faktor za ove tumore (22). Prisustvo mikroinvazije isključuje tumor iz ove kategorije. Prisustvo CIS, odnosno ravne urotelne lezije u okolini ima prognostički značaj (54). Dijagnostikovanje CIS u okolini HG pTa zahteva oprez, jer bočni delovi ili baza papilarnog tumora visokog gradusa može

imponovati kao ravna lezija. U ovim okolnostima CIS bi trebalo dijagnostikovati samo u okolnostima ako je CIS lociran na potpuno drugom biopsijskom fragmentu, ili dovoljno udaljen od papilarne lezije, tako da je segment normalnog, neizmenjenog epitela prisutan između dve lezije ili ukoliko se CIS histološki razlikuje od papilarnog tumora (54). Ako obe lezije nedvosmisleno postoje, onda bi histopatološki nalaz trebalo da sadrži određenje obe lezije (pTa/pTis).

### **Stadijum pTis karcinoma**

Urotelni karcinom *in situ* je ravna, „flat“ urotelna lezija građena od atipičnih, uvećanih urotelnih ćelija sa hiperhromazijom, nuklearnim pleomorfizmom, visokim nukleo-citoplazmatskim odnosom i čestim mitotskim figurama, koja ne pokazuje invaziju kroz bazalnu membranu epitela. Često je udružen sa invazivnim urotelnim karcinomom visokog gradusa, ali može biti prisutan i kao solitarna lezija. Samo cistektomski uzorci na kojima je prisutan samo CIS bez invazivnog tumora označavaju se patološkim stadijumom pTis. Urotelni CIS prisutan je kao jedina promena, bez invazivnog karcinoma, na oko 10% uzoraka radikalnih cistektomija (61).

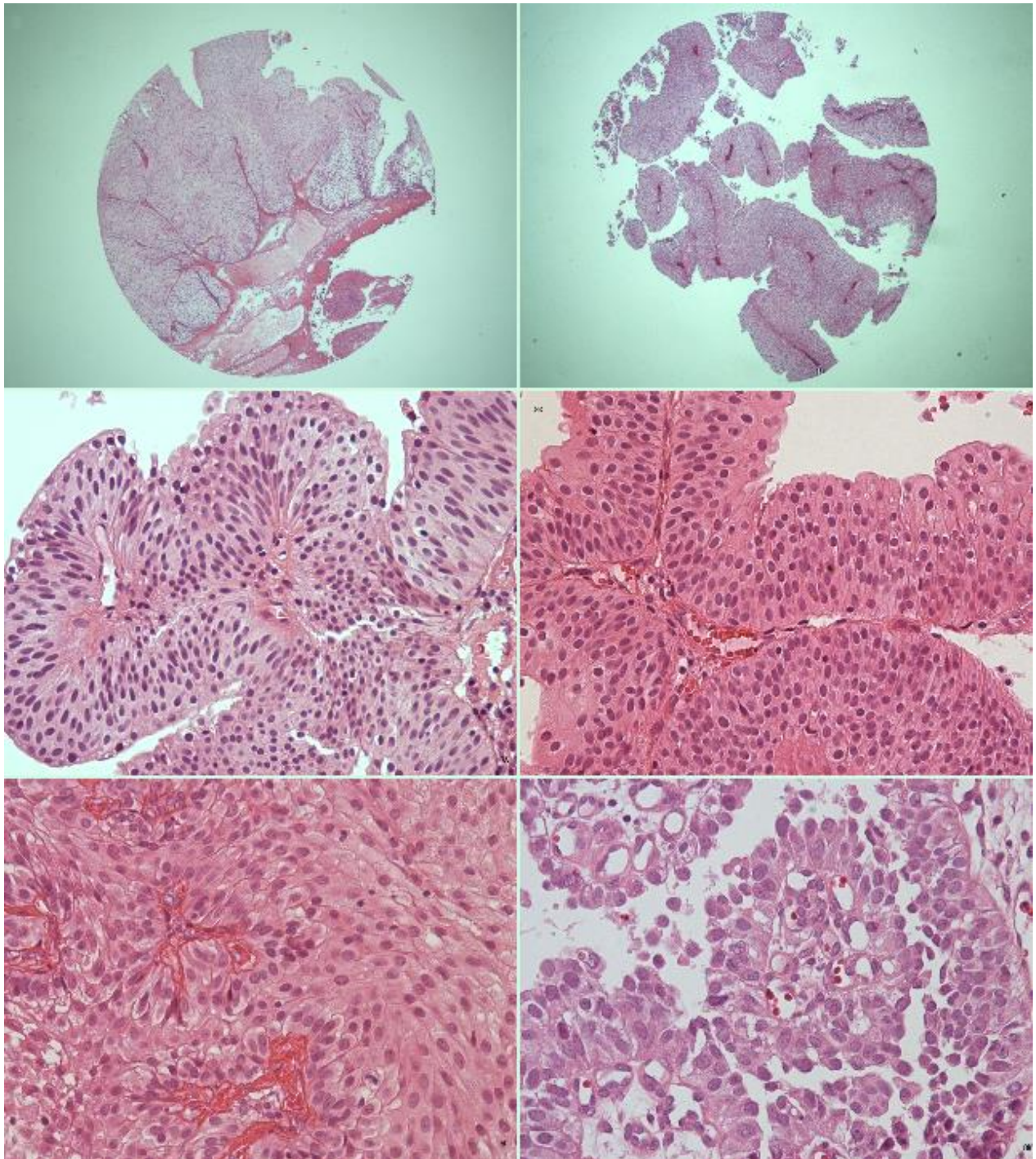
Urotelni CIS može biti rezistentan na hemoterapiju i moguća je njegova progresija u invazivnu bolest (62, 63). CIS je često prisutan na cistektomskim uzorcima nakon neoadjuvantne hemoterapije, ili kao jedina lezija ili udružen sa infiltrativnim karcinomom. Dijagnoza CIS je važna ne samo u slučaju kad je to jedini ili najlošiji patološki nalaz, već je i značajan prognostički indikator kod pacijenata sa invazivnim tumorom pT1-pT2 sa pridruženim CIS (54). Prisustvo CIS u okolini urotelnog karcinoma pT0-pT2 udruženo je sa lošijom prognozom. Međutim, prisustvo CIS nema uticaja na kancer-specifični mortalitet pacijenata sa karcinomom bešike stadijuma pT3-pT4 (64).

### **Stadijum pT1 karcinoma**

Urotelni karcinom koji vrši invaziju lamine proprije, bez širenja u muskularis propriju, označava se kao tumor stadijuma pT1 (Slika 6). AJCC klasifikacija iz 2016. godine (53) preporučuje podelu pT1 tumora na podstadijume, kako bi se preciznije stratifikovali pacijenti i separisali oni sa invazivnim mikrofokusima od pacijenata sa ekstenzivnom invazijom. Međutim, nema jasnih praktičnih preporuka za metodologiju substadiranja, te trenutne ne postoje zvanično prepoznate kategorije pT1 podstadijuma (54). Tumori koji invadiraju laminu propriju imaju agresivni potencijal i mogu razviti metastaze. Na molekularnom nivou većina



tumora koji vrše invaziju lamine proprije su aneuploidne lezije, iako se dijagnostikuju i diploidni tumori. *FGFR3* mutacije su česte (47, 65).



**Slika 5.** Patohistološki izgled urotelnog papilarnog karcinoma stadijuma pTa (H&E, uvećanje x40 gornji red, x200 srednji red, x400 donji red)

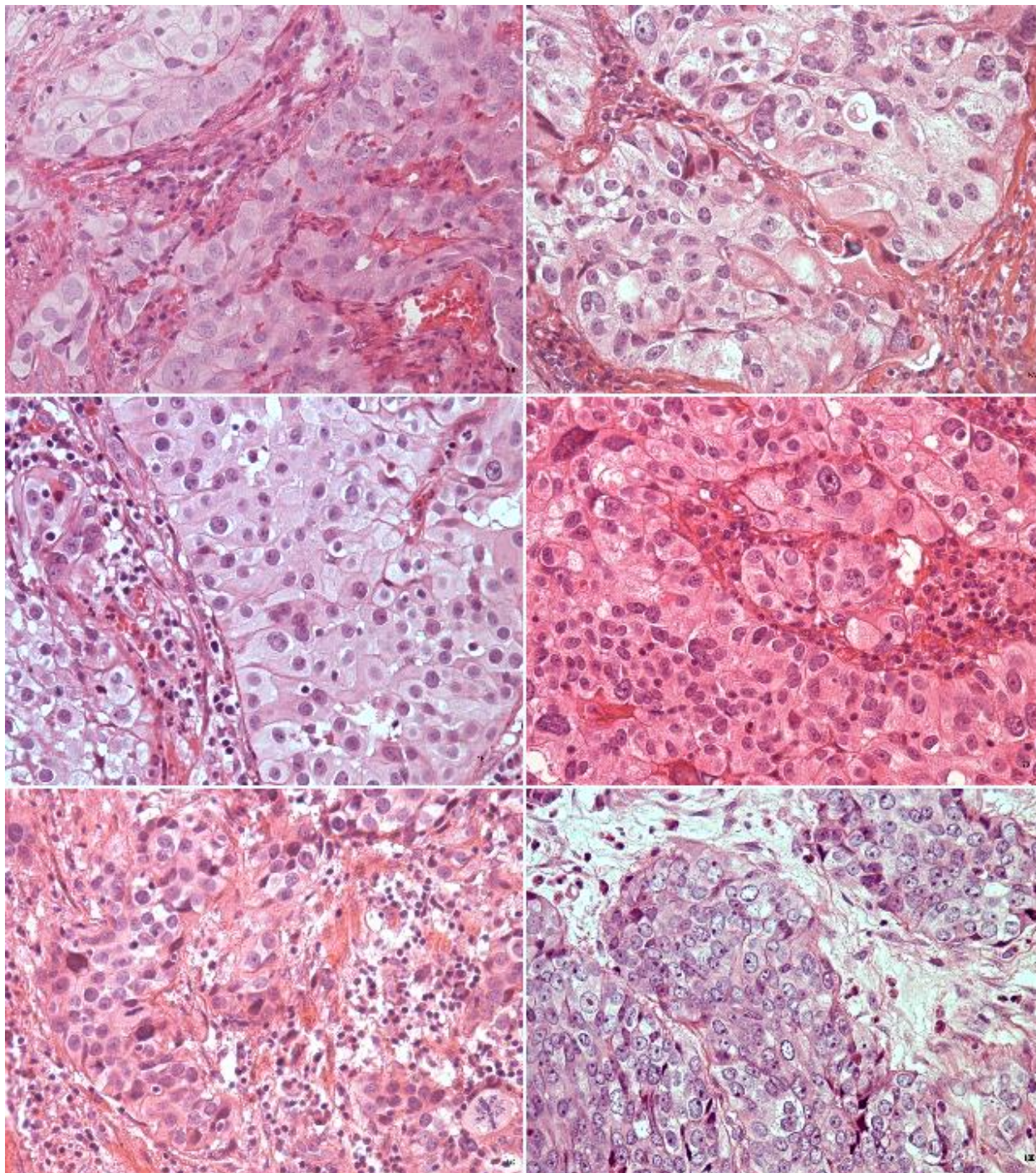
Recidivi su relativno česti, dok se u značajnom procentu slučajeva beleži progresija u viši tumorski gradus ili viši stadijum bolesti. Za bolest specifičan mortalitet iznosi između 0.5% i 4% (18). Studije pokazuju da postoji značajno neslaganje među uropatolozima u dijagnostici pT1 tumora (66). Identifikacija invazije lamine proprije može biti zahtevan zadatak, čak i za iskusnog uropatologa, posebno ako se radi o fokalnoj ili superficijalnoj invaziji. Faktori koji otežavaju interpretaciju prisustva i dubine tumorske invazije na biopsijama dobijenim TUR-om mogu biti vezani za samo kalupljenje uzoraka (tangencijalni preseki ili loše orjentisani fragmenti), proceduralne artefakte (termalno oštećenje ili artefakt izazvan kauterizacijom) ili promene u samom tumoru (npr. izražena inflamacija na interfejsu tumor – stroma) (54, 67). Neke infiltrativne varijante urotelnog karcinoma deluju varljivo uniformno, poput „nested“ varijante urotelnog karcinoma, a ponekad i proliferativna von Brunn-ova gnezda normalnog urotela mogu simulirati invaziju (68). Neoplastična ćelijska proliferacija može da zahvati von Brunn-ova gnezda ili putem pedžetoidnog rasta ili direktnim širenjem susednog tumora, što može izgledati kao invazija lamine proprije, iako to nije. U ovim okolnostima ključno je pažljivo oceniti izgled urotelne bazalne membrane, koja po pravilu deluje glatko i regularne konture oko Brunn-ovih gnezda, a oko nje se ređaju paralelno krvni sudovi tankih zidova.

Infiltracija lamine proprije prepoznaje se uočavanjem infiltracije pojedinačnih ćelija ili ćelijskih gnezda nepravilnog oblika, nazubljenih kontura bazalne membrane, bez linearno aranžiranih krvnih sudova tankih zidova koje prate membranu, ili prstolikih i pupoljastih ekstenzija koje se razvijaju na bazi papilarnih tumora. U prilog invaziji lamine proprije ide i nalaz retrakcionih artefakata koji okružuju iregularna gnezda, kao i paradoksalna maturacija ćelija, koja podrazumeva da invazivne ćelije zadobijaju obilnu, eozinofilnu citoplazmu i izgledaju manje pleomorfno nego *in situ* neoplastične ćelije koje ih prepojavljaju. Ponekad retrakcioni artefakti, korisni u detekciji invazije, mogu otežavati identifikaciju limfovaskularne invazije (LVI), koja je prepoznata kao prognostički značajna kategorija (69).

Stromalna reakcija može dodatno da pomogne u prepoznavanju invazivnog karcinoma, ali ne mora uvek da bude prisutna. Odgovor strome na infiltrativne ćelije ili grupe ćelija može da bude u vidu hipocelularne, mikroidne strome, zatim u vidu celularne strome sa vretenastim fibroblastima i varijabilnom kolagenizacijom, moguć je i pseudosarkomatozni stromalni odgovor, sa bizarnim, izduženim ćelijama hiperhromnih jedara, dezoplastični ili inflamatorni odgovor strome (54). Upotreba imunohistohemije i korišćenje pan-keratinskog koktela može da pomogne u identifikaciji stromalne invazije (70). Međutim, ovo treba izvoditi i tumačiti s



oprezom, jer reaktivni miofibroblasti i ređe drugi tipovi ćelija mogu pokazati pozitivnost na citokeratin (71).



**Slika 6. Patohistološki izgled urotelnog karcinoma stadijuma pT1 – invazija lamine proprije mukoze mokraćne bešike (H&E, originalno uvećanje x400)**

Mikroinvazivni karcinom je važan podtip pT1 tumora, gde je prisutna invazija lamine proprije u najvećoj dubini od 0,5mm, što je ekvivalent dijametra jednog mikroskopskog polja velikog

uvećanja (x400) (54). Ova, „cut-off“ vrednost od 0.5mm/1 HPF (1 high power field – HPF) je u najširoj upotrebi jer se smatra pragmatičnim, najpogodnijim kriterijumom za primenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi (72, 73). U većini studija, mikroinvazivnost definisana ovim kriterijumom korelira sa kliničkim ishodom (72, 74-76). Kod papilarnih pT1 karcinoma nađeno je da tumori koji imaju invaziju samo fibrovaskularne srži papila, tj. peteljke, ili pokazuju samo fokalnu infiltraciju baze, imaju značajno bolju prognozu u poređenju sa papilarnim karcinomima sa ekstenzivnom invazijom (77). S druge strane, grupa renomiranih evropskih uropatologa predložila je kao prag za mikroinvaziju prisustvo 20 infiltrišućih ćelija u lamini propriji, kao surogat za konkretnu linearnu meru (78). Dalja istraživanja i klinička validacija je neophodna kako bi se mikroinvazija izdvojila zvanično kao poseban podstadijum pT1 karcinoma i odredila najbolja „cut-off“ granična vrednost.

Klasifikacija pT1 tumora na podstadijume je od značaja za stratifikaciju pacijenata u prognostički i klinički različite grupe. Iako su aktuelne preporuke da se pokuša neka od strategija za podsadiranje pT1 tumora, ne postoje specifične i jasne smernice kakav sistem je poželjno koristiti (53, 54). Postoje dva osnovna sistema za određivanje podstadijuma superficijelno invazivnih tumora, histo-anatomske sistem i substadiranje na osnovu linearne dubine invazije. Histo-anatomske sistem podrazumeva izjašnjavanje o dubini invazije lamine proprije u odnosu na *lamina muscularis mucosae*, tanke, talasaste snopove glatko-mišićnih vlakana, koji su često udruženi sa velikim krvnim sudovima tankih zidova. Lamina muskularis se nalazi u srednjem ili srednje-gornjem delu lamine proprije, ali na biopsijama dobijenim trasureteralnom resekcijom je varijabilno prisutna, u 15-83% slučajeva (79, 80). U slučaju njenog nedostatka, veliki krvni sudovi bi se mogli koristiti kao zamena, iako položaj vaskularnog pleksusa može veoma da varira i može se naći daleko iznad ili ispod muskularis mukoze, posebno na nivou trigonuma mokraćne bešike (81). Međutim, veliki broj studija pokazao je da substadiranje pT1 u odnosu na lamina muskularis mukoze i vaskularni pleksus ima veliki prognostički značaj (82-85). Pacijenti sa infiltracijom lamine proprije ispod nivoa muskularis mukoze ima značajno lošije preživljavanje do pojave recidiva, preživljavanje bez progresije i kancer specifično preživljavanje. Neke studije su delile pT1 tumore na tri kategorije (invazija iznad, u nivou ili ispod muskularis mukoze), i ova klasifikacija je imala pozitivni prediktivni značaj (83). Alternativni sistem substadiranja baziran je na merenju dubine invazije korišćenjem okularnog mikrometra (54, 84). Merenje dubine invazije od mukozne bazalne membrane korelira dobro sa konačnim patološkim stadijumom, koji se procenjuje na materijalu dobijenim cistektomijom (80). „Cut-off“ vrednost nije još uvek

uspostavljena konsenzusom, ali je nedavno predloženo da prazna vrednost  $\geq 2.3\text{mm}$  predstavlja najbolji prediktor progresije. Ova vrednost ima praktični značaj, jer je 2.3mm prosečno ekvivalentno jednom mikroskopskom polju na uvećanju x100 (86).

**Tabela 3. Prognostički faktori za progresiju superficijalnog karcinoma mokraćne bešike (Ta, T1, Tis) u invazivnu bolest (55)**

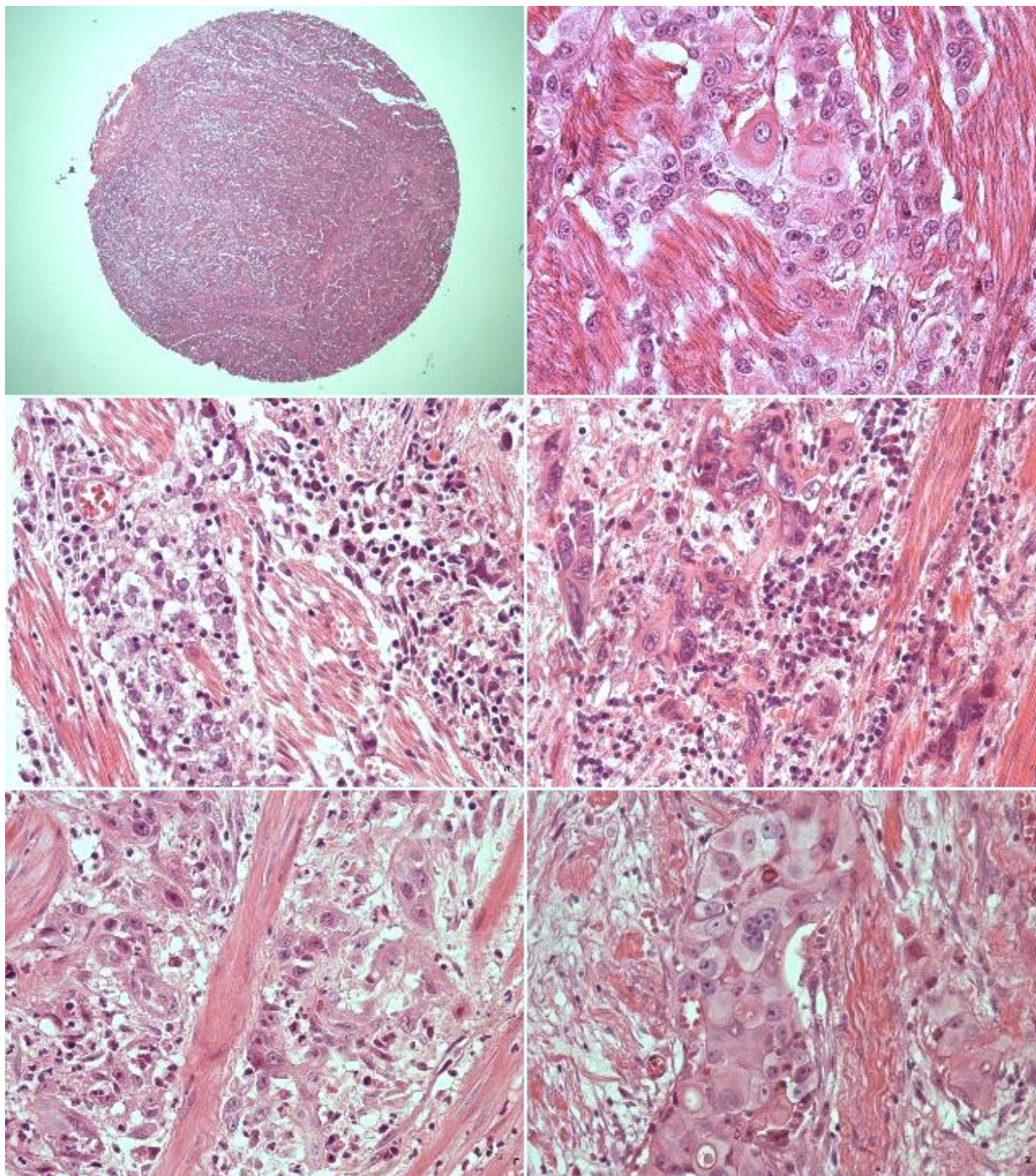
Prognostički faktor	Vezani za tumor	Vezani za domaćina	Vezani za okolinu
Osnovni	Gradus Stadijum (T) Cis Broj lezija Prethodni recidivi	Starost Performans status Ostali komorbiditeti	Stepen transuretralne resekcije (intravezikalna hemoterapija redukuje recidive, ali su ograničeni dokazi da redukuje progresiju)
Dodatni	Veličina tumora Recidiv na 3-mesečnoj kontroli	Pol Nastavak pušenja cigareta	
Novi/obećavajući	p53, NMP22 FGFR3 mutacioni status COX-2 (posebno gornji urotel) Claudin porodica proteina DNA metilacioni status Limfovaskularna invazija Stepen invazije (mikroinvazivni ili ekstenzivno invazivni T1)		

### Stadijum pT2 karcinoma

Stadijum pT2 karakteriše se invazijom muskularis proprije mokraćne bešike. Podeljen je na dva podstadijuma: pT2a, tumor koji invadira superficijalni sloj mišića, tj. unutrašnju polovinu i pT2b, tumor koji invadira duboki sloj muskularis proprije, tj. spoljašnju polovinu mišića. Klinički značaj ove podele je diskutabilan (67). Studije dugo vremena nisu potvrđivale razliku u preživljavanju između pT2a i pT2b tumora, odnosno dubina invazije muskularis proprije nije pokazivala prediktivni značaj (87), ali je zato veličina tumora, tj. njegova najveća dimenzija, predviđala ishod kod pacijenata sa pT2 tumorima (88). Pacijenti sa pT2 tumorima manjim od 3cm imali su bolje 10-godišnje preživljavanje u poređenju sa pacijentima koji su imali mišićno-invazivni tumor veći od 3cm. Pored toga, nije nađena razlika među podstadijumima pT2 tumora ni u statusu regionalnih limfnih nodusa, niti u preživljavanju (87, 89). Međutim, u novije vreme nekoliko velikih, multicentričnih studija dokazalo je statistički



značajne razlike u preživljavanju (73,2 vs. 58,7%) i vremenu do pojave recidiva kod pacijenata sa pT2a i pT2b tumorima (90, 91).



**Slika 7. Patohistološki izgled urotelnog karcinoma stadijuma pT2 – invazija tunike muskularis mokraćne bešike (H&E, uvećanje x40 prva mikrofotografija tkivnog mikroniza, x400 preostale mikrofotografije)**

### **Stadijum pT3 karcinoma**

Stadijum pT3 definiše se kao karcinom mokraćne bešike koji invadira perivezikalno masno tkivo i deli se u dva podstadijuma, pT3a, mikroskopska invazija privezikalnog masnog tkiva, i pT3b, koji podrazumeva makroskopsku invaziju perivezikalnog masnog tkiva.

Određivanje ekstravezikalne ekstenzije otežava nepravilan aranžman mišićnih snopova muskularis proprije i prisustvo adipocita unutar mišićnog sloja, zbog čega je granica između mišićnog sloja i perivezikalnog mekog tkiva slabo definisana. Grupe adipocita mogu biti prisutne čak i u lamini propriji, te se ne sme donositi sud o infiltraciji perivezikalnog masnog tkiva samo na osnovu infiltracije masti tumorom, pogotovo na TUR uzorcima. Opisano je značajno neslaganje među uropatolozima pri proceni dubine invazije između problematičnih pT2b i pT3a (92). Objektivniji parametar, poput merenja debljine invazivnog tumora od bazalne membrane površnog urotela, olakšava stratifikaciju pacijenata na pT2 i pT3 stadijum i može imati veliki klinički značaj u dijagnostici biopsija dobijenih TUR-om (54, 89). Ekstravezikalno širenje može biti makroskopski zamenjeno reaktivnim promenama, npr. inflamacijom i fibrozom, te je mikroskopska potvrda neophodna. Primena preoperativne neoadjuvantne hemoterapije može da oteža ili izmeni procenu dubine invazije na cistoskopskim uzorcima. Međutim, studija koja je uključivala preko 900 pacijenata pokazala je da nema razlike u preživljavanju između pacijenata stadijuma pT3apN0 i pT3bpN0 koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju, dok pacijenti pT3bpN0 stadijuma koji nisu primali hemoterapiju imaju značajno lošije preživljavanje od onih koji su stadijuma pT3apN0 (93).

### **Stadijum pT4 karcinoma**

Ovaj stadijum podrazumeva direktnu invaziju susednih organa i deli se na podstadijum pT4a (direktna invazija prostatične strome, uterusu ili vagine) i pT4b (direktna invazija pelvičnog ili abdominalnog zida).

#### **Invazija prostate**

Invazija prostate urotelnim karcinomom mokraćne bešike može se dešavati na tri načina: intrauretralnim širenjem, ekstravezikalnom infiltracijom ili invazijom vrata bešike (94). Širenje urotelnog karcinoma putem uretre je najčešći oblik širenja od navedena tri mehanizma. Intrauretralno širenje sa posledičnom invazijom u prostatičnu stromu ne smatra se direktnom invazijom prostate već se u ovoj situaciji primenjuje sistem stadiranja za uretralne/prostatične tumore, a sam tumor bešike se zasebno stadira. Invazija prostate nije retka, registruje se kod 7-38% pacijenata muškog pola koji su lečeni cistoprostektomijom



(94-96). U analizi TUR uzoraka, ako se utvrdi prisustvo invazije prostate urotelnim karcinomom, moguće je izjašnjavanje o stadijumu u vidu  $\geq$ pT2, uz prateće objašnjenje razlike između uretralnog pT2 i pT4a mokraćne bešike (83).

#### Invazija semenih kesica

Invazija semenih kesica je loš prognostički faktor, i iako u aktuelnom sistemu stadiranja nije posebno određen podstadijum u koji se svrstava, pacijenti sa invazijom vezikula seminalis imaju prognozu sličnu onima sa pT4b stadijumom bolesti (97, 98). Rezultati obimne studije koja je obuhvatila 1682 pacijenta sa radikalnom cistektomijom i pelvičnom limfadenektomijom zbog karcinoma mokraćne bešike, petogodišnje preživljavanje za pacijente sa invazijom semenih kesica bilo je samo 10%, slično pacijentima sa pT4b stadijumom (7%), što je značajno lošije od preživljavanja pacijenata sa invazijom strome prostate, 38% (97).

#### Invazija ženskih genitalnih organa

Usled anatomskih razlika između muškaraca i žena neophodne su i razlike u stadiranju. Kod žena stadijumom pT4a označava se invazija uterusa ili vagine, jer ti organi su najčešće zahvaćeni ekstravezikalnom ekstenzijom urotelnog karcinoma mokraćne bešike (91). U odnosu na zahvatanje prostate urotelnim karcinomom bešike, direktna invazija vagine i uterusa je retka i prisutna je kod prosečno 3-6% žena kojima je rađena radikalna cistektomija (99). Pored direktne invazije, ženski genitalni organi mogu biti zahvaćeni i pedžetoidnim ili metastatskim širenjem, što je udruženo sa lošom prognozom (100). Nekoliko studija pokazalo je lošije kancer-specifično preživljavanje kod žena sa pT4a stadijumom nakon radikalne cistektomije u poređenju sa pacijentima muškog pola sa istim stadijumom bolesti (101, 102).

#### Invazija pelvičnog ili abdominalnog zida

Direktna invazija struktura zida karlice ili abdomena urotelnim karcinomom mokraćne bešike predstavlja stadijum pT4b. Ovaj nalaz je pri radikalnoj cistektomiji redak, čini samo 14% pT4 tumora i 2% svih resekovanih tumora, verovatno zato što većina ovih pacijenata nisu kandidati za hiruršku terapiju. Ovaj stadijum povezan je sa značajno lošijom prognozom u odnosu na stadijum pT4a (103, 104). Petogodišnji kancer-specifični mortalitet za pacijente sa stadijumom pT3, pT4a i pT4b je 54%, 58% i 82%, što ukazuje na to da je drastičan porast mortaliteta prisutan kada se porede stadijumi pT4b i pT4a, mnogo dramatičniji nego kod poređenja pT4a i pT3 stadijuma (105).

**Tabela 4. Prognostički faktori za metastatski rizik i preživljavanje kod invazivnog, lokalno uznapredovalog i/ili nodus pozitivnog karcinoma mokraćne bešike (T2-4 N0-1) (55, 106)**

<b>Prognostički faktor</b>	<b>Vezani za tumor</b>	<b>Vezani za domaćina</b>	<b>Vezani za okolinu</b>
Osnovni	T kategorija N kategorija	Starost Performans status ALP Ostali komorbiditeti	Status hirurških margina
Dodatni	Gradus Histološki tip Limfovaskularna invazija Konkomitantni CIS Veličina tumora Hidronefroza	Hemoglobin Odgovor na primarnu hemoterapiju	Stepen resekcije limfnih nodusa Proporcija (gustina) zahvaćenih limfnih nodusa
Novi/obećavajući	p53, p63, p21 (za dugotrajno očuvanje bešike) Rb protein Ki67 EGF receptor HER2 ekspresija E-cadherin Mikrovaskularna gustina Mehanizmi rezistencije na terapiju (ERCC1, BRCA1 ili MMR mutacije)	Određeni nasledni jednonukleotidni polimorfizmi (SNP)	

### 2.1.2.3. Histološke varijante urotelnog karcinoma

Urotelni karcinomi sa divergentnom diferencijacijom definišu se kao tumori koji nastaju u urotelnom traktu, a u kojima je zajedno sa određenim procentom uobičajenog tipa urotelnog karcinoma prisutan neki drugi morfološki tip tumora (107). Dobro je poznato da urotelni karcinom poseduje izraženu fenotipsku plastičnost i veliku sklonost divergentnoj diferencijaciji, koja se najčešće susreće u tumorima visokog gradusa i uznapredovalog patološkog stadijuma. Na histološkim uzorcima dobijenim cistektomijom, divergentna diferencijacija je prisutna u trećini slučajeva. Prisustvo divergentne diferencijacije u tumoru udruženo je sa prediktorima agresivnog ponašanja, a procenat tumora divergentne morfologije nema uticaj na ishod bolesti. Međutim, nije nedvosmisleno dokazano da tumori sa mikstnom histologijom imaju lošiju prognozu od urotelnih karcinoma odgovarajućeg stadijuma i gradusa, iako postoje retki izuzeci, poput sitnoćelijskog i mikropapilarnog karcinoma (108-110).

**Tabela 5. Histološke varijante infiltrativnog urotelnog karcinoma (WHO 2016)**

- ❖ Urotelni karcinom sa divergentnom diferencijacijom
  - Sa skvamoznom diferencijacijom
  - Sa glandularnom diferencijacijom
  - Sa trofoblastnom diferencijacijom
  - Sa sitnoćelijskom diferencijacijom
- ❖ „Nested“, uključujući „Large nested“ urotelni karcinom
- ❖ Mikrocistični urotelni karcinom
- ❖ Mikropapilarni urotelni karcinom
- ❖ Limfoepiteliomu–sličan urotelni karcinom
- ❖ Plazmacitoidni/ „signet ring cell“ /difuzni
- ❖ Sarkomatoidni urotelni karcinom (karcinosarkom)
- ❖ Gigantocelularni urotelni karcinom
- ❖ Slabo diferentovani urotelni karcinom
- ❖ Svetlo–ćelijski (glikogenom–bogat)
- ❖ Lipidima–bogat urotelni karcinom

Morfološki oblici divergentne diferencijacije u urotelnom karcinomu su skvamozna, glandularna, sitnoćelijska, trofoblastna i ostale retke forme. Kliničko lečenje karcinoma sa divergentnom diferencijacijom se ne razlikuje od lečenja konvencionalnog urotelnog karcinoma, jer je prognoza ovih tumora veoma slična (109-112). Skvamozna diferencijacija je najčešća, nalazi se u 20–40% invazivnih urotelnih karcinoma i karakteriše se prisustvom intercelularnih mostića i keratinizacije (Slika 8A). Učestalost varira i njen značaj zavisi od gradusa i stadijuma tumora. Urotelni karcinomi niskog gradusa sa fokalnom skvamoznom diferencijacijom mogu imati veću stopu recidiva nego čisti urotelni tumori. Karcinomi sa skvamoznom diferencijacijom imaju manje povoljan odgovor na terapiju od čistih urotelnih, što je najverovatnije povezano sa njihovom prezentacijom u uznapređovalom stadijumu (111, 112). Ovi tumori mogu da eksprimiraju urotelne markere (S100P u 83% slučajeva, GATA3 u 35%, uroplakin III u 13%) i skvamozne markere (CK14 u 87%, desmoglein-3 u 70%) (113, 114). Skvamozna diferencijacija nije udružena sa infekcijom humanim papiloma virusom, izuzev u veoma retkim slučajevima, koji obično imaju bazaloidnu morfologiju (115).

Glandularna diferencijacija je druga po učestalosti, sreće se kod šestine invazivnih tumora (6-18%), a definiše se kao prisustvo glandularnih formacija i pravih glandularnih prostora u tumoru (116, 117). Pseudoglandularne promene sa ćelijama koje u citoplazmi sadrže mucin prisutne su u značajnom procentu urotelnih karcinoma (14-63%) i ne smatraju se glandularnom diferencijacijom (118). Glandularni tumori mogu histološki veoma da nalikuju



kolorektalnom adenokarcinomu, jer mogu imati izražene enterične karakteristike, a sa njima dele i imunofenotipska svojstva. Mogu biti udruženi sa ekstravazacijom mucina u kojima tumorske ćelije slobodno plutaju i mogu sadržati „signet ring“ ćelije. Ekspresija MUC5AC-apomucina je koristan imunohistohemijski marker glandularne diferencijacije u urotelnom karcinomu (119). Trofoblastna diferencijacija je ranije smatrana veoma retkom (120), ali u skoro 30% infiltrativnih urotelnih karcinoma mogu biti prisutni sinciciotrofoblasti, multinuklearne džinovske ćelije, koji stvaraju značajne količine beta-humanog horionskog gonadotropina ( $\beta$ -HCG), što ukazuje na sinciciotrofoblastnu diferencijaciju (121, 122). Broj  $\beta$ -HCG imunoreaktivnih ćelija udružen je sa višim stadijumom i gradusom. U nekim urotelnim karcinomima mogu se naći područja sitnoćelijskog karcinoma, koji je histološki ekvivalentan mikrocelularnom karcinomu pluća (118). Ova retka diferencijacija obično se sreće zajedno sa konvencionalnim urotelnim karcinomom, skvamoznim karcinomom, adenokarcinomom ili sarkomatoidnim karcinomom. S obzirom da sitnoćelijska diferencijacija ima prognostički značaj i zahteva poseban terapijski pristup, prisustvo i minimalnih fokusa bi trebalo da se naznači u histopatološkom izveštaju. Ovi tumori su sada deo kategorije neuroendokrinih tumora mokraćne bešike i leče se kao njihov najčešći ekvivalent, mikrocelularni karcinom pluća (17, 107).

Kada je neka morfološka manifestacija divergentne diferencijacije prisutna u čistoj formi, onda se smatra varijantom urotelnog karcinoma. Prepoznavanje varijantne morfologije je od velikog značaja jer mnoge varijante urotelnog karcinoma predstavljaju diferencijalno dijagnostički problem u rutinskoj patološkoj praksi, a pojedine varijante imaju prognostičke implikacije i zahtevaju modifikaciju pristupa lečenju, te urolozi i onkolozi moraju da budu upoznati sa histologijom tumora (118). S druge strane, precizna dijagnoza varijante infiltrativnog urotelnog karcinoma omogućava i da se izbegne previše agresivno lečenje koje *per se* može doneti još više štete pacijentu (123).

Neki podtipovi infiltrativnog urotelog karcinoma imponuju uniformno, građeni su od urotelnih neoplastičnih ćelija bez značajnije citološke ili histološke atipije, te mogu zavarati svojom naizgled benignom histologijom, a imaju veoma agresivno biološko ponašanje. To je verovatno jedan od razloga zašto su se ranije neki invazivni urotelni karcinomi označavali kao tumori niskog histološkog gradusa. Ove tumore je nekada teško stadirati, jer je njihov invazivni front monomorfog izgleda (18). Zato je od velikog značaja da se ove varijante prepoznaju, ali i da postoji svest o tome koliko je teško utvrditi prisustvo invazije, pogotovo u slučajevima kada su dostavljene superficijalno uzorkovane biopsije, bez mišićnog sloja.

### „Nested“ (gnezdasti) urotelni karcinom

Ova retka varijanta infiltrativnog urotelnog karcinoma karakteriše se citološki uniformnim tumorskim ćelijama, koje infiltrativno rastu u vidu diskretnih ili konfluentnih malih gnezda ili tubula (17, 107). Dugo je smatrana tumorom niskog histološkog gradusa zbog niske mitotske aktivnosti i blagog pleomorfizma tumorskih ćelija, zbog čega tumorski rast liči na Brunn–ova gnezda u lamini propriji. Infiltrativni front ovog tumora čine dobro formirana gnezda tumorskih ćelija. U slučaju da ne invadira musculus detrusor, već samo površno infiltriše laminu propriju, moguće je da ovaj tumor bude označen kao LG tumor. Međutim, ova lezija ima agresivno ponašanje, udružena je sa lošom prognozom, i trebalo bi da se gradira kao tumor visokog gradusa (17, 124, 125).

Nedavno je opisana varijanta histološki uniformnog, a veoma agresivnog infiltrativnog karcinoma koji je građen od velikih, krupnih gnezda samo blago pleomorfnih urotelnih neoplastičnih ćelija i označena kao „large nested“ urotelni karcinom (126, 127). Ovaj karcinom karakteriše se endofitičnim invazivnim rastom koji podseća na invertni urotelni papilom. Atipija je skoro u potpunosti odsutna, ali se ovaj tumor označava kao HG jer invadira mišić i može da se širi u perivezikalno masno tkivo. Diferencijalna dijagnoza „nested“ varijante urotelnog karcinoma uključuje Brunn–ova gnezda, *cystitis cystica*, *cystitis glandularis*, invertni papilom, nefrovenu metaplaziju, paragangliom i paraganglionsko tkivo (118, 128). Na molekularnom nivou ova varijanta karcinoma karakteriše se čestim mutacijama promotora TERT (128). U prognostičkom smislu nema značajne razlike u pojavi recidiva i preživljavanju pacijenata sa „nested“ varijantom i konvencionalnim urotelnim karcinomom (124, 125).

### Mikrocistični urotelni karcinom

Ova varijanta ima naizgled benignan histološki izgled koji se odlikuje prisustvom mikrocista, makrocista i tubularnih struktura, sa okruglim do ovalnim cističnim prostorima varijabilne veličine, od mikroskopskih dimenzija do 2mm u dijametru (129) (slika 8C). Ciste oblažu urotelne ćelije, niskocilindrične ćelije ili jedan sloj aplatiranog epitela sa relativno uniformnim jedrima. Fokusi klasičnog urotelnog karcinoma visokog gradusa nađu se u 40% slučajeva. Mikrocistična varijanta urotelnog karcinoma predstavlja značajan diferencijalno dijagnostički problem zbog uniformne histološke slike, koja može da imitira benigna stanja poput glandularnog cistitisa ili floridnog polipoidnog cističnog cistitisa, a veoma retko može da simulira prostatični adenokarcinom. Mikrocistični urotelni karcinom se može razlikovati

od benignih stanja i po prisustvu mutacije TERT promotora (128). Nema značajnih razlika u preživljavanju u odnosu na klasični urotelni karcinom (129).

#### Mikropapilarni urotelni karcinom

Mikropapilarna varijanta urotelnog karcinoma morfološki se karakteriše malim klasterima i agregatima tumorskih ćelija unutar lakuna. Osnovno svojstvo ove varijante je da mala ćelijska gnezda nemaju fibrovaskularnu srž, dok su jedra izraženo atipična i orjentisana ka periferiji ćelijskog klastera (130, 131). Ovi tumori obično su udruženi sa limfovaskularnom invazijom, uznapređovalog su patološkog stadijuma i ponašaju se klinički agresivno (132). Imunohistohemijski, mikropapilarni karcinom ima sličan imunoprofil kao konvencionalni uroteli karcinom, pozitivan je na CK7, CK20 i uroplakin III, ali je učestalija ekspresija CA-125. Ekspresija MUC1 je prisutna u delu tumorskih klastera koji su orjentisani prema stromi, što ukazuje na reverznu orijentaciju tumorskih ćelija u odnosu na normalan urotel (130, 131, 133). Mikropapilarni karcinom obično eksprimira FOXA1, marker luminalnog fenotipa. Mikropapilarni karcinom, kao i urotelni karcinom sa manjim oblastima mikropapilarnog izgleda, spada u luminalni molekularni podtip, koji često nema mutacije *TP53* gena i može da bude rezistentan na hemoterapiju (134). Na molekularnom nivou, za mikropapilarni urotelni karcinom svojstveno je učestalije prisustvo amplifikacije i prekomerne ekspresije *ERBB2* gena u odnosu na klasični urotelni karcinom (135). Mikropapilarni karcinom češće se sreće kod starijih muškaraca i udružen je sa lošom prognozom, čestim metastazama u limfnim nodusima i niskim stopama preživljavanja u odnosu na klasični urotelni karcinom (130, 131).

#### Limfoepiteliomu–sličan urotelni karcinom

Ova varijanta liči na nazofaringealni karcinom, javlja se kod starijih pacijenata muškog pola i manifestuje hematurijom. Tumori se mogu javiti u čistoj formi, ili se polja slična limfoepiteliomu smenjuju sa klasičnim urotelnim karcinomom ili poljima skvamozne glandularne diferencijacije. Epitelnu komponentu čine gnezda, polja i trake nediferentovanih ćelija nejasnih međućelijskih granica, sincicijelnog izgleda, velikih pleomorfnih jedara prominentnih nukleolusa. Imunohistohemijski, ovi tumori su pozitivni na CKAE1/AE3, CK7, GATA3, a uglavnom negativni na CK20. Stroma sadrži prominentan limfoidni infiltrat sa malim T i B limfocitima, plazma ćelijama, histiocitima i malobrojnim polimorfonuklearima. Za razliku od nazofaringealnog karcinoma, zanimljivo je da ova varijanta limfoepitelijalnog tumora nije udružena sa infekcijom virusima Epštajn–Bar ili humanim papiloma virusom. Česte su mutacije *TP53*, a u svojoj čistoj formi ovaj karcinom ima dobru prognozu, nizak metastatski potencijal i dobar odgovor na hemoterapiju i imunoterapiju (136, 137).

### Plazmacitoidni/ „ signet ring cell “ /difuzni urotelni karcinom

Plazmacitoidni urotelni karcinom (Slika 8B) je retka varijanta koja se karakteriše prisustvom diskohezivnih mononuklearnih tumorskih ćelija sa plazmacitoidnim, limfoidnim i retko rabdoidnim izgledom (138, 139). Veoma često su u ovoj varijanti tumora u različitom procentu zastupljene ćelije sa citoplazmatskim vakuolama koje mogu i ne moraju da sadrže mucin, a imaju izgled signet ring ćelija. Nikada nije prisutan ekstracelularni mucin. Ova varijanta infiltrativnog karcinoma se najčešće sreće u svojoj čistoj formi. Urotelna priroda neoplastičnih ćelija dokazuje se imunohistohemijskom ekspresijom markera urotelne linije diferencijacije (CK7, CK20, p63, GATA3, uroplakin III), dok je trećina slučajeva pozitivna na plazma ćelijski marker CD183. Na molekularnom nivou kod ove varijante tumora prisutne su mutacije *CDH1* gena i gubitak ekspresije E-kaderina. Imunohistohemijski, gubitak E-kaderina registruje se kod 70% plazmacitoidnih karcinoma, a kod samo 11% konvencionalnih urotelnih karcinoma (140). Ova histološka varijanta tumora po pravilu se dijagnostikuje u uznapređovalom stadijumu i povezana je sa nepovoljnim ishodom (138, 139, 141).

### Sarkomatoidni urotelni karcinom (karcinosarkom)

Sarkomatoidni karcinom je maligni tumor sa morfološkim i imunohistohemijskim dokazom prisustva i epitelne i mezenhimne diferencijacije. Mezenhimna komponenta najčešće je predstavljena nediferentovanom vretenasto-ćelijskom neoplazmom visokog gradusa (Slika 8D). Moguće je i prisustvo heterologih elemenata u tumoru i uvek se posebno naznačava u histopatološkom izveštaju. Najčešći heterologi elementi su osteosarkom, hondrosarkom, rabdomiosarkom i leiomiosarkom. Stroma može biti izraženo miksoidna ili sklerozirajućeg izgleda. Molekularne analize pokazuju da sarkomatoidni karcinom predstavlja zajednički, finalni put evolucije svih oblika epitelnih karcinoma mokraćne bešike. U sarkomatoidnom karcinomu česta je imunohistohemijska ekspresija markera epitelno-mezenhimne tranzicije, kao što su vimentin, SNAIL, ZEB1, FOXC2. Obično je prisutan gubitak E-kaderina i povećanje ekspresije N-kaderina (142). Ova varijanta tumora ima agresivno ponašanje, dijagnostikuje se kao uznapređovala bolest i ima lošu prognozu (143).

### Gigantocelularni urotelni karcinom

Ova agresivna i retka forma urotelnog karcinoma ima lošu prognozu i kratko preživljavanje. Tumorska arhitektura varira od infiltrativnih pleomorfih tumora sa bizarnim džinovskim ćelijama do solidnih ekspanzivnih gnezda sa mestimičnim diskohezivnim ćelijama (Slika 8F). Imunohistohemijska bojenja kojima se dokazuje urotelno poreklo pleomorfih džinovskih

tumorskih ćelija ponekad su neophodna za diferencijalnu dijagnozu u odnosu na metastatke neoplazme slične histologije, pre svega poreklom iz pluća (144).

#### Slabo diferentovani urotelni karcinom

Ova kategorija se po prvi put uvodi u klasifikaciju tumora mokraćne bešike tek nedavno (17) i obuhvata heterogeni spektar tumora sa raznovrsnim morfološkim slikama, uključujući sitnoćelijski nediferentovani karcinom, nediferentovani karcinom koji nije drugačije određen, osteoklastima-bogat nediferentovani karcinom. Svi slabo diferentovani karcinomi mogu biti udruženi sa klasičnim urotelnim karcinomom ili drugim formama divergentne diferencijacije (145, 146).

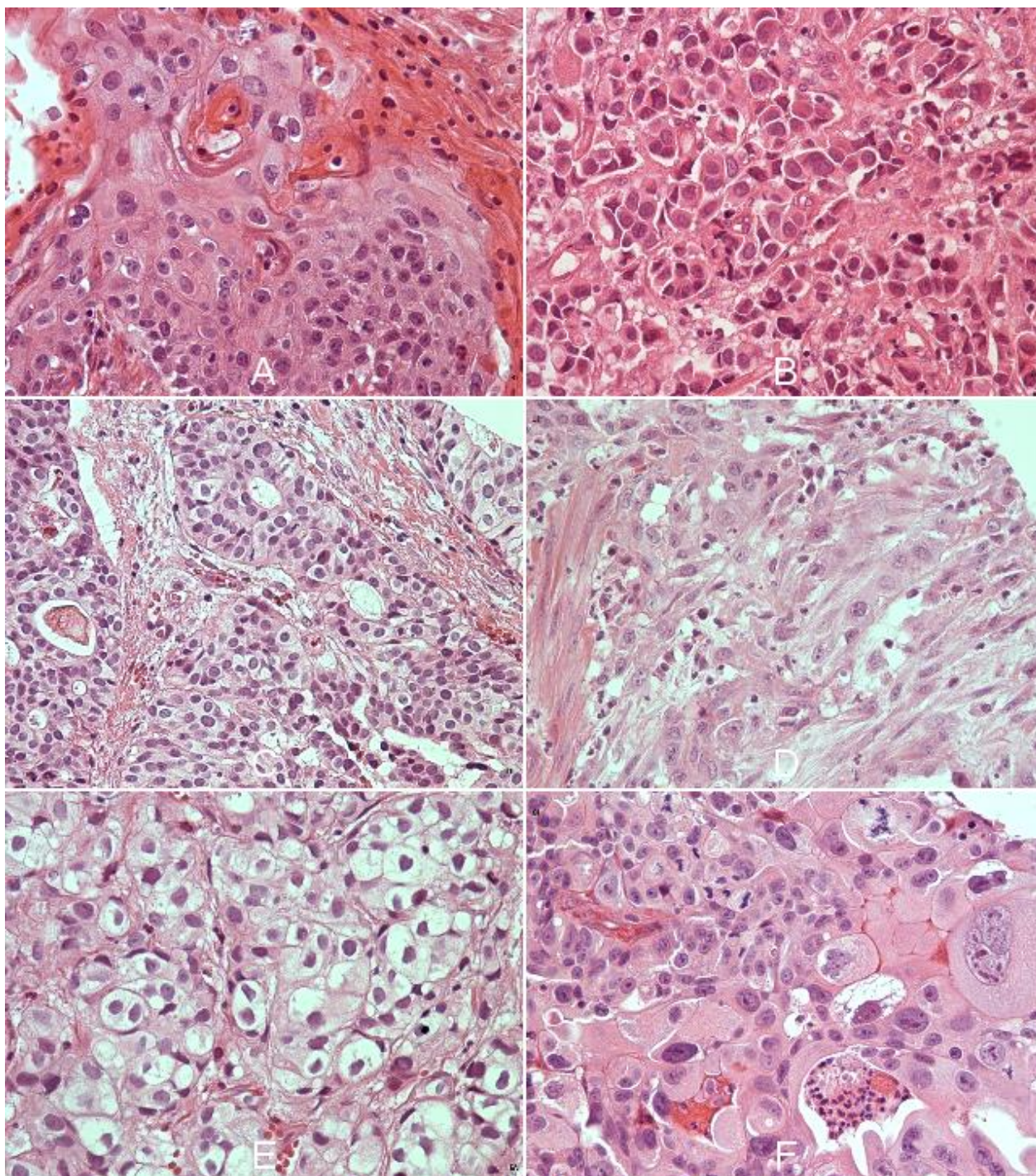
#### Svetloćelijski (glikogenom–bogat) urotelni karcinom

Fokusi svetloćelijske promene se često sreću u urotelnom karcinomu i posledica su obilnog citoplazmatskog glikogena, čije se prisustvo potvrđuje PAS bojenjem koje je senzitivno na digestiju diastazom (Slika 8E). Manifestuje se i dijagnostikuje u uznapredovalom stadijumu, povezan je sa nepovoljnom prognozom. Diferencijalno dijagnostički problemi su histološka sličnost sa svetloćelijskim adenokarcinomom porekla Milerovog epitela i metastatskim svetloćelijskim karcinomom bubrega i prostate (118, 147).

#### Lipidima–bogat urotelni karcinom

Ova varijanta sadrži ćelije koje podsećaju na lipoblaste sa ekscentrično pozicioniranim jedrom i obilnom vakuolisanom citoplazmom. Lipidima–bogat karcinom uvek se vidi udružen sa konvencionalnim urotelnim karcinomom ili drugim varijantnim oblicima. U lipidima–bogatim zonama tumora i okolnom klasičnom urotelnom karcinomu postoji isti obrazac gubitka heterozigotnosti, što ukazuje na njihovo zajedničko klonalno poreklo. Prezentuje se u uznapredovalom stadijumu (148).





**Slika 8. Histološke varijante invazivnog urotelnog karcinoma:** A) Urotelni karcinom sa skvamoznom diferencijacijom; B) Plazmacitoidna varijanta urotelnog karcinoma; C) Mikrocistični urotelni karcinom; D) Sarkomatoidni urotelni karcinom; E) Svetlo-ćelijski urotelni karcinom; F) Gigantocelularna varijanta urotelnog karcinoma (H&E, originalno uvećanje x400)



### 2.1.3. Genomski pejzaž i molekularna karakterizacija urotelnog karcinoma

Primena moćne metode funkcionalne genomike, sekvencioniranja sledeće generacije (next generation sequencing – NGS), omogućila je identifikaciju alteracija u genima koji su odgovorni za urotelnu karcinogenezu, odnosno definisanje promena u genomu koje najpre dovode do maligne transformacije, a zatim i dobijanja svojstava koja omogućavaju tumorski rast i širenje i modifikuju odgovor na terapiju. Geni koji su najčešće mutirani u urotelnom karcinomu mogu se svrstati u tri velike biološko–funkcijske grupe gena koje kodiraju hromatin modifikujuće enzime i članove molekularnih puteva ključnih za ćelijsku proliferaciju i preživljavanje (149). Prvu grupu čine tumor supresorski geni i onkogeni koji se mogu svrstati u p53/Rb put. Ovde spadaju geni čiji proteinski produkti imaju ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, kao što su *TP53*, *MDM2*, *RB1*, *CDKN2A*, *CDKN1A* i *CCND1*. Drugu grupu često mutiranih gena čine oni čiji proteinski produkti grade komplekse koji modifikuju strukturu hromatina. Ovde spadaju geni poput *KDM6A*, *KMT2D*, *ARID1A*, *KMT2C*, *EP300*, *CREBBP*. Treću grupu gena čine članovi RTK/RAS/PI3K puta, gde spadaju brojni tirozin-kinazni receptori koji učestvuju u transmembranskom prenosu signala i tumor supresori geni, uključujući *FGFR3*, *KRAS*, *HRAS*, *ERBB2*, *ERBB3*, *PIK3CA*, *TSC1*, *NF1*.

Molekularna karakterizacija ne-mišićno-invazivnog karcinoma bešike pokazala je da su kod tumora mokraćne bešike svih gradusa i stadijuma veoma česte mutacije *TERT* promotora (73%), kao i hromatin remodelujućih gena (69%), što ukazuje na to da se ove genomske alteracije dešavaju rano u karcinogenezi. Najčešće izmenjeni geni u genomskom pejzažu su *TERT* promotor (73%), *FGFR3* (49%), *KDM6A* (38%), *PIK3CA* (26%), *STAG2* (23%), *ARID1A* (21%) i *TP53* (21%) (44).

Sveobuhvatna molekularna karakterizacija urotelnog karcinoma mokraćne bešike objavljena 2014. godine rezultat je kolaboracije velike međunarodne grupe istraživača okupljenih oko projekta The Cancer Genome Atlas (TCGA), posvećenog identifikaciji i sistematizaciji genetskih mutacija odgovornih za kancer korišćenjem metoda sekvencioniranja genoma i bioinformatike (149). Mreža istraživača TCGA analizirala je detaljan genetski i ekspresioni profil 131 invazivnog urotelnog karcinoma i identifikovala statistički značajne rekurentne mutacije u 32 gena, uključujući 9 gena čije mutacije nikada pre toga nisu identifikovane ni u kojem tumoru. Po prvi put su detektovane mutacije gena *PVRL4* (gen za nektin ćelijski adhezioni molekul 4), *BCL2L1* (gen koji kodira antiapoptotski protein iz BCL-2 familije) i *ZNF703* (kodira protein koji funkcioniše kao transkripcioni faktor sa ulogama u ćelijskoj adheziji, migraciji i proliferaciji). Potencijalne terapijske mete su nađene u 69% tumora, od

toga 42% ciljnih molekula spada u PI3K/AKT/mTOR put, a 45% u RTK/MAPK molekularni put. Ova studija je utvrdila da su mutacije hromatin modifikujućih gena češće u urotelnom karcinomu nego u bilo kojem drugom tumoru, što je istaklo hromatinske abnormalnosti kao potencijalne terapijske ciljeve.

Urotelni karcinomi imaju veliki broj DNK alteracija, nešto manje od karcinoma pluća i melanoma, ali više od drugih čestih tumora u humanoj patologiji (149). Prosečno je po tumoru nađeno 302 mutacije u egzonskim sekvencama, 204 segmentalne varijacije u broju genomskih kopija i 22 genomska rearanžmana. Najčešće nađene fokalne delecije zahvataju hromozomski lokus 9p21.3 koji sadrži *CDKN2A*, kompleksni gen sa koga se u zavisnosti od okvira čitanja prepisuje nekoliko proteinskih produkata, uključujući p16 i p14 sa tumor supresorskim funkcijama, čija se ekspresija smanjuje ovim delecijama. Skoro polovina (49%) mišićno invazivnih karcinoma bešike imalo je mutaciju gena *TP53*, koja se međusobno isključuje sa mutacijom gena *MDM2*, kod koga je nađena amplifikacija (9%) i prekomerna ekspresija (29%), te je stoga funkcija p53 inaktivisana u 76% tumora (149).

Projekat Atlas kancerskog genoma (TCGA) detektovao je veliki broj hromozomskih rearanžmana u invazivnom urotelnom karcinomu mokraćne bešike (149). Nađeno je preko 2.500 strukturnih aberacija, uključujući više od 1.100 rearanžmana koji uključuju fuziju gena. Od ovih, opisano je nekoliko rekurentnih translokacija koje imaju izvestan značaj u patogenezi urotelnog karcinoma, uključujući intrahromozomsku translokaciju na hromozomu 4 koja obuhvata gene *FGFR3* i *TACC3*, koja je zabeležena u tri od 137 ispitivanih slučajeva. Ova translokacija rezultovala je fuzionim proteinom FGFR3-TACC3, sposobnim da se dimerizuje i dovede do konstitutivne aktivacije kinaznog domena FGFR3. Ovaj fuzioni protein, koji je za sada opisan u karcinomu bešike i glioblastomu (150, 151), predstavlja važnu potencijalnu terapijsku metu u personalizovanoj terapiji.

### Mutacije promotora telomeraze

Mutacije promotora za reverznu transkriptazu telomeraze (*TERT*) su jedne od najčešćih u humanoj patologiji, posebno česte u tumorima mokraćne bešike, astrocitnim tumorima mozga, štitaste žlezde i melanomu kože i ekstrakutanih lokalizacija (152). U urotelnom karcinomu mokraćne bešike mutacija *TERT* promotora prisutna je u najmanje 60% papilarnih superficijalnih tumora niskog gradusa, a u 80% superficijalnih i invazivnih tumora visokog gradusa (149). Aktivacija telomeraza je fundaminalni proces u tumorigenezi. Održavanjem dužine telomera, sastavljenim od TTAGGG ponovaka na krajevima hromozoma, telomeraze

prevazilaze osnovnu barijeru dužine ćelijskog trajanja i omogućavaju beskonačnu proliferaciju podstaknutu onkogenima (153). Iako je *TERT* eksprimirana u stem ćelijama, nakon diferencijacije njena aktivnost se gasi. Aberantna transkripciona aktivacija *TERT* dešava se najčešće mutacijom promotora i predstavlja rani događaj u procesu ćelijske transformacije. Mutacije *TERT* promotora koje su česte u urotelnom karcinomu regrutuju transkripcione faktore koji u normalnim okolnostima nisu uključeni u regulaciju ekspresije gena *TERT*. Mutacije *TERT* promotora mogu biti povezane sa agresivnim ponašanjem tumora, jer su udružene sa kapacitetom za samoobnavljanje ćelija sa svojstvima matičnosti u tumoru, kancerskih stem ćelija, te je ciljana terapija protiv telomeraze jedna od najistraživanijih u kontekstu studija (154). Mutacije promotora *TERT* nađene su u skoro 77% urotelnih tumora svih gradusa i stadijuma (155). Ove mutacije značajni su prediktori recidivantne bolesti, ali ne i progresije NMIBC. Pored toga, nađeno je da je hipermetilacija promotora udružena sa većom ekspresijom telomeraze i ukazuje na povećan rizik od progresije kod NMIBC (155). Hipermetilisani status onkogenog regiona promotora *TERT* udvostručuje rizik od progresije kod pacijenata i sa i bez mutacije *TERT*. Ovi rezultati su ukazali da oba mehanizma alteracije telomerazne ekspresije postoje i koegzistiraju u karcinomu mokraćne bešike, ali dok su mutacije promotora rani događaj u karcinogenezi, hipermetilacija je dinamički proces koji doprinosi tumorskoj progresiji. Nedavno je nađeno da neinvazivna detekcija mutacije *TERT* u urinu pacijenata sa urotelnim karcinomom predstavlja pouzdan i dinamički prediktor recidiva superficijelnog karcinoma mokraćne bešike (156). U poređenju sa invazivnom i skupom cistoskopijom koja je po pravilu iterativna u NMIBC, detekcija somatskih *TERT* mutacija u urinu omogućava komforan način praćenja pacijenata nakon transuretralne resekcije i sa visokom specifičnošću i senzitivnoću (preko 80%) predviđa nastanak rekurentne bolesti, čak i kada je cistoskopski nalaz uredan, a ako je nalaz pozitivan neposredno nakon izvedenog TUR-a sa velikom verovatnoćom ukazuje na rezidualni CIS (156).

#### Mutacije u hromatin-modifikujućim genima

Najčešće mutirani hromatin modifikujući geni u superficijanom karcinomu mokraćne bešike su *KDM6A* (38%) i *ARID1A* (21%) (44). *KDM6A* gen kodira sintezu enzima histona H3 lizin-specifična 27 (H3K27) demetilaza 6A koja učestvuje u modifikaciji histona i time reguliše aktivnost mnogih gena. Lizin-specifična demetilaza 6A funkcioniše kao tumor supresor i sprečava nekontrolisanu ćelijsku proliferaciju. U urotelnom karcinomu mutacije *KDM6A* najčešće su u pTa tumorima niskog gradusa, preko 50%, i njihova učestlost opada u tumorima visokog gradusa i uznapredovalog stadijuma, da bi manje od 25% mišićno invazivnih tumora

nosilo ovu mutaciju. Nasuprot tome, mutacije gena *ARID1A* su retke u pTa LG tumorima (9%), a sve učestalije kako raste invazivnost neoplazme, u mišićno invazivnim tumorima su 30%. Gen *ARID1A* kodira sintezu subjedinice proteinskih kompleksa SWI/SNF koji regulišu ekspresiju gena remodelovanjem hromatina i ona omogućava vezivanje remodelujućeg kompleksa za sam DNK lanac. Mutacije gena *ARID1A* bile su statistički značajno povezane sa povećani rizikom od rekurentne bolesti nakon primene imunoterapije BCG-om. U grupu hromatin modifikujućih gena spada i *STAG2*, mutiran u 23% superficijalnih i 5% mišićno invazivnih urotelnih karcinoma. *STAG2* kodira sintezu podjedinice kohezina kompleksa, koji regulišu razdvajanje sestrinskih hromatida tokom mitoze. Njegova inaktivacija dovodi do defekata u koheziji hromatida i aneuploidije, što govori u prilog tome da je poremećaj kohezina u osnovi aneuploidije u kanceru. Rezultati studija koje su ispitivale značaj mutacije *STAG2* u urotelnom karcinomu dale su konfliktne rezultate (44, 157–159). U ne-papilarnom karcinomu mokraćne bešike najčešće mutirani hromatin-modifikujući gen je *KMT2D*, histon H3 lizin 4 (H3K4) metiltransferaza (149).

#### Mutacije signalnog puta RTK(FGFR3)/RAS/PI3K

Nedavno objavljena studija, bazirana na NGS analizi genoma urotelnog karcinoma potvrdila je da su alteracije gena *FGFR3* i *ERBB2* prisutne u više od polovine superficijalnih urotelnih karcinoma visokog gradusa i da se njihova prisustva međusobno isključuju (44). Alteracije u receptor tirozin kinaza/fofatidil-inozitol-3-kinaza (RTK/PI3K) putu nađene su u 79% superficijalnih karcinoma. Mutacije *FGFR3* su izrazito česte u karcinomu mokraćne bešike, udružene su sa niskim gradusom tumora i niskim stadijumom, te se nađu u većini (83%) pTa LG tumora, 59% pTa HG tumora, 34% superficijelno invazivnih pT1 HG tumora i samo u 8-16% mišićno invazivnih tumora (27, 44). *FGFR3* igra važnu ulogu u regulaciji ćelijskog rasta i proliferacije, angiogenezi, embrionalnom razvoju i diferencijaciju ćelija. Opisane su i fuzije *FGFR3* gena sa drugim genima, kao mogući mehanizam kancerske transformacije ovog onkogena (160, 161). *ERBB2* je gen koji kodira sintezu receptora za epidermalni faktor rasta iz familije tirozin kinaznih receptora. Ovaj protein ne poseduje sopstveni ligand-vezujući domen, te ne može da vezuje faktore rasta, ali se vezuje čvrsto za druge receptore za EGF, stvarajući stabilne heterodimere i pojačava aktivaciju posredovanu kinazama u nishodim signalnim putevima, poput onih koji uključuju mitogenom aktiviranu kinazu ili PI3 kinazu. Amplifikacija i prekomerna ekspresija *ERBB2* česta je u tumorima dojke i jajnika. Kod karcinoma mokraćne bešike, *ERBB2/HER2* mutacije se skoro isključivo javljaju u tumorima kod kojih je *FGFR3* očuvan, tj. divljeg tipa. Alteracije *ERBB2* nađene su isključivo u

tumorima visokog gradusa, kod 57% slučajeva, i bile su statistički značajno povezane sa visokim gradusom i većim stadijumom tumora (44).

#### Mutacije gena koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa

Mutacije *TP53* puta ili nekog od gena sa centralnom ulogom u regulaciji ćelijskog ciklusa nađene su u 47% NMIBC tumora, uglavnom visokog gradusa. Učestalost mutacija *TP53* i *MDM2* raste linearno sa stadijumom i gradusom tumora, od 9% u LG pTa tumorima, preko 19% u HG pTa tumorima, 45% u pT1 tumorima visokog gradusa do čak 75% u mišićno invazivnom karcinomu bešike. Slična distribucija je i kod mutacija gena čiji proteinski produkti regulišu ključne tačke ćelijskog ciklusa, kao što su retinoblastom (*RBI*), Ciklin D1 (*CCND1*), p21 (*CDKN1A*) i *CDKN2A*, gen koji kodira nekoliko važnih inhibitora ćelijskog ciklusa, uključujući p16 (*INK4a*), blokator ciklin zavisnih kinaza CDK4 i CDK6, i p14 (*ARF*), proteina koji sprečava razgradnju p53. Geni ćelijskog ciklusa mutirani su kod 13% LG pTa tumora, 41% HG pTa, 42% HG pT1 i 52% mišićno invazivnih tumora (44).

#### Mutacije gena koji učestvuju u reparaciji oštećenja DNK

Jedno od najznačajnijih otkrića istraživanja molekularnog mutacionog pejzaža urotelnog karcinoma jeste nalaz visoke stope alteracija gena označenih kao geni reparacije oštećene DNK (DNA damage repair – DDR). Mutacije u ovim genima utiču na osetljivost na cisplatinu, imunoterapiju i zračnu terapiju u mišićno-invazivnom karcinomu mokraćne bešike (162, 163). Ovi geni mutirani su u 30% NMIBC visokog gradusa, što je stopa slična mutacijama u mišićno invazivnom karcinomu urotela, a u samo 4% tumora niskog gradusa. Najčešća među mutacijama DDR gena jeste mutacija pogrešnog smisla *ERCC2* gena, koja je prisutna kod 17% HG NMIBC i kod 20% MIBC. Manje česte mutacije DDR gena su nađene u genima *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHECK2*, *ERCC4*, *FANCC* i *MSH6*. Somatske mutacije gena *ERCC2*, odgovornog za reparaciju DNK ekscizijom nukleotida, izrazito povećavaju osetljivost na klasičnu hemoterapiju cisplatinom (163). Pacijenti kod kojih se klinički identifikuju mutacije pogrešnog smisla *ERCC2* gena su oni koji imaju odličan odgovor na konvencionalnu hemoterapiju i manji rizik od recidiva bolesti. Tumori sa oštećujućim mutacijama DDR gena imaju povišeno mutaciono opterećenje (44). Ovaj nalaz bi mogao da ima uticaj na vrstu lečenja NMIBC, jer visoko mutaciono opterećenje u tumoru zahteva agresivniji terapijski pristup, te bi pacijenti sa DDR mutacijama bili kandidati za sistemsku terapiju inhibitorima kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa (checkpoint inhibitori). NGS analiza NMIBC pokazala je da većina tumora ima najmanje jednu genomsku alteraciju



na koju se može delovati, tj. koja može postati cilj za dejstvo novih lekova koji se ispituju u kliničkim studijama, a primenjuju se intravezikalno ili sistemski.

### **2.1.3.1. Molekularna klasifikacija urotelnog karcinoma mokraćne beške**

Istraživanja pokazuju da molekularna klasifikacija postaje sve značajnija u određivanju prognoze i lečenja urotelnog karcinoma, sa boljom prediktivnom vrednošću u odnosu na klasično histološko gradiranje tumora.

#### ***Molekularni podtipovi ne-mišićno-invazivnog karcinoma mokraćne beške***

NMIBC uključuje više različitih fenotipova, od neinvazivnog pTa karcinoma niskog i visokog gradusa, CIS, do invazivnog pT1 karcinoma (61). Binarna stratifikacija u odnosu na gradus (LG vs. HG) i stadijum (Ta vs. T1) služi kao polazna osnova za donošenje odluke o terapiji (52). Patološke karakteristike poput veličine tumora preko 3cm, prisustvo limfovaskularne invazije ili varijantna histologija pomažu da se identifikuju pacijenti sa T1 tumorima koji su visoko-rizični. Do danas nema validiranih biomarkera koji bi mogli zameniti ili se koristiti komplementarno sa ovom kliničko-patološkom stratifikacijom rizika.

Hedagaard i kolege (45) nedavno su izveli sveobuhvatnu transkripcionu analizu 460 NMIBC koja je pokazala da se NMIBC može podeliti u tri molekularne podgrupe sa različitim kliničkim ishodima i biološkim tokom bolesti, a na osnovu ekspresionog profila 8.074 gena. Identifikacija ove tri potklase omogućava precizniju prognozu bolesti i odabir odgovarajućeg načina lečenja. Naime, utvrđeno je da tri glavne potklase NMIBC sa *basal-like* i *luminal-like* karakteristikama pokazuju velike razlike u biološkim procesima kao što su ćelijski ciklus, epitelno-mezenhimna tranzicija i diferencijacija. Utvrđeno je da su česte mutacije u genima koji kodiraju proteine uključene u organizaciju hromatina i funkcije citoskeleta. Mutacije u vodećim genima karcinogeneze, poput *TP53* i *ERBB2*, dominantno su nađene kod tumora visokog rizika, kao i APOBEC-povezan mutacioni potpis (45). Klasa 1 tumora ima najbolju prognozu i karakteriše se ekspresijom ranih gena ćelijskog ciklusa, dok klasa 2 tumora pokazuje visoku ekspresiju kasnih gena ćelijskog ciklusa koji su udruženi sa agresivnim ponašanjem urotelnog karcinoma, a ovde su svrstani i CIS. Klase 1 i 2 takođe pokazuju visoku ekspresiju uroplakina, koji se dominantno nalazi u luminalnim/*umbrella* ćelijama. Primitivni citokeratini poput citokeratina 14, 5, citokeratina 15 (*KRT14*, *KRT5*, *KRT15*) i markera stem ćelija karcinoma beške (*ALDH1A1*, *ALDH1A2*, *CD133*, *CD90*, *NES*), najčešće su eksprimirani u klasi 2 tumora. Tumori klase 3 pored *KRT14* imaju i visok nivo ekspresije *CD44*, markera bazalnih ćelija i kancerskih stem ćelija. Većina tumora kod kojih se

desila progresija spadaju u grupu 2, a ovde je svrstana i većina mišićno-invazivnih tumora. Klase 2 i 3 obuhvataju većinu tumora visokog gradusa, T1, CIS i tumora koji su visoko-rizični na osnovu kliničko-patoloških kriterijuma. Autori su formulisali i razvili klasifikator od 117 gena za optimalno predviđanje pripadnosti nezavisnog uzorka.

Nekoliko grupa autora opisalo je molekularne podtipove karcinoma bešike koji su slični luminalnom i bazalnom tipu karcinoma dojke (149, 164, 165). U Hedagaard-ovoj studiji, tumori klase 1 i 2 pokazuju luminalne karakteristike, a klase 3 bazalne. U komparaciji uspostavljena tri podtipa sa nalazima ranijih studija (165, 166) nađeno je značajno preklapanje. Klase 1 i 3 preklapaju se sa urobazalnim A tipom, a klasa 1 je sačinjena uglavnom od tumora niskog gradusa i niskog stadijuma. U ovim tumorima su česte aktivacione mutacije *FGFR3* i imaju veoma nisku verovatnoću za progresiju. Klasa 3 se preklapa sa podtipom bazalnog molekularnog profila, dok klasa 2 obuhvata tumore koji bi se mogli svrstati u infiltrativni i genomski nestabilni podtip. Tumori klase 2 pokazuju najveću stopu progresije i visoku ekspresiju markera EMT. Pošto je genomski profil klase 2 znak povećanog rizika za progresiju, validacijom ovih rezultata omogućilo bi se prepoznavanje pacijenata koji bi kao ranu konačnu terapiju trebalo da budu podvrgnuti cistektomiji (16, 45).

#### Molekularni markeri progresije superficijelnog urotelnog karcinoma

Nedavno su objavljeni rezultati studije koja je ispitala faktore koji predviđaju progresiju NMIBC visokog gradusa u mišićno invazivnu i potencijalno metastatsku bolest (43). Genomska karakterizacija visoko rizičnih ne-mišićno invazivnih tumora pokazala je da postoji velika genetska sličnost između tumora koji recidiviraju i progrediraju i tumora koji dobro odgovore na endoskopsku resekciju i lečenje BCG-om. Između ovih tumora nije bilo razlike u mutacionom statusu i ekspresiji gena, pre svega onih iz puteva najčešće mutiranih u karcinomu mokraćne bešike, uključujući *TP53*, *PIK3CA* i *KMT2D*. Nađeno je da tumori koji odgovore na intravezikalnu terapiju imaju veće mutaciono opterećenje u odnosu na tumore koji progrediraju. Gubitak *CDKN2A/B* nađen je kod 38% pacijenata koji su kasnije razvili mišićno-invazivnu bolest, a kod samo 6% onih koji nisu, što ukazuje na to da je ovaj gubitak potencijalno važan događaj u progresiji tumora i da se dešava kasno tokom tumorske invazije (42, 43).

#### *Molekularni podtipovi mišićno–invazivnog urotelnog karcinoma mokraćne bešike i implikacije za ciljanu terapiju*

Uprkos velikom napretku u saznanjima o molekularnim zbivanjima u urotelnoj karcinogenezi, mišićno invazivni karcinom mokraćne bešike i dalje predstavlja smrtonosnu bolest, a napretka

u terapiji nema. Ovi tumori često metastaziraju, a tada je preživljavanje jako kratko, oko 12 meseci u proseku (167). Standardna terapija za lokalizovani MIBC je cistektomija kojoj prethodi neoadjuvantna hemoterapija, bazirana na cispladini, kako bi se uništile nedetektovane metastaze. Međutim, odgovor na neoadjuvantnu terapiju postoji u samo 40-60% slučajeva i metastatska bolest se često detektuje u vreme operacije (168). Rezistencija na klasičnu hemoterapiju predstavlja veliki problem, te je neophodan razvoj novih terapija. U tom cilju, izvršeni su brojni pokušaji da se urotelni karcinomi klasifikuju u odnosu na profil molekularne ekspresije, kako bi se prepoznali tumori sa adekvatnim potencijalnim metaama za novorazvijenu personalizovanu terapiju (16, 43-45, 164, 166, 168). Predviđanjem odgovora na hemoterapiju omogućila bi se selekcija pacijenata koji će dobro odgovoriti na neoadjuvantnu hemoterapiju i izbegla bi se neželjena i nepotrebna toksičnost kod pacijenata koji najverovatnije neće imati dobar terapijski odgovor. Značajna heterogenost u MIBC ukazuje na to da bolest obuhvata više entiteta, a genomske analize su pokušale da sistematizuju ove razlike. Pokazano je da pojedini molekularni podtipovi imaju prognostičku vrednost (166).

Genomskim profilisanjem uz pomoć hijerarhijske klaster analize informacione RNK celokupnog genoma, Choi i saradnici identifikovali su tri molekularna podtipa mišićno invazivnog urotelnog karcinoma koji dele molekularne karakteristike sa bazalnim i luminalnim karcinomom dojke i međusobno se razlikuju u pogledu osetljivosti na hemoterapiju (164). Ovi podtipovi su označeni kao bazalni, luminalni i „p53-like“. Bazalni i luminalni podtipovi odslikavaju visoku ekspresiju markera koji su prethodno opisani u ekvivalentno označenim tumorima dojke.

Bazalni podtip MIBC karakteristično eksprimira *CD44*, *KRT5*, *KRT6*, *KRT14*, *CDH3* i nedostaje mu ekspresija citokeratina 20. Ovakva diferencijalna ekspresija citokeratina 5 i 20 vezana je za stanje urotelne diferencijacije, gde je najmanje diferentovan fenotip prisutan u bazalnom sloju ćelija normalnog urotela, koje su *KRT14<sup>+</sup>/KRT5<sup>+</sup>/KRT20<sup>-</sup>* (169). Ovakav ekspresioni profil imaju i kancerske ćelije sa stem ćelijskim svojstvima (170). Imunohistohemijski, tumori bazalnog podtipa ekspimiraju CK5/6, a takva ekspresija je u inverznoj korelaciji sa CK20. Bioinformatičkim metodama određena je povećana aktivacija transkripcionih faktora koji su aktivni u bazalnom/stem ćelijskom kompartmanu normalnog urotela: p63, Stat-3, NF-kB i HIF1. Pored citokeratina, bazalni podtip takođe eksprimira i mezenhimne markere kao što su *TWIST1/2*, *SNAI2*, *ZEB2*, *VIMENTIN*, dok je ekspresija miR-200 koja je negativni regulator mezenhimnih molekula snižena. Povećana je i ekspresija

EGFR i njegovih liganada. Bazalni podtip obuhvata tumore sa sarkomatoidnom i skvamoznom diferencijacijom, i povezan je sa lošijom prognozom. Bazalni tumori se prezentuju kao agresivnija bolest pri dijagnozi i povezani su sa kraćim ukupnim i kancer-specifičnim preživljavanjem (164).

Luminalni podtip eksprimira luminalne markere dojke (*KRT20*, *CD24*, *FOXA1*, *GATA3*, *ERBB2*, *ERBB3*, *XBPI*), epitelni marker E-kaderin i miR-200. Kod urotelnih karcinoma luminalnog podtipa prisutne su mutacije *FGFR3* i prekomerna ekspresija *FGFR3*, te su tumori iz ove grupe potencijalno senzitivni na terapiju *FGFR3* inhibitorima. Analizom ushodnih regulatora genske ekspresije, utvrđena je ključna uloga aktivacije *PPAR $\gamma$*  i puta estrogenih receptora u stimulaciji ekspresije gena luminalnog fenotipa (168).

Treći „p53-like“ podtip takođe eksprimira markere luminalne diferencijacije, ali se izdvaja iz grupe po aktivisanom p53 genskom otisku koji odgovara divljem tipu alela gena *TP53*. Međutim, zanimljivo je da prisustvo „p53-like“ otiska genske ekspresije nije povezano sa mutacionim statusom gena *TP53*. Ova grupa tumora sa aktivnim p53 bila je konzistentno rezistentna na neoadjuvantnu hemoterapiju cisplatinom, metotreksatom, vinblastinom i doksorubicinom. Svi hemorezistentni tumori su nakon terapije pokazivali „p53-like“ fenotip. Nije razjašnjeno da li ovo reflektuje globalne promene u ekspresiji nakon hemoterapije ili ukazuje na selekciju rezistentnih subklonova (168).

Analiza molekularnih profila ekspresije ukazuje da, iako nastaju u različitim organima, neki tumori mokraćne bešike dojke, glave i vrata i pluća dele zajedničke puteve u nastanku tumora. Ono što je još značajniji zaključak jeste da ovi tumori dele i zajedničke terapijske mete, koje su cilj terapija u razvoju ili onih koje su već dobro razvijene i uspešno se primenjuju u nekim tipovima tumora, a potrebna je njihova translacija i ispitivanje u urotelnom karcinomu.

Važan nalaz u ekspresionom profilu urotelnog karcinoma je da među transkriptima gena za piruvat kinazu, jednog od ključnih enzima glikolize, prosečno 97% transkripata u tumorskim uzorcima čine transkripti izoforme *PKM2*, a izoforme *PKM1* samo 3%. Izoforma 2 piruvat kinaze osnovni je pokretač konverzije energetskog metabolizma u tumorskoj ćeliji na anaerobnu glikolizu, odnosno aktivacije Warburgovog efekta (171). Stoga je potencijalni terapijski pristup u karcinomu beške inhibicija glikolize i sa njom povezanih metaboličkih puteva.

#### **2.1.4. Klinička prezentacija i dijagnostika karcinoma mokraćne bešike**

Većina pacijenata sa karcinomom mokraćne bešike klinički se prezentuje bezbolnom hematurijom. Vidljivo prisustvo krvi u mokraći je simptom koji najsnažnije korelira sa dijagnozom karcinoma mokraćne bešike. Prediktivna vrednost hematurije za dijagnozu je u trogodišnjem periodu 7,4% za pacijente muškog pola, a 3,4% za pacijente ženskog pola (172). Pacijenti kod kojih se ne javlja hematurija kao prvi simptom obično imaju duže vreme od pojave prezentujućih tegoba, kao što su urinarna urgencija, učestalo mokrenje, infekcija bešike i urinarnih puteva, do dijagnoze (173). Skrining stanovništva na okultno prisustvo krvi u mokraći pomoću testova sa trakama za urin se ne preporučuje, kao ni bilo koja druga vrsta skrininga na karcinom mokraćne bešike, jer kvalitet skrining studija ne opravdava preporuke (174). Okultna hematurija je relativno česta, prisutna je u oko 5% opšte populacije, često je intermitentna i varira u intenzitetu, te primena skrining testova urina čak ni u visokorizičnim grupama kao što su teški pušači ili radnici eksponirani poznatim urotelnim karcinogenima ne daje zadovoljavajući dijagnostički učinak (175-177). Pri prezentaciji kod većine pacijenata se detektuje solitarna lezija veličine do 15mm (178).

Kod pacijenata sa kliničkom sumnjom na karcinom urotela donjih mokraćnih puteva u cilju dijagnostike izvodi se cistoskopski pregled. Cistoskopija je i danas zlatni standard u dijagnostici tumora mokraćne bešike. U novije vreme primenjuje se i cistoskopija plavim svetlom, moderna fotodinamička metoda koja omogućava unapređenu detekciju malignih lezija mokraćne bešike, posebno CIS (179). Nove tehnologije poput virtuelne cistoskopije, optične koherentne tomografije, konfokalne laserske endomikroskopije su u primeni u vrhunskim urološkim centrima i očekuje se da će unaprediti dijagnostiku karcinoma bešike kako se bude povećavala njihova dostupnost (19).

##### **2.1.4.1. Urinarni markeri**

Citološka i molekularna analiza urina ima samo ograničenu ulogu kao inicijalni dijagnostički test kod postojanja sumnje na karcinom urotela. Citološki pregled urina ima nisku senzitivnost (34–55%), posebno u detekciji tumora niskog gradusa, ali zato ima visoku specifičnost, preko 90% (180). Veliki problem u citološkoj dijagnostici urina jeste i ljudski faktor, odnosno slaba reproducibilnost interpretacije nalaza među citopatolozima (181). Poslednjih decenija razvijen je veći broj testova kojima se u urinu detektuju markeri koji se diferecijalno ekspimiraju kod pacijenata sa urotelnim karcinomom. Neki od ovih eseja i testova su odobreni za komercijalnu primenu u dijagnostici tumora i kliničkom praćenju pacijenata sa dijagnostikovanim urotelnim karcinomom, a baziraju se na detekciji urinarnih biomarkera kao što su sa tumorom



povezani proteini, DNK, RNK ili ćelijski markeri, a među najčešće primenjivanim su nuklearni matriksni proteini NMP2 I BLCA-4, komplement faktor H i sa njim povezan protein, fragmenti intermedijarnih citoskeletnih proteina citokeratina CK8 i CK18, CK19 i CK20, kao i Survivin, član familije inhibitora apoptoze (180, 182). Novi molekularni markeri imaju bolji dijagnostički učinak u odnosu na citologiju, ali se on ne smatra u potpunosti zadovoljavajućim da bi ovi testovi ušli u vodiče i ključne preporuke za dijagnostiku i praćenje tumora mokraćne bešike. Senzitivnost za većinu urinarnih biomarkera iznosi 50–80%, što su bolje vrednosti u odnosu na senzitivnost citologije urina, ali je specifičnost markera u opsegu 70–90%, što je nešto niže od citologije. Noviji paneli za testiranje urina bazirani su na detekciji metilacije DNK u urinu i preliminarni rezultati ukazuju na njihovu visoku specifičnost, do 95%, uz senzitivnost od 85% (183). Ni jedan od ispitivanih biomarkera iz urina nema dovoljno visoku senzitivnost i specifičnost da može da zameni cistoskopiju.

## **2.1.5. Lečenje karcinoma mokraćne bešike**

### **2.1.5.1. Lečenje ne–mišićno–invazivnog karcinoma mokraćne bešike**

Tri četvrtine pacijenata kod kojih se dijagnostikuje urotelni karcinom mokraćne bešike ima ne–mišićno–invazivnu bolest. U toku petogodišnjeg perioda, kod 50-70% ovih pacijenata razvijaju se recidivi bolesti, dok je petogodišnja stopa progresije u mišićno–invazivnu bolest 10-30% (19). Najznačajniji faktori udruženi sa rekurentnom bolešću i progresijom su visok histološki gradus, viši stadijum, veličina tumora, multifokalnost, veći broj prethodnih recidiva i prisustvo konkomitantnog karcinoma in situ. Nepovoljni prognostički faktori su i prisustvo limfovaskularne invazije, veća dubina invazije kod T1 tumora, histološki varijantna morfologija (184, 185). Ne–mišićno–invazivni urotelni karcinom može se podeliti na tri grupe, karcinome niskog, intermedijarnog i visokog stepena rizika u skladu sa rizikom za pojavu recidiva ili nastanak progresije (186, 187), a kliničko lečenje se odvija u skladu sa ovim kategorijama (Slika 9).

#### **Transuretralna resekcija**

Početni korak u lečenju ne–mišićno–invazivnog karcinoma mokraćne bešike je trasuretralna resekcija, kojom se uklanjaju sve vidljive tumorske promene, sa adekvatnim tumorskim marginama i dubinskom resekcijom koja obuhvata i muskularis propriju. U mnogim urološkim centrima predlaže se ponavljanje transuretralne resekcije (TUR) nakon 4 do 6 nedelja od inicijalne intervencije, u cilju tačnije procene stadijuma bolesti i poboljšanja odgovora na adjuvantno intravezikalno lečenje (52). Ponavljane trasuretralne resekcije kod T1

tumora visokog gradusa dovode to promene dijagnostikovanog patološkog stadijuma u viši i do promene odluke o kliničkom lečenju kod svakog trećeg pacijenta (188).

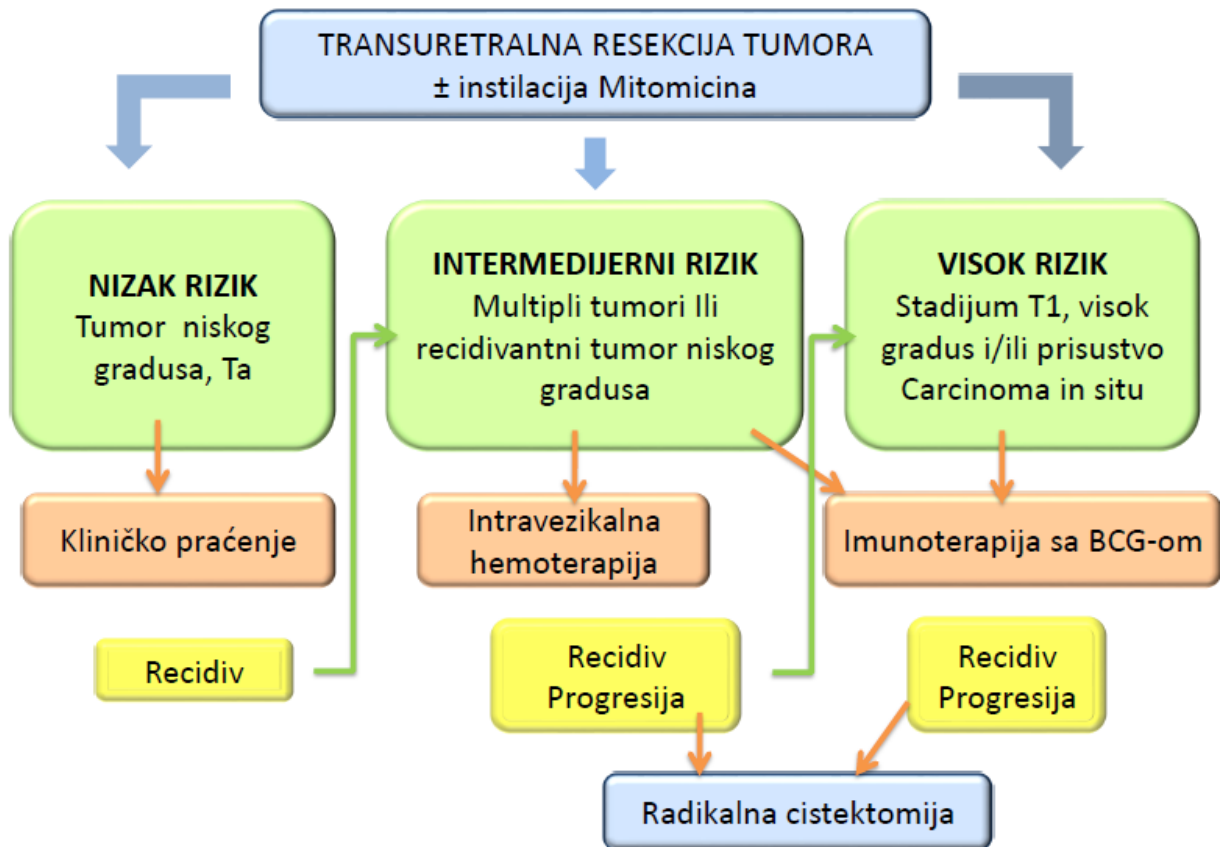
#### Intravezikalna hemoterapija

Kod pacijenata sa ne-mišićno-invazivnim karcinomom preporučuje se instilacija jedne doze intravezikalne hemoterapije neposredno nakon TUR. Najčešće korišćeni hemoterapeutici su mitomicin, epirubicin i gemcitabin, a idealno vreme aplikacije je šest časova nakon TUR. Efikasnost intravezikalnog leka opada ukoliko se aplikuje više od 24h nakon resekcije. Meta-analiza randomizovanih studija utvrdila je povoljan efekat primene instilacije jedne doze hemoterapeutika nakon TUR-a kod pacijenata sa niskim ili intermedijarnim rizikom, ali ne i kod pacijenata sa tumorima stratifikovanim u grupu visokog rizika (189, 190).

#### Intravezikalna imunoterapija

Pacijenti sa ne-mišićno-invazivnim karcinomom mokraćne bešike visokog rizika leče se intravezikalnom imunoterapijom uz pomoć bacila Calmette-Guérin (BCG), vakcine koja se koristi protiv tuberkuloze. Mehanizam dejstva intravezikalnog BCG-a još uvek nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra se da BCG podstiče reakciju imunog sistema koji uništava neoplastične ćelije, te se smatra imunoterapijom. Obično se primenjuje šestonedeljni tretman (indukciona terapija), praćen takozvanom terapijom održavanja u trajanju od najmanje godinu dana. Terapija održavanja može da traje i do dve godine (191). Intravezikalna instilacija BCG vakcine je jedini modalitet lečenja koji značajno odlaže progresiju bolesti i, u poređenju sa primenom samo TUR-a ili TUR-a sa intravezikalnom hemoterapijom, značajno smanjuje stopu recidiva (192, 193).

Neuspeh BCG terapije je veliki klinički problem i smatra se da je u ovim okolnostima radikalna cistektomija opravdani način lečenja ili, ukoliko pacijent odbije radikalno hirurško lečenje, primenjuje se intravezikalna terapija spašavanja primenom ponavljanih instilacija BCG-a, BCG-a u kombinaciji sa interferonom  $\alpha 21$ , gemcitabina ili valrubicina (191, 194). Kategorija pacijenata koji ne odgovaraju na BCG terapiju (BCG-non-responderi) obuhvata BCG-refraktarnu i BCG-relapsirajuću bolest, gde spadaju pacijenti sa perzistencijom HG tumora ili recidivom manje od 6 meseci nakon poslednje instilacije BCG, tj. nakon adekvatnog indukcionog ili tretmana održavanja. Neuspeh terapije se beleži i kod BCG netolerantnih pacijenata, kod kojih bolest perzistira jer je pacijent onemogućen da prima BCG terapiju usled njenih toksičnih efekata (186, 195).



**Slika 9. Stratifikacija rizika i terapijski algoritam za lečenje ne–mišićno–invazivnog karcinoma mokraćne bešike**, prema smernicama Evropske Urološke Asocijacije. (Modifikovano iz referenci (186, 187)).

#### Cistektomija

Cistektomija je opcija radikalnog lečenja koja se razmatra u slučajevima ne–mišićno–invazivnog karcinoma sa veoma visokim rizikom od progresije, npr. u slučaju multiplih ili velikih T1 tumora visokog gradusa, visoko rizičnih histoloških varijanti poput mikropapilarnog karcinoma, T1 tumora udruženih sa konkomitantnim CIS, kao i kod prisustva ekstenzivne limfovaskularne invazije. Kod pacijenata koji ne reaguju na adjuvantni intravezikalni tretman, refraktarni su na ili ne tolerišu BCG imunoterapiju radikalna cistektomija se smatra opravdanom u cilju poboljšanja preživljavanja (185, 191, 194).

#### 2.1.5.2. Lečenje mišićno–invazivnog i metastatskog karcinoma mokraćne bešike

##### Radikalna cistektomija

Zlatni standard za hirurško lečenje karcinoma mokraćne bešike je radikalna cistektomija sa bilateralnom pelvičnom limfadenektomijom, kojoj često prethodi neoadjuvantna hemoterapija

bazirana na cisplatinu (196, 197). Radikalna cistektomija je osnovni modalitet terapije za lokalizovani mišićno–invazivni karcinom mokraćne bešike kod pacijenata koji su fizički sposobni i voljni da se operišu. Važno je sprovesti radikalnu cistektomiju unutar 90 dana od postavljanja dijagoze, jer odlaganje intervencije duže od tri meseca udruženo je sa lošijim kliničkim ishodom bolesti (198). Standardna radikalna cistektomija obuhvata hirurško uklanjanje distalnih uretera, prostate i semenih kesica kod muškaraca, a kod žena i uretre, okolne vagine i uterusa. Disekcija limfnih nodusa je integralni deo zahvata jer je mikroskopsko nodalno zahvatanje tumorom često, neretko i bilateralno.

Radikalna cistektomija povezana je sa značajnim perioperativnim mortalitetom, koji dostiže do 9% unutar tri meseca od intervencije (199). Robotizovana laparoskopjska hirurgija nije pokazala značajnu prednost u perioperativnom morbiditetu i dužini boravka u bolnici u odnosu na klasičnu otvorenu cistektomiju (200). Iako su obično prvi limfni nodusi sa metastazama prisutni u maloj karlici i retko se nađu iznad nivoa aortne bifurkacije, postoje velike individualne razlike u broju limfnih nodusa, ali je utvrđeno da je rezultat onkološkog lečenja bolji što je ekstenzivnija resekcija limfnih nodusa (96, 97). Kako bi se poboljšala funkcija mokrenja i očuvala seksualna funkcija, razvijeno je nekoliko terapijskih pristupa sa očuvanjem organa prilikom cistektomije. Pažljivom selekcijom pacijenata i praćenjem nakon operacije, moguće je perzervacijom prostate, vezikula, vagine, uterusa i neravnih spletova kod muškaraca i žena sačuvati kontrolu mokrenja i seksualnu funkcionalnost bez ugrožavanja ishoda onkološkog lečenja (196).

Nakon radikalne cistektomije koriste se tri tipa diverzije urina: inkontinentne i kontinentne diverzije preko trbušnog zida (ureterokutanostomija, ilealni ili kolonski konduit, kontinentni pauči – kese), uretralna diverzija ili neobešike, ukoliko je uretralna margina negativna, i rektosigmoidne diverzije. Dva najčešće korišćena pristupa su ortotopna supstitucija neobešikom i ilealni konduit. Nakon ilealnog konduita skoro polovina pacijenata razvije rane komplikacije, uključujući infekcije, curenje i stenozu, dok su glavne dugoročne komplikacije vezane za samu stomu i promene u gornjem urinarnom traktu i javljaju se kod trećine operisanih, a sa godinama preživljavanja procenat komplikacija raste do preko 90% nakon 15 godina od hirurške intervencije (201). Neobešika ili ortotopna supstitucija bešike je metoda koja se koristi kod oba pola, ali je takođe povezana sa značajnim perioperativnim morbiditetom i dugoročnim komplikacijama kao što su dnevna i noćna inkontinencija mokraće, ureterointestinalna stenoza, metabolički poremećaji i opadanje bubrežne funkcije (201, 202).

Ukupno preživljavanje i preživljavanje bez recidiva nakon radikalne cistektomije iznosi 66%, odnosno 68% nakon pet godina, odnosno 43% i 66% nakon deset godina postoperativnog praćenja, ali je značajno niže za pacijente koji su imali metastaze u limfnim nodusima (203).

#### Lečenje lokalizovane bolesti sa očuvanjem mokraćne bešike

Ponekad je moguće uklanjanje mišićno–invazivnog tumora u celini samo transuretralnom resekcijom, odjednom ili u nekoliko sukcesivnih akata (204). Alternativni tretman za pacijente sa mišićno–invazivnom bolešću koji ili ne žele ili nisu podobni za radikalnu cistektomiju je savremena metoda zračenja, radijaciona terapija eksternim snopom (external-beam radiation therapy – EBRT), koja ima bolje pokrivanje mokraćne bešike i smanjenu integralnu dozu zračenja koja se emituje u okolna tkiva (196). Nakon primene EBRT stopa kompletnog odgovora je 64%, ali je desetogodišnje kancer–specifično preživljavanje samo 19%, a primenom neoadjuvantne hemoterapije pre zračne povećava se na 35% (205).

#### Radioterapija u lečenju karcinoma mokraćne bešike

##### Multimodalni tretman sa očuvanjem mokraćne bešike

U okolnostima kada radikalna cistektomija nije moguća, primarni kurativni terapijski pristup je multimodalni tretman, pogotovo kod pacijenata koji dobro sarađuju (196). Multimodalni tretman podrazumeva blisku multidisciplinarnu saradnju u primeni kombinacije TUR-a i radioterapije za lokalnu kontrolu bolesti i primenu radiosenzitizujućih supstanci (cisplatina ili mitomicin C plus 5-fluorouracil ili gemcitabin), da bi se pojačao efekt radioterapije. Primenuje se kod pacijenata koji imaju dobar performans status i žele da očuvaju bešiku, ili kod pacijenata koji ne mogu da podnesu radikalnu operaciju. Petogodišnje kancer–specifično preživljavanje je između 55% i 82%, dok je ukupno preživljavanje 36-74% (206). Rezultati dugogodišnjeg praćenja pacijenata ukazuju na to da sa multimodalnim tretmanom 70% pacijenata postigne kompletan odgovor i zadrži nativnu bešiku (207). Pacijenti koji ne odgovore na multimodalni tretman leče se salvažnom radikalnom cistektomijom. Spasonosna cistektomija se kasnije izvede kod 25-30% pacijenata, sa sličnom stopom komplikacija kao i primarna radikalna cistektomija. Kod svih pacijenata na trimodalnom tretmanu od ključne je važnosti doživotno cistoskopsko praćenje.

##### Adjuvantna radioterapija

Primena adjuvantne radioterapije se još uvek ispituje, pre svega za primenu nakon cistektomije kod pacijenata sa pT3 ili pT4 karcinomom mokraćne bešike. Adjuvantna radioterapija može da poboljša lokoregionalnu kontrolu bolesti kod pacijenata sa lokalno



uznapredovalim karcinomom koji su bili podvrgnuti radikalnoj cistektomiji, jer se recidivi bolesti u karlici nakon radikalne hirurške intervencije relativno često javljaju, u 20–45% slučajeva (208).

### **Sistemska terapija karcinoma mokraćne bešike**

#### Sistemsko lečenje mišićno–invazivnog karcinoma

Hemoterapija kod mišićno–invazivne bolesti je najkorisnija kada se primeni kao neoadjuvantna hemoterapija, pre radikalne cistektomije ili radioterapije, dok su dokazi o korisnosti adjuvantne terapije manje ubedljivi (19). Najbolji efekat se postiže primenom protokola baziranih na cisplatinu u formi neoadjuvantne terapije, dok davanje kombinacija sa cisplatinom u okolnostima adjuvantne hemoterapije značajno poboljšava vreme bez progresije bolesti, ali ne daje poboljšanje u ukupnom petogodišnjem preživljavanju (209).

#### Tretman prve linije za metastatsku bolest

Hemoterapija bazirana na cisplatinu je osnovni modalitet lečenja za proširenu bolest. Kombinacije citostatika koje sadrže cisplatinu su trenutno standardni režimi lečenja metastatskog karcinoma bešike. Najznačajniji protokoli su MVAC – metotreksat, vinblastin, doksorubicin, cisplatin, i GemCis – gemcitabin i cisplatin, koji produžavaju preživljavanje za 14,8 i 13,8 meseci i imaju stope odgovora 46% i 49% (196). GemCis je manje toksičan protokol, ali se dobra tolerancija i efikasnost postiže sa visokim dozama MVAC u kombinaciji sa G-CSF. Preživljavanje u metastatskoj bolesti zavisi od primenjene terapije, ali i od lokalizacija metastatskih depozita. Petogodišnje preživljavanje je 20% za pacijente sa nodalnim metastazama, a samo 6.8% za one sa visceralnim metastazama (210).

Pošto je više od polovine pacijenata sa metastatskim karcinomom bešike nepodobno za sistemska terapija platinom, najčešće zbog snižene glomerulske filtracije bubrega, niskog performans skora, oštećenja sluha, periferne neuropatije ili srčane insuficijencije, izbor kombinacije hemoterapeutika zavisi pre svega od performans statusa pacijenta (211). Kod pacijenata koji ne mogu da primaju cisplatinu, primenjuju se protokoli sa manje toksičnom, ali i manje efikasnom karboplatinom, ili se daje monoterapija. Najznačajnije kombinacije su metotreksat/karboplatin/vinblastin (M-CAVI) i gemcitabin/karboplatin (GemCarbo), čije su stope odgovora 30%, odnosno 42% (212).

### Tretman druge linije

Preporuke za drugu liniju terapije kada dodje do progresije nakon kombinovane hemoterapije sa platinom su primena vinflunina ili terapije u okviru kliničkih studija (213). Za lečenje koštanih metastaza koristi se zoledronska kiselina ili denosumab (214).

### Nove terapije za karcinom mokraćne bešike

Zahvaljujući velikom napretku u rasvetljavanju molekularnog pejzaža urotelnog karcinoma u poslednjoj deceniji, otkrivene su nove potencijalne molekularne mete pa je došlo do otkrivanja i razvoja novih terapija za karcinom mokraćne bešike, nakon dugog vremena bez ikakvog napretka u lečenju (19). Lekovi čije su terapijske mete FGFR3, EGFR, VEGF, mTOR, STAT3, androgen receptor, zatim rekombinantni BCG i još nekoliko terapijskih strategija već daju ohrabrujuće rezultate u studijskim ispitivanjima (215, 216).

Ligand 1 programirane smrti PD-L1 (programmed death ligand 1) je molekul koji se eksprimira na površini tumorskih ćelija ili okolnih imunokompetentnih ćelija mikrookoline i angažuje PD-1 receptor na aktivisanim citotoksičnim T ćelijama, gaseći imuni odgovor domaćina na tumor. Jedna od osnovnih terapijskih strategija za lečenje karcinoma bešike jeste ablacija ovog mehanizma negativne povratne sprege. Inhibitori imunih kontrolnih tačaka usmerenih na PD-1 i PD-L1 već su pokazali dobru efikasnost kod nekoliko tipova solidnih tumora, uključujući melanom, ne-sitnoćelijski karcinom pluća, renocelularni karcinom, neke tipove karcinoma kolona (217). Ovi imunoinhibitori intenzivno se ispituju kod pacijenata sa uznapredovalom bolešću ili metastatskim urotelnim karcinomom bešike koji razviju progresiju nakon hemoterapijskih protokola prve linije baziranih na platini sa veoma ohrabrujućim rezultatima. Atezolizumab, PD-L1 inhibitor, se u velikoj multicentričnoj studiji pokazao kao lek sa bezbednim profilom za primenu kod teško bolesnih pacijenata sa uznapredovalim urotelnim karcinomom i brojnim komorbiditetima, sa terapijskim odgovorom od skromnih, ali u datim okolnostima izuzetno važnih 15% (162). Ohrabrujući rezultati sa odgovorom od 27% postignuti su kod pacijenata kod kojih je imunohistohemijski detektovan visok nivo PD-L1 ekspresije u imunim ćelijama, što ukazuje na to da PD-L1 ekspresija u tumorskoj mikrookolini može biti dobar prediktor odgovora na imunoterapiju. Pored toga, odgovor na atezolizumab bio je značajno bolji kod pacijenata sa određenim molekularnim profilom tumora (luminalni klaster II podtip) u odnosu na tumore ostalih TGCA podtipova, kao i kod tumora koji imaju veće ukupno mutaciono opterećenje (149, 162, 217). Međutim, medijana ukupnog preživljavanja i uz ovu savremenu terapiju ostaje veoma niska, 7,9 meseci, što naglašava značaj budućih napora na identifikaciji i validaciji novih terapijskih modaliteta.

## 2.2. Transformišući faktor rasta beta – TGF- $\beta$

Superfamiliju transformišućeg faktora rasta beta (TGF- $\beta$ ) čini 32 različita strukturno srodna proteina, među kojima su vodeći i najpoznatiji TGF- $\beta$  ligandi, koji obuhvataju tri visoko homologne izoforme, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3, dva aktivina (aktivin A i aktivin B), Nodal, koštani morfogenetski proteini (*bone morphogenetic proteins* – BMP), faktori rasta i diferencijacije (*growth and differentiation factors* – GDF) i anti-Milerov hormon (AMH) (218, 219). Svi članovi superfamilije dele niz zajedničkih karakteristika vezanih za njihovu strukturu, sintezu, mehanizme prenosa signala i regulacije (219, 220). Najvažniji član familije u pogledu njegovih funkcija i uticaja koji ostvaruje u celokupnoj TGF- $\beta$  signalizaciji jeste TGF- $\beta$ 1.

TGF- $\beta$ 1, kao i njemu strukturno i funkcionalno veoma srodni ligandi TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3, sintetiše se u formi prohormona, koji uključuje signalnu sekvencu, veliki N-terminalni deo koji se naziva sa latencom–udružen peptid (*latency-associated peptide* – LAP) i kratki segment na C-kraju, koji odgovara zreloom, aktivnom citokinskom monomeru (221). Nakon isecanja proteazom Furin u Goldžijevom kompleksu, dimerni bioaktivni deo molekula ostaje ne-kovalentno vezan disulfidnim mostovima za LAP homodimer. Kristalna struktura ovog kompleksa pokazala je da LAP okružuje aktivni deo TGF- $\beta$ 1 i blokira kontaktna mesta na citokinu koja su važna za vezivanje za receptore. U mnogim tipovima ćelija LAP homodimer je vezan disulfidnim mostovima za familiju proteina koja se naziva latentni TGF- $\beta$  vezujući proteini (LTBP), stvarajući tako veliki latentni kompleks (LCC). Nakon sekrecije LCC interaguje sa fibrilinom, proteinom ekstracelularnog matriksa koji ulazi u sastav elastičnih vlakana (221, 222).

Otpuštanje aktivnog TGF- $\beta$ 1 iz latentnog kompleksa je strogo regulisani proces koji se ostvaruje putem enzimskih i neenzimskih aktivnosti u ekstracelularnom prostoru. Isecanje mogu da vrše ekstracelularne serinske proteaze, poput plazmina i katepsina D, kao i nekoliko metaloproteaza, uključujući matriks metaloproteaze MMP9 i MMP14 (221). Najbolje proučeni mehanizam otpuštanja aktivnog TGF- $\beta$  iz latentnog kompleksa uključuje integrinske heterodimere  $\alpha$ v $\beta$ 6 ili  $\alpha$ v $\beta$ 8 koji se vezuju za Arg-Gly-Asp (RGD) motiv prepoznavanja integrina prisutan na LAP domenu TGF- $\beta$ 1. Nakon kontrakcije ćelije, tenzija koju stvori citoskelet konvertuje se integrinima u fizičku silu koja se prenese na latentni kompleks LCC, što odmotava LAP i dovede do oslobađanja aktivnog TGF- $\beta$ 1 (223). TGF- $\beta$  signalizacija odvija se putem parnih transmembranskih serin/treonin protein kinaza koji se označavaju kao tip I i

tip II receptori. Receptori za TGF- $\beta$ 1 su TGFBR1 (poznat i kao T $\beta$ R-I i Alk5) i TGFBR2 (T $\beta$ R-II).

Signalni putevi TGF- $\beta$  superfamilije imaju mnogobrojne plejotropne funkcije u regulaciji ćelijskog rasta, diferencijacije i proliferacije, apoptoze, angiogeneze, motiliteta i invazije, stvaranja i organizacije ekstracelularnog matriksa i imunog odgovora. Oni imaju ključnu ulogu u ranom embrionalnom razvoju i regulaciji tkivne homeostaze kod odraslih. Poremećaji signalizacije mnogih od ovih članova imaju presudne uloge u nastanku tumora i metastaziranju. TGF- $\beta$  signalizacija je značajna ne samo za tumorske ćelije, već ima ogroman uticaj na tumorsku mikrookolinu i organizam u celini (218, 224).

### **2.2.1. Kanonski signalni put TGF- $\beta$ ; SMAD4 – prenosilac signala i transaktivator gena u odgovoru na TGF- $\beta$**

Svi ligandi koji pripadaju TGF- $\beta$  porodici proteina se sintetišu i sekretuju u vidu latentnih prekursorskih molekula koji zahtevaju proteolitičku obradu ekstracelularnim konvertazama kako bi se transformisali u biološki aktivne dimerne ligande. Mehanizam prenosa signala za sve članove TGF- $\beta$  porodice je sličan i počinje vezivanjem liganda za jedan od receptora na površini ćelije, konstitutivno aktivisanih membranskih tip II serin/treonin kinaza receptora. Vezivanje liganda dovodi do regrutovanja i fosforilacije jedne od sedam tipova serin/treonin kinaznih receptora koji se nazivaju aktivin receptoru-slične kinaze (*Activin receptor-like kinase* – ALK1–7), zatim i do aktivacije receptorskih heterodimera, koji se sastoje od tip I i tip II receptora (219). Nakon fosforilacije kinazni domen receptora tipa I postaje aktivan i on može da aktivira kanonski Smad-zavisni put TGF- $\beta$  signalizacije, putem fosforilacije receptorom–regulisanih Smad proteina (R-Smad). TGF- $\beta$ , aktivini i Nodal aktiviraju Smad2 i Smad3, dok BMP i GDF aktiviraju Smad1, Smad5 i Smad8, ali TGF- $\beta$  takođe može da aktivira Smad1 i Smad5. R-Smad protein zatim formira kompleks sa Smad4 proteinom. Ovaj heteromerni kompleks se dislocira u jedro, tamo se akumulira i vezuje za specifične lokacije na DNK lancu, prepoznatljive sekvence unutar promotorskih regiona stotine ciljnih gena. Na taj način, R-Smad u kompleksu sa Smad4 direktno reguliše transkripciju velikog broja target gena, u pozitivnom ili negativnom smislu. Smad–zavisna genska transkripcija je modifikovana i amplifikovana učešćem mnogobrojnih DNK vezujućih kofaktora kao što su p300, CBP i FOXH1, koji interaguju sa Smad kompleksima (Slika 10).

U kanonskom putu TGF- $\beta$  signalizacije, Smad2 i Smad3 funkcionišu kao direktni regulatori koji aktiviraju ili vrše represiju transkripcije ciljnih gena. Oni obično deluju u kompleksima

od dva R-Smad molekula i jednog molekula Smad4 (225). TGF- $\beta$ /Smad ciljni geni imaju regulatorne DNK sekvence za koje se vezuju Smad kompleksi, najčešće su to AGAC ili GTCT sekvence. Međutim, samo vezivanje Smad kompleksa nije dovoljno za efikasnu represiju ili aktivaciju transkripcije. Smad proteini svoje efikasno dejstvo ostvaruju tako što se fizički asociraju sa drugim transkripcionim faktorima koji se sa većim afinitetom i opsežnije vezuju za regulatorne DNK sekvence. Smad vezujuće DNK sekvence se nalaze u neposrednoj blizini visoko-afinitetnog DNK vezujućeg domena, što omogućava kooperativno vezivanje kompleksa transkripcionih faktora za DNK pod kontrolom TGF- $\beta$ . Kompleksnost transkripcionog odgovora posledica je samog transkripcionog partnera koji se vezuje za DNK u kooperaciji sa Smad kompleksom, a može da bude pod kontrolom drugih signalnih puteva, kao i interakcije koregulatora koji određuju amplitudu transkripcionih odgovora ciljnih gena (226).

Interakcija Smad sa visoko-afinitetnim DNK-vezujućim transkripcionim faktorima omogućava Smad proteinima da igraju ključne uloge u ćelijskoj diferencijaciji (227). Aktivacijom i represijom transkripcije velikih grupa gena specifičnih za određenu ćelijsku liniju omogućava se usmeravanje toka diferencijacije. TGF- $\beta$  kontroliše mezenhimnu diferencijaciju duž mioblastne, adipocitne, osteoblastne ili hondroblastne linije putem interakcije Smad kompleksa sa glavnim, master transkripcionim faktorima specifičnim za ćelijsku liniju. Interakcija Smad kompleksa sa master transkripcionim faktorima takođe kontroliše samoobnavljanje i diferencijaciju embrionalnih stem ćelija. U humanim embrionalnim matičnim ćelijama kanonski put TGF- $\beta$  signalizacije udružuje se sa transkripcionim faktorima koji definišu pluripotentno stanje ćelije, kao što su Oct4, Nanog ili Sox2 (227).

Sposobnost TGF- $\beta$  da inicira i sprovede proces epitelno-mezenhimne tranzicije (EMT) takođe se odvija putem kanonskog puta signalizacije u kojem Smad proteini stimulišu i kontrolišu diferencijaciju ćelije. U procesu EMT odvija se Smad-om posredovano reprogramiranje ekspresije gena i regulatornih RNK (mikro RNK i duge nekodirajuće RNK) koje dovodi do promene fenotipa epitelnih ćelija u pravcu mezenhimnog fenotipa, čime se gubi apiko-bazalna polarizacija ćelija i preusmerava u prednje-zadnju polarizaciju, koja omogućava usmerenu migraciju ćelija (228). TGF- $\beta$ -aktivirani kompleksi Smad3/Smad4 direktno aktiviraju ekspresiju EMT master transkripcionih faktora, uključujući Snail1 ili Snail2/Slug, ZEB1, ZEB2 i u kooperaciji sa njima učestvuju u represiji epitelnih gena i ekspresiji gena mezenhimnog programa. Pored toga, Smad3 koji je aktivisan sa TGF- $\beta$



direktno interaguje sa RNK helikazom p68/DDX5 i na taj način direktno kontroliše stvaranje prekursora mikro RNK (229). Smad3 takođe reguliše alternativni splajsing prekursorskih RNK molekula na indirektan način, putem Smad3 posredovanih promena u ekspresiji samih proteina koji regulišu splajsing. Smad3 ostvaruje regulaciju splajsinga i na direktan način, tako što se asocira sa PCBP1/hnRNPE1 i ulazi u sastav heterogene mašinerije za splajsing RNK unutar jedra ćelije (230). Oba ova mehanizma dovode do promene izoforme proteina koji kontrolišu epitelne i mezenhimne fenotipe ćelija i značajno doprinose EMT.

Signalne kaskade kanonskog TGF- $\beta$  puta regulisane su na mnogo nivoa. Na prvom mestu, nekoliko sistema kontroliše raspoloživost TGF- $\beta$  njegovom aktivacijom iz neaktivnih, prekursorskih formi u aktivan oblik. U ovom koraku ključna je uloga sastava mikrookoline i aktivnosti matriksnih metaloproteinaza i drugih enzima koji proteolitičkim cepanjem oslobađaju TGF- $\beta$  iz prekursorskih kompleksa. Zatim, moguća je interakcija liganda sa njihovim ekstracelularnim antagonistima što sprečava njihovo vezivanje za receptore (219, 225). U fiziološkim uslovima ćelija reguliše osetljivost i odgovor na TGF- $\beta$  tako što reguliše raspoloživost receptora za TGF- $\beta$  na površini ćelije. Ovi receptori podležu post-translacionoj modifikaciji, a različiti tipovi modifikacija i njihove kombinacije dodaju nove slojeve složenosti regulacije TGF- $\beta$  signalizacije. Sastav i kompartmentalizacija receptorskih kompleksa za TGF- $\beta$  definiše tip odgovora koji će biti generisan na TGF- $\beta$  signal. Modulacija stabilnosti R-Smad proteina odvija se putem fosforilacije kinazama, i to MAPK, glikogen sintaza kinaza 3 $\beta$  i ciklin-zavisnim kinazama. Regulacija se odvija i aktivacijom Smurf-zavisne degradacije, gde je Smurf Smad-ubikvitinacija-regulatorni faktor. Ekspresija inhibitornih Smad proteina kao što su Smad6 i Smad7 može da prekine intracelularni prenos signala. Ćelijska specifičnost odgovora na TGF- $\beta$  regulisana je interakcijom Smad transkripcionih faktora u određenoj ćeliji i velikog broja raznovrsnih ko-regulatora koji se uključuju u proces transkripcije. Na taj način, aktivisani Smad proteini mogu da usmeravaju ćelijski odgovor u različitim pravcima, koji često imaju presudni značaj za sudbinu ćelije (219, 224, 225).

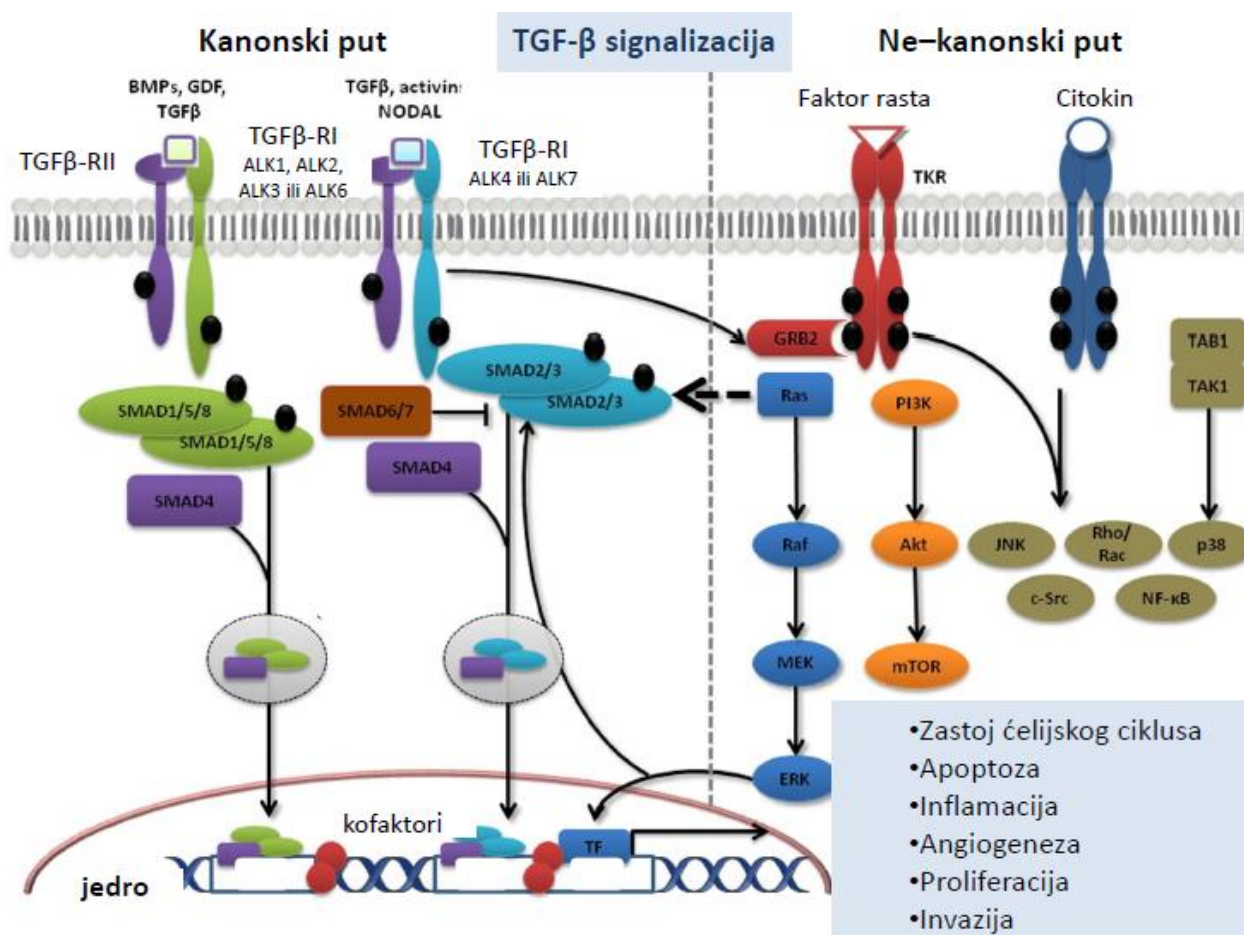
Smad signalizacija posredovana je receptorima koji podležu internalizaciji u klatrinom-obložene jamice i regulisana je učešćem niza Smad-pridruženih proteina, koji promovišu ili atenuiraju prenos Smad signala. Smad kompleksi bivaju internalizovani u endozomske kompartmane preko klatrinskih jamica i unutar njih bivaju aktivisani i pripremljeni za ulazak u jedro ćelije. Jedni od najznačajnijih regulatornih proteina su dva srodna molekula, SARA (*Smad anchor for receptor activation*) i Hgs/Hrs, koji olakšavaju interakciju Smad2 i Smad3

sa tipom I receptora na plazma ćelijskoj membrani (TGFBR1), stimulišu povezivanje Smad za klatrinske komplekse i internalizaciju Smad. Intracelularni proteini STRAP (serin/treonin kinaznom receptoru pridružen protein) i Aksin takođe učestvuju u angažovanju Smad tako što inhibiraju ili promovišu TGF- $\beta$ -indukovanom Smad signalizaciju (225). S druge strane, transmembranski proteini TMEPAI i C18 ORF1 interferišu sa aktivacijom Smad preko svoje sposobnosti da vezuju protein SARA i na taj način sprečavaju SARA-om posredovano vezivanje Smad za klatrinske receptore (225, 231).

Važan činilac u TGF- $\beta$  signalizaciji jeste raspoloživost TGF- $\beta$  receptora na ćelijskoj površini. Obično se samo deo postojećih TGF- $\beta$  receptora nalazi na površini plazma membrane, dok se većina zadržava unutar ćelije. Intracelularni pul TGFBR1 i TGFBR2 receptora omogućava brzi transport ovih molekula na ćelijsku površinu, a povećanje njihove raspoloživosti na površini odražava povećan odgovor na TGF- $\beta$  i to na autokrino oslobođeni TGF- $\beta$  ili TGF- $\beta$  oslobođen iz drugih ćelija. Aktivacija Akt indukuje fosforilaciju intracelularnog proteina vezanog za membranu RabGAP AS160 i na taj način podstiče transport TGF- $\beta$  receptora na ćelijsku površinu, što rezultuje pojačanjem odgovora na TGF- $\beta$  i intenziviranjem signalizacije. Akt se zato može smatrati jednim od centralnih regulatora TGF- $\beta$  odgovora jer kontroliše nivo površinskih receptora na plazma membrani. Akt se aktivira na insulin, povišen nivo glukoze i aktivirane receptorske tirozin kinaze i njegova aktivnost je često povišena u kancerškoj ćeliji, te mehanizam kontrole raspoloživosti TGF- $\beta$  receptora putem Akt aktivnosti u uslovima neoplastičog rasta ima veći značaj nego u normalnoj ćeliji (232).

### **2.2.2. Alternativni signalni putevi TGF- $\beta$**

U ne-kanonskom putu TGF- $\beta$  signalizacije aktiviraju se intracelularni putevi prenosa koji ne zavise od Smad proteina, kao što su PI3K/AKT, MAPK signalne kaskade (ERK, JNK i p38 MAPK), c-Src, NF- $\kappa$ B, Abl, zatim male GTP-aze poput RhoA, Rac1 i Cdc42 (220). Aktivisane mitogenom aktivirane protein kinaze mogu da ostvaruju regulaciju transkripcije ili putem interakcije sa intranuklearnim, translociranim Smad proteinskim kompleksom ili drugim nishodnim putevima. Aktivacija JNK/p38/ERK, u kooperaciji sa Smad proteinima, učestvuje u regulaciji apoptoze i ćelijske proliferacije, dok se regulacija metastaziranja i angiogeneze odvija angažovanjem drugih transkripcionih faktora, kao što su c-JUN i ATF. Aktivacija Rho malih GTP-aza putem TGF- $\beta$  signalizacije učestvuje u procesu epitelno-mezenhimne tranzicije tako što indukuje formiranje aktinskih stres vlakana, putevima koj su nezavisni od transkripcije gena (224, 233).



**Slika 10. Pregled puteva TGF- $\beta$  signalizacije.** Šematski su predstavljene kanonski (klasični) put signalizacije, koji se odvija putem SMAD proteina, intracelularnih prenosilaca signala, i ne-kanonski SMAD-nezavisni putevi. U kanonskom putu signalizacije biološki aktivni TGF- $\beta$  ligandi vezuju se za receptor TGFBR2, koji zatim aktivira TGFBR1. TGFBR1 reguliše intracelularni, nishodni prenos signala fosforilacijom proteina Smad2/3, a potom se oni vezuju za SMAD4, formirajući kompleks preko svojih C-terminalnih serinskih ostataka. Translokacija SMAD kompleksa u jedro inicira niz bioloških procesa regulacijom transkripcije stotina ciljnih gena. U ne-kanonskom putu signalizacije TGF- $\beta$  receptorski kompleks prenosi signal učešćem drugih faktora, kao što su mitogenom-aktivirane protein kinaze, fosfatidilinozitolid-3-kinaze, TNF receptoru–pridružen faktor 4/6 i Rho familija malih GTP-aza. (Modifikovano iz reference (224)).

Za razliku od kanonskog puta TGF- $\beta$  signalizacije koji se odvija preko Smad proteina i u kome je neophodna obrada prenosilaca signala u endozomima posredovana klatrinom, prenos signala u ne-kanonskim putevima iniciranim TGF- $\beta$  signalizacijom odvija se preko kaveolin posredovanih kompartmana. Iako su ovi signalni putevi slabije okarakterisani, TGF- $\beta$  indukovana aktivacija Erk MAPK I PI3K/AKT signalnih puteva odvija se u kaveolinskom

kompartmanu. Ovo ukazuje na činjenicu da se Smad aktivacioni putevi i ne–kanonski putevi pokrenuti aktivacijom TGF- $\beta$  receptora razlikuju u efektima koje pokreću divergentnom signalizacijom koja angažuje različite, fizički separisane subcelularne kompartmane (225).

Kanonske i ne–kanonske signalne kaskade prenosa međusobno komuniciraju, posebno na nivou Smad prenosnika, gde postoji transverzalna transdukcija signala koja to omogućava. Ova komunikacija omogućava da se u aktivaciji TGF- $\beta$  puta integrišu signali koji su pokrenuti integrinima, Wnt/B-catenin, Notch, Hedgehog, TNF- $\alpha$  ili EGF-zavisnim putevima (220). Naime, iako postoje dva divergentna puta internalizacije TGF- $\beta$  receptora koji se odvijaju posredstvom endocitotičnih jamica bogatih klatrinom, odnosno kaveolinom, ultrastrukturne studije intracelularnih puteva su pokazale da ove dve rute mogu da konvergiraju pod kontrolom proteina Rab5, pre nego što dođe do formiranja ranog endozoma, te na taj način nastaju vezikule koje su pozitivne i za klatrin i za kaveolin-1. Ovom fuzijom formiraju se multikomponentne i multifunkcionalne organele koje sadrže Rab-5, TGFBR1, Smad3–SARA komplekse, Smad7–Smurf komplekse u kojima TGF- $\beta$  receptori imaju lak pristup ovim različitim proteinima i tako efikasno ostvaruju signalizaciju. Ovo otkriće intersekcije kanonskih i ne–kanonskih puteva može delimično da objasni zašto inhibicija klatrinom–posredovane endocitoze ili prekid kaveolinske endocitoze ima samo neznatne efekte na nivo TGF- $\beta$  signalizacije (234).

### 2.2.3. Uloge TGF- $\beta$ u kanceru

Uloga TGF- $\beta$  u kanceru je kompleksna, kontekstualno zavisna i u funkciji vremena promenljiva. U zavisnosti od faze evolucije neoplastičnog rasta, TGF- $\beta$  u kancerskoj ćeliji ima dualnu ulogu – prvenstveno se ponaša tumor–supresorski, a zatim promoviše tumorski rast, odnosno deluje i anti–tumorski i pro–tumorski (222, 225, 235). Ekspresija TGF- $\beta$  ispitivana je u ekstenzivnim serijama raznovrsnih tipova tumora, uključujući karcinom prostate, dojke, pluća, kolorektuma, pankreasa, jetre, kože, gliome. Kod tumora ranog stadijuma nivoi TGF- $\beta$  koreliraju sa povoljnom prognozom, dok su kod uznapredovalih tumora pozitivno asocirani sa agresivnim ponašanjem tumora i lošom prognozom (236). U ranim fazama tumorigeneze TGF- $\beta$  signalizacija promoviše zastoj ćelijskog ciklusa i programiranu smrt ćelija. Nasuprot tome, u odmaklim stadijumima kancera TGF- $\beta$  promoviše tumorsku progresiju i metastaziranje tako što pospešuje motilitet tumorskih ćelija, invaziju, epitelno–mezenhimnu tranziciju i održavanje stem ćelija (237). Ova funkcionalna transformacija TGF- $\beta$ , sa promenom antikancerskih aktivnosti TGF- $\beta$  u onkogene, označava se kao TGF- $\beta$  paradoks (238). Molekularne determinante koje određuju TGF- $\beta$  paradoks

predmet su intenzivnih istraživanja, a poznato je da obuhvataju genetske i epigenetske događaje koji posreduju u transformaciji TGF- $\beta$  u onkogeni agens, kao i alteracije u tumorskoj mikrosredini.

Tumorska progresija zahteva gašenje tumor-supresorskih efekata TGF- $\beta$  signalizacije do koga dolazi putem dva mehanizma akumulacija genetskih alteracija. Prvi mehanizam podrazumeva dekapitaciju TGF- $\beta$  puta inaktivacijom njegovih ključnih komponenata, bilo putem mutacije ili putem alelskog gubitka heterozigotnosti, pre svega receptora (TGFBR1 i TGFBR2) ili Smad transkripcionih faktora (*SMAD2*, *SMAD4/DPC4*) (236). Inaktivirajuće mutacije receptora TGFBR2 se često nalaze u kancerima udruženim sa mikrosatelitskom nestabilnošću, koja nastaje kao posledica defekata u *mismatch* reparacionom sistemu i udružene su sa fenotipom metilacije CpG ostrva. *TGFBR2* gen sadrži poliadeninski ponovak od 10 baznih parova koji je izložen replikacionim pogreškama koje rezultuju inaktivacijom gena, posebno kod tumora sa oštećenjem sistema za reparaciju pogrešno sparenih baza. Zato su ove mutacije posebno učestale u karcinomu želuca, kolorektuma, žučnih vodova i adenokarcinomu pluća (224). S druge strane, inaktivacija gena *SMAD4/DPC4* nađena je kod 50% invazivnog dukalnog karcinoma pankreasa, a veoma često i u kolorektalnom i karcinomu ezofagusa. Inaktivacija gena za Smad4 dešava se ili putem mutacije ili gubitkom heterozigotnosti za alel na dugom kraku hromozoma 18 (236). Genetska inaktivacija ključnih komponenti TGF- $\beta$  signalizacije ima za posledicu eliminaciju većine TGF- $\beta$  odgovora, uključujući tumor-supresorske aktivnosti, i u kooperaciji sa drugim genetskim alteracijama promovise inicijaciju tumora, a zatim i progresiju i širenje neoplastične proliferacije. Na animalnim modelima sa onkogenim mutacijama u tumor supresorskim genima i vodećim onkogenima, nastanak i razvoj tumora je izraženo akcelerisan i razvijaju se tumori sa agresivnijim ponašanjem ukoliko su prisutne i alteracije u ključnim TGF- $\beta$  genima (239). Nasuprot tome, u karcinomu dojke i prostate, melanomu i gliomu često je funkcionalni integritet signalizacije TGF- $\beta$  očuvan, ali dolazi do selektivne ablacije tumor supresorske grane nishodno od ovih komponenti (236). Ovim mehanizmima TGF- $\beta$  signalizacija biva dekapitirana, odnosno odstranjene su antitumorske aktivnosti TGF- $\beta$ , a tumorski rast počinje da dobija podršku preostalih TGF- $\beta$  aktivnosti, kao što su invazija i EMT, koje promovisu tumorsku progresiju i metastaziranje.

TGF- $\beta$  je arhetipski predstavnik citokina koji inhibiše ćelijski rast i proliferaciju tako što povećava aktivnost inhibitora ciklin zavisnih kinaza (CDK), uključujući p15INK4, p21CIP1, p27KIP1 i p57KIP2 i nishodno reguliše ekspresiju protoonkogeni MYC (222, 240, 241).



TGF- $\beta$  vrši inhibiciju ćelijskog ciklusa, pre svega u nivou G1 kontrolne tačke, što je uz indukciju apoptoze ključni mehanizam kojim TGF- $\beta$  ostvaruje tumor supresorsku aktivnost. Međutim, onkogeno transformisane ćelije nose snažne CDK aktivirajuće signale, koje nadjačavaju efikasnost citostaze indukovane tumor suprimirajućim efektom TGF- $\beta$ . Pored toga, sposobnost da uđu u stanje sporih ćelijskih ciklusa osnovna je karakteristika stem ćelija i ona im omogućava da izbegnu imunološki nadzor i antimitotsko dejstvo hemoterapeutika. Stoga citostaza ne samo da predstavlja blažu formu tumorske supresije u poređenju s apoptozom, već može i da osposobi diseminovane tumorske ćelije da prežive aktivnosti i imunog sistema i hemoterapije i eventualno započnu metastatski rast.

Rezultati sveobuhvatnih analiza genoma najčešćih humanih kancera pokazali su da su mutacije ili delecije Smad i gena za TGF- $\beta$  receptore prisutni u čak 25-50% slučajeva karcinoma ezofagusa, želuca, kolorektuma, pankreasa. Tumori mokraćne bešike, glave i vrata, endometrijalni adenokarcinom, kao i skvamocelularni karcinom grlića materice i pluća sadrže aberacije ovih gena u 10-20% slučajeva (223, 225).

### **2.2.3.1. Efekti TGF- $\beta$ signalizacije na nivou tumorske mikrookoline**

Većinu svojih pro-tumorskih efekata TGF- $\beta$  ostvaruje medijacijom interakcija tumora i strome i remodelovanjem tumorske mikrookoline (224). Stroma je kompleksna struktura sačinjena od proteina ekstracelularnog matriksa, pre svega kolagena tipa I i osnovne supstance u koju su utopljeni različiti tipovi ćelija, uključujući mezenhimne ćelije (kancer-asocirani fibroblasti, endotelne ćelije i periciti, ćelije imunog sistema, ćelije poreklom iz kostne srži, nervne ćelije). Ovi tipovi ćelija eksprimiraju TGF- $\beta$  receptore, te TGF- $\beta$  signalni putevi ostvaruju značajan uticaj na procese fibroze, angiogeneze i infiltracije imunim ćelijama u tumorskoj mikrookolini. Na taj način, aktivacija TGF- $\beta$  puta doprinosi stvaranju specifične tumorske mikrookoline iz netumorske stromalne sredine i održavanju povoljne mikrosredine za tumorski rast.

TGF- $\beta$ 1 se stvara u uslovima inflamacije kao deo fiziološkog odgovora na oštećenje kojim se pokušava uspostavljanje kontrole nad inflamatornom reakcijom. Sličan proces odvija se i u tumoru, gde se TGF- $\beta$ 1 sekretuje kao odgovor na prisustvo pro-inflamatornih citokina, pre svega faktora tumorske nekroze alfa (TNF $\alpha$ ) i interleukina 1 (IL-1), dominantno u ćelijama strome (242). Aktivacija TGF- $\beta$  puteva dovodi do povećanog stvaranja i smanjene degradacije komponenti ekstracelularnog matriksa, posebno kolagena tipa I, kao i proliferacije mezenhimnih ćelija i diferencijacije u miofibroblaste, koji mogu da migriraju i

učestvuju u tkivnoj kontraktilnosti. TGF- $\beta$  stimuliše stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (*reactive oxygen species* – ROS) različitim mehanizmima, per svega inaktivacijom NADPH oksidaza, a ROS aktiviraju nishodne signalne puteve (SMAD, EGFR, MAPK familiju) koji dovode do ekspresije pro-fibrotičnih gena, poput TGF- $\beta$ 1, angiotenzinigena, PAI-1, faktora rasta vezivnog tkiva (224, 242). Prekomerno stvaranje TGF- $\beta$ 1, koji je osnovni pokretač fibroziranja u hroničnoj fazi inflamatornih procesa, prethodi stvaranju tumora i priprema mikrookolinu koja će biti pogodna za tumorski rast.

TGF- $\beta$ 1 je ključni medijator dijaloga između kancerskih ćelija i stromalnih mezenhimnih ćelija, kao što su kanceru pridruženi fibroblasti i stelatne ćelije. Kancerske ćelije otpuštaju mitogene i fibrogene stimulanse (pored TGF- $\beta$ 1 tu je i PDGF i komponente puta zvučnog ježa), koje aktiviraju fibroblaste i stelatne ćelije. A zatim ove aktivirane stromalne ćelije sekretuju faktore rasta (EGF, IGF-1, PDGF, FGF), kolagen tipa I i matriksne metaloproteinaze koje promovišu tumorski rast, inavaziju i metastaziranje. Kvalitet strome, pre svega struktura kolagena I, jedan je ključnih faktora koji funkcionišu kao prepreka za širenje tumora, ili pak podržavaju metastatsku diseminaciju tumorskih ćelija. Ovi efekti su ponekad izraženi u vidu prekomernog stvaranja ekstracelularnog matriksa koji se histološki manifestuje kao gusta, fibrotična, dezmodoplastična stroma (243). Pored toga, aktivirane stromalne ćelije doprinose stvaranju hipoksične mikrookoline, što stvara selektivni pritisak ka nastanku invazivnijeg fenotipa kancerske ćelije.

Jedna od ključnih funkcija TGF- $\beta$  u promociji tumorskog rasta jeste stimulacija angiogeneze (233, 244). TGF- $\beta$  pokreće angiogenezu u endotelnim ćelima aktivacijom kanonskog puta signalizacije, koji stimuliše angiogenezu povećanjem ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i njegovog funkcionalnog receptora, VEGFR2. Angiogeni efekti TGF- $\beta$  u tumorskoj ćeliji regulisani su putem TGFBR2/SMAD3 podstaknute ekspresije i oslobađanja u stromu fibroblastnog faktora rasta 2. TGF- $\beta$  može ostvarivati i pro-angiogene, ali i anti-angiogene efekte, u zavisnosti od nivoa ekspresije i konteksta. Nizak nivo TGF- $\beta$  indirekto doprinosi stimulaciji angiogeneze tako što povećava ekspresiju i aktivnost angiogenih faktora i proteaza, dok visok nivo TGF- $\beta$  stimuliše remodelovanje bazalne membrane, regrutuje glatkomišićne ćelije, a inhibira rast i proliferaciju endotelnih ćelija.

TGF- $\beta$  igra centralnu ulogu u regulaciji antitumorskog imunog odgovora (222). Kancerske ćelije su sposobne da izbegnu imunološki nadzor i destrukciju razvijajući mehanizme nevidljivosti za imuni sistem ili sekretujući citokine koji zaslepljuju imuni sistem za prisustvo

abnormalnih antigena na površini kancerske ćelije. TGF- $\beta$ 1 je najmoćniji imunosupresor i u ovim procesima, zajedno sa interleukinom 10 (IL-10), igra ključnu ulogu. TGF- $\beta$ 1 koji se sekretuje u tumoru oslabljuje ili gasi imuni odgovor domaćina putem nekoliko mehanizama. Na prvom mestu, TGF- $\beta$ 1 pomera ravnotežu subsetova T-helper ćelija Th1/Th2 u pravcu Th2 odgovora putem IL-10, odnosno u pravcu imunog fenotipa udruženog sa humoralnim imunitetom, bez citotoksične aktivnosti protiv kancerskih ćelija. TGF- $\beta$ 1 direktno inhibira anti-tumorske odgovore tipa Th1, tj. ćelijama posredovan imunitet i M1 tip makrofaga. Pored toga, TGF- $\beta$ 1 suprimira funkciju citotoksičnih CD8+ T-limfocita, ćelija prirodnih ubica (*natural killer* – NK) i dendritičnih antigen prezentujućih ćelija. TGF- $\beta$ 1 stimuliše stvaranje CD4+/CD25+ T-regulatornih ćelija (T-reg), koje suprimiraju aktivnost ostalih populacija limfocita i promoviše M2 tip makrofaga, koji imaju pro-tumorske aktivnosti. Uz sve navedeno, TGF- $\beta$ 1 povećava sekreciju hemokina koji privlače neutrofile, angažuju ih i aktiviraju antitumorska svojstva u njima (222, 245).

#### **2.2.3.2. Epitelno–mezenhimna tranzicija (EMT)**

EMT podrazumeva proces transformacije epitelnog fenotipa ćelija u mezenhimni i u fiziološkim uslovima odvija se u embrionalnom rastu i razvoju kao proces od fundamentalnog značaja. EMT upravlja morfogenezom tako što indukuje diferencijaciju epitelnih u mezenhimne tipove ćelija, kako bi se formirale određene teritorije embriona. EMT se karakteriše diferencijacijom visoko organizovanih i tesno povezanih epitelnih ćelija u neorganizovane i mobilne mezenhimne ćelije sa svojstvima matičnih stem ćelija. EMT uključuje gubitak međućelijskih spojeva i kontakata i akviziciju fibroblastolikih karakteristika od strane epitelnih ćelija, kao i poprimanje migratornih i invazivnih svojstava od strane kancerskih ćelija (246, 247).

EMT se karakteriše disolucijom tesnih veza epitela i bazolateralnih adherentnih junkcija, što uzrokuje gubitak polarizacije epitelnih ćelija. Dolazi do gubitka ekspresije epitelnih gena kao što su E-kaderin, ZO-1, okludin, klaudin, citokeratini 8, 18 i 19 i dezmozoplakin, a indukcije ekspresije mezenhimnih markera, uključujući N-Kaderin, vimentin, fibronektin, tenascin-C i vitronektin. Tokom EMT aktinski citoskelet se reorganizuje od kortikalnih adherentno–asociranih lokalizacija u aktinska stres vlakna koja su usidrena u fokalne adhezione komplekse, koji učestvuju u stvaranju filopodija i doprinose ćelijskoj migraciji (246, 248).

Indukcijom EMT i modifikacijom fenotipa ćelije TGF- $\beta$  menja međućelijsku adheziju, kao i adhezivna, migratorna i invazivna svojstva tumorskih ćelija. EMT doprinosi invaziji i

diseminaciji kancerskih ćelija. Nishodna regulacija E-kaderina dozvoljava da se  $\beta$ -katenin oslobodi, translocira iz citoplazme u jedro i dovede do povećanja ekspresije c-MYC, ciklina D1, matriksne metaloproteinaze 7 i na taj način promoviše invazivno ponašanje ćelija. Tokom EMT povećana je sekrecija ekstracelularnih proteaza, a redukovana ekspresija proteina ekstracelularnog matriksa, što dalje doprinosi invaziji kancerskih ćelija. TGF- $\beta$  je glavni regulator EMT, jer kontroliše ekspresiju nekoliko ključnih transkripcionih faktora koji upravljaju EMT, regulišući ekspresiju mezenhimnih markera, a vršeći represiju epitelnih markera. Ovi ključni neposredni regulatori EMT su transkripcioni faktori Snail i Slug, Twist, ZEB1 i ZEB2, kao i faktor FoxC3 (248, 249).

TGF- $\beta$  indukuje reverzibilnu EMT kako u normalnim ćelijama, tako i u kontekstu neoplastične bolesti. Obrnuto, blokadom TGF- $\beta$  signalizacije putem prekomerne ekspresije dominantno–negativnog TGFBR2 efikasno se sprečava EMT kancerskih ćelija skvamocelularnog karcinoma kože *in vivo* (250). Kancerske ćelije na invazivnom frontu tumora imaju pojačanu ekspresiju TGF- $\beta$  i pokazuju izraženije EMT karakteristike. Kanonski put TGF- $\beta$  signalizacije ima ključnu ulogu u medijaciji EMT. Smad-zavisna aktivacija transkripcije dovodi do ekspresije EMT regulatornih faktora kao što su Snail, Slug, Twist, ZEB2 putem indukcije ekspresije proteina visoko-mobilne grupe A2 (HMGA2), što uzrokuje represiju ekspresije E-kaderina i disocijaciju dezmozoma (249, 251). Ne–kanonski nishodni signalni putevi TGF- $\beta$ , koji su nezavisni od Smad, takođe doprinose EMT, pre svega ovde mogu učestvovati Pas/PI3K, RhoA, mTOR, Erk/MAPK i p38 stresom-aktivirana kinaza (248).

Mikro RNK takođe igraju važnu ulogu u regulaciji i održavanju EMT indukovane TGF- $\beta$  signalima (252). Mikro RNK regulišu ekspresiju više od trećine transkriptoma na posttranskripcionom nivou, a samo jedna miRNK može da kontroliše ekspresiju stotine gena direktno ili hiljade indirektno (253). TGF- $\beta$  vrši represiju ekspresije miR-200, što dovodi do porasta nivoa ciljnih molekula ove mikro RNK, ZEB2, transkripcionog faktora koji je jedan od ključnih EMT upravljača i glavni represor E-kaderina (254).

### **2.2.3.3. TGF- $\beta$ ciljana terapija – inhibitori TGF- $\beta$ puta u terapiji kancera**

Poslednjih decenija razvijen je veliki broj terapijskih agenasa koji inhibiraju TGF- $\beta$  signalni put, koji su ispitivani u pretkliničkim studijama, a mnogi su danas u fazi kliničkog razvoja (224). Inhibicija TGF- $\beta$  signalizacije može se postići na nekoliko nivoa. Blokada TGF- $\beta$  na nivou liganda podrazumeva primenu antisens nukleotida koji se dostavljaju intravenski ili se

biološkim inženjeringom ubacuju u imune ćelije, a u cilju sprečavanja sinteze TGF- $\beta$ . Inhibicija na nivou ligand–receptor može biti u obliku zamke za ligande (TGF- $\beta$  neutralizujuća monoklonalna antitela i solubilni receptori) ili monoklonalnih antitela na TGF- $\beta$  receptore koji sprečavaju interakciju liganda sa receptorom. Ovde spadaju peptidni inhibitor koji specifično blokira interakciju TGF- $\beta$ 1 sa svojim receptorom, monoklonalno antitelo na receptor TGFBR2, kao i pan-TGF- $\beta$  antitelo. Blokada TGF- $\beta$  puta moguća je i na intracelularnom nivou. TGF- $\beta$  receptor kinazni inhibitori sprečavaju prenos signala unutar ćelije, i ovde spada do sada najpotentniji agens TGF- $\beta$  ciljane terapije, galunisertib, inhibitor TGFBR1 malog molekula (224, 255).

Inhibitori TGF- $\beta$  signalizacije *in vitro* su pokazali ograničenu anti–proliferativnu aktivnost, uprkos efikasnoj blokadi i kanonskog i ne–kanonskog puta prenosa signala. Galunisertib se pokazao kao potentan inhibitor klasičnog TGF- $\beta$  puta, jer inhibira fosfo-Smad2, ali i ne–kanonskih puteva u kancerskoj ćeliji (MAPK ili PI3K/AKT/mTOR) u *in vitro* uslovima, na ćelijskim linijama hepatocelularnog karcinoma, a inhibicija nije zavisila od nivoa ekspresije TGF- $\beta$  proteina (256). U *in vitro* uslovima galunisertib je inhibisao proliferativnu kancersku aktivnost u zavisnosti od ćelijskog konteksta, ali je zato pokazao odličnu anti–invazivnu aktivnost i anti–proliferativno dejstvo u *ex vivo* uslovima, koji vernije od ćelijskih linija oponašaju fiziološke okolnosti i ukazuju da bi antitumorski efekti TGF- $\beta$  inhibicije mogli biti posredovani tumorskom mikrookolinom. Međutim, međuzavisnost i ukrštanje različitih intracelularnih signalnih puteva može da dovede do neočekivanih i nepredvidivih efekata TGF- $\beta$  blokade. Opisano je da TGF- $\beta$  inhibicija galunisertibom potencira invaziju ćelija pankreasnog duktalnog adenokarcinoma u kolageni matriks trodimenzionalne fibroblastne kulture. Ovaj paradoksalni efekat posledica je ukrštanja puteva TGF- $\beta$  i hepatocitnog faktora rasta, koji pored TGF- $\beta$  ima vodeću ulogu u invazivnosti karcinoma pankreasa, gde inhibicija TGF- $\beta$  signalizacije uzrokuje potenciranje sekrecije hepatocitnog faktora rasta u fibroblastima (257).

S obzirom na to da mnogi tumori ekspimiraju imunogene antigene, ali sekretuju niz imunosupresivnih citokina, uključujući TGF- $\beta$ 1, jedan od osnovnih pravaca za razvoj TGF- $\beta$  usmerene terapije jeste slom uspostavljene imune tolerancije na kancer i reaktivacija imunog sistema. Inhibitori TGF- $\beta$  mogu da doprinesu reverziji imune supresije indukovane tumorskom mikrookolinom, putem inhibicije T-reg ćelija i uspostavljanjem citotoksičnosti posredovane T-limfocitima i NK–ćelijama. Istraživanja na animalnim modelima melanoma daju ohrabrujuće rezultate. Nishodnom regulacijom TGF- $\beta$  pomoću male interferišuće RNK



povećana je efikasnost vakcine i značajno inhibisan tumorski rast u odnosu na primenu samo vakcine, kao rezultat povećane infiltracije tumora citotoksičnim T limfocitima i smanjenja broja regulatornih T-ćelija (226).

#### 2.2.4. TGF- $\beta$ u urotelnom karcinomu mokraćne bešike

Dobro je poznato da TGF- $\beta$  signalizacija doprinosi razvoju tumora tako što promovira inaktivni tumorski rast i metastaziranje i indukuje EMT. Međutim, plejotropna priroda TGF- $\beta$  puteva i zavisnost aktivnosti od konteksta otežava univerzalno ekstrapoliranje zaključaka, jer značaj TGF- $\beta$  varira u zavisnosti od tipa kancera i istraživačkog modela. Relativno mali broj istraživanja bio je posvećen ulozi TGF- $\beta$  signalizacije u urotelnom karcinomu mokraćne bešike, međutim, nedavno objavljeni rezultati ukazuju na ključnu ulogu TGF- $\beta$  signalizacije u tumorigenezi, promociji tumorskog rasta i invaziji, kao i u indukciji EMT i metastaziranju urotelnog karcinoma mokraćne bešike.

Nekoliko studija ispitalo je značaj genetskih markera, tj. genetske varijabilnosti ključnih članova TGF- $\beta$  puta u određivanju rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike (258-260). Iako su polimorfizmi receptora za TGF- $\beta$  receptore TGFBR1 i TGFBR2 povezani sa povećanim rizikom za razvoj nekih tumora, pre svega karcinoma dojke i jajnika, nije nađena udruženost ovih polimorfizama sa rizikom za nastanak karcinoma mokraćne bešike (258, 259). Međutim, utvrđeno je da je polimorfni oblik alela za *TGFBR1* rs868 kod mišićno–invazivnih tumora mokraćne bešike povezan sa kancer–specifičnim mortalitetom (258). Genetske varijante gena *RUNX3*, koji je meta TGF- $\beta$ , a igra važnu tumor supresorsku ulogu, takođe značajno utiču na rizik za razvoj karcinoma bešike (260). Studija koja je najsvieobuhvatnije ispitala uticaj genetske varijabilnosti komponenti TGF- $\beta$  puta u kontekstu rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike, ukazala je da postoji nedvosmisleni značaj TGF- $\beta$  signalizacije za razvoj urotelnog karcinoma (259). U studiji je ispitano čak 356 polimorfizama jednog nukleotida (*single nucleotid polymorphism* – SNP) kod 37 gena članova signalnog puta TGF- $\beta$  na značajnom populacijskom uzorku od 801 pacijenta sa karcinomom bešike, uparenih sa isto toliko zdravih ispitanika. Rezultati su pokazali da je preko četrdeset genetskih polimorfizama povezano sa povećanim rizikom za razvoj kancera, od kojih je devet polimorfizama zadržalo statističku značajnost nakon prilagođavanja za višestruke komparativne kriterijume između parametara. Ovi polimorfizmi značajni za rizik od nastanka karcinoma pripadaju genima *SMAD2*, *EGFR* i *VEGFC* (259).

Iako je nishodna regulacija ili inaktivacija receptora mutacijama uobičajena strategija kojom tumorske ćelije u inicijalnim fazama tumorigeneze izbegavaju citostatske anti-tumorske efekte TGF- $\beta$ 1, nedavno je utvrđeno da neki oblici mutacija receptora za TGF- $\beta$ 1 mogu da pojačaju signalizaciju čiji su efekti stimulacija tumorskog rasta, invazivnosti i migracije (261). U ćelijskoj kulturi karcinoma mokraćne bešike T24 nađena je prekomerna ekspresija receptora TGFBR2, zajedno sa konkomitantnim tačkastim mutacijama, posebno mutacijom koja dovodi do zamene Glutaminske kiseline Lizinom na poziciji 269. Iako ove mutacije receptora ne remete nishodnu signalizaciju preko Smad proteina, one su rezultovale pojačanjem ćelijske mobilnosti i izostankom efekta zaustavljanja rasta na vezivanje TGF- $\beta$ 1. Mutacija Glu269Lys detektovana je i kod pacijenata sa karcinomom mokraćne bešike. Utvrđeno je da pacijenti sa ovom mutacijom TGFBR2 receptora imaju tumore višeg gradusa i veće T kategorije primarnog tumora (261).

Pionirska studija koja je ispitivala ekspresiju TGF- $\beta$ 1 objavljena je pre više od dve decenije i ukazala je da TGF- $\beta$  može imati značajnu ulogu u razvoju karcinoma mokraćne bešike, pre svega u ranim stadijumima tumorskog rasta (262). U ovom istraživanju ispitivan je nivo ekspresije TGF- $\beta$ 1 u uzorcima karcinoma mokraćne bešike kod 51 pacijenta, korišćenjem metode kvantitativne polimeraza lančane reakcije (q-PCR). Rezultati studije su pokazali da je nivo TGF- $\beta$ 1 značajno veći u kancerskom tkivu nego u okolnom normalnom urotelu, kao i da je povećana ekspresija TGF- $\beta$ 1 izraženija u tumorima niskog histološkog gradusa i nižeg patološkog stadijuma, u odnosu na mišićno-invazivne karcinome. Međutim, ovakav zaključak da je TGF- $\beta$ 1 ekspresija svojstvena neinvazivnim ili superficijalno-invazivnim neoplazmama niskog gradusa brzo je modifikovan nalazima narednih studija.

Studija koja je analizirala ekspresiju TGF- $\beta$ 1 i njegovih receptora TGFBR1 i TGFBR2 imunohistohemijskom metodom na 80 uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike dobijenih radikalnom cistektomijom, utvrdila je da je prekomerna ekspresija TGF- $\beta$ 1 veoma česta i u mišićno-invazivnom karcinomu mokraćne bešike, te da se beleži kod dve trećine ispitivanih tumora (263). Ova studija obuhvatila je heterogenu populaciju urotelnih tumora u pogledu nivoa invazivnosti, histološkog gradusa i statusa limfnih nodusa, ali su rezultati ukazali na to da je visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 nedvosmisleno povezana sa invazivnim tumorskim stadijumom i da predstavlja nezavisni prediktor progresije bolesti. Pored toga, nađeno je da prekomerna ekspresija TGF- $\beta$ 1 u tumorskim ćelijama značajno korelira sa gubitkom ekspresije receptora za TGF- $\beta$ , kao i da je gubitak receptora TGFBR1 i TGFBR2, koji je prisutan kod nešto manje od polovine tumora, udružen sa invazivnim tumorskim

stadijumom, visokim histološkim gradusom i prisustvom limfovaskularne invazije. Ova studija je po prvi put ukazala na prognostički značaj imunohistochemijske ekspresije komponenti TGF- $\beta$  puta, sugerišući asocijaciju nepovoljnog kliničkog ishoda kod pacijenata sa karcinomom bešike i izmenjene ekspresije TGF- $\beta$ 1 i njegovih receptora. Iako nije pokazala značajnu korelaciju sa kancer-specifičnim preživljavanjem, visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je statistički nezavisni prediktor progresije bolesti (263).

Ispitivanje prognostičkog značaja ekspresije gena TGF- $\beta$  puta komplikovano je opisanim dualizmom TGF- $\beta$  signalizacije i promenom tumor-supresorke u tumor-promovišuću ulogu TGF- $\beta$  u toku evolucije neoplastičnog rasta. Zato je učinjen pokušaj da se definiše profil ekspresije grupe gena iz TGF- $\beta$  puta koji bi doprineo identifikaciji agresivnih tumora, koji zahtevaju posebnu pažnju kliničara i energičniji pristup lečenju. Selektovano je 13 gena udruženih sa TGF- $\beta$  koji su diferencijalno eksprimirani u urotelnim karcinomima, od kojih dva gena, *SMAD6* i *ID2*, inhibitor DNK-vezujućeg proteina, imaju protektivni efekat, odnosno njihova pojačana ekspresija korelira sa dobrom diferencijacijom i nižim patološkim stadijumom, a preostalih 11 su udruženi sa agresivnim svojstvima tumora. Utvrđeno je da definisani profil ekspresije značajno korelira sa tumorskim gradusom i stadijumom i predviđa loše preživljavanje pacijenata sa karcinomom mokraćne bešike (264).

U skladu sa težnjom da se identifikuju markeri za dijagnostiku tumora, ali i praćenje recidiva i progresije bolesti, nivo TGF- $\beta$ 1 analiziran je u serumu i urinu pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bešike (265, 266). Primenom komercijalnih imunoeseja za detekciju TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2 analizirani su uzorci seruma i urina 57 pacijenata sa karcinomom bešike i 18 zdravih ispitanika koji su predstavljali kontrolnu grupu (265). Utvrđeno je da je nivo TGF- $\beta$ 1 značajno povišen u serumu pacijenata sa invazivnim karcinomom mokraćne bešike, dok je kod pacijenata sa superficijelnim tumorom bio unutar opsega normalnih vrednosti. Serumske vrednosti TGF- $\beta$ 1 značajno su korelirale kako sa stadijumom, tako i sa visokim histološkim gradusom tumora, ali nije bilo značajne korelacije sa prisustvom metastaza u limfnim nodusima. Ni vrednosti TGF- $\beta$ 1 u urinu niti serumske i urinarne vrednosti TGF- $\beta$ 2 nisu pokazale značajnu udruženost sa kliničko-patološkim parametrima. Potonje studije potvrdile su da je nivo TGF- $\beta$ 1 povišen u serumu kod pacijenata sa urotelnim karcinomom bešike u odnosu na zdrave ispitanike, ali može biti povišen i kod pacijenata sa različitim urinarnim poremećajima (266). Nivo TGF- $\beta$ 1 u serumu pokazao je značajnu korelaciju sa tumorskim gradusom, ali ne i sa patološkim stadijumom bolesti.

Kako bi ispitali ulogu TGF- $\beta$ 1 na sposobnost invazivnog rasta i EMT analizirani su efekti različitih koncentracija TGF- $\beta$ 1 na morfološke promene u T24 ćelijskoj liniji invazivnog HG humanog karcinoma bešike (267). Procena efekata TGF- $\beta$ 1 određivana je korišćenjem migracionog i invazivnog *in vitro* esej, opservacijom ćelijske kulture pod fazno-kontrastni mikroskopom i određivanjem ekspresije E-kaderina i Vimentina putem RT-PCR. Rezultati su pokazali da je TGF- $\beta$ 1 snažan induktor EMT, te da efikasno pojačava migraciju i invazivnu sposobnost kancerskih ćelija, a rezultati merenja mRNA markera EMT su takođe u skladu sa indukcijom EMT u ćelijskoj kulturi. Pored toga, utvrđeno je da efekti koji odgovaraju EMT izazvani tretmanom T24 ćelijske linije rastućim koncentracijama TGF- $\beta$ 1 mogu biti suprimirani aplikacijom sintetskog inhibitora TGF- $\beta$ 1, LY2109761 (267).

TGF- $\beta$  reguliše ekspresiju duge nekodirajuće RNK nazvane *malat1* (*metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*), koja je u karcinomu pluća opisana kao ključni regulator metastaziranja. U studiji na ćelijskim i animalnim modelima urotelnog karcinoma mokraćne bešike (268) utvrđeno je da je ova lncRNA jedan od ključnih medijatora EMT pokrenue TGF- $\beta$  u urotelnim tumorima. Isključivanje (*knockdown*) ekspresije *malat1* inhibira TGF- $\beta$  indukovanu EMT u *in vitro* i u *in vivo* uslovima. Pored toga, utvrđeno je da humana lncRNA *malat1* reguliše EMT tako što u odgovoru na TGF- $\beta$  regrutuje veliki metilacioni kompleks koji neposredno vrši represiju i modulaciju ekspresije EMT gena. Tako je ekspresija *malat1* udružena sa suz12, supresorom zeste 12, proteina koji ulazi u sastav polycomb proteinskog represivnog kompleksa (PCR2), koji je uključen u epigenetsku regulaciju genske ekspresije, zajedno sa EZH2. Ova udruženost rezultuje time da povećanje *malat1* indukovano sa TGF- $\beta$  upravo putem suz1 smanjuje ekspresiju E-kaderina, a povećava ekspresiju N-kaderina i fibronektina, makrera mezenhimnog fenotipa. Ciljana inhibicija *malat1* i suz12 sprečava efekte TGF- $\beta$  koji podržava invazivnost, migraciju i metastatsku diseminaciju tumorskih ćelija. Ovi rezultati ukazuju da je inhibicija kancer-promovišućeg dejstva TGF- $\beta$  i indukcije metastatskog fenotipa moguća i selektivnim gašenjem ekspresije *malat1* (268).

Prva studija koja se bavila karakterizacijom uloge TGF- $\beta$  *in vivo* objavljena je tek nedavno (269). U ovoj studiji je na eksperimentalnom mišjem modelu u kome je N-butyl-N-4-hidroksibutyl nitrozaminom (BBN) indukovani karcinom mokraćne bešike ispitivana uloga TGF- $\beta$ . Kondicionalnom ablacijom TGF- $\beta$  signalizacije, pomoću *knockout*-a TGF- $\beta$  receptora *TGFBR2*, Liang i kolege su ukazali na to da bi isključenje TGF- $\beta$  signalizacije moglo da inhibira progresiju i invaziju karcinoma bešike *in vivo*. Pored toga, ablacija TGF- $\beta$  rezultovala je i redukcijom populacije kancerskih stem ćelija i EMT (269).

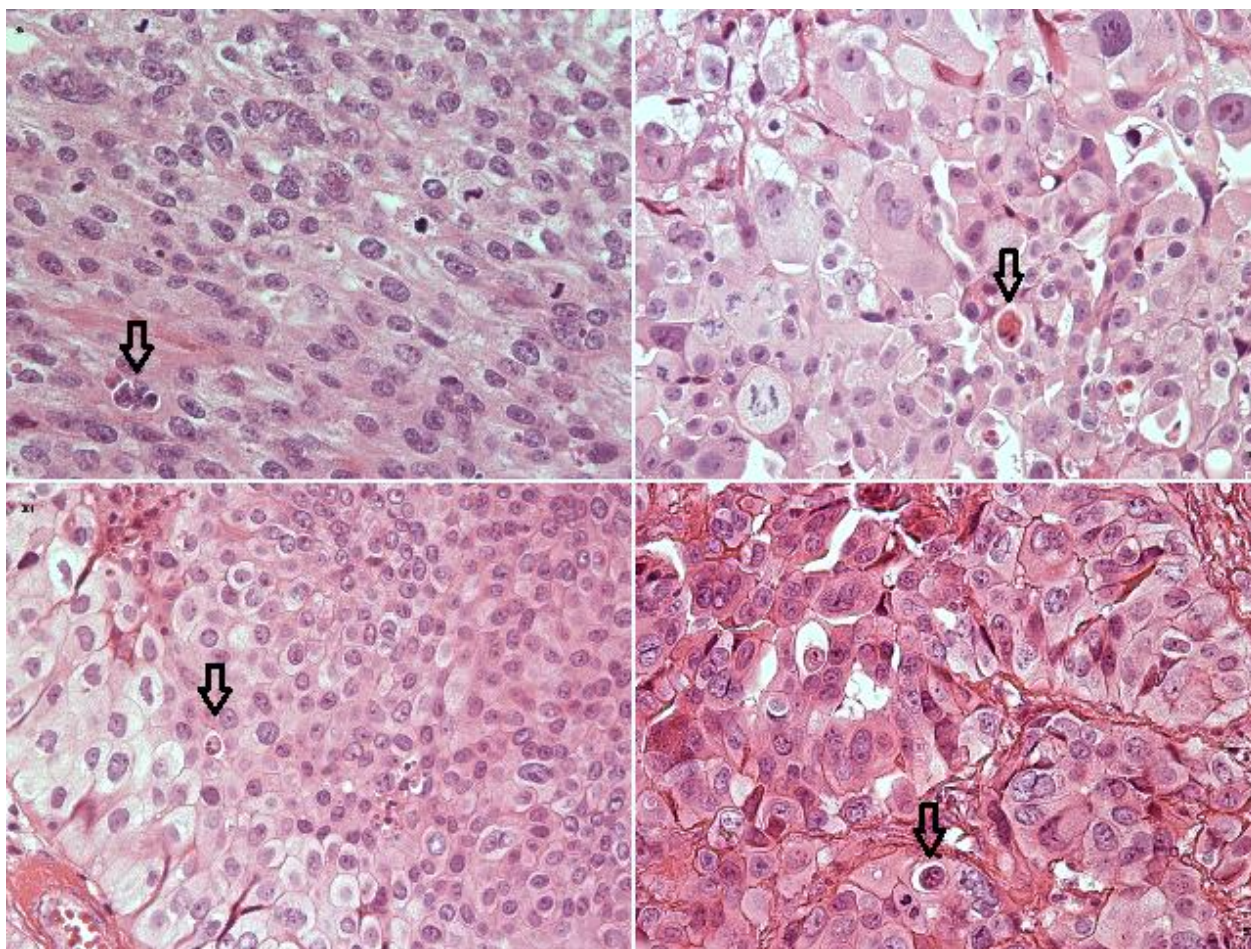
## 2.3. Apoptoza u urotelnom karcinomu mokraćne bešike

Apoptoza je oblik programirane smrti ćelija koji ima fundamentalni značaj u fiziološkim i patološkim uslovima i omogućava eliminaciju pojedinačnih nepotrebnih, neželjenih ili oštećenih ćelija (270). Apoptotska ćelijska smrt inhibira različite stadijume onkogeneze, od inicijalne transforacije do metastaziranja, te je inhibicija ili izbegavanje apoptoze jedno od osnovnih osobina kancerskog fenotipa (271). Iako je nekontrolisana ćelijska proliferacija inherentno svojsvo maligne bolesti, kancerske ćelije imaju tendenciju da ispoljavaju više apoptoze nego normalne ćelije, što može da doprinese efikasnosti nekih citotoksičnih i ciljanih terapija (272). Apoptoza može da bude inicirana aktivacijom unutrašnjeg (intrinzič) ili spoljašnjeg (ekstrinzič) puta, koji konačno dovode do aktivacije efektorskih molekula i egzekutorskih kaspaza, koje cepaju stotine različitih proteina i vode do brze ćelijske smrti, praćene specifičnim biohemijskim i morfološkim znacima. U urotelnom karcinomu mokraćne bešike alteracija ekspresije molekula koji učestvuju u apoptozi je česta (273-275). Procena statusa markera apoptoze u karcinomu bešike može imati prognostički značaj (275). Mikromorfološki izgled apoptotskih ćelija u urotelnom karcinomu prikazan je na Slici 11.

### 2.3.1. Mitohondrijalni (unutrašnji) put apoptoze u kanceru

Mitohondrijalni put apoptoze je najčešće deregulisani oblik programirane ćelijske smrti u kanceru (271). Ključni događaj koji usmerava ćeliju u egzekuciju apoptoze je permeabilizacija spoljašnje mitohondrijalne membrane, a pošto je permeabilizacija tačka bez povratka koja neumitno vodi u ćelijsku smrt, ona je precizno i tesno regulisana članovima BCL-2 familije proteina. BCL-2 familija može da se podeli na nekoliko funkcionalnih podgrupa: pro-apoptotske efektorne proteine (BAX i BAK), pro-apoptotske BH3-only proteine (BID, BIM, BAD, PUMA, NOXA, HRK, BIK, BMF) i anti-apoptotske BCL-2 proteine (BCL-2, BCL-xL, MCL-1, A1, BCL-B, BCL-w). Pomeranje ravnoteže u pravcu proapoptotskih BCL-2 proteina dejstvom različitih agenasa dovodi do direktne interakcije BH3-only proteina sa BAX i BAK, koji bivaju aktivirani, prolaze kroz konformacione promene i oligomerizuju se, stvarajući pore u spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani i indukujući njenu permeabilnost. U ovom procesu BH3-only proteini deluju kao konduktori stresnih signala koji prenose širok spektar apoptotskih impulsa do mitohondrija. Permeabilizacija spoljašnje mitohondrijalne membrane omogućava otpuštanje proteina normalno uskladištenih u mitohondrijalnom intermembranskom prostoru, pre svega citohroma c, koji se u citozolu vezuje za adaptorni molekul APAF-1. To izaziva opsežne promene u konformaciji APAF-1, koji se oligomerizuje i formira strukturu koja se naziva apoptozom.





**Slika 11. Histološki izgled apoptoze u urotelnom karcinomu mokraćne bešike. Strelice pokazuju ćelije u apoptozi i apoptotska telašca (HE, originalno uvećanje x400)**

Apoptozom regrutuje i aktivira pro-kaspazu 9, koja zatim cepa i aktivira egzekutorske kaspaze 3 i 7. Ove efektorske kaspaze efikasno ubijaju ćeliju, paralelno cepajući na stotine različitih ciljnih supstrata. Iz mitohondrija se pored citohroma c oslobađaju i supstance koje stimulišu kaspaznu aktivnost kao što su Smac/Diablo i Omi/HtrA2. Smac i Omi antagonizuju funkciju endogenih inhibitora kaspaza (34, 270, 271).

Kancerske ćelije imaju čitav spektar sredstava i aktivnosti kojima inhibiraju ili izbegavaju mitohondrijalnu apoptozu. Često je apoptoza u kancerskoj ćeliji blokirana prekomernom ekspresijom Bcl-2, koji onemogućava permeabilizaciju spoljašnje mitohondrijalne membrane. Bcl-2 može biti ushodno regulisan amplifikacijom broja kopija gena, transkripcionom aktivacijom ili nishodnom regulacijom mikro RNK koja suprimira ekspresiju Bcl-2. Drugi anti-apoptotski molekuli BCL-2 familije su takođe često mutirani. U karcinomu mokraćne bešike česta je amplifikacija MCL-1, koja stabilizuje aktivnost ovog proteina, koji u fiziološkim okolnostima ima veoma kratak poluživot i meta je proteozomske degradacije



(276). Kancerske ćelije razvile su i brojne mogućnosti za gašenje pokretača apoptoze, a klasičan primer je rasprostranjen gubitak aktivnosti funkcije tumor supresorskog proteina p53 (277).

### 2.3.2. Put receptora smrti – spoljašnji put apoptoze u kanceru

Spoljašnji put apoptoze (Slika 12) pokreće se vezivanjem liganda superfamilije faktora tumorske nekroze (TNF) za njihove receptore, označene kao ćelijski receptori smrti (272, 278). Protein TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) je moćni pokretač apoptoze. Tumorske ćelije su mnogo osetljivije na apoptozu pokrenutu TRAIL-om od normalnih ćelija, a molekularna osnova ove selektivne osetljivosti još uvek nije razjašnjena (279, 280).

TRAIL se vezuje za dva tipa receptora, receptore smrti (TRAIL-R1/DR4 i TRAIL-R2/DR5) i receptore mamce (TRAIL-R3/DcR1 i TRAIL-R4/DcR2), koji verovatno inhibiraju ovaj put. Samo receptori smrti DR4 i DR5 sadrže konzervirani domen smrti i signaliziraju apoptozu. DcR1 sadrži skraćeni, nefunkcionalni domen smrti, dok receptoru DcR2 u celini nedostaje citoplazmatski domen. Aktivacija receptora DR4 i DR5 dovodi do oligomerizacije receptora na ćelijskoj membrani i aktivacije apoptoze putem regrutovanja FADD, FAS-asociranog proteina sa domenom smrti, koji se vezuje za motive smrti na karboksilnom kraju receptora (Slika 12). FADD zatim regrutuje preko svog efekorskog smrtnog domena kaspaze koje su u blizini membrane – kaspazu 8 ili kaspazu 10. Na taj način formira se multiproteinski kompleks koji se naziva DISC (*death-inducing signaling complex* – signalni kompleks koji indukuje smrt), koji omogućava auto-aktivaciju regrutovanih kaspaza. Kaspaza 3 je zatim meta proteolitičkog cepanja od strane kaspaza 8 i 10. Aktivirana kaspaza 3 vrši enzimsku degradaciju brojnih ćelijskih proteina što dovodi do ispoljavanja biohemijskih i morfoloških znakova apoptoze (Slika 11). Protein Bid, koji spada u grupu Bcl-2 BH3-only proteina takođe je važna meta kaspaze 8. Aktivirani Bid aktivira unutrašnji apoptotski put vezujući se za Bax i time dramatično amplifikuje apoptotski signal upućen putem receptora smrti (279).

U zavisnosti od tipa ćelija, snage i trajanja signala prenetog putem receptora smrti, kao i prisustva ili odsustva određenih nishodnih intracelularnih signalnih proteina, stimulacija receptora smrti može da pokrene ne samo apoptozu, već, u ređim okolnostima, ćelijsku proliferaciju. Pored aktivacije kaspaza, TRAIL aktivira i druge intracelularne signalne puteve, poput NF- $\kappa$ B, PI3K i MAPK familiju proteina, koji stimulišu ćelijsko preživljavanje i proliferaciju (279, 280). TRAIL ima važne uloge u tumorskom imunitetu i eliminaciji

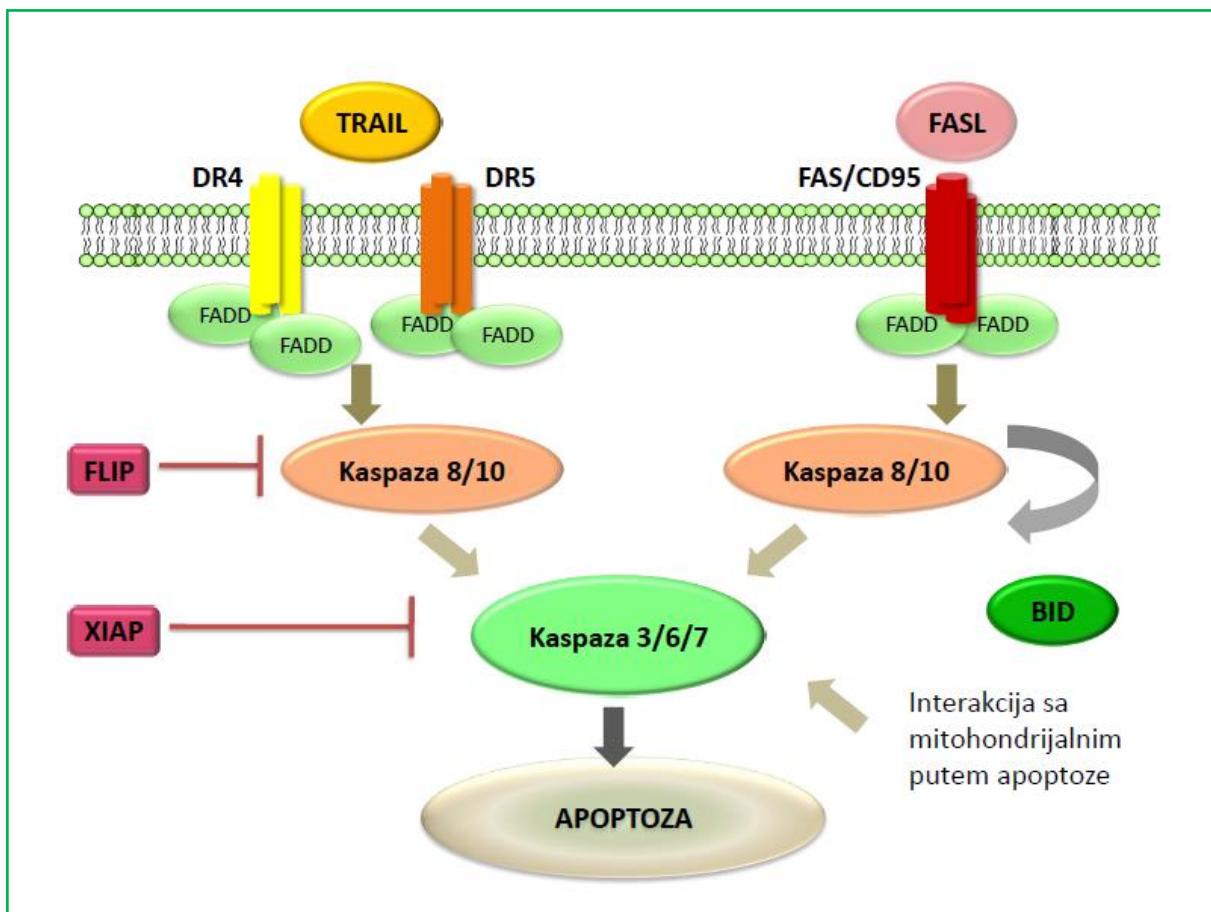
tumorskih ćelija, te su alteracije u komponentama puta TRAIL/receptori smrti uključene u progresiju tumora i mehanizmom izbegavanja imunog nadzora (278).

Mehanizmi osetljivosti i rezistencije na TRAIL-om indukovanu apoptozu su kompleksni i nepotpuno razjašnjeni. Kancerske, transformisane ćelije osetljivije su na TRAIL-om indukovanu apoptozu, a ova selektivna senzitivizacija tumorskih ćelija na TRAIL samo delimično se može objasniti većom ekspresijom receptora smrti na površini tumorskih ćelija (281). U *in vitro* studiji na ćelijskim linijama urotelnog karcinoma beške, nađeno je da ćelijske linije senzitivne na TRAIL-om izazvanu apoptozu imaju povećanu ekspresiju receptora smrti, dok kancerske linije rezistentne na TRAIL imaju smanjen nivo ekspresije receptora DR5 (282). Pored toga, prisustvo receptora mamaca koji vezuju TRAIL, a ne pokreću apoptozu izraženije je na normalnim nego na malignim ćelijama. Ćelijski FLICE inhibicioni protein (c-FLIP) sadrži sekvence homologe kaspazi 8 i kaspazi 10, te njegovo regrutovanje u DISC kompleks umesto kaspaza blokira njihovu aktivaciju i dovodi do rezistencije na TRAIL. Iako bi degradacija FLIP trebalo da poveća osetljivost na apoptozu, ne postoji linearna zavisnost između koncentracije FLIP i apoptoze u kancerskoj ćeliji, a u nekim okolnostima kada dođe do aktivacije FAS, FLIP čak može da stimuliše aktivaciju kaspaze 8 (278).

Rekombinantne forme TRAIL ili agonistička antitela na receptore DR4 i DR5 ispituju se kao potencijalni terapeutici u lečenju tumora. Ovi agensi bi mogli da se primenjuju kao monoterapija kod TRAIL senzitivnih tumora, ali i kao sinergistička sredstva za zajedničku primenu sa hemoterapijskim lekovima i novim molekularnim terapijskim agensima kako bi se povećala efikasnost lečenja i TRAIL senzitivnih i TRAIL rezistentnih tumora. Rane faze kliničkih studija pokazuju da se ovi lekovi dobro podnose i mogu bezbedno da se primenjuju (279). S obzirom na to da hemoterapija i radioterapija uglavnom inhibiraju rast i aktiviraju mitohondrijani put apoptoze, od kombinacione terapije koja bi uključila i aktivator ekstrinzičkog puta apoptoze očekuje se veliki napredak u terapiji kancera (272).

#### **2.3.2.1. Recetori smrti DR4 i DR5**

Na ćelijama čoveka opisano je dva tipa receptora smrti koji specifično vezuju TRAIL: DR4 (*Death receptor 4*, CD261, takođe nazvan i TRAILR1, *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*, ili TNFRSF10A, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A*) i DR5 (*Death receptor 5*, CD262, KILLER, TRAILR2 *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*, ili TNFRSF10B, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B*).



**Slika 12. Spoljašnji put apoptoze.** Ovaj put apoptoze pokreće vezivanje liganda smrti, TRAIL ili FAS liganda, za ćelijske receptore smrti (TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5 i FAS/CD95) na površini ćelije. Interakcija liganda i receptora dovodi do trimerizacije receptora i regrutovanja adapternih proteina FADD (*FAS-associated protein with death domain*), a zatim i kaspaze 8, ključnog medijatora ekstrinzičnog puta apoptoze, čime se stvara funkcionalni kompleks DISC (*death-inducing signalling complex*). DISC cepa i aktivira kaspazu 8, a zatim aktivisane kaspaze 8 i 10 iniciraju apoptozu direktno, cepanjem egzekutorskih kaspaza 3, 6 i 7, ili aktiviraju intrinzični, mitohondrijalni put apoptoze cepanjem molekula Bid. Aktivni Bid veže pro-apoptotske proteine Bax i Bak, što rezultuje permeabilizacijom spoljašnje mitohondrijalne membrane i oslobađanjem mitohondrijalnih proteina citohroma c i DIABLO. Citohrom c, APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) i kaspaza 9 udružuju se u funkcionalni apoptozom koji cepa i aktivira kaspazu 9, a ona cepa kaspazu 3. Kaspaza 3 iseca veliki broj intracelularnih meta, što rezultuje morfološkim i biohemijskim manifestacijama apoptoze. DIABLO suprimira inhibitore apoptoze koji vežuju i inaktiviraju kaspaze. XIAP, X-vezani inhibitor apoptoze, najmoćniji je poznati inhibitor apoptoze koji veže kaspaze 3, 7 i 9, dok FLIP protein (*FLICE inhibitory protein*) može da spreči aktivaciju kaspaze 8 i specifični je inhibitor spoljašnjeg apoptotskog puta.

Geni koji kodiraju sintezu receptora DR4 i DR5, *TRAILR1* i *TRAILR2*, nalaze se na hromozomu 8p21-22. Ovaj lokus je često zahvaćen delecijom alela u različitim tumorima, uključujući i karcinom mokraćne bešike (279, 283). U nekim solidnim humanim neoplazmama nađene su somatske mutacije ovih gena, uključujući karcinom dojke, pluća i glave i vrata (284, 285). Većina identifikovanih i opisanih mutacija zahvata intracelularni domen DR5, region koji vezuje FADD, dok DR4 često zadrži svoj divlji alelski oblik. Još uvek nije poznato kako mutacije receptora smrti deluju na signalizaciju. Neke tačkaste mutacije dovode do toga da DR5 izgubi sposobnost da formira funkcionalni DISC i indukuje apoptozu. Pošto TRAIL signalizacija može da se odvija i preko DR4 i preko DR5, gubitak ili mutacija jednog od tih receptora ne mora da dovede do inhibicije signalizacije. Međutim, mutantna forma DR5 ima dominantni negativni efekat, te onemogućava da TRAIL pokrene apoptozu preko funkcionalnog DR4 (279). Utvrđeno je da je učestalost retke alelske varijante DR4 (*DR4* A683C) značajno veća kod pacijenata sa karcinomom mokraćne bešike, kao i u hroničnoj limfocitnoj i mijeloidnoj leukemiji, karcinomu prostate i glave i vrata nego u opštoj populaciji (283). Opisano je i epigenetsko utišavanje ekspresije receptora smrti kao mehanizam koji doprinosi rezistenciji na TRAIL. Hipermetilacija promotera DR4 detektovana je u skoro 30% tumora jajnika, što je značajno bilo povezano sa smanjenjem ili potpunim gubitkom ekspresije DR4, a najčešće je ovaj nalaz potvrđen kod pacijentkinja mlađih od 50 godina (286). Primena demetilišućeg agensa je u *in vitro* uslovima dovela do restitucije DR4 i uspostavljanja osetljivosti na TRAIL.

Ispitivanje nivoa ekspresije receptora smrti na kancerskim ćelijama urotelnog karcinoma mokraćne bešike pokazalo je da nivo ekspresije korelira sa osetljivošću na TRAIL-om indukovanu apoptozu (282). Senzitivnost na TRAIL u *in vitro* uslovima opada sa smanjenjem ekspresije receptora smrti DR4 i DR5 na ćelijskoj površini. Citotoksični agensi koji mogu da povećaju ekspresiju ovih receptora mogli bi da senzibiliju kancerske ćelije na TRAIL-om indukovanu apoptozu.

Dugo se smatralo je da je u osnovi smanjene osetljivosti kancerske ćelije na TRAIL-om pokrenutu apoptozu smanjena stimulacija receptora smrti DR4 i DR5 usled prisustva lažnih receptora mamaca (*Decoy receptors*) i supresija intracelularne apoptotske kaskade. Međutim, nedavno je otkriveno da posttranslacione modifikacije receptora smrti igraju važnu ulogu u određivanju senzitivnosti na TRAIL (280). Genomskom analizom ekspresionog profila preko 100 humanih kancerskih ćelijskih linija nađeno je da su kod TRAIL-senzitivnih linija konzistentno prekomerno eksprimirani geni koji kodiraju enzime koji učestvuju u O-

glikozilaciji: *GALNT14*, *GALNT3*, *FUT6* i *FUT3*. Otkriveno je da receptori DR4 i DR5 podležu post-translacionoj modifikaciji po tipu *O*-glikozilacije, te da inhibicija ekspresije gena koji regulišu i izvide glikozilaciju farmakološkim ili genetičkim putem dovodi do supresije TRAIL-om posredovane apoptoze (280). *O*-glikozilacija ne utiče na ekspresiju receptora smrti, ali poboljšava nishodnu aktivnost ovih receptora, stimulišući formiranje DISC kompleksa i aktivaciju kaspaze 8.

Signalizacija koja se ostvaruje putem DR4 i DR5 može da rezultuje i aktivacijom puta nuklearnog faktora NF- $\kappa$ B, verovatno putem RPA-interagujućeg proteina (RIP). Inhibicija NF- $\kappa$ B *in vitro* senzibiliše tumorske ćelije na apoptozu posredovanu TRAIL-om i posreduje TRAIL-zavisnom regresijom tumora *in vivo* (287, 288). U uslovima kad je apoptoza inhibirana, aktivacija NF- $\kappa$ B TRAIL-om transformiše TRAIL signal sa indukcije apoptoze na stimulaciju ćelijske proliferacije i preživljavanja. Ovo je potvrđeno u tumorskim ćelijama koje su rezistentne na TRAIL-om indukovanu apoptozu usled defektne signalizacije preko receptora smrti. U ovim ćelijama beleži se NF- $\kappa$ B-zavisno pojačanje proliferacije, potenciranje invazivnosti i metastaziranja nakon stimulacije TRAIL-om (289). Međutim, NF- $\kappa$ B je multiproteinski kompleks koji, u zavisnosti od svog sastava, može da aktivira nishodne puteve sa potpuno različitim biološkim ishodima. RELA subjedinica NF- $\kappa$ B može da poveća TRAIL-om indukovanu ekspresiju DR4 i DR5, kao i Bcl-X<sub>s</sub> i da izaziva represiju proteina inhibitora apoptoze 1 (IAP1), IAP2 i Survivina, te da deluje kao pro-apoptotski signal. Nasuprot tome, REL subjedinica inhibira ekspresiju kaspaze 8, DR4 i DR5 i povećava TRAIL-om posredovanu ekspresiju IAP1 i IAP2, što je snažan anti-apoptotski signal. Stoga, i u uslovima kada je klasični put signalizacije putem receptora smrti blokiran, stimulacija NF- $\kappa$ B aktivnosti putem TRAIL-a još uvek može da izazove smrt ćelije, u zavisnosti od toga da li je RELA ili REL dominantna transkripciona komponenta NF- $\kappa$ B (289).

Delujući preko receptora smrti TRAIL može da izazove brzu fosforilaciju i aktivaciju PI3K/Akt puta, jednog od najznačajnijih onkogenih puteva proliferacije i preživljavanja kancerskih ćelija. Aktivacija PI3K i njegove nishodne mete Akt stimuliše ekspresiju FLIP, snažnog inhibitora apoptoze, i ostvaruje efekat preživljavanja ćelija. Nedavno je utvrđeno da maligni ascites kod karcinoma jajnika štiti tumorske ćelije od TRAIL-om indukovane apoptoze upravo aktivacijom PI3K/Akt puta i time doprinosi rezistenciji tumorskih ćelija na apoptozu pokrenutu preko receptora smrti (290). O značaju PI3K/Akt signalizacije za modulaciju osetljivosti tumorskih ćelija na TRAIL-om indukovanu apoptozu svedoče i studije

koje ukazuju na to da su tumorske ćelije sa aktivirajućim somatskim mutacijama PI3K relativno neosetljive na apoptozu indukovanu aktivacijom DR4 i DR5 (291).

### 2.3.2.2. FAS

FAS receptor (CD95, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*, Apo-1 antigen) je transmembranski glikoprotein koji je široko eksprimiran u mnogim tkivima, a posebno visoka ekspresija je prisutna u timusu, jetri, srcu i bubregu (292). FAS receptor ima tri ekstracelularna domena sa cisteinskim ponovcima i intracelularni region sa domenom smrti, koji je ključan za apoptotsku signalizaciju. Ekspresiju FAS mogu indukovati citokini, kao što je interferon gama i TNF- $\alpha$ , i limfocitna aktivacija. FAS je receptor za FAS ligand (FASL), čije vezivanje pokreće apoptozu (273). Mehanizam FAS-posredovane apoptoze pokreće se vezivanjem FASL za receptor, nakon čega se formira kompleks DISC, koji uključuje FADD, FAS-u pridružen domen smrti i cisteinsku proteazu kaspazu 8. Aktivacija kaspaze 8 direktno ili indirektno aktivira ostale članove familije kaspaza, što dovodi do cepanja ćelijskih proteina i apoptoze ćelije.

FASL se u fiziološkim okolnostima ekspirira na citotoksičnim T limfocitima i ćelijama prirodnim ubicama (natural killer cells – NK), dok se u kanceru može ekspimirati u tumorskim ćelijama. U uslovima očuvanog imuniteta, FAS-om posredovana apoptoza ima važnu ulogu u ubijanju i eliminaciji tumorskih ćelija. U okolnostima progresije tumora, kada tumorske ćelije počnu da sekretuju FASL, receptorski sistem FASL/FAS biva uključen u ubijanje tumor infiltrišućih limfocita (TIL), tj. protivnapad tumora protiv domaćina (293). Tumorske ćelije su efikasnije u ovom protivnapadu, jer one same mogu biti rezistentne na citotoksične efekte FASL, dok su TIL veoma osetljivi na FASL-posredovanu apoptotsku smrt. Ubijanjem imunih ćelija koja ekspimiraju FAS na svojoj površini, tumorske ćelije ne samo što izbegavaju odbrambenu reakciju imunog sistema, već su aktivni učesnici u njihovoj destrukciji. U toku progresije solidnih tumora raste i nivo solubilnog FAS liganda, što inhibira FAS-om posredovanu tumoricidnu aktivnost citotoksičnih T limfocita i NK ćelija. Povećanje ekspresije FAS liganda u tumorskim ćelijama udruženo je sa smanjenjem nivoa ekspresije receptora FAS. Gubitak FAS smanjuje osetljivost tumorskih ćelija na T-ćelijsku citotoksičnost. Smanjenje ekspresije FAS u tumorskim ćelijama povezano je sa povećanjem sposobnosti tumorskih ćelija za izbegavanje imunog nadzora i olakšanjem procesa tumorske progresije i metastaziranja (273).



U karcinomu mokraćne bešike nađena je nishodna regulacija receptora FAS u odnosu na okolni normalni urotel (294). Utvrđeno je da redukcija i gubitak ekspresije FAS inverzno korelira sa stopom apoptoze u tumor infiltrirajućim limfocitima, te da smanjenje ekspresije FAS olakšava apoptozu limfocita u urotelnom karcinomu. Smanjenje imunohistohemijske ekspresije FAS u urotelnim tumorima je značajno udruženo sa višim histološkim gradusom i višim patološkim stadijumom tumora (294, 295). Među molekulima koji učestvuju u FAS signalizaciji, receptor smrti FAS, odnosno njegov nedostatak, pokazao se kao najznačajniji u progresiji tumora mokraćne bešike. Nađeno je da gubitak ekspresije FAS značajno korelira sa lošijom prognozom pacijenata sa urotelnim karcinomima mokraćne bešike, uretera i bubrežne karlice (295).

### **2.3.2.3. Ostali receptori smrti**

Receptor 1 za faktor tumorske nekroze, TNFR1 (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A*) je receptor za TNF $\alpha$  i TNF $\beta$  (limfotoksin alfa), koji učestvuje u indukciji apoptoze, regulaciji inflamacije, ali je i važan aktivator NF- $\kappa$ B puta, preko koga indukuje preživljavanje ćelija.

TRAILR3 i TRAILR4 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 3 i 4*) su receptori smrti koji vezuju TRAIL, ali nisu sposobni da prenesu signal na kaspazu 8, te se smatralo da oni funkcionišu kao receptori mamci koji inhibiraju apoptozu. Njihova ekspresija je mnogo veća u normalnim nego u tumorskim ćelijama, a prekomerna ekspresija inhibira apoptozu. To je inicijalno ukazalo na to da je osetljivost ćelije na TRAIL apoptozu određena balansom pro-apoptotskih receptora (DR4 i DR5) i receptora mamaca, ali su kasnije studije ukazale na to da apoptoza ne korelira sa nivoom TRAILR3 i TRAILR4 receptora. Nađeno je da TRAILR4 inhibira apoptozu ne samo jednostavnom kompeticijom za isti ligand, već suprimira apoptozu koju pokreće aktivacija DR5 tako što formira ligand-nezavisni proteinski kompleks. Heterokompleks DR5-TRAILR4 je deficijentan da stvori apoptotski signal. Iz svega navedenog može se zaključiti da još uvek nije razjašnjeno kako receptori mamci regulišu aktivnost TRAIL u izazivanju apoptoze (279, 296).

## 2.4. Transformišući faktor rasta beta i apoptoza

Tumor supresorski i citostatski efekti koje TGF- $\beta$  ostvaruje u ciljnim ćelijama obuhvataju inhibiciju ćelijskog ciklusa, prevenciju imortalizacije ćelija i – indukciju apoptoze. TGF- $\beta$  stimuliše ćelijsku smrt u različitim tkivima i ovaj efekat je naročito detaljno dokumentovan u različitim tipovima epitela, jetri i ćelijama imunog sistema (248, 297). Međutim, molekularni mehanizmi i signalni putevi koji se nalaze u osnovi pro–apoptotskih efekata TGF- $\beta$  nisu još uvek u potpunosti rasvetljeni i precizno okarakterisani. Nekoliko apoptotskih regulatora uključeno je u nishodnu signalizaciju TGF- $\beta$  puta, često na način koji je specifičan za određeni tip tkiva ili ćelije. U hepatocelularnom karcinomu u TGF- $\beta$  indukovanoj apoptozi važnu ulogu ima Daxx adapterski protein, koji interaguje sa TGFBR2 receptorom i dovodi do njegove stabilizacije. Ovo kuplovano dejstvo Daxx-a sa TGF- $\beta$  signalom dovodi do aktivacije JNK i FAS-posredovanih apoptotskih puteva (298). U ovom karcinomu TGF- $\beta$  takođe indukuje ekspresiju gena za DAPK, smrti–asocirane protein kinaze, koja promoviše smrt ćelije putem zavisnim od Smad proteina, na taj način povezujući Smad i kanonski put TGF- $\beta$  sa mitohondrijalnim proapoptotskim procesima (299).

TGF- $\beta$  putem Smad signalizacije aktivira proteine unutrašnjeg mitohondrijalnog puta apoptoze (248, 300). TGF- $\beta$  indukuje apoptozu pomerajući ravnotežu između pro–apoptotskih i anti–apoptotskih proteina regulatora apoptoze iz familije Bcl-2 u pravcu prve grupe proteina. Jedan mitohondrijalni protein nazvan je po svojoj sposobnosti da posreduje u TGF- $\beta$  indukovanoj apoptozi, ARTS – sa apoptozom povezan protein u TGF- $\beta$  signalnom putu. Ovaj protein potencira pro–apoptotsko dejstvo TGF- $\beta$ , a sposoban je da indukuje apoptozu čak i u ćelijama koje su rezistentne na TGF- $\beta$  posredovanu ćelijsku smrt (301). Signalni put stresom-aktivirane protein kinaze/c-Jun N-terminalne kinaze (SAPK/JNK) igra ključnu ulogu u iniciranju apoptoze koja je pokrenuta sa TGF- $\beta$ , a odvija se prenosom signala putem Smad proteina, gde Smad aktivira aktivator protein 1 (AP1) (301, 302). TGF- $\beta$  uzrokuje Smad i SAPK zavisnu indukciju transkripcije pro–apoptotskih članova Bcl-2 familije, Bmf i Bim, koji zatim aktiviraju moćni pro–apoptotski faktor Bax, a on indukuje otpuštanje citohroma c iz mitohondrija i aktivaciju apoptozoma. Ovaj mehanizam rezultuje kaspazama posredovanom apoptozom u epitelnim ćelijama gastrointestinalne sluznice i B limfocitima. Sa druge strane, TGF- $\beta$  vrši nishodnu regulaciju anti–apoptotskih proteina Bcl-Xl i Bcl-2 u različitim tipovima ćelija (303). Svi ovi signalni događaji konačno povezuju TGF- $\beta$  sa mašinerijom ćelijske smrti, što dovodi do promena u ekspresiji, lokalizaciji i aktivaciji članova familije Bcl-2 i kaspaza.

Pro-apoptotski efekti TGF- $\beta$  posebno su snažno izraženi u ćelijama imunog sistema. TGF- $\beta$  i aktivin, jedan od proteina TGF- $\beta$  superfamilije, indukuju programiranu ćelijsku smrt u imunocitima tako što indukuju ekspresiju SHIP, Src homologe fosfataze (304). Ekspresija SHIP indukovana TGF- $\beta$  i posredovana Smad-om rezultuje intracelularnim promjenama u sadržaju fosfolipida. Nakon stimulacije sa TGF- $\beta$ , povećana ekspresija SHIP dovodi do smanjenja nivoa sekundarnog glasnika fosfatidil inozitol trifosfata (PI3P), dalje doprinoseći inhibiciji Akt puta preživljavanja, što rezultuje apoptozom B i T limfocita. Ovaj mehanizam doprinosi imunotoleranciji na kancerske ćelije pokrenuto sekrecijom TGF- $\beta$ .

TGF- $\beta$  antagonizuje signale preživljavanja inhibicijom ekspresije anti-apoptotskog proteina Survivina. Ova aktivnost ostvaruje se kroz fizičku interakciju Smad3 sa Akt, što uzrokuje apoptozu u ćelijama karcinoma kolona (305). U epitelnim ćelijama prostate TGF- $\beta$  vrši inhibiciju Survivina putem Smad-zavisne signalizacije, između ostalog angažujući represivni kompleks pRb/E2F4 koji deluje na promoter gena za Survivin sprečavajući transkripciju (306). Nedavno je opisan centralni mehanizam kojim TGF- $\beta$  indukuje apoptozu kako u normalnim, tako i u kancerskim ćelijama različitih neoplazmi (307). Naime, TGF- $\beta$  povećava ekspresiju transkripcionog faktora E2F1, što dalje vodi do stvaranja transkripciono aktivnog kompleksa E2F1-pRb-P/CAF koji se vezuje za promotore mnogobrojnih pro-apoptotskih ciljnih gena za TGF- $\beta$ . Na taj način, stimulišući transkripciju neposrednih učesnika u indukciji apoptoze E2F1 dobija mesto centralnog medijatora TGF- $\beta$  apoptotskog programa.

TGF- $\beta$  pokreće apoptozu u pre-malignim ćelijama koje pretrpe onkogeni stres, posebno stres pokrenut RAS onkogenima (241). Ovo saznanje je dokumentovano na brojnim mišjim modelima različitih kancera dobijenim genetičkim inženjeringom, kao i na kancerskim ćelijskim linijama. Utvrđeno je da TGF- $\beta$ /SMAD signalni put uzrokuje apoptozu pankreasnih progenitornih ćelija koje su nosioci KRAS mutacije (308). Epiteli mukoza i kože miša pokazuju hiperproliferaciju pokrenutu TGF- $\beta$ -zavisnom apoptozom u uslovima postojanja HRAS mutacije, blagu hiperplaziju kada postoji samo delecija receptora TGFBR2, a kada se kombinuju obe genetske alteracije, dolazi do stvaranja pravih tumorskih formacija (309). Može se zaključiti da onkogene mutacije senzibilizuju premaligne ćelije na apoptozu indukovanu sa TGF $\beta$ .

U nedavno objavljenoj studiji u kojoj je ispitivana uloga TGF- $\beta$  signalizacije *in vivo*, na mišjem eksperimentalnom modelu, analiziran je uticaj TGF- $\beta$  na apoptozu i tumorsku proliferaciju, procenom apoptotske ćelijske smrti imunohistohemijskim bojenjem na aktivnu

Kaspazu 3 i TUNEL esejem, i analizom Ki67 proliferativnog indeksa (269). Rezultati su pokazali da postoji statistički značajna razlika između analiziranih vrednosti u tumorskom tkivu invazivnog urotelnog karcinoma mokraćne bešike, koji je indukovano N-butil-N-4-hidroksibutil nitrozaminom kod kontrolnih životinja i životinja sa kondicionalnom ablacijom TGF- $\beta$  signalizacije izmenjenom ekspresijom receptora 2 za TGF- $\beta$ . U tumorima životinja iz grupe *Tgfr2 knockout* zabeležen je značajno viši udeo procenta ćelija u apoptozi u odnosu na tumore miševa iz kontrolne grupe, sa većim vrednostima TUNEL eseja i apoptotskog indeksa određenom pomoću kaspaze 3. Pored toga, Ki67 proliferativni indeks je bio značajno veći u tumorima životinja sa očuvanom TGF- $\beta$  signalizacijom. Ovi rezultati su ukazali na to da u eksperimentalnom modelu *in vivo* TGF- $\beta$  promovise progresiju karcinoma mokraćne bešike tako što inhibira apoptozu i stimuliše ćelijsku proliferaciju (269).

#### **2.4.1. Uloga TGF- $\beta$ u indukciji apoptoze putem receptora smrti**

TGF- $\beta$ 1 je ključni aktivator apoptoze u mnogim normalnim i tumorskim ćelijama (310). Istraživanja na animalnim modelima sa transgenim miševima i ćelijskim linijama hepatocelularnog karcinoma pokazala su da TGF- $\beta$ 1 indukuje apoptozu kako u normalnim hepatocitima, tako i u maligno transformisanim ćelijama posredstvom sistema TRAIL/receptori smrti (311, 312). Kod transgenih miševa sa prekomernom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 u jetri se razvija kontinuirana, prekomerna apoptoza hepatocita i dolazi do razvoja hepatične fibroze. Analize biohemijskih mehanizama koji dovode do apoptoze pokrenute TGF- $\beta$ 1 u ćelijskim linijama hepatocelularnog karcinoma pokazale su da je apoptoza pokrenuta aktivacijom receptora smrti, a dovodi do aktivacije kaspaza i cepanja supstrata specifičnog za kaspazu 3, poli-ADP-riboza polimeraze (PARP). Potvrđeno je da je apoptoza pokrenuta TGF- $\beta$ 1 aktivan proces koji podrazumeva transkripcionu aktivaciju da bi došlo do indukcije ćelijske smrti. U kulturi ćelija primena TRAIL-a izaziva apoptotsku smrt ćelija već nakon 18 časova, dok aplikacija TGF- $\beta$  indukuje apoptozu koja postaje manifestna tek nakon 36 sati. To je ukazalo na činjenicu da TGF- $\beta$ -indukovana apoptoza zahteva *de novo* sintezu molekula koji učestvuju u apoptozi da bi njihova količina bila dovoljna da dovede do egzekucije apoptotskog programa (311). Primena cikloheksimida, supstance koja blokira sintezu proteina, inhibira TGF- $\beta$ 1-posredovanu indukciju apoptoze (313). *In vitro* studije nedvosmisleno su ukazale da je TRAIL ključni medijator TGF- $\beta$ -indukovane apoptoze. Blokada signalizacije TRAIL/receptori smrti dramatično smanjuje efekat TGF- $\beta$  na apoptozu (311, 312).

TGF- $\beta$  može da utiče na nivo TRAIL na različitim nivoima, bilo indukcijom molekula koji regulišu TRAIL ili direktni uticajem na ekspresiju TRAIL na nivou transkripcije i translacije. Osnovni mehanizam kojim TGF- $\beta$  regrutuje TRAIL i aktivira spoljašnji put apoptoze jeste transkripciona aktivacija gena za TRAIL, jer je promotor TRAIL-a direktna i primarna meta TGF- $\beta$  signalizacije (311, 312). Još uvek nije razjašnjeno da li TGF- $\beta$  ostvaruje isti efekat i ushodno reguliše ekspresiju gena za receptore smrti.

TGF- $\beta$  i FASL signalizacija doprinose zajedno obezbeđivanju imune privilegovanosti u tumorskoj mikrookolini u toku tumorske progresije (327). TGF- $\beta$  je moćan inhibitor tumorskog rasta i u ranim fazama kancerogeneze ima tumor supresorsku ulogu. Međutim, u toku tumorske progresije, povećana sekrecija TGF- $\beta$  u tumorskim ćelijama, kao i parakrina sekrecija iz okolnih stromalnih ćelija, stimuliše tumorsku invazivnost i metastaziranje praćeno imunosupresijom, u čemu posreduje sistem FASL/FAS. TGF- $\beta$ 1 može da aktivira FAS receptor i na način nezavisan od FASL i indukuje apoptozu u ćelijskoj liniji humanog karcinoma želuca SNU-620 (314). Ovo svoje dejstvo TGF- $\beta$ 1 ostvaruje putem Smad3, koji pokreće klasterizaciju FAS receptora, što dovodi do vezivanja i aktivacije FADD i posledične aktivacije kaspaze 8. Kaspaza 8 cepa i aktivira Bid koji se vezuje za pro-apoptotske proteine Bax i Bak i tako dovodi do oslobađanja citohroma c i stvaranja apoptozoma.

FAS receptorski sistem i TGF- $\beta$ 1 igraju važne uloge u homeostazi imunog sistema. TGF- $\beta$ 1 je snažan imunosupresor i, iako mehanizmi ostvarivanja TGF- $\beta$ 1 posredovane imunosupresije nisu kompletno razlučeni, apoptoza koju indukuje TGF- $\beta$ 1 svakako u ovome ima značajnu ulogu (297). TGF- $\beta$ 1 suprimira citotoksične T ćelije putem kontakt-zavisnog mehanizma između CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> supresorskih ćelija i citotoksičnih T ćelija (315). Pred toga, TGF- $\beta$ 1 inhibira ili smanjuje osetljivost na apoptozu u aktivisanim T ćelijama koja je pokrenuta sistemom receptora smrti. U centralnom nervnom sistemu TGF- $\beta$  ima važnu ulogu u zaštiti mikroglije od apoptoze indukovane FASL. U ćelijama mikroglije eksprimira se TGF- $\beta$  koji povećava ekspresiju FLIP i inhibira aktivaciju kaspaze 8 i kaspaze 3. Inhibicija FAS ligandom pokrenute apoptoze stimuliše preživljavanje mikroglije i pospešuje raščišćavanje aktivisanih T limfocita fagocitozom (316). TGF- $\beta$  može da inhibira FAS-om posredovanu apoptozu i u beta ćelijama pankreasnih ostrvaca u uslovima hiperglikemije (317). U svim ovim okolnostima, TGF- $\beta$  sprečava apoptozu pokrenutu putem receptora smrti FAS i povećava ekspresiju FLIP, dovodeći do posledične aktivacije signala preživljavanja putem NF- $\kappa$ B. Iako je ovakav mehanizam dejstva TGF- $\beta$  na apoptozu opisan u normalnim ćelijama, izvesno je da može biti aktiviran i u tumorskim ćelijama.

FAS ligand može da aktivira dva nezavisna signalna puta apoptoze: prvi koji uključuje formiranje kompleksa DISC i aktivaciju kaspaze 8, i drugi put koji uključuje Daxx, adaptorni molekul koji je povezan sa FAS receptorom. Daxx interaguje sa brojnim molekulima koji su uključeni u egzekuciju apoptotskog signala, uključujući FLIP i kinazu 1 koja reguliše apoptotski signal ASK1. Daxx interaguje i sa tipom 2 TGF- $\beta$  receptora i aktivira JNK put i apoptozu. Dakle, TGF- $\beta$  može da ispoljava oponirajuće uticaje na apoptozu, s jedne strane je aktivirajući, a s druge dovodeći do njene inhibicije, često povećanjem ekspresije FLIP. Prekomerna ekspresija FLIP često se registruje u tumorskim ćelijama i ona može da uzrokuje rezistenciju tumorske ćelije i na FAS i na TGF- $\beta$  posredovanu apoptozu tako što inhibira DISC/kapaza 8 ili Daxx/JNK pro-apoptotsku signalizaciju i stimuliše aktivaciju NF- $\kappa$ B signala preživljavanja (298).



## 2.5. Epigenetska regulacija u kanceru

Epigenetika je studija o promenama ekspresije gena bez alteracija u sekvenci DNK. Epigenetska regulacija igra ključnu ulogu u mnogim biološkim procesima i epigenetski mehanizmi su neophodni za održavanje tkivno–specifičnih obrazaca ekspresije gena. Epigenetske promene su reverzibilne, dok se epigenetski obrasci ekspresije gena nasleđuju i definišu mnoge hereditarne fenotipske karakteristike. Poremećaj epigenetskih procesa može dovesti do alteracije funkcije gena i maligne transformacije ćelije (318).

Ekspanziji saznanja o epigenetskim promenama doprineo je napredak biotehnologije koji je omogućio analizu celokupnog genoma i simultane ekspresije velikog broja gena. Zahvaljući modernim genomskim metodologijama, danas je poznato da patogeneza kancera podrazumeva često ekstenzivne promene u epigenetskoj mašineriji ćelije. Zajedno sa rasprostranjenim genetskim alteracijama, epigenetske mutacije igraju važnu ulogu u inicijaciji i progresiji kancera. Kancerski epigenom karakterišu globalne promene u metilaciji DNK i modifikaciji histona, kao i promene u ekspresionom profilu hromatin–modifikujućih enzima. Epigenetske modifikacije u kanceru dovode do utišavanja tumor–supresorskih gena u vidu nezavisnih, samostalnih događaja, ili u kooperaciji sa inaktivirajućim mutacijama ili delecijama. Moguća je i epigenetska promocija tumorigeneze aktivacijom onkogeno (318, 319).

Epigenetski fenomeni imaju moćan uticaj na biologiju ćelije, a po svojoj prirodi su potencijalno reverzibilni, što ih čini idealnim terapijskim metama za personalizovanu anti–neoplastičnu terapiju. Osnovni cilj epigenetske terapije je reverzija uzročnih epigenetskih aberacija i ponovno uspostavljanje poremećene funkcije i normalnog epigenoma. U skladu sa tim, u poslednjoj deceniji otkriveno je više terapijskih agenasa koji mogu efikasno da preobrate DNK metilaciju ili modifikaciju histona koja se desila u kanceru. S obzirom na to da ovi lekovi deluju isključivo na ćelije koje su u deobi, pre svega su pogođene brzodeleće ćelije, dok je toksični efekat na normalne ćelije koje se sporije dele slab (318, 319).

Otkriće da je način na koji je genom upakovan skoro podjednako važan kao i sam sadržaj genoma doveo je do svojevrstne revolucije u sagledavanju biologije tumora.

### 2.5.1. Epigenetske promene u urotelnom karcinomu mokraćne bešike

Epigenetske promene u karcinomu mokraćne bešike su česte, kao i somatske mutacije u genima koji su nosioci epigenetskih mehanizama, tj. u genima koji kodiraju sintezu DNK

metiltransferaza, hromatin–remodelujućih i hromatin–modifikujućih proteina. Mutacije u genima koji učestvuju u regulaciji hromatina mogu se naći u 76% invazivnih urotelnih karcinoma mokraćne bešike (149).

Osnovni epigenetski procesi koji učestvuju u nastanku i razvoju urotelnog karcinoma mokraćne bešike obuhvataju tri grupe epigenetskih modifikacija: aberantnu metilaciju DNK, alteracije u remodelovanju hromatina, uključujući modifikaciju histona, i regulaciju koja se ostvaruje nekodirajućim RNK. Ovi epigenetski fenomeni pojedinačno ili u različitim kombinacijama doprinose kancerskom fenotipu tako što deluju na stabilnost genoma i pojačavaju ili utišavaju ekspresiju gena, i to dominantno gena sa ključnim ulogama u inicijaciji i progresiji tumora (318).

### 2.5.1.1. Aberantna DNK metilacija

Metilacija DNK je najbolje proučeni mehanizam epigenetske alteracije u karcinomu mokraćne bešike i podrazumeva vezivanje metil grupe kovalentnom vezom na poziciji 5' citozinskog prstena. Metilacija se obično dešava u poziciji CpG ostrva, dinukleotida u kojima za citozinom sledi guanin, najčešće ushodno od promotorskih regiona različitih gena. Hipermetilacija DNK prisutna je u većini karcinoma mokraćne bešike. Najčešće su zahvaćene promotorske sekvence gena sa velikim funkcionalnim značajem; gena koji deluju kao tumor–supresori, gena koji učestvuju u reparaciji DNK, kontroli ćelijskog ciklusa i brojnih signalnih puteva od značaja za invaziju i progresiju tumora kao što su *HOXA9*, *A2BP1*, *PAX5A*, *IGSF4*, *SOX11*, *VIM*, *STK11*, *MSH6*, *BRCA1*, *TBX2*, *TBX3*, *TERT*, *GATA2*, *DAPK1*, *CDH4*, *CCND2*, *GSTP1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *WIF1*, *NPTX2*, *ZIC4* (342, 343, 344). Metilaciju DNK katalizuje tri tipa metiltransferaza, DNMT1, DNMT3A i DNMT3B, čija je osnovna uloga održavanje ravnotežnog stanja obrazaca metilacije i, ukoliko je to potrebno, *de novo* metilacija. Mutacije u genima za epigenetske regulatore, gde spadaju metiltransferaze, veoma su česte u karcinomu mokraćne bešike (149).

Većina epigenetskih promena dešava se rano u toku tumorigeneze i biva konzervirano u toku tumorske progresije jer se epigenetske alteracije prenose tokom mitotske deobe tumorske ćelije. Mnoga područja hipermetilacije prisutna su i u neinvazivnim i invazivnim tumorima i kod *carcinoma in situ*, čak 89% lokusa, što govori u prilog tome da je hipermetilacija CpG ostrvaca rani događaj u urotelnoj karcinogenezi (320). Međutim, tumori niskog gradusa imaju manja područja sa izmenjenom metilacijom u odnosu na tumore visokog gradusa i invazivne karcinome, što ukazuje na to da stepen i obim hipermetilacije korelira sa gradusom i

stadijumom (345). Hipermetilacija promotora gena *HOXB2* značajno je i nezavisno udružena sa invazivnim tumorima agresivnog fenotipa, dok metilacija gena *HOXB2*, *KRT13* i *FRZB* zajedno ukazuje na neinvazivne tumore visokog gradusa (321).

U karcinomu mokraćne bešike sreće se i hipometilacija, iako njen značaj još uvek nije u potpunosti razjašnjen. DNA hipometilacija zahvata regione bogate CpG satelitskim ponovcima koji su u normalnim uslovima hipermetilisani i rasuti po genomu. Hipometilacija rasutih elemenata sačinjenih od satelitskih ponovaka u karcinomu mokraćne bešike dovodi do genomske nestabilnosti i poremećaja u transkripciji koji mogu rezultovati aberantnom transkripcijom egzona okolnih gena, kao što je *MET*, tirozin kinaza receptor (322). U toku su brojne validacione studije kako bi se među brojnim epigenetskim markerima prepoznali oni najvredniji za dijagnostiku, kliničko praćenje, stratifikaciju i prognozu, predviđanje terapijskog odgovora i progresije, a ispituje se upotreba testova koja bi ispitivala sediment urina, koji ima sličan DNK metilacioni status kao samo tumorsko tkivo (318). DNMT su i značajne terapijske mete. Inhibitori DNMT poput 5-Aza-2-deoksicitidina su efikasni u inhibiciji proliferacije i indukciji apoptoze u ćelijskim linijama karcinoma mokraćne bešike i ispituju se kao komplementarno sredstvo sa klasičnim hemoterapeuticima (323, 324).

#### **2.5.1.2. Remodelovanje hromatina i modifikacije histona**

U hromatinskom vlaknu DNK lanac je čvrsto namotan oko histonskih oktamera, sačinjenih od po dva pozitivno naelektrisana molekula histona H2A, H2B, H3 i H4, formirajući organizovane nukleozome. Histoni mogu da podlegnu enzimskoj modifikaciji uz pomoć histonskih metiltransferaza, histonskih acetiltransferaza ili histonskih deacetilaza (HDAC) (325). Modifikacije histona dovode do fizičke promene strukture hromatina i utiču na ekspresiju gena, ali i DNK replikaciju i reparaciju DNK, tako što modifikuju raspoloživost, odnosno pristupačnost hromatinskom vlaknu.

Većina invazivnih karcinoma mokraćne bešike (89%) sadrži najmanje jednu alteraciju po tipu histonske modifikacije (326). Najčešće promene obuhvataju izmenu H3 histona usled trimetilacije lizinskog ostatka na poziciji 27, što rezultuje utišavanjem gena, nezavisno od metilacije promoterskih sekvenci (327). Ove modifikacije uzrokovane su mutacijama u genu za EZH2, histonsku metil-transferazu koja je ključna, enzimska komponenta Polycomb represivnog kompleksa (Slika 13). Mutacije u hromatin remodelujućim genima su izrazito česte u karcinomu mokraćne bešike, češće nego u bilo kom drugom solidnom kanceru (149, 326). Najčešće mutirani geni su *ARID1A*, *KDM6A*, *CHD6*, *MLL*, dok su ciljni geni koji bivaju

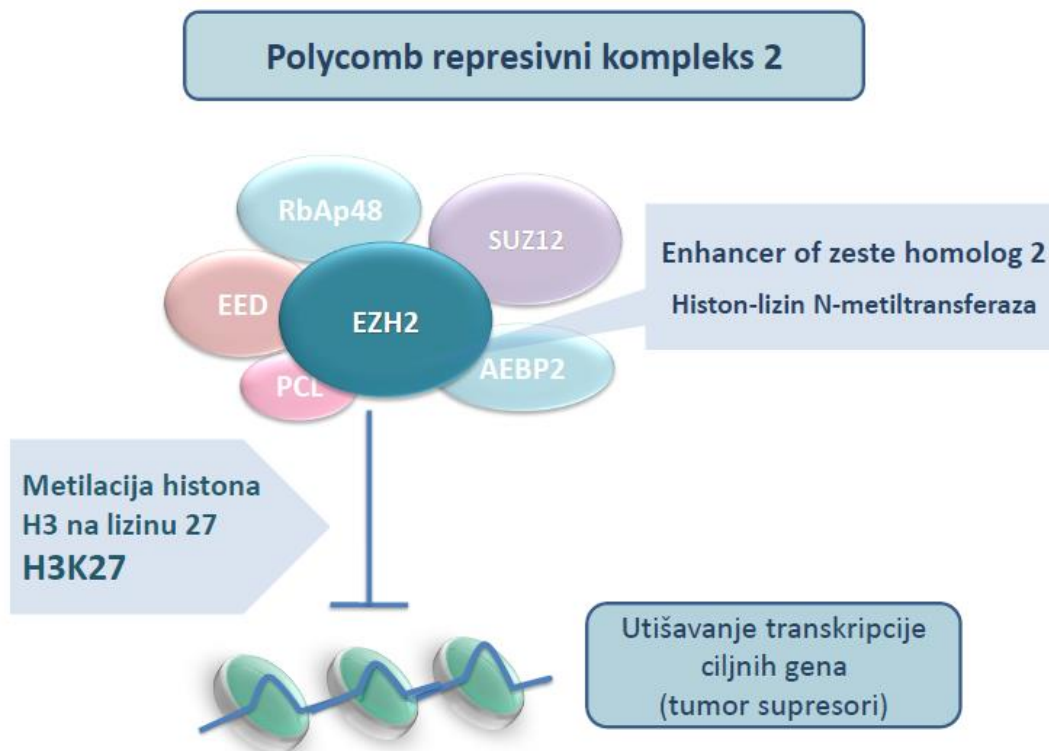
utišani hromatinskim remodelovanjem obično tumor supresori, poput gena za E-kaderin. *KDM6A* kodira sintezu lizin-specifične demetilaze 6A, koja uklanja trimetilacioni otisak sa H3K27 i mutiran je u više od četvrtine karcinoma mokraćne bešike. *ARID1A* kodira komponentu SWI/SNF hromatin-remodulujućeg kompleksa i izmenjena je u 22% urotelnih tumora, dok *MLL* kodira H3K4 metilazu i ona je izmenjena mutacijom u 17% slučajeva (328).

Inhibicija enzima HDAC može da povрати ekspresiju utišanih gena i uspostavi transkripciju tumor supresora. Primena HDAC inhibitora može da blokira ćelijski rast i proliferaciju i da deluje sinergistički uz hemoterapiju baziranu na cispladini, kako u ćelijski linijama, tako i na animalnim modelima. Jedan od HDAC inhibitora, Mocetinostat, u fazi je kliničkih ispitivanja kod pacijenata sa uznapredovalim urotelnim karcinomom mokraćne bešike (324).

#### **2.5.1.2.1. EZH2 – epigenetski utišivač genske ekspresije**

EZH2, Enhancer of zeste homolog 2, je metil-transferaza aktivna u sklopu Polycomb represivnog kompleksa 2 (PRC2), koja funkcioniše kao epigenetski utišivač ekspresije gena. Svoju katalitičku aktivnost EZH2 ostvaruje putem SET domena, a da bi bio aktivan neophodna mu je kooperacija sa ostalim podjedinicama PRC2 proteinskog kompleksa, EED i Suz12, koje regulišu alosteričku konfiguraciju i moduliraju efikasnost PCR2. EZH2 saraduje i sa drugim epigenetskim modifikatorima, poput DNK metiltransferaza, te na taj način promoviše trajnije utišavanje ekspresije gena putem metilacije CpG ostrva, kao i sa histonskim deacetilazama, što omogućava specifičnu modifikaciju histona. Zajednička aktivnost ovih epigenetskih regulatora u utišavanju ekspresije gena uključena je u procese ćelijske diferencijacije i zastoj ćelijskog ciklusa, kao i održavanje svojstava matičnosti u stem ćelijama tkiva i organa (327, 329).

Opisane su dve izoforme EZH2, EZH2 $\alpha$  i rezultat alternativnog splajsinga EZH2 $\beta$ , i obe učestvuju u epigenetskom utišavanju, ali se razlikuju po specifičnim ciljnim genima. Dok EZH2 $\alpha$  prevashodno pogađa aktivnost gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa i ćelijskog rasta, EZH2 $\beta$  reguliše gene koji su uključeni u procese kao što su diferencijacija, angiogeneza ili održavanje svojstava matičnosti. Razlike u aktivnosti su posledica razlike u građi, jer izoformi EZH2 $\beta$  nedostaje domen koji podleže posttranskripcionim modifikacijama, kao što je fosforilacija različitim protein kinazama. Postojanje izoformi govori u prilog velikoj plastičnosti remodelovanja hromatina i kompleksnosti mehanizama koji obezbeđuju preciznu regulaciju utišavanja gena (330).



**Slika 13. Struktura i funkcija Polycomb represivnog kompleksa 2.** Ovaj enzimski kompleks je odgovoran za utišavanje transkripcije hromatina putem modifikacije histona. Subjedinice kompleksa aktivne su samo kada su objedinjene. Aktivna enzimska jedinica proteinskog kompleksa je metiltransferaza EZH2, koja vrši trimetilaciju histona H3 na poziciji lizina 27. EZH2 može da veže duge nekodirajuće RNK, kao što je *HOTAIR*, jedna od prvih opisanih nekodirajućih DNK, koja zajedno sa Polycomb kompleksom učestvuje u modulaciji histona, angažujući metilacioni kompleks na specifičnim ciljnim genima.

Uloga EZH2 kao onkogenog faktora opisana je u različitim tumorima, uključujući i urotelni karcinom mokraćne bešike (329, 331). EZH2 ostvaruje svoju ulogu utišivača ekspresije gena klasičnim putem, preko PRC2 kompleksa, ali i metilacijom ne-histonskih proteina, funkcijom nezavisnom od PRC2. Nakon što EZH2 metiliše histon H3, ove metilacione znake prepoznaje PRC1 koji vrši monoubikvitinaciju lizina K119 na histonu H2A, što dovodi do kompaktnog pakovanja hromatina i posledične represije transkripcije gena. Na taj način EZH2 utišava ekspresiju tumor supresorskih gena i doprinosi progresiji neoplastične bolesti.

Koliko je kompleksna uloga EZH2 u kanceru svedoči i nedavno opisana funkcija u aktivaciji faktora koji stimuišu tumorski rast i progresiju. Kada EZH2 bude fosforilisan putem AKT na

pozicija Serin 21, on gubi afinitet za histon H3 i dobija sposobnost da metiliše druge proteine kao što je androgeni receptor i njemu pridruženi proteini ili transkripcione faktore poput STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), te na taj način EZH2 postaje aktivator ekspresije gena i dobija onkogenu aktivnost (332).

### 2.5.1.3. Nekodirajuće RNK

Nekodirajuće RNK obuhvataju duge nekodirajuće RNK (long non-coding RNA – lncRNA), koje modulišu ekspresiju gena regulacijom hromatina, i mikro RNK (micro RNA – miR), koje regulišu transkripciju na post-translacionom nivou. LncRNA čine oko 2% genoma i mogu imati i onkogene i tumor-supresorske funkcije, a uključene su u poremećaje ćelijske proliferacije, migracije, invazivnosti i apoptozu. Nađeno je da je u urotelnom karcinomu bešike prisutna diferencijalna ekspresija lncRNA u odnosu na okolni normalan urotel, a intenzivno se istražuju lncRNA od značaja za tumorsku inicijaciju i progresiju koje pokazuju korelaciju sa kliničko-patološkim parametrima. Meta-analiza dobijenih rezultata je pokazala da je pet lncRNA konstantno prekomerno ekspimirano u urotelnom karcinomu i asociirane su sa tumorskim gradusom i stadijumom, ali i sa prognostičkim parametrima i preživljavanjem pacijenata (333). *HOTAIR* je lncRNA kodirana HOX genom koja interaguje sa PRC2 kompleksom i drugim demetilazama u epigenetskoj regulaciji genske ekspresije. Prekomerno je ekspimirana u nekoliko karcinoma, uključujući karcinom bešike, gde je povezana sa progresijom bolesti, metastaziranjem i kraćim preživljavanjem pacijenata. Inhibicija *HOTAIR* pak rezultuje smanjenjem migratornih sposobnosti i invazivnosti kancerskih ćelija, redukcijom EMT–pridruženih faktora (334). Inhibicija aktivnosti lncRNA *TUG1* i *H19* u karcinomu mokraćne bešike dovodi do inhibicije EMT, redukcije ćelijskog rasta i proliferacije, a stimulacije apoptoze, što svedoči o njihovim onkogenim svojstvima u urotelnoj karcinogenezi (335).

Mikro RNK su kratki, jednolančani molekuli RNK koji regulišu ekspresiju gena na post-transkripcionom nivou, a svaka miR može imati stotine različitih ciljnih informacionih RNK. MiR mogu da funkcionišu kao onkogeni, tumor supresori ili da interaguju sa drugim epigenetskim regulatorima (318). Analiza profila ekspresije miR u urotelnom karcinomu je pokazala da postoji diferencijalna ekspresija različitih miR, gde su neki molekuli (miR-1, miR-101, miR-143, miR-145, miR-29c, miR-127) nishodno regulisani, a neki pak prekomerno ekspimirani u kancerskom tkivu (miR-224, miR-182, and miR-183) (336). MiR-200 familija mikro RNK se u karcinomu mokraćne bešike ponaša kao važan onkogeni faktor, koji podržava signalne puteve koji doprinose invazivnosti i metastaziranju, uključujući



EMT i EGFR signalizaciju (337). Nasuprot tome, miR-145 se ponaša kao tumor supresor i stimuliše apoptozu, ali je u urotelnom karcinomu njena ekspresija značajno redukovana (338). MiR-101 je odgovorna za direktnu represiju ekspresije EZH2 i primer je interaktivnog dejstva različitih epigenetskih regulatora (336).

### 3. Hipoteza i cilj istraživanja

---

Nova saznanja o molekularnim karakteristikama i biološkoj heterogenosti urotelnog karcinoma mokraćne bešike otvorila su sveže mogućnosti za prognozu, praćenje bolesti i primenu personalizovane, molekularne terapije. Analiza ekspresije biomarkera je savremeni princip u istraživanju tumora čiji rezultati bi mogli biti od značaja u identifikaciji pacijenata sa visokim rizikom od progresije i definisanju specifičnih molekularnih meta u inovativnom i efikasnom terapijskom pristupu koji se označava kao target terapija.

Iako rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju na to da signalni putevi TGF- $\beta$ 1 i receptora smrti imaju važne uloge u patogenezi i evoluciji urotelnog karcinoma mokraćne bešike, njihove precizne uloge i značaj još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni. Činjenica da je ekspresija receptora smrti i TGF- $\beta$ 1 široko rasprostranjena, kao i da aktivacija i receptora smrti i TGF- $\beta$  receptora uključuje zajedničke, identične signalne puteve u aktivaciji kaspaza i indukciji apoptoze, ukazuje na to da bi ovi receptorski signalni mehanizmi mogli biti međusobno povezani.

Na osnovu dosadašnjih saznanja i raspoloživih literaturnih podataka o urotelnom karcinomu mokraćne bešike, definišu se sledeće **radne hipoteze istraživanja**:

- Postoji značajna povezanost između visoke imunohistohemijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i kliničko-patoloških parametara urotelnog karcinoma udruženih sa agresivnim ponašanjem tumora i kraćim preživljavanjem pacijenata (visok histološki gradus, uznapređovali patološki stadijum, prisustvo karcinoma in situ).
- Visoka ekspresija receptora smrti (DR4, DR5 i FAS) značajno je udružena sa dobrom diferencijacijom tumora i superficijalnim karcinomom, dok gubitak ekspresije receptora smrti značajno korelira sa visokim gradusom i stadijumom tumora.
- Postoji značajna inverzna korelacija između imunohistohemijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i receptora smrti.
- Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1, kao i redukcija ekspresije receptora smrti, značajno je povezana sa kraćim ukupnim preživljavanjem pacijenata.

**Cilj** ovog istraživanja je analiza ekspresije TGF- $\beta$ 1, plejotropnog citokina koji reguliše apoptozu, i receptora smrti DR4, DR5 i FAS, čija aktivacija inicira spoljašnji signalni put

apoptoze, ispitivanje njihove međusobne povezanosti i prognostičkog značaja u urotelnom karcinomu mokraćne bešike.

Konkretni ciljevi predstavljenog naučnog istraživanja su:

1. Ispitivanje imunohistohemijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i analiza njene povezanost sa kliničko-patološkim parametrima: demografsko–epidemiološkim i kliničkim karakteristikama pacijenata i histopatološkim svojstvima tumora, uključujući histološki gradus i patološki stadijum urotelnog karcinoma, prisustvo karcinoma in situ u okolini tumora, prisustvo divergentne diferencijacije i varijantne morfologije tumora.
2. Analiza ekspresije proteina Smad4 u urotelnom karcinomu, koji ima centralnu ulogu u klasičnoj TGF- $\beta$  signalnoj kaskadi, kao i ispitivanje povezanost ekspresije Smad4 sa kliničko-patološkim parametrima.
3. Ispitivanje imunohistohemijske ekspresije receptora smrti - DR4, DR5 i FAS u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i njihova povezanost sa kliničko-patološkim parametrima: demografsko–epidemiološkim i kliničkim karakteristikama pacijenata i histopatološkim svojstvima tumora.
4. Analiza ekspresije EZH2, proteina sa ključnom ulogom u epigenetskoj regulaciji ekspresije brojnih molekula, a putem koga TGF- $\beta$  potencijalno ostvaruje svoje dejstvo u regulaciji apoptoze, kao i ispitivanje povezanost ekspresije EZH2 sa kliničko-patološkim parametrima.
5. Ispitivanje međusobnog odnosa i potencijalne udruženosti ekspresije TGF- $\beta$ 1 i ćelijskih receptora smrti u urotelom karcinomu mokraćne bešike.
6. Analiza povezanosti efektorskih komponenti TGF- $\beta$  signalizacije, Smad4 i EZH2, sa ekspresijom receptora smrti u urotelom karcinomu mokraćne bešike.
7. Utvrđivanje povezanosti ekspresije TGF- $\beta$ 1 i sa njim udruženih molekula Smad4 i EZH2 sa pojavom recidiva urotelnog karcinoma u mokraćnoj bešici i vremenom do pojave recidiva, tj. dužinom preživljavanja bez rekurentne bolesti.
8. Utvrđivanje povezanost ekspresije ćelijskih receptora smrti, DR4, DR5 i FAS, sa pojavom recidiva bolesti i vremenom do pojave recidiva, tj. dužinom preživljavanja bez rekurentne bolesti.
9. Utvrđivanje povezanosti imunohistohemijske ekspresije TGF- $\beta$  u tumorskim ćelijama, kao i sa njim udruženih molekula Smad4 i EZH2, sa ukupnim preživljavanjem pacijenata nakon postavljanja dijagnoze bolesti.

10. Utvrđivanje povezanosti imunohistohemijske ekspresije ćelijskih receptora smrti sa ukupnim preživljavanjem pacijenata.

## 4. Materijal i metode

---

### 4.1. Pacijenti i histopatološka analiza

U ovom istraživanju korišćeni su tkivni uzorci urotelnog karcinoma mokraćne bešike, fiksirani u formalinu i ukalupljeni u parafinu. Uzorci tumora dobijeni su od 647 pacijenata koji su u periodu od januara 2007. godine do decembra 2012. godine bili podvrgnuti endoskopskoj hirurškoj proceduri po tipu transuretralne resekcije tumora mokraćne bešike na Klinici za urologiju Kliničkog centra u Nišu. U svim slučajevima dijagnoza urotelnog karcinoma mokraćne bešike je postavljena u Centru za patologiju Kliničkog centra u Nišu. Studija je izvedena uz saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu (Odluka broj 12-1250/8).

#### 4.1.1. Demografsko–epidemiološke i kliničke karakteristike pacijenata

U studiju su uključeni samo uzorci pacijenata za koje su bili dostupni klinički podaci o ishodu lečenja, koji su prikupljeni uvidom u istorije bolesti sa odlukama urološkog konzilijuma Klinike za Onkologiju Kliničkog centra u Nišu. Srednja starost pacijenata bila je  $66.4 \pm 9.9$  godina (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija), sa brojčanom dominacijom pacijenata muškog pola, koji su činili 77,1% bolesnika, dok su žene činile 22,9%.

Prikupljeni su podaci o ukupnom preživljavanju pacijenata, uzroku smrti ukoliko je došlo do fatalnog ishoda u toku perioda praćenja, pojavi recidiva, vremenu do pojave recidiva. Kancer–specifičnim mortalitetom definisana je smrtnost prouzrokovana karcinomom mokraćne bešike, nastala usled uznapredovale i/ili metastatski proširene bolesti, i nije uključivala smrtnost od drugih neoplastičnih ili ne-neoplastičnih bolesti. Vreme kliničkog praćenja pacijenata definisano je kao vreme izraženo u mesecima od dijagnostičke transuretralne resekcije do poslednje kontrole ili smrti. Srednje vreme praćenja pacijenata bilo je 61 mesec, medijana 92 meseca, sa intervalom 25–130 meseci.

Na osnovu podataka o lečenju nakon postavljanja histopatološke dijagnoze bolesti, pacijenti su podeljeni u četiri grupe u odnosu na primenjeni terapijski modalitet. Prvu grupu činili su pacijenti čije je lečenje završeno već samom transuretralnom resekcijom, dominantno pacijenti sa superficijalnim papilarnim urotelnim tumorima, ali i deo pacijenata sa superficijalno infiltrativnim karcinomom, klinički stratifikovanim kao karcinomi niskog rizika. U drugoj najbrojnijoj grupi bili su pacijenti koji su lečeni intravezikalnom instilacijom

BCG vakcine po preporučenom protokolu, u skladu sa važećim nacionalnim onkološkim vodičem. Treću grupu činili su pacijenti koji su podvrgnuti radikalnoj cistektomiji, a četvrtu pacijenti koji su lečeni hemioterapijskim protokolima, zračenjem ili kombinacijom tih modaliteta.

Za sve pacijente zabeleženi su i anamnestički podaci o inicijalnim kliničkim simptomima (da li je bilo prisustva makroskopske hematurije ili druge urološke simptomatologije), podaci o drugim bolestima od kojih pacijent boluje i bolestim od značaja u *anamnezi familiae*. Uzimajući u obzir značaj pušenja u etiopatogenezi karcinoma mokraćne bešike, svi pacijenti su podeljeni u dve grupe: one sa pušačkim stažom dužim od 20–paklo godina, što znači da su konzumirali najmanje broj cigareta ekvivalentan kontinuiranom pušenju 20 cigareta na dan u toku 20 godina, bez obzira na to da li su aktuelni pušači ili su ostavili pušenje pre određenog vremena ili u momentu dijagnoze, i na one koji nikada nisu pušili ili su bili tzv. socijalni pušači. Za manju grupu pacijenata (7,4%) bio je poznato izlaganje karcinogenim faktorima (rad u industrijskoj proizvodnji i poljoprivredi sa ekspozicijom policikličnim aminima i ugljovodonicima i fenolima ili izlaganje radijaciji).

Ovo istraživanje uključuje pacijente sa teritorije Jugoistočne Srbije koja obuhvata i naselja u slivu Južne Morave označena kao endemska područja balkanske endemske nefropatije (BEN). BEN je danas prepoznata kao nozološki entitet ekvivalentan nefropatiji prouzrokovanoj hroničnom intoksikacijom aristolohijskom kiselinom, bolesti rasprostranjene širom sveta (339-342). S obzirom na to da je BEN asociirana sa povećanom učestalošću tumora gornjeg urotela, a verovatno i urotelnih tumora mokraćne bešike, posebno je definisana i analizirana grupa pacijenata sa tumorima mokraćne bešike koji potiču sa endemskog područja.

#### **4.1.2. Histopatološka analiza**

Parafinski kalupi na kojima su dijagnostikovani slučajevi od interesa u periodu od 2007. do 2012. godine izdvojeni su iz arhive Centra za patologiju Kliničkog centra u Nišu. Histološki preseći celokupnog ukalupljenog materijala tumora svakog pacijenta su bojani klasičnom hematoksilin-eozin (HE) metodom i histopatološki analizirani. Patološka klasifikacija tumora mokraćne bešike izvršena je u skladu sa Klasifikacijom Svetske Zdravstvene organizacije iz 2016. godine (17), a za određivanje patološkog stadijuma bolesti korišćeno je Osmo izdanje TNM Klasifikacije malignih tumora (55). HE preseći korišćeni su za detaljnu evauaciju patohistoloških parametara: histološkog gradusa tumora, dubine invazije zida mokraćne bešike, odnosno patološkog stadijuma, prisustvo divergentne diferencijacije i varijantne

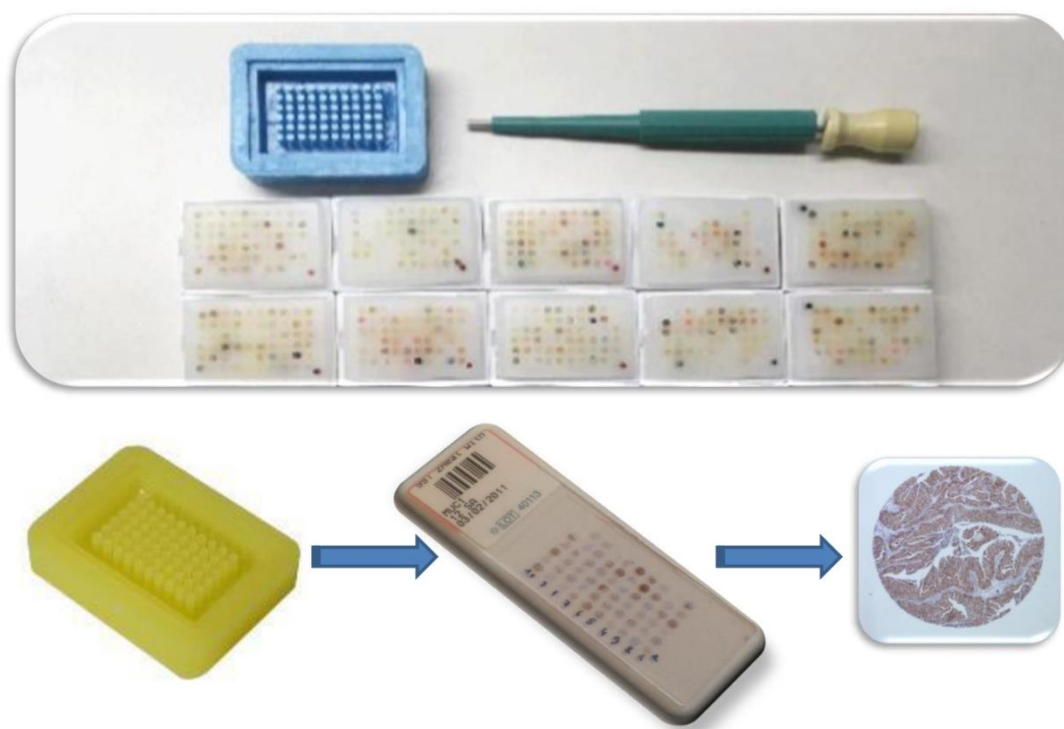


morfologije. Ni jedan od slučajeva ne-invazivnog karcinoma nije klasifikovan kao *carcinoma in situ* (CIS), odnosno flat tumor, jer je CIS uvek dijagnostikovano u okolini infiltrativnog urotelnog karcinoma, a ne kao samostalna neoplastična lezija u resekovanom histološkom materijalu. Pored toga, histološki je procenjivana i neposredna okolina tumora, gde je evidentirano prisustvo cistitisa i kvalitet i kvantitet inflamatornog infiltrata u tumorskoj stromi. Obilan zapaljenski odgovor definisan je kao prisustvo gustog limfoidnog, odnosno polimorfonuklearnog infiltrata briske distribucije oko tumorskih gnezda.

## 4.2. Imunohistohemijska analiza

### 4.2.1. Konstrukcija tkivnih mikronizova

U svrhu imunohistohemijske analize konstruisani su tkivni mikronizovi (tissue microarray – TMA) korišćenjem seta za manuelnu izradu tkivnih mikronizova (Arraymold Paraffin Tissue Microarrayer, Arraymold, Utah, USA) (Sika 14).



**Slika 14. Konstrukcija tkivnog mikroniza.** Kompleksni recipijentni blokovi sadrže po 60 cilindričnih tkivnih uzoraka dijametara po 2mm. Najveći broj uzoraka u svakom bloku tkivnog mikroniza predstavljaju uzorci tumora mokraćne bešike, a svaki pojedinačni slučaj predstavljen je sa po dva uzorka. U svaki TMA blok inkorporirani su i uzorci normalne mukoze mokraćne bešike i spoljašnje pozitivne kontrole.

Učinjena je selekcija reprezentativnog parafinskog kalupa svakog pojedinačnog slučaja. Na korespondirajućoj HE pločici zone od interesa su prepoznate i obeležene markerom. Adekvantnim instrumentom (šupljom iglom) dijametra 2mm iz svakog donorskog bloka uzeta su po dva cilindrična uzorka iz obeleženih zona i preneti u kompleksni recipijentski blok. Na isti način su u recipijentski blok uneti i u parafinu ukalupljeni uzorci normalne mukoze mokraćne bešike, kao i odgovarajuće spoljašnje pozitivne kontrole.

#### 4.2.2. Imunohistohemijsko bojenje

Preseci debljine četiri mikrometara isečeni su na mikrotomu sa svakog TMA kalupa, deparafinirani u ksilolu i rehidratirani u seriji etil alkohola opadajuće koncentracije. Procedura demaskiranja antigena za sva bojenja izvođena je zagrevanjem histoloških slajdova u rastvoru citratnog pufera (pH 6.0) u mikrotalasnoj pećnici u trajanju od 20 minuta. Blokada aktivnosti endogene peroksidaze postignuta je imerzijom histoloških pločica u 3% rastvor vodonik peroksida u metanolu. Nakon detaljnog ispiranja u 0.01M fosfatnom puferu (PBS), preseci su inkubirani sa odgovarajućim primarnim antitelom u trajanju od 60 minuta na sobnoj temperaturi. Antitela koja su korišćena za imunohistohemijska bojenja prikazana su u Tabeli 6.

**Tabela 6. Antitela korišćena za imunohistohemijsku analizu**

Meta antitela	Klon	Tip	Proizvođač	Razblaženje	Celularna lokalizacija
TGF- $\beta$ 1	TGFB17	Mišje monoklonalno	Leica Biosystems	1:40	Citoplazma/membrana
Smad4	ab236321	Zečje plikolonarno	Abcam	1:100	Jedro/citoplazma
DR4	ab8414	Zečje plikolonarno	Abcam	1:100	Membrana/citoplazma
DR5	ab8416	Zečje plikolonarno	Abcam	1:200	Membrana/citoplazma/jedro
FAS	B-10	Mišje monoklonalno	Santa Cruz	1:100	Citoplazma/membrana
EZH2	D2C9	Zečje monoklonalno	Cell Signaling	1:50	Jedro

Za detekciju reakcije antitela s odgovarajućim antigenom na histološkim presecima korišćen je standardni avidin-biotin imunoperoksidazni kompleks (EnVision + Dual Link System HRP DAB+, Agilent Technologies). Vizuelizacija reakcije postizana je korišćenjem tečnog 3,3'

diaminobenzidina (DAB). Zatim je izvršeno kontrastiranje preseka bojenjem histoloških detalja pozadine Majerovim hematoksilinom. U sve imunohistohemijske procedure bile su uključene adekvatne negativne i pozitivne kontrole. Kao spoljašnja pozitivna kontrola krišćeno je tkivo bubrega za TGF- $\beta$ 1 i Smad4, a za DR4, DR5 i FAS normalno tkivo slezine.

#### **4.2.3. Interpretacija i skoring imunohistohemijskih bojenja**

Analiza i interpretacija imunohistohemijskih bojenja izvedena je na svetlosnom mikroskopu (Olympus BX43, Olympus Corporation, Tokio, Japan) i na digitalnim fotografijama koje su dobijene na imidžing sistemu Olympus cellSens (Olympus cellSens platform standard, Olympus Corporation, Tokio, Japan). Za svaki od analiziranih imunohistohemijskih markera određivan je procenat pozitivnih ćelija (%), odnosno broj tumorskih ćelija sa pozitivnom reakcijom u adekvatnom kompartmanu ćelije u zavisnosti od primenjenog antitela (Tabela 6), u odnosu na celokupan broj tumorskih ćelija na svakom od preseka u mikronizu, a čiji je dijametar 2mm i površina prosečno 3,14mm<sup>2</sup>. Za određivanje procenta obojenih ćelija korišćen je program ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Intenzitet bojenja precipitata braon pigmenta gradiran je skalom od 0 do 3, gde je 0 odsustvo bojenja, 1 – slabo prebojavanje, 2 – bojenje umerenog intenziteta i 3 – bojenje jakog intenziteta. Finalni skor imunohistohemijske ekspresije dobijan je kao proizvod proporcije obojenog tumorskog tkiva i intenziteta bojenja.

Na osnovu dostupnih literaturnih podataka, u svrhe statističke analize za imunohistohemijsku ekspresiju svakog od ispitivanih markera određena je prazna vrednost ekspresije, na osnovu koje su tumori klasifikovani u grupu sa visokom ili niskom ekspresijom markera. Tako su u slučaju ekspresije TGF- $\beta$ 1 i Smad4 u grupu tumora sa visokom ekspresijom svrstani tumori sa ekspresijom markera u  $\geq 50\%$  tumorskih ćelija, sa intermedijernim ili jakim intenzitetom bojenja (263). Ekspresija receptora smrti DR4, DR5 i FAS smatrana je visokom u slučajevima kada je bojenje srednjeg ili jakog intenziteta verifikovano u  $\geq 25\%$  tumorskih ćelija (294, 343). Imunoekspresija EZH2 određena je kombinovanim skorom procenta i intenziteta bojenja (suma proizvoda skora intenziteta i procenta površine tumora), u skladu sa prethodno opisanom metodologijom procene ekspresije EZH2 (344). Na osnovu srednje vrednosti skora za celokupnu ispitivanu grupu, tumori su dihotomizovani u grupe sa niskom i visokom ekspresijom.

### 4.3. Statistička obrada podataka

Svi podaci analizirani su korišćenjem programskog paketa SPSS, verzija 24.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL). Asocijacija ekspresije markera i kliničko-patoloških karakteristika ispitivana je  $\chi^2$  testom. Analiza preživljavanja pacijenata vršena je Kaplan-Majerovom (Kaplan-Meier) metodom. Statistička značajnost razlika u preživljavanju između grupa pacijenata sa visokom i niskom ekspresijom ispitivanih markera utvrđivana je pomoću log rank testa. Za multivarijantnu analizu povezanosti preživljavanja pacijenata i eksplanatornih varijabli korišćen je Koks (Cox) proporcionalni hazard model. U ovu analizu uključene su kategorijske nezavisne varijable: histološki gradus, patološki stadijum (referentna kategorija - pTa, neinvazivni tumor), varijantna diferencijacija, carcinoma in situ i ekspresija ispitivanih markera. Prag značajnosti  $p \leq 0,05$  smatran je indikativnim za statistički značajnu razliku između ispitivanih varijabli.

Ukupno vreme preživljavanja pacijenata (OS – overall survival) definisano je kao vremenski interval od dijagnostičke transuretralne resekcije do poslednje kontrole ili smrti i izraženo je u mesecima. Vreme preživljavanja bez pojave recidiva (RFS – recurrence free survival) definisano je kao vreme proteklo od prvog TUR-a i postavljanja dijagnoze do pojave relapsa/recidiva bolesti, utvrđenog radiološkim ili endoskopskim kliničkim metodama, sa ili bez histopatološke potvrde dijagnoze. Za pacijente kod kojih nije zabeležena pojava rekurentnog tumora vreme preživljavanja bez recidiva bilo je jednako ukupnom vremenu preživljavanja.

## 5. Rezultati

### 5.1. Kliničko – patološke karakteristike pacijenata

Istraživanjem je obuhvaćeno 647 pacijenata sa tumorom mokraćne bešike, prosečne starosti  $66,4 \pm 9,9$  godina (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija), gde je najmlađi pacijent imao 29, a najstariji 91 godinu u vreme postavljanja dijagnoze bolesti. Pacijenti muškog pola bili su trostruko brojniji, čineći 77% obolelih. Osnovne demografsko–epidemiološke karakteristike pacijenata prikazane su u Tabeli 6. Dve trećine pacijenata bili su teški pušači, sa više od 20-paklo-godina pušačkog staža, iako bi veliki broj obolelih ostavio pušenje cigareta nakon dobijanja dijagnoze maligne bolesti. Među obolelima ženskog pola bilo je svega 23,6% pušača, dok je među pacijentima muškog pola bilo čak 73,5%.

<b>Tabela 6. Demografsko–epidemiološke karakteristike pacijenata (N=647)</b>		
	N	%
<b>Pol</b>		
Muški	499	77.1
Ženski	148	22.9
<b>Starost</b>		
<66	279	43.1
$\geq 66$	368	56.9
<b>Pušenje cigareta (<math>\geq 20</math> paklo godina)</b>		
Da	402	62.1
Ne	245	37.9
<b>Izloženost poznatim karcinogenima</b>		
Da	48	7.4
Ne	599	92.6
<b>Endemsko područje</b>		
Da	80	12.4
Ne	567	87.6
<b>Komorbidity</b>		
Kardiovaskularni/metabolički	225	34.8
Drugi maligniteti	41	6.3
Ostale bolesti	106	16.4
Bez drugih bolesti	275	42.5
<b>Porodična anamneza</b>		
Maligne bolesti	35	5.4
Tumor mokraćne bešike	17	2.6
Bubrežna insuficijencija	21	3.2
Drugo/negativna anamneza	575	88.8

Za 48 pacijenata bili su dostupni anamnestički podaci o hroničnoj ili ekscesivnoj ekspoziciji poznatim karcinogenima, najčešće u vidu okupacione izloženosti industrijskim kancerogenima ili radioaktivnom zračenju. Više od polovine pacijenata bolovalo je od drugih bolesti, najčešće od hroničnih bolesti kardiovaskularnog sistema (esencijalna arterijska hipertenzija, ishemijska bolest srca) ili respiratornog sistema (hronična opstruktivna bolest pluća), a 41 pacijent (6,1%) imao je i drugu malignu bolest. U porodičnoj anamnezi svega 2,6% pacijenata imalo je karcinom mokraćne bešike. Osamdeset pacijenata (12,6%) je sa endemskih područja. Histopatološke karakteristike tumora sumirane su u Tabeli 7. U momentu postavljanja dijagnoze 31,1% pacijenata imalo je neinvazivni karcinom bešike, ograničen samo na mukozu, a među ovim pTa tumorima dominirali su neinvazivni papilarni urotelni karcinomi niskog histološkog gradusa, kojih je bilo 165 (82,1%), dok su neinvazivni karcinomi visokog histološkog gradusa činili 17,9%.

**Tabela 7. Histopatološke karakteristike tumora (N=647)**

	N	%
<b>Histološki gradus</b>		
Nizak	260	40.2
Visok	387	59.8
<b>Patološki stadijum</b>		
pTa	201	31.1
pT1	296	45.7
≥pT2	150	23.2
<b>Carcinoma in situ</b>		
Prisutan	47	7.3
Nije prisutan	600	92.7
<b>Divergentna diferencijacija</b>		
Skvamozna	58	9.0
Glandularna	12	1.9
Ostalo	17	2.5
Nije prisutna	560	86.6
<b>Cistitis u okolini</b>		
Prisutan	106	16.4
Nije prisutan	541	83.6
<b>Obilan limfocitni infiltrat</b>		
Prisutan	45	7.0
Nije prisutan	602	93.0
<b>Obilan polimorfonuklearni infiltrat</b>		
Prisutan	13	2.0
Nije prisutan	634	98.0



Infiltrativnih urotelnih karconoma bilo je 68,9%, od čega je dvostruko više detektovanih neoplazmi klasifikovano u grupu superficijalno invazivnih pT1 tumora (46,7% ukupnog broja tumora), nego tumora sa invazijom tunike muskularis mokraćne bešike (23,2%). Među superficijalno invazivnim tumorima bilo je 32,1% tumora niskog i 67,9% tumora visokog histološkog gradusa, dok su mišićno invazivni tumori konsenzusno klasifikovani kao neoplazme visokog histološkog gradusa.

Prisustvo *carcinoma in situ* registrovano je u okolini 106 infiltrativnih karcinoma, a ni u jednom slučaju TUR-om dobijenog materijala nije registrovan kao jedina neoplastična urotelna lezija. Varijantna morfologija i divergentna diferencijacija nađena je u 13,4% tumora, a najčešće je zabeležena skvamozna diferencijacija, u 58 slučajeva. Mikromorfološka analiza neposredne okoline tumora pokazala je prisustvo cistitisa u 16,4%, kao i veoma upadljivi, brisk inflamatorni odgovor u tumorskoj stromi, koji je bio dominantno limfocitnog sastava u 7% slučajeva, a granulocitni u 2%.

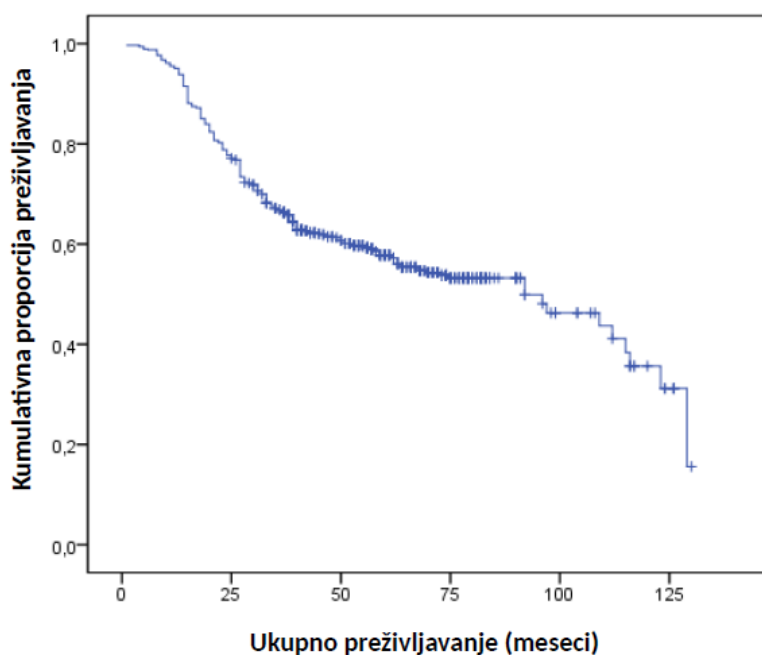
Kod većine pacijenata bolest se klinički manifestovala pojavom makrohaturije, kod skoro 84% (Tabela 8). U toku kliničkog praćenja pacijenata, 37,7% je razvilo rekurentnu bolest, sa pojavom recidivantnih tumora u mokraćnoj bešici. Većina pacijenata sa relapsnom bolešću je u toku perioda praćenja imala samo jedan recidiv bolesti, 58,2%, dok je 15,2% imalo dva recidiva, a 26,6% je imalo tri ili više recidiva tumora.

U trenutku preseka praćenja, od 647 pacijenata čiji su uzorci tumora analizirani u studiji, živo je 362 pacijenta, a medijana njihovog praćenja je 92 meseca. Fatalan ishod desio se kod 285 pacijenata (44%) u toku perioda praćenja, od toga je kancer specifičan mortalitet utvrđen kod 200 pacijenata, uglavnom kod onih sa mišićno-invazivnim tumorom pri inicijalnoj dijagnozi. Smrtni ishod je zabeležen kod 110/150 (73,3%) pacijenata sa mišićno invazivnim tumorima, 84/296 (28,4%) pacijenata sa superficijalno invazivnim tumorima i kod svega 6/201 (2,9%) pacijenata sa neinvazivnim intramukoznim tumorima na inicijalnoj dijagnozi. Kancer-specifični mortalitet bio je udružen sa brzom lokalnom progresijom bolesti, metastatskom bolešću, razvojem bubrežne insuficijencije i drugih komplikacija udruženih sa neoplastičnim rastom i primenjenom terapijom, ali i slabijom komplijansom pacijenata sa konzilijarnom odlukom o terapiji radikalnim hirurškim lečenjem. Drugi uzroci smrti su najčešće bili vezani za postojeće komorbiditete (akutni infarkt miokarda, hronična srčana insuficijencija, cerebrovaskularni insult, hronična respiratorna insuficijencija, druge neoplastične bolesti – karcinom pluća i kolorekuma najčešće, a zabeleženo je i nekoliko slučajeva zadesne smrti.

<b>Tabela 8. Kliničke karakteristike pacijenata (N=647)</b>		
	N	%
<b>Klinička prezentacija bolesti</b>		
Hematurija	543	83.9
Smetnje u mokrenju	81	12.5
Drugo	23	3.6
<b>Recidiv bolesti</b>		
Da	244	37.7
Ne	403	62.3
<b>Broj recidiva</b>		
Jedan	142	21.9
Dva	37	5.8
Tri ili više	65	10.0
Bez recidiva	403	62.3
<b>Kancer–specifični mortalitet</b>		
Da	200	30.9
Drugi uzrok smrti	85	13.1
Živ	362	56.0
<b>Lečenje (terapijski modalitet)</b>		
TUR	122	18.9
Intravezikalna BCG th	303	46.8
Hirurška th (Cistektomija)	101	15.6
Hemo/radioterapija	121	18.7

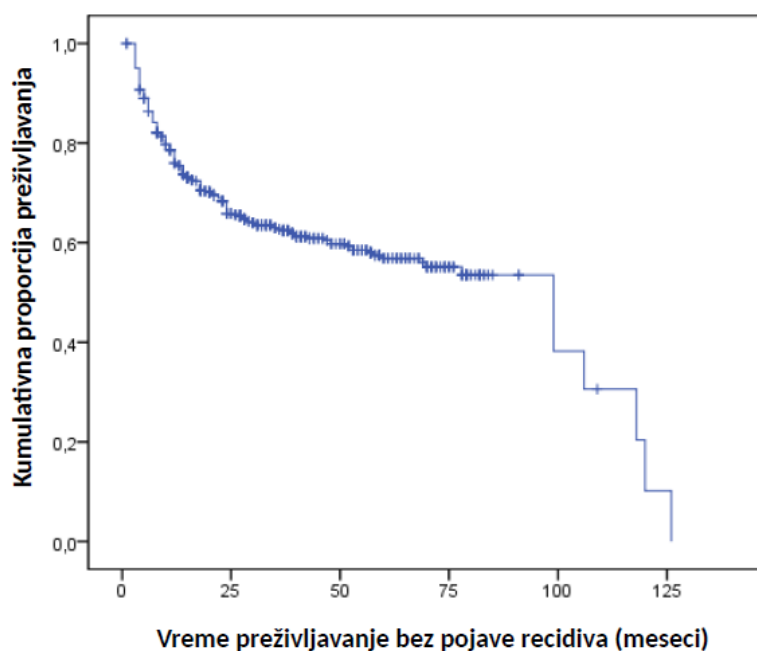
Ukupno jednogodišnje preživljavanje pacijenata bilo je 95,1%, dok je petogodišnje preživljavanje bilo svega 57.7%, a srednje OS iznosilo je 78.4±2.3 meseci (Grafikon 1). Preživljavanje obolelih u odnosu na patološki stadijum bolesti predstavljeno je u Tabeli 9.

<b>Tabela 9. Preživljavanje pacijenata u odnosu na patološki stadijum bolesti</b>				
Preživljavanje pacijenata (u procentima – %)				
	<b>pTa</b>	<b>pT1</b>	<b>pT2</b>	<b>Ukupno</b>
Nakon 1 godine (12 meseci)	99.5	95.3	88.0	95.1
Nakon 2 godine (24 meseci)	97.0	80.1	47.3	77.7
Nakon 3 godine (36 meseci)	94.5	68.5	26.4	66.8
Nakon 5 godina (60 meseci)	87.7	57.8	17.7	57.7
<b>Srednje preživljavanje (u mesecima)</b>				
Sredina ± SG	110.4 ± 3.8	78.4 ± 3.0	34.6 ± 2.8	78.4 ± 2.3
Medijana	129	109	24	92



**Grafikon 1.** Ukupno preživljavanje za celu grupu pacijenata

Srednje vreme do pojave recidiva bilo je  $16,3 \pm 1,3$  meseca. Od pacijenata koji su u toku perioda praćenja razvili recidive, već do kraja prve godine praćenja kod 56,1% njih je detektovan rekurentni tumor. Vreme preživljavanja bez pojave recidiva u ispitivanoj grupi bilo je  $70,1 \pm 3,1$ , a medijana 99 meseci (Grafikon 2).



**Grafikon 2.** Vreme preživljavanja bez pojave recidiva za celu grupu pacijenata

## 5.2. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u urotelnom karcinomu mokraćne bežike

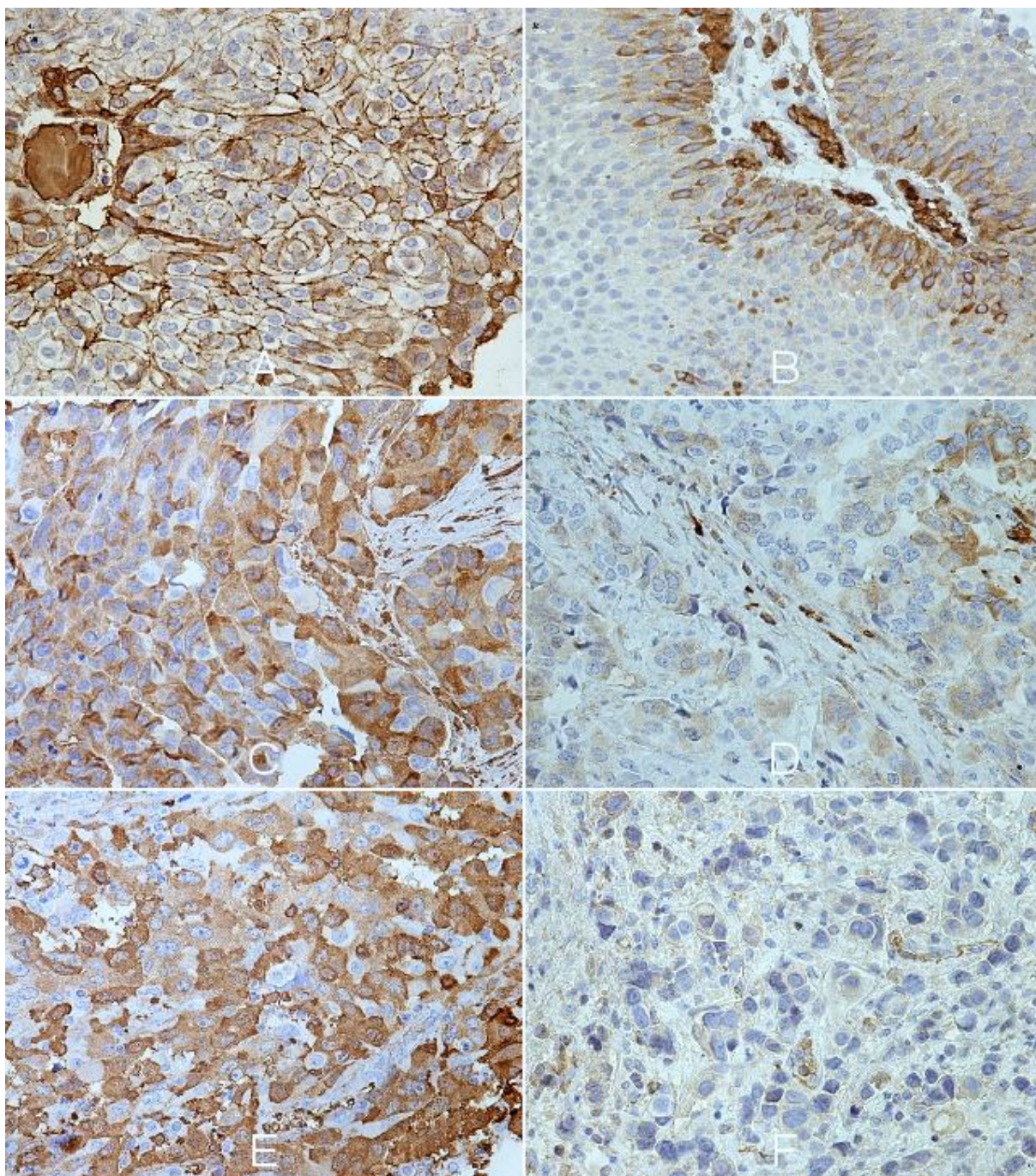
Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 zabeležena je u 66,5% tumora, dominantno u vidu citoplazmatskog, fino granuliranog prebojavanja braon ili zlatno-smeđe boje, sa permembranoznom akcentuacijom ili, ređe, u vidu linearnog membranskog bojenja (Slika 15). Membranski obrazac imunohistohemijske reaktivnosti opserviran je često u papilarnim urotelnim neoplazmama, dok su tumori solidnije arhitekture češće pokazivali i citoplazmatsko bojenje. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 detektovana je ne samo u tumorskom parenhimu, već i u okolnoj tumorskoj stromi, gde je reakcija fokalno bila pozitivna u ćelijama mezenhimnog porekla, inflamatornim ćelijama i fibrilarnim komponentama ekstracelularnog matriksa.

### 5.2.1. Povezanost ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa kliničko–patološkim karakteristikama

Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je povezana sa većom starošću pacijenata ( $p=0,01$ ). Inverzna korelacija nađena je između pušačkog statusa i ekspresije TGF- $\beta$ 1, gde je visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila statistički značajno učestalija kod nepušača u odnosu na pušače (71,8% vs. 63,2%,  $p=0,014$ ). Pored toga, tumori obolelih sa endemskih poručja imali su značajno nižu ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u odnosu na ostale tumore (55,0% vs. 68,1%,  $p=0,015$ ). Analiza povezanosti ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa demografsko–epidemiološkim karakteristikama pacijenata prikazana je u Tabeli 10.

<b>Tabela 10. Povezanost ekspresije TGF-<math>\beta</math>1 sa demografsko–epidemiološkim karakteristikama pacijenata</b>								
		<i>TGF-<math>\beta</math>1 ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>
		Ukupno N (%)		217 (33.5)		430 (66.5)		
<b>Pol</b>								
	Muški	499	(77.1)	175	(80.6)	324	(75.3)	0.078
	Ženski	148	(22.9)	42	(19.4)	106	(24.7)	
<b>Starost</b>								
	<66	279	(43.1)	108	(49.8)	171	(39.8)	<b>0.010</b>
	≥66	368	(56.9)	109	(50.2)	259	(60.2)	
<b>Pušenje cigareta (≥20 paklo godina)</b>								
	Da	402	(62.1)	148	(68.2)	254	(59.1)	<b>0.014</b>
	Ne	245	(37.9)	69	(31.8)	176	(40.9)	
<b>Izloženost poznatim karcinogenima</b>								
	Da	48	(7.4)	19	(8.8)	41	(6.7)	0.221
	Ne	599	(92.6)	198	(91.2)	401	(93.3)	
<b>Endemsko područje</b>								
	Da	80	(12.4)	36	(16.6)	44	(10.2)	<b>0.015</b>
	Ne	567	(87.6)	181	(83.4)	386	(89.8)	





**Slika 15. Imunohistohemijska ekspresija TGF- $\beta$ 1 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike.** Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 prikazana je u u koloni levo, a niska u koloni desno: (A, B) neinvazivni papilarni karcinom, pTa; (C, D) superficijalno invazivni karcinom, pT1; (E, F) mišićno–invazivni urotelni karcinom, pT2. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 u tumorskim ćelijama je u vidu membranskog bojenja, koje prevladava u papilarnim tumorima, i/ili u vidu citoplazmatskog prebojavanja, koje je dominantan obrazac imunoreaktivnosti u infiltrativnim tumorima. TGF- $\beta$ 1 pozitivnost zabeležena je i u tumorskoj stromi. (Originalno uvećanje x400).

Analiza povezanosti ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa histopatološkim svojstvima tumora (Tabela 11) pokazala je veoma značajnu korelaciju intratumorske TGF- $\beta$ 1 ekspresije i visokog histološkog gradusa ( $p < 0,001$ ), kao i patološkog stadijuma ( $p < 0,001$ ). Među tumorima visokog gradusa 75,5% demonstriralo je difuznu ekspresiju TGF- $\beta$ 1, a među tumorima niskog gradusa svega 52,7%. Proporcija tumora sa visokim nivoom ekspresije TGF- $\beta$ 1 raste sa nepredovanjem stadijuma: visok TGF- $\beta$ 1 zabeležen je kod 47,8% neinvazivnih tumora, 73,6% rano invazivnih i 77,3% mišićno-invazivnih tumora, sa visoko značajnom razlikom između superficijalnih i infiltrativnih urotelnih tumora.

<b>Tabela 11. Povezanost ekspresije TGF-<math>\beta</math>1 sa histopatološkim svojstvima tumora</b>								
<i>TGF-<math>\beta</math>1 ekspresija</i>				<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>
Ukupno N (%)		647	(100)	217	(33.5)	430	(66.5)	
<b>Histološki gradus</b>								
Nizak	260	(40.2)	123	(56.7)	137	(31.9)	<b>&lt;0.001</b>	
Visok	387	(59.8)	94	(43.3)	293	(68.1)		
<b>Patološki stadijum</b>								
pTa	201	(31.1)	105	(48.4)	96	(22.3)	<b>&lt;0.001</b>	
pT1	296	(45.7)	78	(35.9)	218	(50.7)		
$\geq$ pT2	150	(23.2)	34	(15.7)	116	(27.0)		
<b>Carcinoma in situ</b>								
Prisutan	47	(7.3)	11	(5.1)	36	(8.4)	0.083	
Nije prisutan	600	(92.7)	206	(94.9)	394	(91.6)		
<b>Divergentna diferencijacija</b>								
Skvamozna	58	(9.0)	17	(7.8)	41	(9.5)	0.258	
Glandularna	12	(1.9)	3	(1.4)	9	(2.1)		
Ostalo	17	(2.5)	6	(2.8)	11	(2.6)		
Nije prisutna	560	(86.6)	191	(88.0)	369	(85.8)		
<b>Cistitis u okolini</b>								
Prisutan	106	(16.4)	43	(19.8)	63	(14.7)	0.060	
Nije prisutan	541	(83.6)	174	(80.2)	367	(85.3)		
<b>Obilan limfocitni infiltrat</b>								
Prisutan	45	(7.0)	10	(4.6)	35	(8.1)	0.063	
Nije prisutan	602	(93.0)	207	(95.4)	395	(91.9)		
<b>Obilan polimorfonuklearni infiltrat</b>								
Prisutan	13	(2.0)	3	(1.4)	10	(2.3)	0.315	
Nije prisutan	634	(98.0)	214	(98.6)	420	(97.7)		

Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je trostruko češća od niske ekspresije u tumorima udruženim sa CIS, ali ovaj nalaz nije pokazao statističku značajnost ( $p=0,083$ ). Tumori sa visokom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 takođe su bili učestalije povezani sa prisustvom cistitisa u okolini



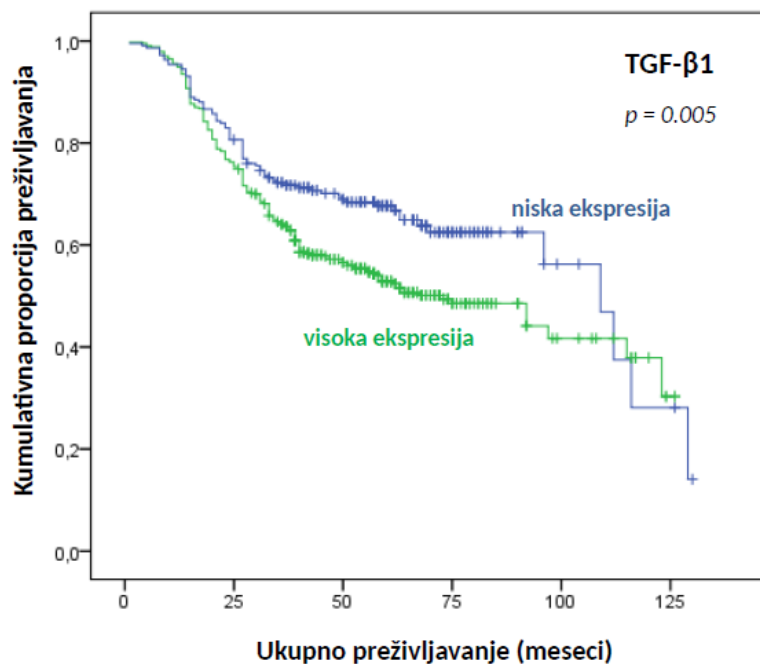
tumora i opsežnog limfocitnog infiltrata u tumorskoj stromi, ali bez statističke značajnosti ( $p=0,060$  i  $p=0,063$ ). Nije nađena povezanost ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa divergentnom diferencijacijom tumora.

Prekomerna ekspresija TGF- $\beta$ 1 pokazala je snažnu direktnu korelaciju sa kancer-specifičnim mortalitetom ( $p=0,001$ ), dok značajna povezanost sa pojavom recidiva nije utvrđena (Tabela 12). Pored toga, pacijenti sa TGF- $\beta$ 1 pozitivnim tumorima imali su veću šansu da budu lečeni radikalnom cistektomijom ( $p=0,008$ ) ili sistemskom radio- i/ili hemoterapijom ( $p=0,008$ ). S druge strane, lečenje pacijenata sa TGF- $\beta$ 1 pozitivnim tumorima značajno ređe je bilo bazirano isključivo na samoj transuretralnoj resekciji ( $p=0,035$ ) ili intravezikalnoj primeni BCG-a ( $p=0,016$ ).

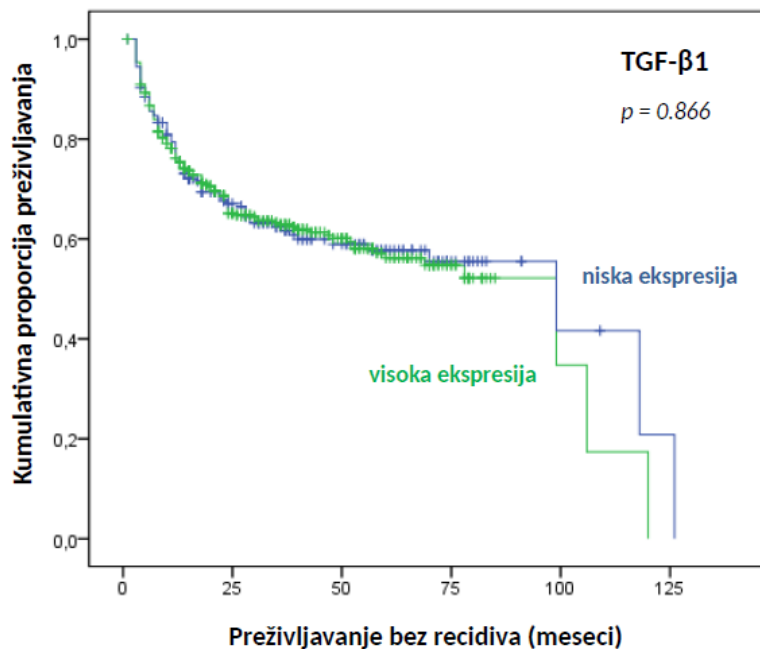
<b>Tabela 12. Povezanost ekspresije TGF-<math>\beta</math>1 sa kliničkim karakteristikama pacijenata</b>							
<i>TGF-<math>\beta</math>1 ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>	
Ukupno	N (%)	217	(33.5)	430	(66.5)		
<b>Klinička prezentacija bolesti</b>							
Hematurija	543 (83.9)	183	(84.3)	360	(83.7)	0.469	
Drugo	104 (16.1)	34	(15.7)	70	(16.3)		
<b>Recidiv bolesti</b>							
Da	244 (37.7)	84	(38.7)	160	(37.2)	0.387	
Ne	403 (62.3)	133	(61.3)	270	(62.8)		
<b>Kancer-specifični mortalitet</b>							
Da	200 (30.9)	47	(21.7)	153	(35.6)	<b>0.001</b>	
Drugi uzrok smrti	85 (13.1)	31	(14.2)	54	(12.5)		
Živ	362 (56.0)	139	(64.1)	223	(51.9)		
<b>Lečenje (terapijski modalitet)</b>							
TUR	122 (18.9)	50	(23.0)	72	(16.7)	<b>0.035</b>	
Intravezikalna BCG	303 (46.8)	115	(53.0)	188	(43.8)	<b>0.016</b>	
Cistektomija	101 (15.6)	23	(10.6)	78	(18.1)	<b>0.008</b>	
Hemo/radioterapija	121 (18.7)	29	(13.4)	92	(21.4)	<b>0.008</b>	

### 5.2.2. Asocijacija ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa preživljavanjem pacijenata

Analiza preživljavanja pacijenata ukazala je na statistički značajnu razliku u ukupnom preživljavanju u odnosu na ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u tumoru (Grafikon 3). Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 bila je povezana sa lošijom prognozom i kraćim OS ( $p=0,005$ ). Srednje vreme preživljavanja pacijenata sa TGF- $\beta$ 1 visoko pozitivnim tumorima je  $73,8 \pm 2,7$ , a za obolele sa tumorima negativnim ili slabo/fokalno pozitivnim na TGF- $\beta$ 1  $85,1 \pm 4,1$  meseca. Nije nađena povezanost ekspresije TGF- $\beta$ 1 i RFS ( $p=0,866$ ) (Grafikon 4).



**Grafikon 3.** Kaplan–Majerove krive preživljavanja 647 pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne beške u odnosu na ekspresiju TGF-β1.



**Grafikon 4.** Kaplan–Majerova analiza vremena preživljavanja do pojave recidiva bolesti kod 647 pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne beške u odnosu na ekspresiju TGF-β1.

### 5.3. Ekspresija Smad4 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike

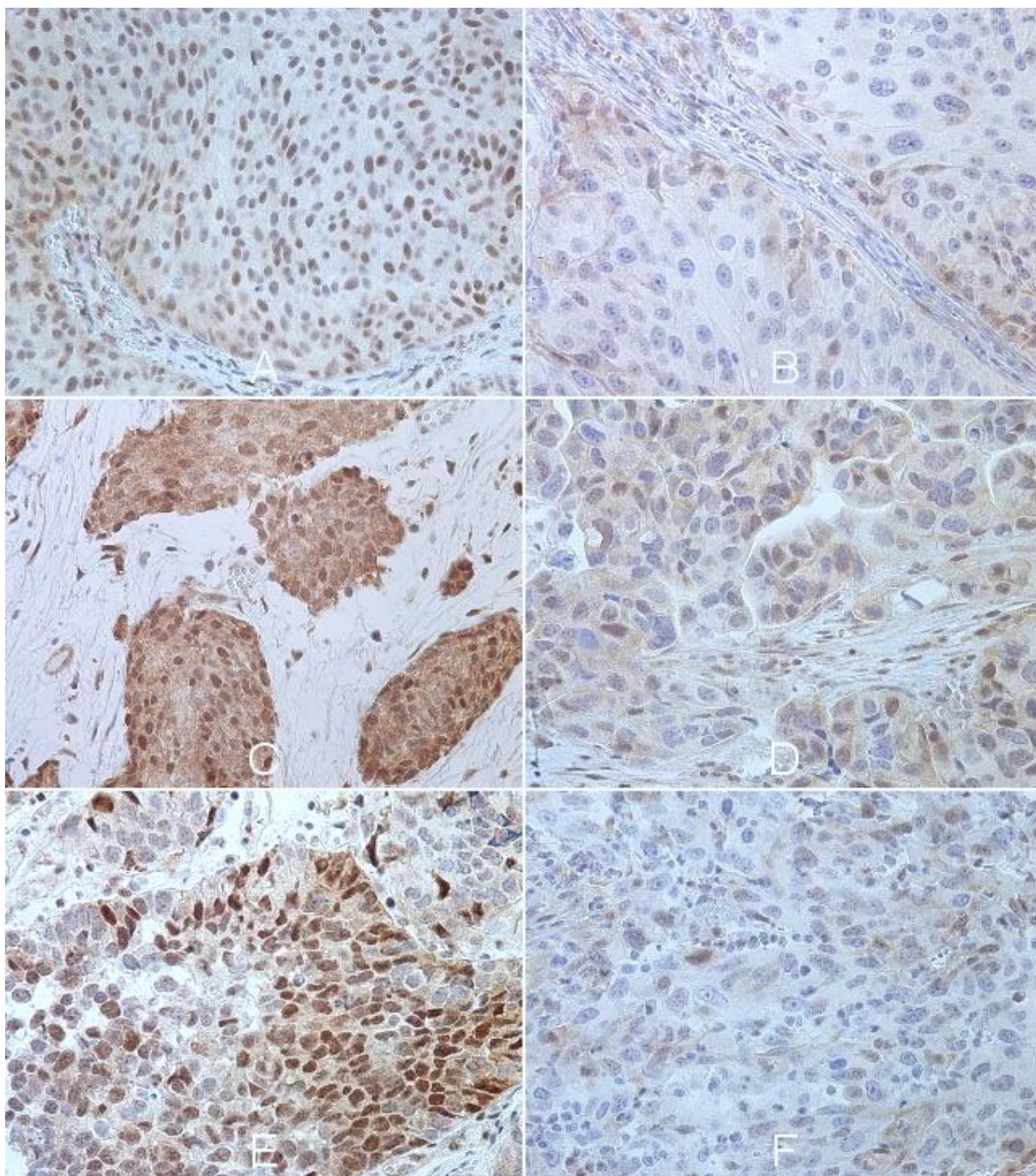
Analiza imunohistohemijske ekspresije Smad4 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike pokazala je da se Smad4 uglavnom eksprimira u jedrima tumorskih ćelija, a u nešto manjoj meri i u citoplazmi, intermedijernim intenzitetom kolornog signala (Slika 16).

#### 5.3.1. Povezanost ekspresije Smad4 sa kliničko–patološkim karakteristikama

Ekspresija Smad4 zabeležena je u većini tumorskih ćelija kod 47,1% tumora (Tabela 13). Smad4 nije pokazao statistički značajnu korelaciju ni sa jednim od analiziranih demografsko-epidemioloških parametara, iako su tumori sa endemskih područja češće imali visoku ekspresiju Smad4 nego tumori iz neendemskih oblasti (56,3% vs. 35,9%,  $p=0,052$ ).

<b>Tabela 13. Povezanost ekspresije Smad4 sa demografsko–epidemiološkim karakteristikama pacijenata</b>								
		<i>Smad4 ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>
		Ukupno	N (%)					
<b>Pol</b>								
	Muški	499	(77.1)	271	(79.2)	228	(74.8)	0.103
	Ženski	148	(22.9)	71	(20.8)	77	(25.2)	
<b>Starost</b>								
	<66	279	(43.1)	141	(41.2)	138	(43.1)	0.171
	≥66	368	(56.9)	201	(58.8)	167	(54.8)	
<b>Pušenje cigareta (≥20 paklo godina)</b>								
	Da	402	(62.1)	214	(62.6)	188	(61.6)	0.435
	Ne	245	(37.9)	128	(37.4)	117	(38.4)	
<b>Izloženost poznatim karcinogenima</b>								
	Da	48	(7.4)	22	(6.4)	26	(8.5)	0.194
	Ne	599	(92.6)	320	(93.6)	279	(91.5)	
<b>Endemsko područje</b>								
	Da	80	(12.4)	35	(10.2)	45	(14.8)	0.052
	Ne	567	(87.6)	307	(89.8)	260	(85.2)	

Redukcija ili gubitak Smad4 ekspresije povezana je sa visokim histološkim gradusom tumora ( $p=0,002$ ). Generalno, tumori niskog histološkog gradusa, papilarne mikroahitektonike i neoplastičnog rasta ograničenog na mukozu najčešće su pokazivali uniformnu Smad4 ekspresiju. Ekspresija Smad4 je opada sa napredovanjem patološkog stadijuma tumora, te je visoka ekspresija Smad4 detektovana u 58,7% pTa, 48,9% pT1 i samo u 28,0% tumora stadijuma pT2 ili većim. Visoka ekspresija Smad4 direktno korelira sa pTa tumorima ( $p<0,001$ ), a inverzno sa mišićno-invazivnom bolešću ( $p<0,001$ ).



**Slika 16. Imunohistohemijska ekspresija Smad4 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike.** Visoka ekspresija Smad4 prikazana je u u koloni levo, a niska ekspresija u koloni desno: (A, B) neinvazivni papilarni karcinom, pTa; (C, D) superfcijalno invazivni karcinom, pT1; (E, F) mišićno–invazivni urotelni karcinom, pT2. Dominantni obrazac imunoreaktivnosti na Smad4 u tumorskim ćelijama je u vidu nuklearnog bojenja intermedijernog intenziteta i/ili citoplazmatskog prebojavanja. (Originalno uvećanje x400).



Gubitak Smad4 pozitivnosti značajno je asociran sa dijagnozom CIS ( $p=0,021$ ), prisustvom skvamozne diferencijacije u tumoru ( $p=0,015$ ), kao i sa nalazom ekstenzivnog, brisk mononuklearnog infiltrata u tumorskoj stromi ( $p=0,008$ ). U Tabeli 14 prikazana je povezanost ekspresije Smad4 sa histopatološkim karakteristikama tumora.

<b>Tabela 14. Povezanost ekspresije Smad4 sa histopatološkim svojstvima tumora</b>								
<i>Smad4 ekspresija</i>				<b>Niska</b>	<b>Visoka</b>			
Ukupno	N (%)	647	(100)	342	(52.9)	305	(47.1)	<i>P vrednost</i>
<b>Histološki gradus</b>								
Nizak		260	(40.2)	119	(34.8)	141	(46.2)	<b>0.002</b>
Visok		387	(59.8)	223	(65.2)	164	(53.8)	
<b>Patološki stadijum</b>								
pTa		201	(31.1)	83	(24.3)	118	(38.7)	<b>&lt;0.001</b>
pT1		296	(45.7)	151	(44.2)	145	(47.5)	0.216
≥pT2		150	(23.2)	108	(31.5)	42	(13.8)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Carcinoma in situ</b>								
Prisutan		47	(7.3)	32	(9.4)	15	(4.9)	<b>0.021</b>
Nije prisutan		600	(92.7)	310	(90.6)	290	(95.1)	
<b>Divergentna diferencijacija</b>								
Skvamozna		58	(9.0)	39	(11.4)	19	(6.3)	<b>0.015*</b>
Glandularna		12	(1.9)	6	(1.8)	6	(1.8)	
Ostalo		17	(2.5)	8	(2.3)	9	(3.0)	
Nije prisutna		560	(86.6)	289	(84.5)	271	(88.9)	
<b>Cistitis u okolini</b>								
Prisutan		106	(16.4)	58	(17.0)	48	(15.7)	0.378
Nije prisutan		541	(83.6)	284	(83.0)	257	(84.3)	
<b>Obilan limfocitni infiltrat</b>								
Prisutan		45	(7.0)	32	(9.4)	13	(4.3)	<b>0.008</b>
Nije prisutan		602	(93.0)	310	(90.6)	292	(95.7)	
<b>Obilan polimorfonuklearni infiltrat</b>								
Prisutan		13	(2.0)	7	(2.0)	6	(2.0)	0.584
Nije prisutan		634	(98.0)	335	(98.0)	299	(98.0)	

\*Skvamozna diferencijacija u odnosu na sve ostale tumore

Visoka ekspresija Smad4 značajno je udružena sa pojavom recidiva bolesti ( $p=0,021$ ). Više od polovine pacijenata sa visokim Smad4 je razvilo relaps tumora. Nasuprot tome, smanjena ekspresija ili gubitak Smad4 u tumorskim ćelijama je snažan prediktor kancer-specifičnog mortaliteta ( $p<0,001$ ). U pogledu primenjene terapije, ekspresija Smad4 u tumoru je bila povezana sa najvećom verovatnoćom da će pacijent biti lečen intravezikalnom BCG imunoterapijom ( $p=0,007$ ), dok gubitak Smad4 ukazuje na radikalno hirurško lečenje ( $p=0,007$ ).

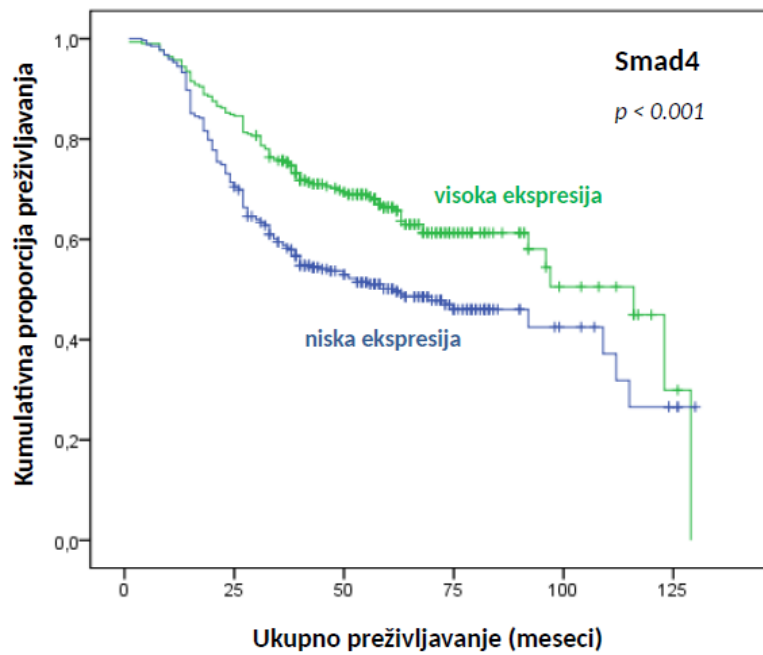
<b>Tabela 15. Povezanost ekspresije Smad4 sa kliničkim karakteristikama pacijenata</b>								
<i>Smad4 ekspresija</i>				<b>Niska</b>	<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>	
Ukupno	N (%)	647	(100)	342	(52.9)	305		(47.1)
<b>Klinička prezentacija bolesti</b>								
Hematurija		543	(83.9)	290	(84.8)	253	(83.0)	0.298
Drugo		104	(16.1)	52	(15.2)	52	(15.2)	
<b>Recidiv bolesti</b>								
Da		244	(37.7)	116	(33.9)	128	(42.0)	<b>0.021</b>
Ne		403	(62.3)	226	(66.1)	177	(58.0)	
<b>Kancer–specifični mortalitet</b>								
Da		200	(30.9)	129	(37.7)	71	(23.3)	<b>&lt;0.001</b>
Drugi uzrok smrti		85	(13.1)	46	(13.5)	39	(12.8)	
Živ		362	(56.0)	167	(48.8)	195	(63.9)	
<b>Lečenje (terapijski modalitet)</b>								
TUR		122	(18.9)	63	(18.4)	59	(19.3)	0.421
Intravezikalna BCG		303	(46.8)	144	(42.1)	159	(52.2)	<b>0.007</b>
Cistektomija		101	(15.6)	68	(19.9)	33	(10.8)	<b>0.001</b>
Hemo/radioterapija		121	(18.7)	67	(19.6)	54	(17.7)	0.304

### 5.3.2. Asocijacija ekspresije Smad4 sa preživljavanjem pacijenata

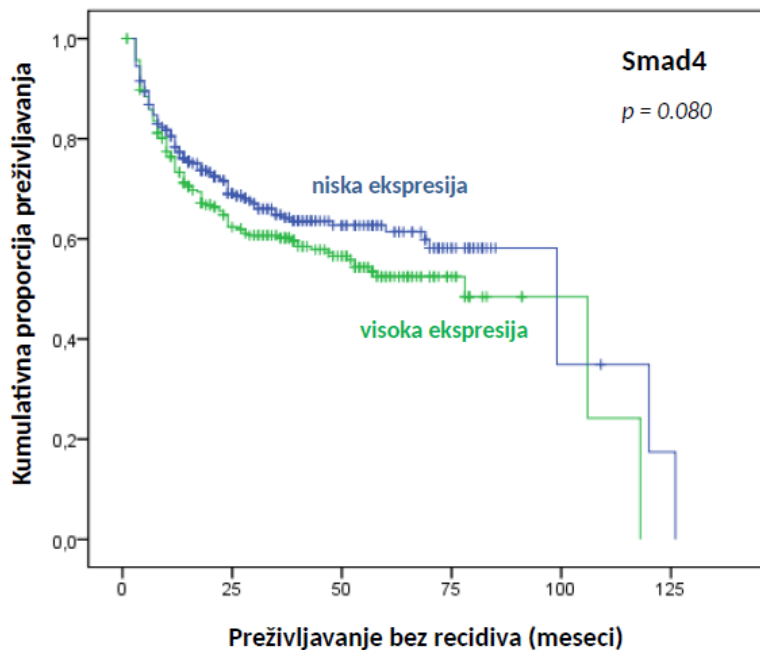
Visoka ekspresija Smad4 u urotelnom karcinomu povezana je sa boljom prognozom i dužim ukupnim preživljavanjem pacijenata sa urotelnim karcinomom (Grafikon 5). Srednje vreme preživljavanja pacijenata sa Smad4 pozitivnim tumorima je  $86,4 \pm 3,4$ , a za one sa Smad4 negativnim  $70,8 \pm 3,2$  meseca. Ova razlika je visoko statistički značajna ( $p < 0,001$ ).

Iako ekspresija Smad4 značajno predviđa pojavu recidiva tumora, ona ne korelira sa vremenskim intervalom do pojave rekurentne bolesti. Pacijenti sa visokom imunohistochemijskom ekspresijom Smad4 u tumoru imaju nešto kraće preživljavanje bez recidiva,  $65,7 \pm 3,8$  meseci vs.  $74,3 \pm 4,4$  za one sa Smad4 negativnim tumorima, ali ova razlika nije statistički značajna ( $p = 0.080$ ).





**Grafikon 5.** Kaplan–Majerove krive preživljavanja 647 pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne beške u odnosu na ekspresiju Smad4.



**Grafikon 6.** Kaplan–Majerova analiza vremena preživljavanja do pojave recidiva bolesti kod 647 pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne beške u odnosu na ekspresiju Smad4.

## 5.4. Ekspresija ćelijskih receptora smrti u urotelnom karcinomu mokraćne bešike

Receptori smrti su visoko eksprimirani u urotelnim neoplazmama niskog i visokog gradusa, svih patoloških stadijuma, kao i u normalnom urotelu. Imunohistohemijska ekspresija DR4 uglavnom je u vidu fino granuliranog, prašinstog citoplazmatskog prebojavanja sa membranskom akcentuacijom, ređe se vizualizuje kao čisto linearno membransko bojenje (Slika 17). Obrazac ekspresije DR5 je veoma sličan, mestimično uz opserviranu nuklearnu imunoreaktivnost, ali je intenzitet reakcije generalno nešto slabiji u odnosu na DR4 (Slika 18).

Dominantni nalaz imunoreaktivnosti na FAS bila je citoplazmatska i membranska reakcija umereno jakog intenziteta, sa zlatno-smeđom bojom precipitata (Slika 19). Dok je imunohistohemijska ekspresija DR4 i DR5 unutar tumora bila uglavnom homogena i uniformnija, sa difuzno obojenim ili u potpunosti negativnim tumorima, ekspresija FAS je unutar tumora bila heterogenijeg sastava, često u vidu fokalnih zona i kolizionih delova tumora sa snažnom ekspresijom FAS nasuprot slaboj ili odsutnoj ekspresiji.

### 5.4.1. Povezanost ekspresije DR4, DR5 i FAS sa kliničko–patološkim karakteristikama

<b>Tabela 16. Povezanost ekspresije DR4 sa demografsko–epidemiološkim karakteristikama pacijenata</b>								
		<i>DR4 ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>
Ukupno N (%)		647 (100)	193 (29.8)	454 (70.2)				
<b>Pol</b>								
	Muški	499 (77.1)	154 (79.8)	345 (76.0)			0.171	
	Ženski	148 (22.9)	39 (20.2)	109 (24.0)				
<b>Starost</b>								
	<66	279 (43.1)	84 (43.5)	195 (43.0)			0.480	
	≥66	368 (56.9)	109 (56.5)	259 (57.0)				
<b>Pušenje cigareta (≥20 paklo godina)</b>								
	Da	402 (62.1)	128 (66.3)	274 (60.4)			0.089	
	Ne	245 (37.9)	65 (33.7)	180 (39.6)				
<b>Izloženost poznatim karcinogenima</b>								
	Da	48 (7.4)	8 (4.1)	40 (8.9)			<b>0.024</b>	
	Ne	599 (92.6)	185 (95.9)	414 (91.2)				
<b>Endemsko područje</b>								
	Da	80 (12.4)	24 (12.4)	56 (12.3)			0.533	
	Ne	567 (87.6)	169 (87.6)	398 (87.7)				

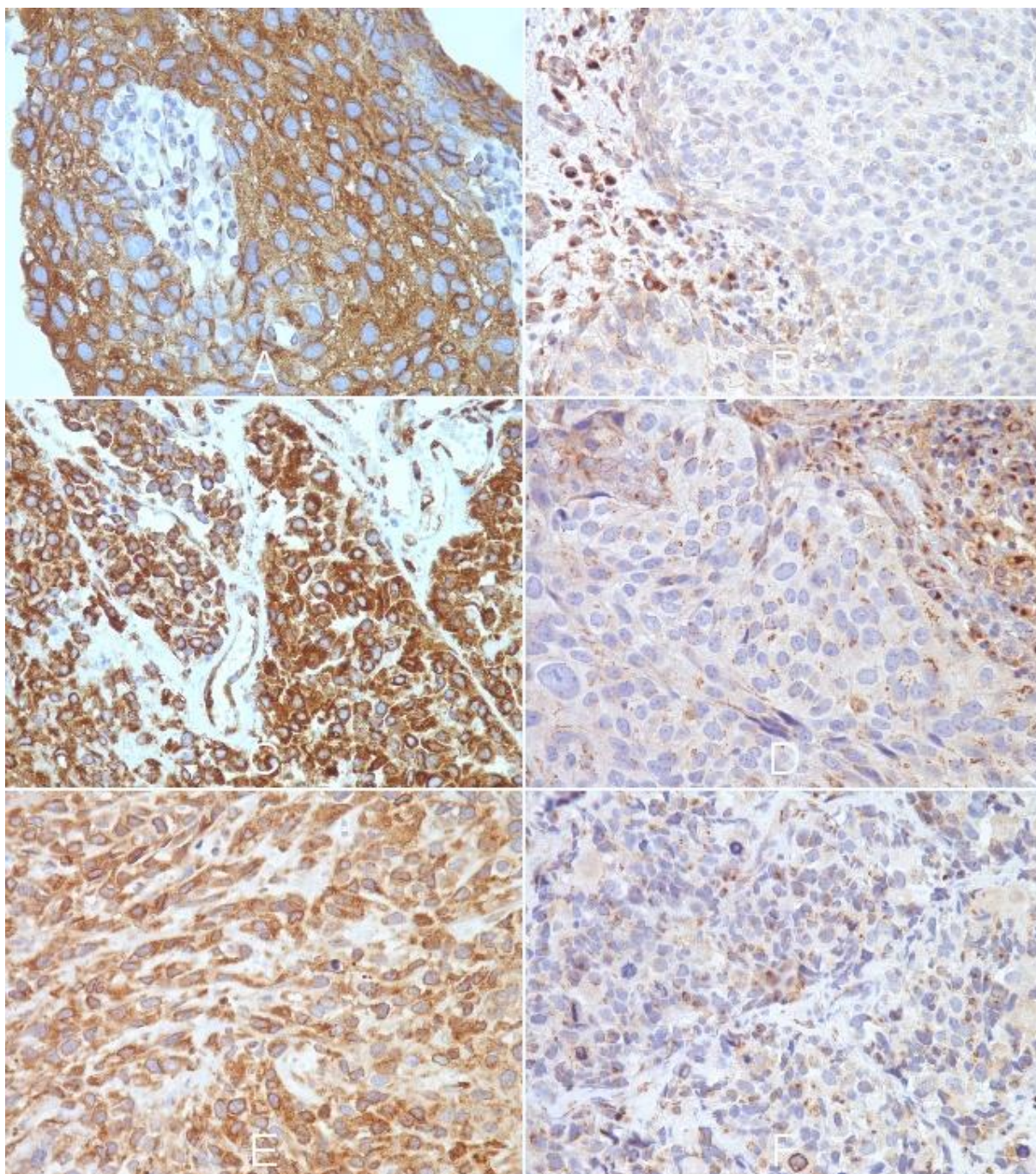
Visoka ekspresija DR4 zabeležena je kod 70,2% tumora i značajno je korelirala sa izloženošću obolelih poznatim karcinogenima ( $p=0,024$ ). Pored toga, tumori pušača češće su imali redukciju ekspresije DR4, 31,8% u odnosu na 26,5% tumora nepušača, ali ova razlika nije na pragu statističke značajnosti ( $p=0.089$ ) (Tabela 16).

Tumori sa redukovanom ili izgubljenom ekspresijom DR4 uglavnom su tumori visokog gradusa. Trećina tumora visokog histološkog gradusa i petina niskog gradusa (35,4% vs. 21,5%) ima redukciju ekspresije ovog receptora smrti, a ova razlika je statistički značajna ( $p<0.001$ ) (Tabela 17). Gubitak DR4 značajno korelira sa mišićno-invazivnim tumorima ( $p<0.001$ ), dok je očuvana, difuzna ekspresija marker neinvazivnih urotelnih tumora. Tumori sa skvamoznom diferencijacijom imaju tendenciju da izgube ekspresiju DR4 ( $p=0,008$ ).

<b>Tabela 17. Povezanost ekspresije DR4 sa histopatološkim svojstvima tumora</b>							
<i>DR4 ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>	
Ukupno	N (%)						
<b>Histološki gradus</b>							
Nizak	260	(40.2)	56	(29.0)	204	(44.9)	<b>&lt;0.001</b>
Visok	387	(59.8)	137	(71.0)	250	(55.1)	
<b>Patološki stadijum</b>							
pTa	201	(31.1)	34	(17.6)	167	(36.8)	<b>&lt;0.001</b>
pT1	296	(45.7)	95	(49.2)	201	(44.3)	0.142
≥pT2	150	(23.2)	64	(33.2)	86	(18.9)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Carcinoma in situ</b>							
Prisutan	47	(7.3)	17	(8.8)	30	(6.6)	0.204
Nije prisutan	600	(92.7)	310	(91.2)	424	(93.4)	
<b>Divergentna diferencijacija</b>							
Skvamozna	58	(9.0)	26	(13.5)	32	(7.0)	<b>0.008*</b>
Glandularna	12	(1.9)	2	(1.0)	10	(2.2)	
Ostalo	17	(2.5)	5	(2.6)	12	(2.9)	
Nije prisutna	560	(86.6)	160	(82.9)	400	(88.1)	
<b>Cistitis u okolini</b>							
Prisutan	106	(16.4)	37	(19.2)	69	(15.2)	0.129
Nije prisutan	541	(83.6)	156	(80.8)	385	(84.8)	
<b>Obilan limfocitni infiltrat</b>							
Prisutan	45	(7.0)	14	(7.3)	31	(6.8)	0.482
Nije prisutan	602	(93.0)	179	(92.7)	423	(93.2)	
<b>Obilan polimorfonuklearni infiltrat</b>							
Prisutan	13	(2.0)	2	(1.0)	11	(2.4)	0.203
Nije prisutan	634	(98.0)	191	(99.0)	443	(97.6)	

\*Skvamozna diferencijacija u odnosu na sve ostale tumore





**Slika 17. Imunohistohemijska ekspresija receptora smrti DR4 (TRAILR1) u urotelnom karcinomu mokraćne bešike.** Visoka ekspresija DR4 prikazana je u koloni levo, a redukovana/negativna ekspresija u koloni desno: (A, B) neinvazivni papilarni karcinom, pTa; (C, D) superficijalno invazivni karcinom, pT1; (E, F) mišićno–invazivni urotelni karcinom, pT2. Ekspresija DR4 u tumorskim ćelijama je u vidu membranskog i/ili citoplazmatskog bojenja, često difuzne distribucije. Bojenje na DR4 zabeleženo je i u pojedinim imunocitima inflamatornog infiltrata u stromi tumora. (Originalno uvećanje x400).

<b>Tabela 18. Povezanost ekspresije DR4 sa kliničkim karakteristikama pacijenata</b>							
<i>DR4 ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>	
Ukupno	N (%)	647	(100)	193	(29.8)		454
<b>Klinička prezentacija bolesti</b>							
Hematurija	543	(83.9)	159	(82.4)	384	(84.6)	0.279
Drugo	104	(16.1)	34	(17.6)	70	(15.4)	
<b>Recidiv bolesti</b>							
Da	244	(37.7)	72	(37.3)	172	(37.9)	0.481
Ne	403	(62.3)	121	(62.7)	282	(62.1)	
<b>Kancer–specifični mortalitet</b>							
Da	200	(30.9)	76	(39.4)	124	(27.3)	<b>0.002</b>
Drugi uzrok smrti	85	(13.1)	27	(14.0)	58	(12.8)	
Živ	362	(56.0)	90	(46.6)	272	(59.9)	
<b>Lečenje (terapijski modalitet)</b>							
TUR	122	(18.9)	27	(14.0)	95	(20.8)	<b>0.024</b>
Intravezikalna BCG	303	(46.8)	85	(44.0)	218	(48.0)	0.200
Cistektomija	101	(15.6)	48	(24.9)	53	(11.7)	<b>&lt;0.001</b>
Hemo/radioterapija	121	(18.7)	33	(17.1)	88	(13.6)	0.286

<b>Tabela 19. Povezanost ekspresije DR5 sa demografsko–epidemiološkim karakteristikama pacijenata</b>							
<i>DR5 ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>	
Ukupno	N (%)	647	(100)	195	(30.1)		452
<b>Pol</b>							
Muški	499	(77.1)	153	(78.5)	346	(76.5)	0.336
Ženski	148	(22.9)	42	(21.5)	106	(23.5)	
<b>Starost</b>							
<66	279	(43.1)	84	(43.1)	195	(43.1)	0.529
≥66	368	(56.9)	111	(56.9)	257	(56.9)	
<b>Pušenje cigareta (≥20 paklo godina)</b>							
Da	402	(62.1)	127	(65.1)	275	(60.8)	0.173
Ne	245	(37.9)	68	(34.9)	177	(39.2)	
<b>Izloženost poznatim karcinogenima</b>							
Da	48	(7.4)	15	(7.7)	33	(7.3)	0.488
Ne	599	(92.6)	180	(92.3)	419	(92.7)	
<b>Endemsko područje</b>							
Da	80	(12.4)	25	(12.8)	55	(12.2)	0.455
Ne	567	(87.6)	170	(87.2)	397	(87.8)	

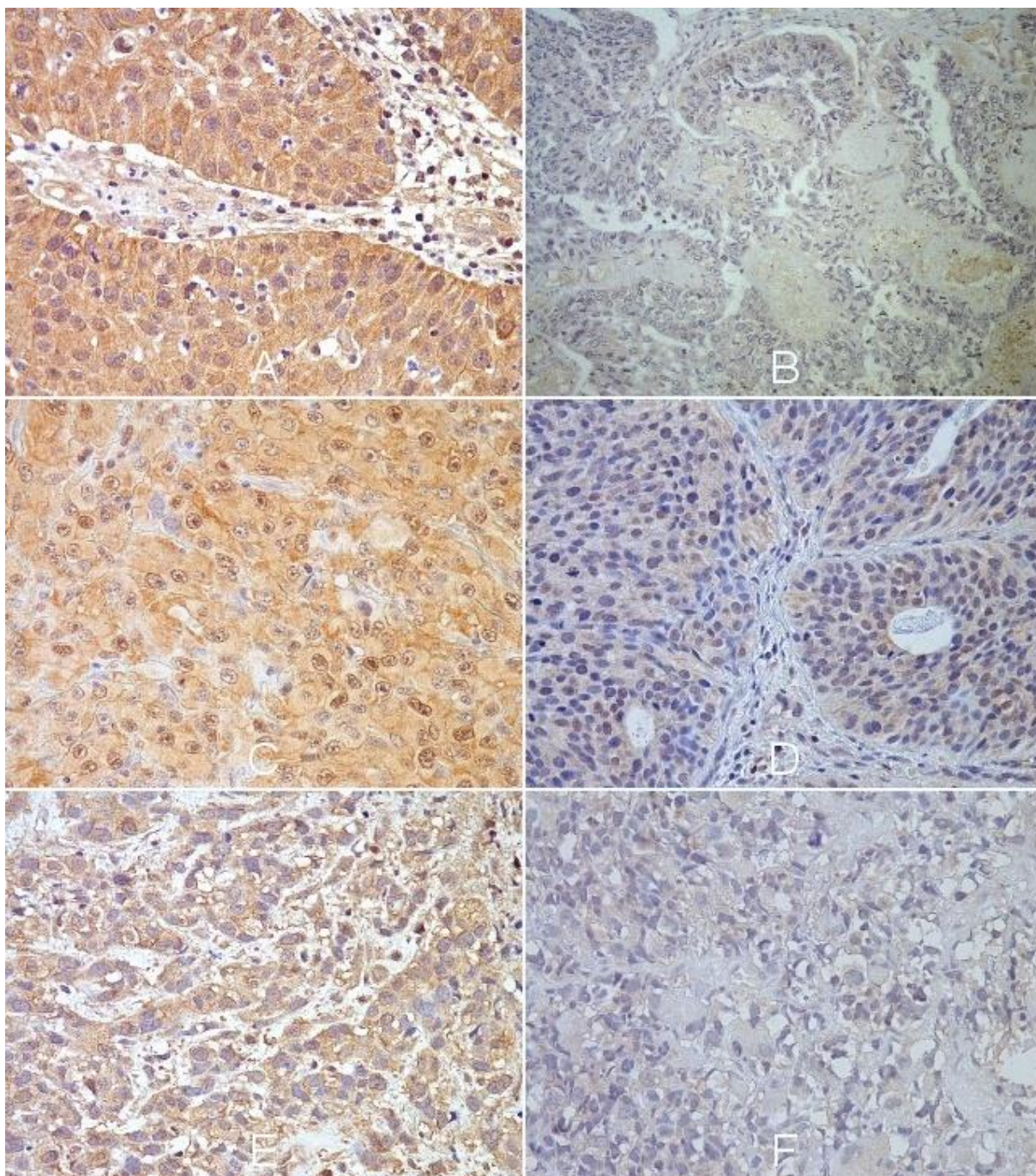
Imunoekspresija DR4 u tumorima značajno je inverzno povezana sa smrtnošću uzrokovanom kancerom ( $p=0,002$ ). Samo četvrtina pacijenata (24,9%) koji su živi nakon vremena praćenja ima redukciju DR4 ekspresije, a među onima koji su umrli od progresije i diseminacije

karcinoma bešike čak 38,0%. Gubitak ekspresije DR4 je snažan prediktor radikalne cistektomije ( $p < 0.001$ ), dok očuvana visoka ekspresija DR4 pozitivno korelira sa TUR-om kao jedinim primenjenim terapijskim modalitetom ( $p = 0,024$ ) (Tabela 18).

Ekspresija DR5 nije pokazala značajnu povezanost sa demografsko-epidemiološkim karakteristikama pacijenata i bila je relativno ujednačena u svim ispitivanim grupama (Tabela 19). Visoka ekspresija je detektovana u 69,9% tumora. U analizi udruženosti ekspresije DR5 i histopatoloških parametara tumora (Tabela 20), visoka ekspresija DR5 bila je diskriminativni faktor koji sa velikom značajnošću izdvaja grupu superficijalno invazivnih tumora ( $p = 0,006$ ). Rano invazivni karcinomi u 76% slučajeva imali su očuvanu ekspresiju DR5, dok je redukcija ekspresije bila karakteristična za mišićno-invazivnu bolest ( $p = 0,019$ ).

<b>Tabela 20. Povezanost ekspresije DR5 sa histopatološkim svojstvima tumora</b>							
	<i>DR5 ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>
	Ukupno	N (%)	195	(30.1)	452	(69.9)	
<b>Histološki gradus</b>							
Nizak	260	(40.2)	71	(36.4)	189	(41.8)	0.115
Visok	387	(59.8)	124	(63.6)	263	(58.2)	
<b>Patološki stadijum</b>							
pTa	201	(31.1)	65	(33.4)	136	(30.1)	0.233
pT1	296	(45.7)	74	(37.9)	222	(49.1)	<b>0.006</b>
≥pT2	150	(23.2)	56	(28.7)	94	(20.8)	<b>0.019</b>
<b>Carcinoma in situ</b>							
Prisutan	47	(7.3)	16	(8.2)	31	(6.9)	0.324
Nije prisutan	600	(92.7)	179	(91.8)	421	(93.1)	
<b>Divergentna diferencijacija</b>							
Skvamozna	58	(9.0)	16	(8.1)	42	(9.3)	0.337
Glandularna	12	(1.9)	2	(1.0)	10	(2.2)	
Ostalo	17	(2.5)	6	(3.0)	11	(2.4)	
Nije prisutna	560	(86.6)	171	(82.9)	389	(88.1)	
<b>Cistitis u okolini</b>							
Prisutan	106	(16.4)	37	(19.0)	69	(15.3)	0.146
Nije prisutan	541	(83.6)	158	(81.0)	383	(84.7)	
<b>Obilan limfocitni infiltrat</b>							
Prisutan	45	(7.0)	16	(8.2)	29	(6.4)	0.254
Nije prisutan	602	(93.0)	179	(91.8)	423	(93.6)	
<b>Obilan polimorfonuklearni infiltrat</b>							
Prisutan	13	(2.0)	1	(0.5)	12	(2.7)	0.061
Nije prisutan	634	(98.0)	194	(99.5)	440	(97.3)	





**Slika 18. Imunohistohemijska ekspresija receptora smrti DR5 (TRAILR2, KILLER) u urotelnom karcinomu mokraćne bešike.** Visoka ekspresija DR5 prikazana je u koloni levo, a redukovana/negativna ekspresija u koloni desno: (A, B) neinvazivni papilarni karcinom, pTa; (C, D) superficijalno invazivni karcinom, pT1; (E, F) mišićno–invazivni urotelni karcinom, pT2. Imunoreaktivnost na DR5 u tumorskim ćelijama je u vidu membranskog i/ili citoplazmatskog prašinstog bojenja, uglavnom intermedijernog intenziteta, a zabeleženo je i aberantno nuklearno prebojavanje. (Originalno uvećanje x400).

<b>Tabela 21. Povezanost ekspresije DR5 sa kliničkim karakteristikama pacijenata</b>								
<i>DR5 ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>		
Ukupno	N (%)	647	(100)	195	(30.1)		452	(69.9)
<b>Klinička prezentacija bolesti</b>								
Hematurija		543	(83.9)	157	(80.5)	386	(85.4)	0.077
Drugo		104	(16.1)	38	(19.5)	66	(14.6)	
<b>Recidiv bolesti</b>								
Da		244	(37.7)	66	(33.8)	178	(39.4)	0.106
Ne		403	(62.3)	129	(66.2)	274	(60.6)	
<b>Kancer–specifični mortalitet</b>								
Da		200	(30.9)	65	(33.3)	135	(29.9)	0.216
Drugi uzrok smrti		85	(13.1)	29	(14.9)	56	(12.4)	
Živ		362	(56.0)	101	(51.8)	261	(57.7)	
<b>Lečenje (terapijski modalitet)</b>								
TUR		122	(18.9)	42	(21.5)	80	(17.7)	0.150
Intravezikalna BCG		303	(46.8)	82	(42.1)	221	(48.9)	0.065
Cistektomija		101	(15.6)	38	(19.5)	63	(13.9)	<b>0.049</b>
Hemo/radioterapija		121	(18.7)	33	(16.9)	88	(19.5)	0.259

<b>Tabela 22. Povezanost ekspresije FAS sa demografsko–epidemiološkim karakteristikama pacijenata</b>								
<i>FAS ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>		
Ukupno	N (%)	647	(100)	293	(45.3)		354	(54.7)
<b>Pol</b>								
Muški		499	(77.1)	222	(75.8)	277	(78.2)	0.256
Ženski		148	(22.9)	71	(24.2)	77	(21.8)	
<b>Starost</b>								
<66		279	(43.1)	133	(45.4)	146	(41.2)	0.163
≥66		368	(56.9)	160	(54.6)	208	(58.8)	
<b>Pušenje cigareta (≥20 paklo godina)</b>								
Da		402	(62.1)	190	(64.8)	212	(59.9)	0.112
Ne		245	(37.9)	103	(35.2)	142	(40.1)	
<b>Izloženost poznatim karcinogenima</b>								
Da		48	(7.4)	18	(6.1)	30	(8.5)	0.165
Ne		599	(92.6)	275	(93.9)	324	(91.5)	
<b>Endemsko područje</b>								
Da		80	(12.4)	35	(11.9)	45	(12.7)	0.432
Ne		567	(87.6)	258	(88.1)	309	(87.3)	

Pacijenti sa visokom ekspresijom DR5 u tumorima češće su kao inicijalnu kliničku manifestaciju bolesti imali hematuriju nego pacijenti sa niskom DR5 ekspresijom (71,1% vs.

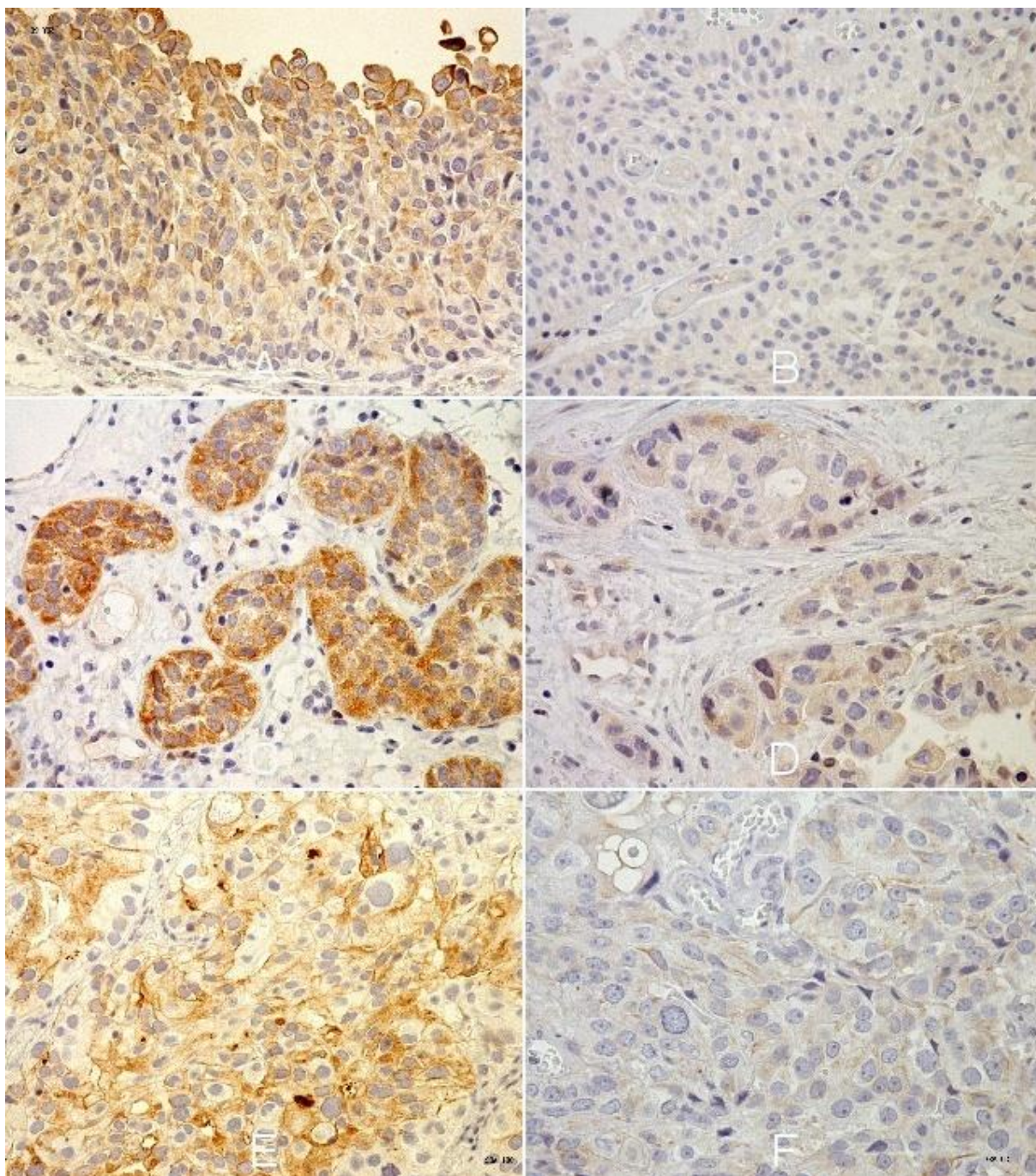
63,5%), ali ova razlika između grupa nije bila statistički značajna ( $p=0,077$ ). Gubitak ekspresije DR5 značajan je prediktor cistektomije ( $p=0.049$ ) (Tabela 21).

Visoka ekspresija FAS nađena je u 54,7% tumora. Iako nije utvrđena značajna povezanost ekspresije FAS sa demografsko–epidemiološkim karakteristikama pacijenata, (Tabela 22), niti sa histološkim gradusom tumora, gubitak ekspresije FAS je značajno asociran sa mišićno-invazivnom bolešću ( $p=0,015$ ). Neinvazivni urotelni karcinomi pokazuju redukciju i gubitak FAS ekspresije u 40,3% slučajeva, superficijalno invazivni u 44,6%, a tumori sa infiltracijom detrusora u 53,3%.

<b>Tabela 23. Povezanost ekspresije FAS sa histopatološkim svojstvima tumora</b>							
	<i>FAS ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>
	Ukupno N (%)		293 (45.3)	354 (54.7)			
<b>Histološki gradus</b>							
Nizak	260 (40.2)		120 (41.0)	140 (39.5)		0.388	
Visok	387 (59.8)		173 (59.0)	214 (60.5)			
<b>Patološki stadijum</b>							
pTa	201 (31.1)		81 (27.6)	120 (33.9)		0.052	
pT1	296 (45.7)		132 (45.1)	164 (46.3)		0.403	
≥pT2	150 (23.2)		80 (27.3)	70 (19.8)		<b>0.015</b>	
<b>Carcinoma in situ</b>							
Prisutan	47 (7.3)		15 (5.1)	32 (9.0)		<b>0.038</b>	
Nije prisutan	600 (92.7)		278 (94.9)	322 (91.0)			
<b>Divergentna diferencijacija</b>							
Skvamozna	58 (9.0)		37 (12.6)	21 (5.9)		<b>0.003</b>	
Glandularna	12 (1.9)		3 (1.0)	9 (2.5)		<b>0.042</b>	
Ostalo	17 (2.5)		3 (1.0)	14 (4.0)		<b>0.020</b>	
Nije prisutna	560 (86.6)		250 (85.4)	310 (87.6)			
<b>Cistitis u okolini</b>							
Prisutan	106 (16.4)		44 (15.0)	62 (17.5)		0.228	
Nije prisutan	541 (83.6)		249 (85.0)	292 (82.5)			
<b>Obilan limfocitni infiltrat</b>							
Prisutan	45 (7.0)		14 (4.8)	31 (8.8)		<b>0.033</b>	
Nije prisutan	602 (93.0)		279 (95.2)	323 (91.2)			
<b>Obilan polimorfonuklearni infiltrat</b>							
Prisutan	13 (2.0)		9 (3.1)	4 (1.1)		0.071	
Nije prisutan	634 (98.0)		284 (96.9)	350 (98.9)			

Infiltrativni urotelni karcinomi sa visokom ekspresijom FAS su udruženi sa učestalijim nalazom CIS u okolini tumora ( $p=0,038$ ), kao i prisustvom obilnog limfocitog infiltrata u tumorskoj stromi ( $p=0,033$ ). Tumori sa skvamoznom divergentnom diferencijacijom imaju





**Slika 19. Imunohistohemijška ekspresija receptora smrti FAS (APO-1, CD95) u urotelnom karcinomu mokraćne bešike.** Visoka ekspresija DR4 prikazana je u koloni levo, a redukovana/negativna ekspresija u koloni desno: (A, B) neinvazivni papilarni karcinom, pTa; (C, D) superficijalno invazivni karcinom, pT1; (E, F) mišićno–invazivni urotelni karcinom, pT2. Dominantni obrazac imunohistohemijske ekspresije FAS u tumorskim ćelijama je fino, mrežasto membransko bojenje i/ili granularno citoplazmatsko prebojavanje. (Originalno uvećanje x400).

značajno slabiju ekspresiju FAS od ostatka grupe ( $p=0.002$ ), dok tumori sa glandularnom diferencijacijom ( $p=0,042$ ) i tumori sa varijantnom morfoloijom ( $p=0,020$ ) imaju značajno višu ekspresiju FAS nego tumori klasične mikromorfologije. Čak 82,4% varijantnih tumora visoko ekspresira FAS, a sa druge strane urotelni karcinomi sa skvamoznom diferencijacijom su FAS pozitivni u samo 36,2% slučajeva (Tabela 23).

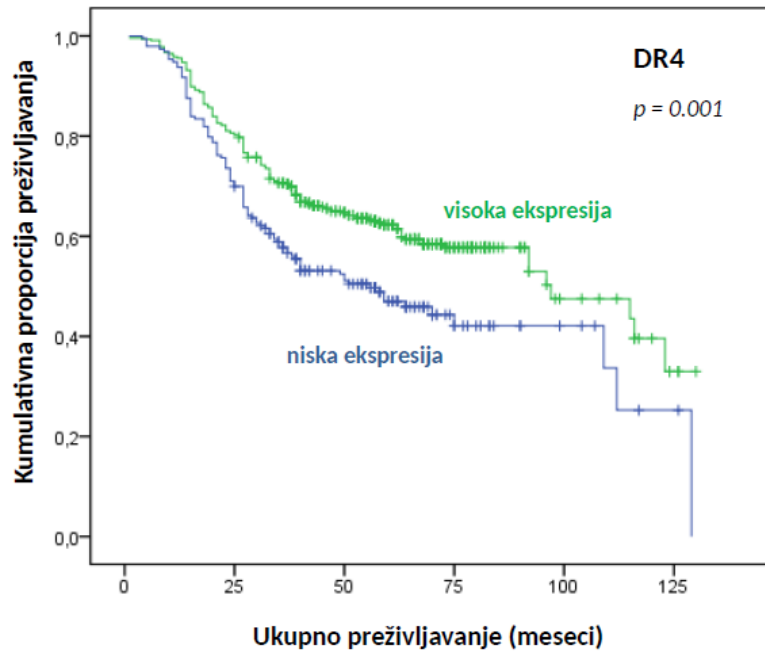
Među pacijentima kod kojih je proglašena kancer-specifična smrt većina obolelih (55,0%) imala je nisku ili negativnu ekspresiju FAS i ova asocijacija je visoko statistički značajna ( $p=0,001$ ) (Tabela 24). Pored toga, redukcija ekspresije FAS značajno je povezana sa radikalnom cistektomijom ( $p=0,010$ ).

<b>Tabela 24. Povezanost ekspresije FAS sa kliničkim karakteristikama pacijenata</b>							
<i>FAS ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>	
Ukupno N (%)	647 (100)	293 (45.3)	354 (54.7)				
<b>Klinička prezentacija bolesti</b>							
Hematurija	543 (83.9)	248 (84.6)	295 (83.3)	0.366			
Drugo	104 (16.1)	45 (15.4)	59 (16.7)				
<b>Recidiv bolesti</b>							
Da	244 (37.7)	103 (35.2)	141 (39.8)	0.127			
Ne	403 (62.3)	190 (64.8)	213 (60.2)				
<b>Kancer-specifični mortalitet</b>							
Da	200 (30.9)	110 (37.5)	90 (25.4)	<b>0.001</b>			
Drugi uzrok smrti	85 (13.1)	37 (12.6)	48 (13.6)				
Živ	362 (56.0)	146 (49.8)	216 (61.0)				
<b>Lečenje (terapijski modalitet)</b>							
TUR	122 (18.9)	48 (18.4)	74 (20.9)	0.086			
Intravezikalna BCG	303 (46.8)	128 (43.7)	175 (49.4)	0.084			
Cistektomija	101 (15.6)	57 (19.5)	44 (12.4)	<b>0.010</b>			
Hemo/radioterapija	121 (18.7)	60 (20.4)	61 (17.3)	0.170			

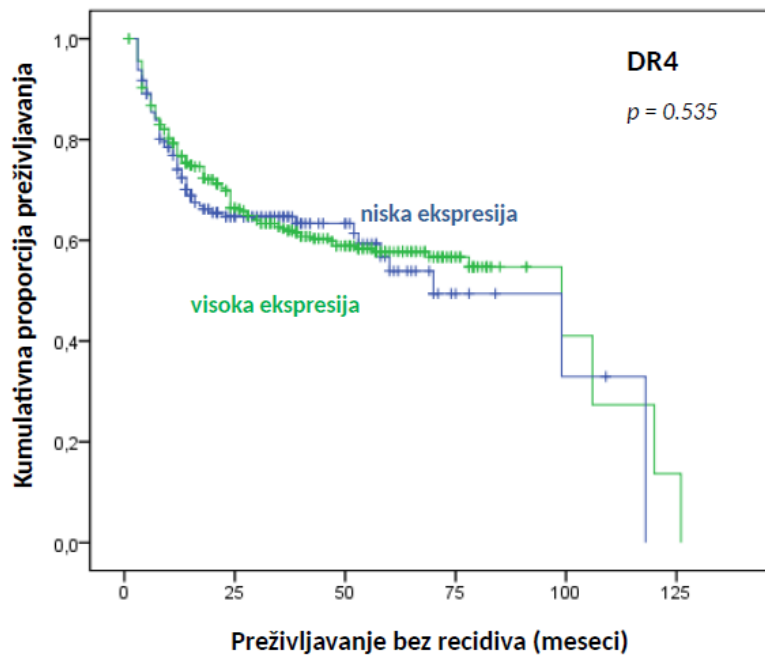
#### 5.4.2. Asocijacija ekspresije DR4, DR5 i FAS sa preživljavanjem pacijenata

U analizi preživljavanja visoka ekspresija receptora smrti DR4 i FAS značajno je povezana sa dužim preživljavanjem pacijenata i boljom prognozom ( $p=0,001$  i  $p=0,003$ ) (Grafikoni 7 i 11). Pacijenti sa visokom ekspresijom DR4 prosečno žive 25% duže od onih sa niskom ekspresijom ( $82,5\pm 2,8$  vs.  $68,4\pm 4,1$  meseci), dok oboleli sa visokom tumorskom ekspresijom FAS imaju 22% duže ukupno preživljavanje u odnosu na one sa FAS niskom ili negativnom ekspresijom ( $85,1\pm 3,1$  vs.  $69,6\pm 3,1$ ). Imunoekspresija DR5 nije značajno povezana sa OS ( $p=0.233$ ) (Grafikon 11). Dok pacijenti sa visokom i niskom ekspresijom DR4 i FAS imaju

veoma sličnu dužinu RFS (Grafikoni 8 i 12), pacijenti sa visokim DR5 imaju preživljavanje do pojave recidiva  $64,3 \pm 3,8$  meseci, nasuprot  $80,2 \pm 4,7$  za niski DR5 (Grafikon 10). Međutim, ova razlika nije dostigla statistički značajan nivo ( $p=0,149$ ).

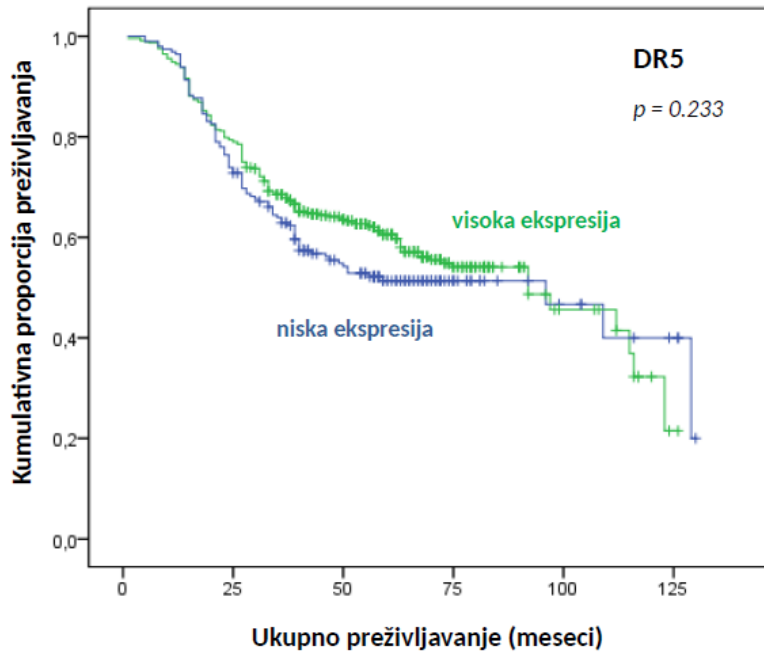


**Grafikon 7.** Kaplan–Majerove krive preživljavanja 647 pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bešike u odnosu na ekspresiju ćelijskog recetora smrti DR4 (TRAIL-R1).

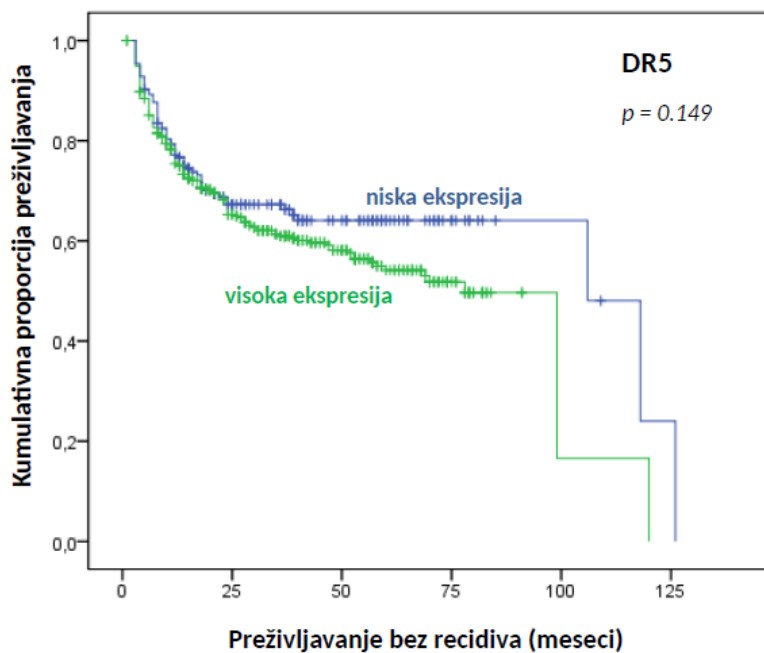


**Grafikon 8.** Kaplan–Majerova analiza vremena preživljavanja do pojave recidiva kod pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bešike u odnosu na ekspresiju DR4.

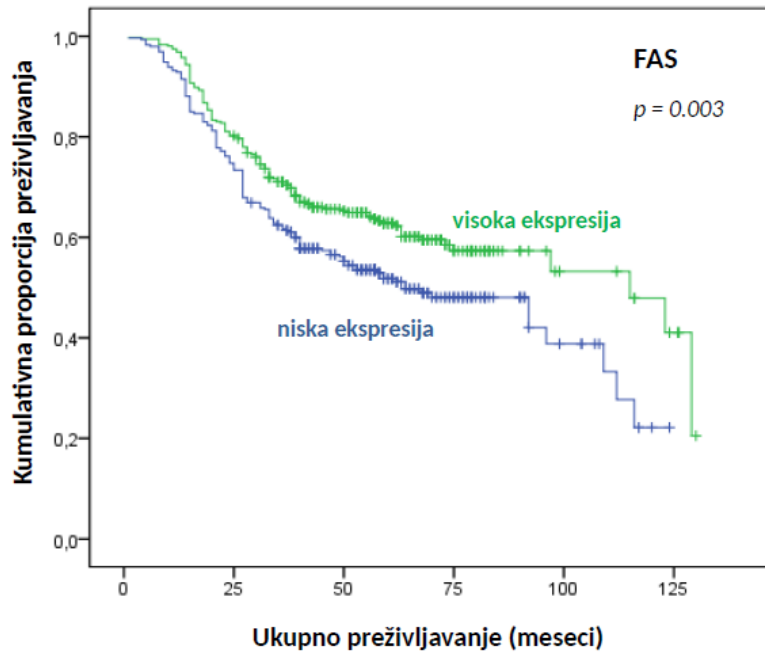




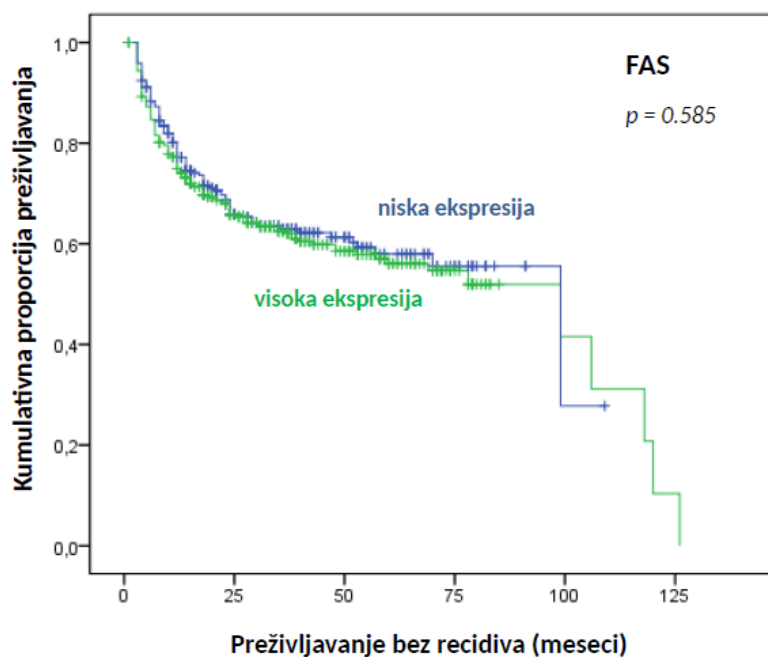
**Grafikon 9.** Kaplan–Majerove krive preživljavanja 647 pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne beške u odnosu na ekspresiju ćelijskog recetora smrti DR5 (TRAIL-R2).



**Grafikon 10.** Kaplan–Majerova analiza vremena preživljavanja do pojave recidiva bolesti kod 647 pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne beške u odnosu na ekspresiju DR5 (TRAIL-R2).



**Grafikon 11.** Kaplan–Majerove krive preživljavanja 647 pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bešike u odnosu na ekspresiju ćelijskog recetora smrti FAS.



**Grafikon 12.** Kaplan–Majerova analiza vremena preživljavanja do pojave recidiva bolesti kod 647 pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bešike u odnosu na ekspresiju FAS.

## 5.5. Ekspresija epigenetskog utišivača EZH2 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike

Imunohistochemijska ekspresija EZH2 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike detektovana je isključivo u vidu nuklearnog bojenja (Slika 20). Jedra tumorskih ćelija su pokazivala pozitivnost na EZH2 u vidu svetlo- do tamno-smeđeg prebojavanja, dok značajnija imunohistochemijska aktivnost nije zabeležena u normalnom, neneoplastičnom urotelu. Mestimično se svetlobraon prebojavanje jedara moglo naći fokalno u maloj frakciji jedara bazalnih slojeva u tumor-okružujućem urotelu.

### 5.5.1. Povezanost ekspresije EZH2sa kliničko–patološkim karakteristikama

Visoka ekspresija EZH2 nađena je u 38,9% analiziranih tumora (Tabela 25). Visoka EZH2 ekspresija značajno je češće opservirana u tumorima starijih pacijenata ( $p < 0.001$ ).

Ekspresija EZH2 povezana je sa visokim tumorskim gradusom i visokim patološkim stadijumom ( $p < 0.001$ ) (Tabela 26). Većina tumora visokog histološkog gradusa (53,7%) pokazalo je visoku ekspresiju EZH2 za razliku od svega 16,9% tumora niskog gradusa. Ekspresija EZH2 linearno raste sa povećanjem stadijuma: 15,9% tumora pTa, 44,2% pT1 i 59,3% tumora stadijuma pT2 ili većim ima visoku ekspresiju EZH2.

<b>Tabela 25. Povezanost ekspresije EZH2 sa demografsko–epidemiološkim karakteristikama pacijenata</b>							
<i>EZH2 ekspresija</i>				<b>Niska</b>	<b>Visoka</b>		
Ukupno N (%)		647 (100)	395 (61.1)	252 (38.9)	<i>P vrednost</i>		
<b>Pol</b>							
Muški	499 (77.1)	302 (76.5)	197 (78.2)	0.342			
Ženski	148 (22.9)	93 (23.5)	55 (21.8)				
<b>Starost</b>							
<66	279 (43.1)	191 (48.4)	88 (34.9)	<b>&lt;0.001</b>			
≥66	368 (56.9)	204 (51.6)	164 (65.1)				
<b>Pušenje cigareta (≥20 paklo godina)</b>							
Da	402 (62.1)	246 (62.3)	156 (61.9)	0.494			
Ne	245 (37.9)	149 (37.7)	96 (38.1)				
<b>Izloženost poznatim karcinogenima</b>							
Da	48 (7.4)	34 (8.6)	14 (5.6)	0.097			
Ne	599 (92.6)	361 (91.4)	238 (94.4)				
<b>Endemsko područje</b>							
Da	80 (12.4)	46 (11.6)	34 (13.5)	0.282			
Ne	567 (87.6)	349 (88.4)	218 (86.5)				

EZH2 korelira direktno sa prisustvom CIS ( $p < 0.001$ ): 68% infiltrativnih karcinoma udruženih sa CIS ima visoku ekspresiju EZH2, za razliku od 36,7% karcinoma neasociranih sa CIS.

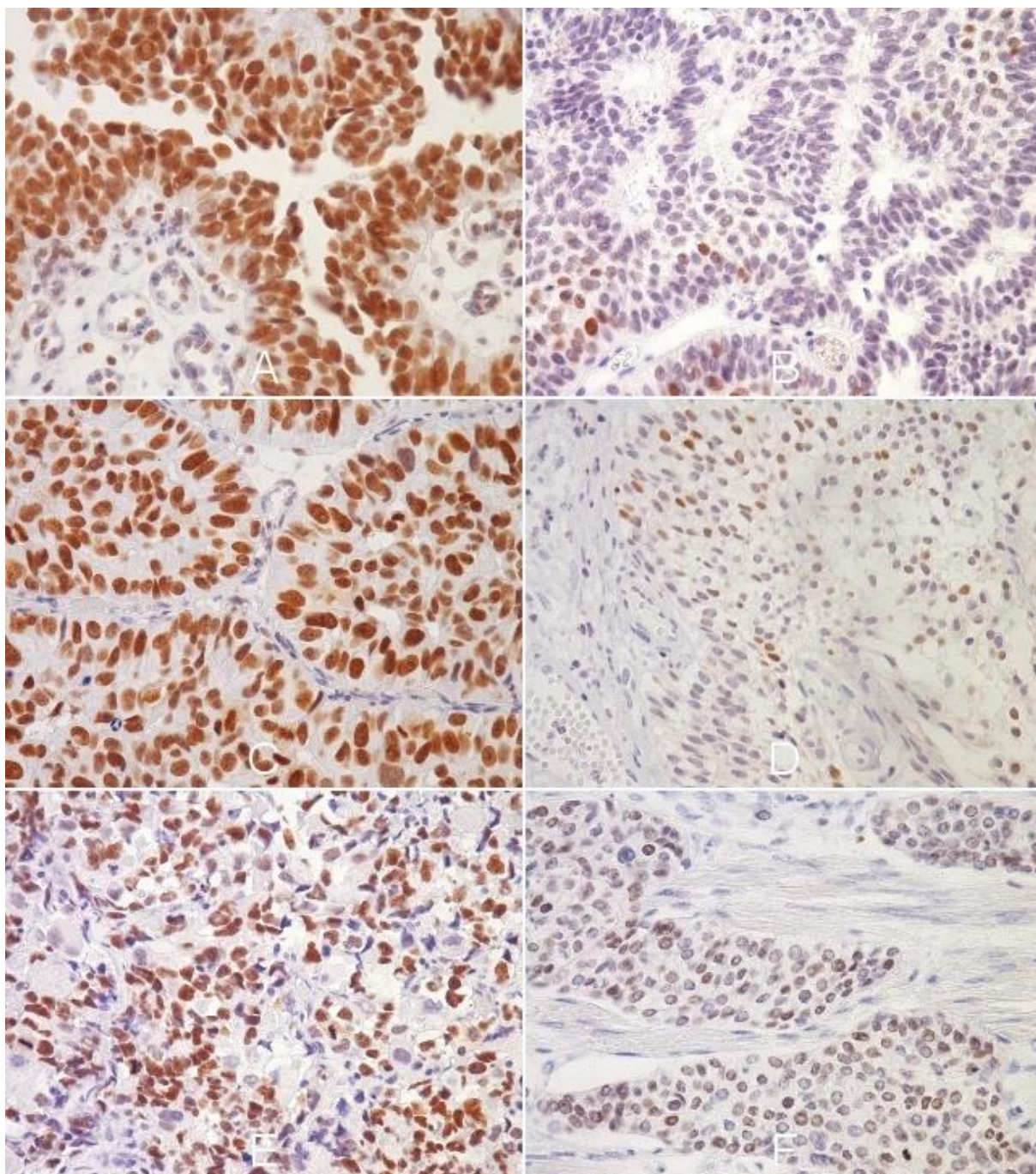
Nuklearna aktivost EZH2 snažno je i direktno asocirana sa divergentnom diferencijacijom i varijantnom morfologijom tumora ( $p < 0.001$ ). Pored toga, visoka EZH2 ekspresija značajno korelira sa prisustvom markantnog limfocitnog ( $p = 0,014$ ), ali i granulocitnog infiltrata ( $p = 0,001$ ) u tumorskoj stromi.

<b>Tabela 26. Povezanost ekspresije EZH2 sa histopatološkim svojstvima tumora</b>							
<i>FAS ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>	
Ukupno N (%)							
<b>Histološki gradus</b>							
Nizak	260 (40.2)	216 (54.7)	44 (17.5)			<b>&lt;0.001</b>	
Visok	387 (59.8)	179 (45.3)	208 (82.5)				
<b>Patološki stadijum</b>							
pTa	201 (31.1)	169 (42.8)	32 (12.7)			<b>&lt;0.001</b>	
pT1	296 (45.7)	165 (41.8)	131 (52.0)			<b>0.007</b>	
≥pT2	150 (23.2)	61 (15.4)	89 (35.3)			<b>&lt;0.001</b>	
<b>Carcinoma in situ</b>							
Prisutan	47 (7.3)	15 (3.8)	32 (12.7)			<b>&lt;0.001</b>	
Nije prisutan	600 (92.7)	380 (96.2)	220 (87.3)				
<b>Divergentna diferencijacija</b>							
Skvamozna	58 (9.0)	28 (7.1)	30 (11.8)			<b>0.027*</b>	
Glandularna	12 (1.9)	3 (0.8)	9 (3.6)			<b>0.032**</b>	
Ostalo	17 (2.5)	7 (1.7)	10 (4.0)				
Nije prisutna	560 (86.6)	357 (90.4)	203 (80.6)			<b>&lt;0.001</b>	
<b>Cistitis u okolini</b>							
Prisutan	106 (16.4)	62 (15.7)	44 (17.5)			0.313	
Nije prisutan	541 (83.6)	333 (84.3)	208 (82.5)				
<b>Obilan limfocitni infiltrat</b>							
Prisutan	45 (7.0)	20 (5.1)	25 (9.9)			<b>0.014</b>	
Nije prisutan	602 (93.0)	375 (94.9)	227 (90.1)				
<b>Obilan polimorfonuklearni infiltrat</b>							
Prisutan	13 (2.0)	2 (0.5)	11 (4.4)			<b>0.001</b>	
Nije prisutan	634 (98.0)	393 (99.5)	241 (95.6)				

\*Skvamozna diferencijacija u odnosu na sve ostale tumore

\*\*Glandularna diferencijacija u odnosu na sve ostale tumore





**Slika 20. Imunohistohemijska ekspresija EZH2 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike.** Visoka ekspresija EZH2 prikazana je u levoj koloni, a niska ekspresija u desnoj: (A, B) neinvazivni papilarni karcinom, pTa; (C, D) superficijalno invazivni karcinom, pT1; (E, F) mišićno–invazivni urotelni karcinom, pT2. Pozitivna ekspresija EZH2 u tumorskim ćelijama manifestovala se nuklearnim bojenjem varijabilnog intenziteta. (Originalno uvećanje x400).

U analizi korelacije ekspresije EZH2 sa kliničkim karakteristikama pacijenata (Tabela 27) nađeno je da tumori sa visokom ekspresijom EZH2 imaju tendenciju da ostaju klinički naparentni i bivaju detektovani akcidentalno, radološkim pregledom male karlice ili, ređe, nespecifičnim dizuričnim tegobama. Ekspresija EZH2 inverzno korelira sa pojavom hematurije ( $p=0,005$ ).

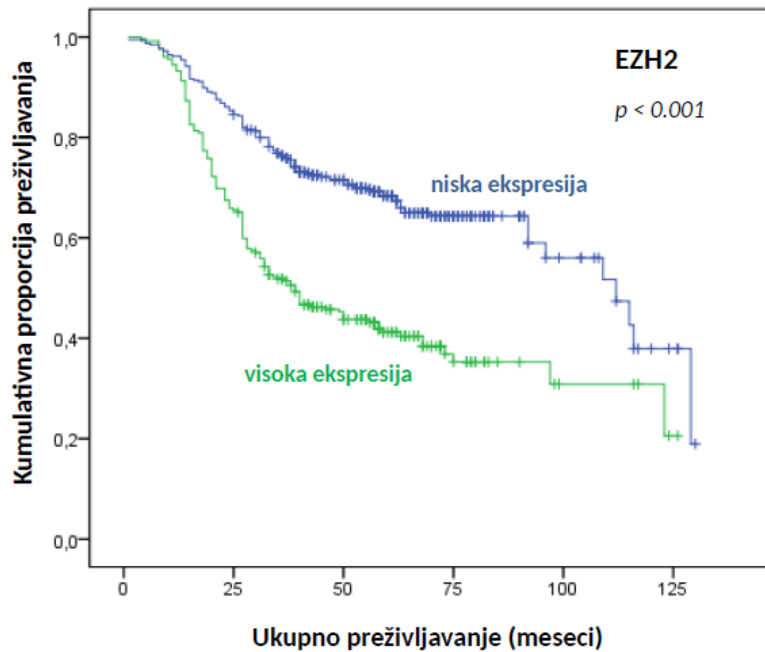
Ekspresija EZH2 sa visokom statističkom značajnošću ukazuje na kancer-specifični mortalitet ( $p<0.001$ ): čak 58,5% pacijenata sa EZH2 pozitivnim tumorima umrlo je od posledica karcinoma, dok visoku ekspresiju markera ima samo 28,2% pacijenata koji su živi na kraju intervala praćenja i 38,8% pacijenata kod kojih se fatalni ishod desio zbog drugih uzroka smrti. Visoka ekspresija EZH2 je snažan indikator da će pacijent biti lečen radikalnom cistektomijom ( $p=0,002$ ) ili sistemskom hemoterapijom i/ili radioterapijom ( $p<0.001$ ).

<b>Tabela 27. Povezanost ekspresije EZH2 sa kliničkim karakteristikama pacijenata</b>							
<i>EZH2 ekspresija</i>		<b>Niska</b>		<b>Visoka</b>		<i>P vrednost</i>	
Ukupno	N (%)	647	(100)	395	(61.1)		252
<b>Klinička prezentacija bolesti</b>							
Hematurija	543	(83.9)	344	(87.1)	199	(79.0)	<b>0.005</b>
Drugo	104	(16.1)	51	(12.9)	53	(21.0)	
<b>Recidiv bolesti</b>							
Da	244	(37.7)	156	(39.5)	88	(34.9)	0.138
Ne	403	(62.3)	239	(60.5)	164	(65.1)	
<b>Kancer-specifični mortalitet</b>							
Da	200	(30.9)	83	(21.0)	117	(46.4)	<b>&lt;0.001</b>
Drugi uzrok smrti	85	(13.1)	52	(13.2)	33	(13.1)	
Živ	362	(56.0)	260	(65.8)	102	(40.5)	
<b>Lečenje (terapijski modalitet)</b>							
TUR	122	(18.9)	82	(20.8)	40	(15.9)	0.073
Intravezikalna BCG	303	(46.8)	210	(53.2)	93	(36.9)	<b>&lt;0.001</b>
Cistektomija	101	(15.6)	48	(12.2)	53	(21.0)	<b>0.002</b>
Hemo/radioterapija	121	(18.7)	55	(13.9)	66	(26.2)	<b>&lt;0.001</b>

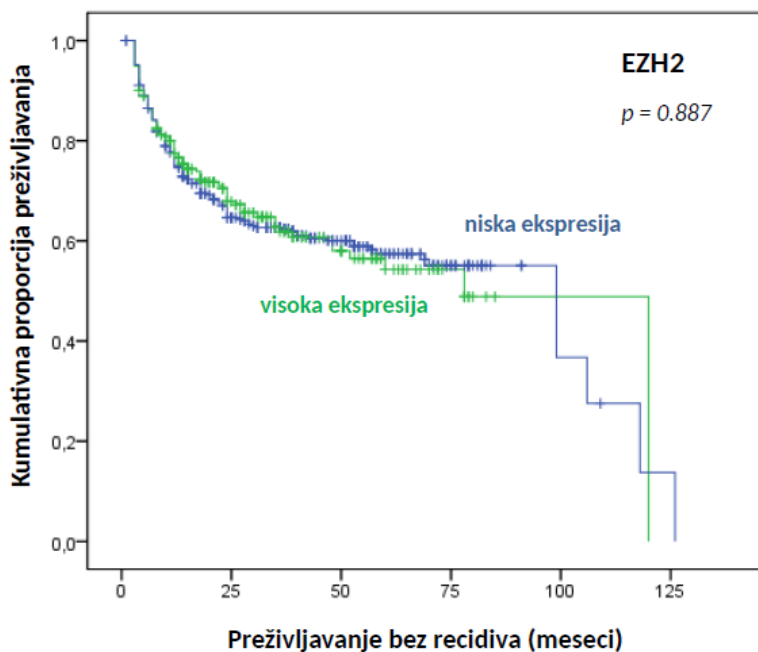
### 5.5.2. Asocijacija ekspresije EZH2 sa preživljavanjem pacijenata

Visoka ekspresija EZH2 je direktan prediktor kraćeg OS ( $p<0.001$ ). Srednje OS pacijenata sa EZH2 pozitivnim tumorima je  $61,5\pm 3,4$  meseca, 44% kraće od OS obolelih sa niskom EZH2 tumorskom ekspresijom ( $88,6\pm 3,0$  meseci). EZH2 ekspresija nije značajno povezana sa RFS ( $p=0,887$ ) (Grafikon 14).





**Grafikon 13.** Kaplan–Majerove krive preživljavanja 647 pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bešike u odnosu na ekspresiju EZH2.



**Grafikon 14.** Kaplan–Majerova analiza vremena preživljavanja do pojave recidiva bolesti kod 647 pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bešike u odnosu na ekspresiju EZH2.

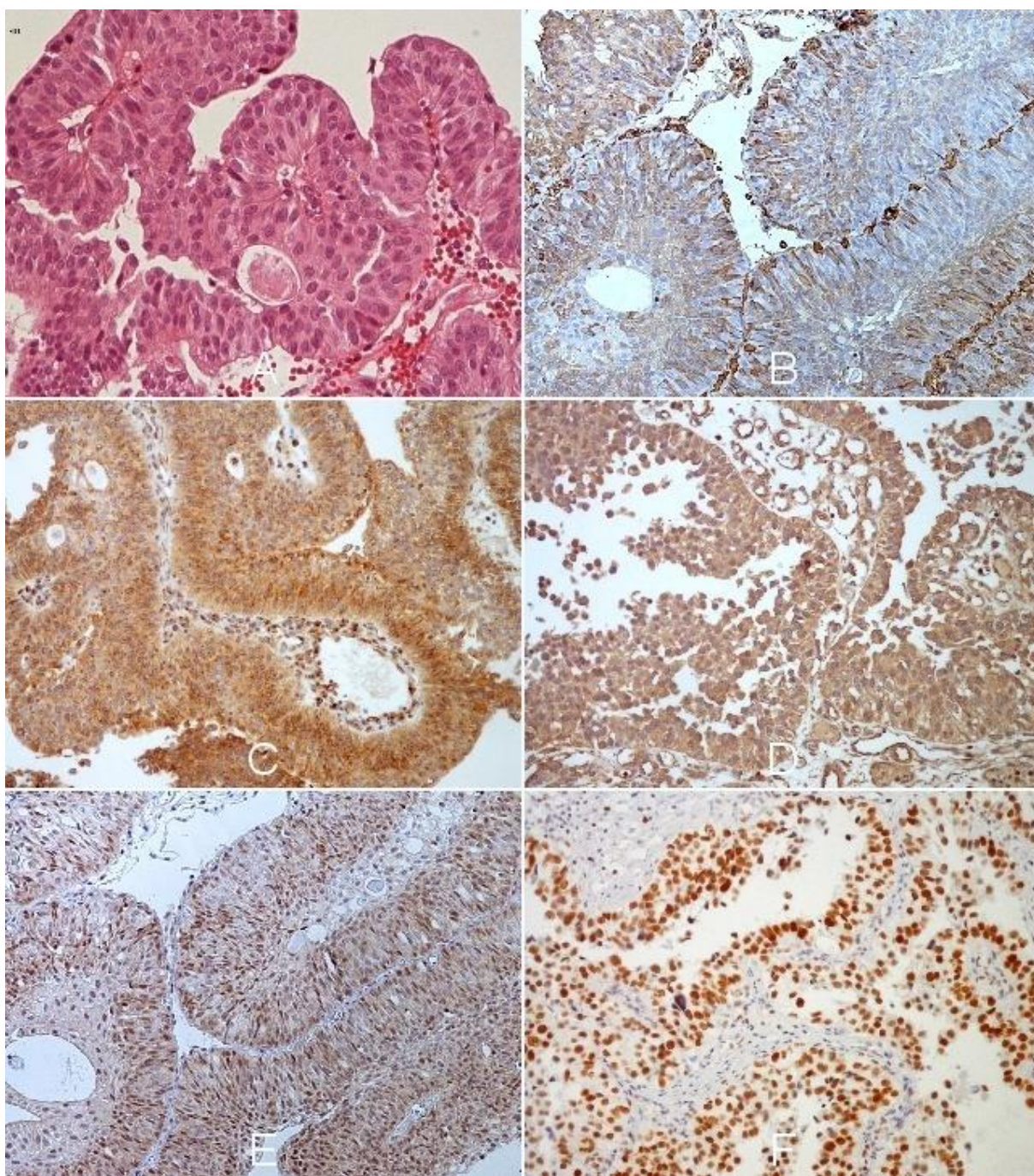
## 5. 6. Analiza međusobne korelacije ekspresije markera

Ekspresija TGF- $\beta$ 1 pozitivno korelira sa ekspresijom Smad4 ( $p=0.044$ ), kao i sa ekspresijom EZH2 ( $p=0,003$ ). Čak 73% tumora sa visokom ekspresijom EZH2 pokazuje visoku imunoreaktivnost na TGF- $\beta$ 1. Primeri imunoprofila tumora različitih stadijuma prikazani su na Slikama 21 – 23.

### 5.6.1. Korelacija TGF- $\beta$ 1 i ćelijskih receptora smrti u urotelnom karcinomu mokraćne bešike

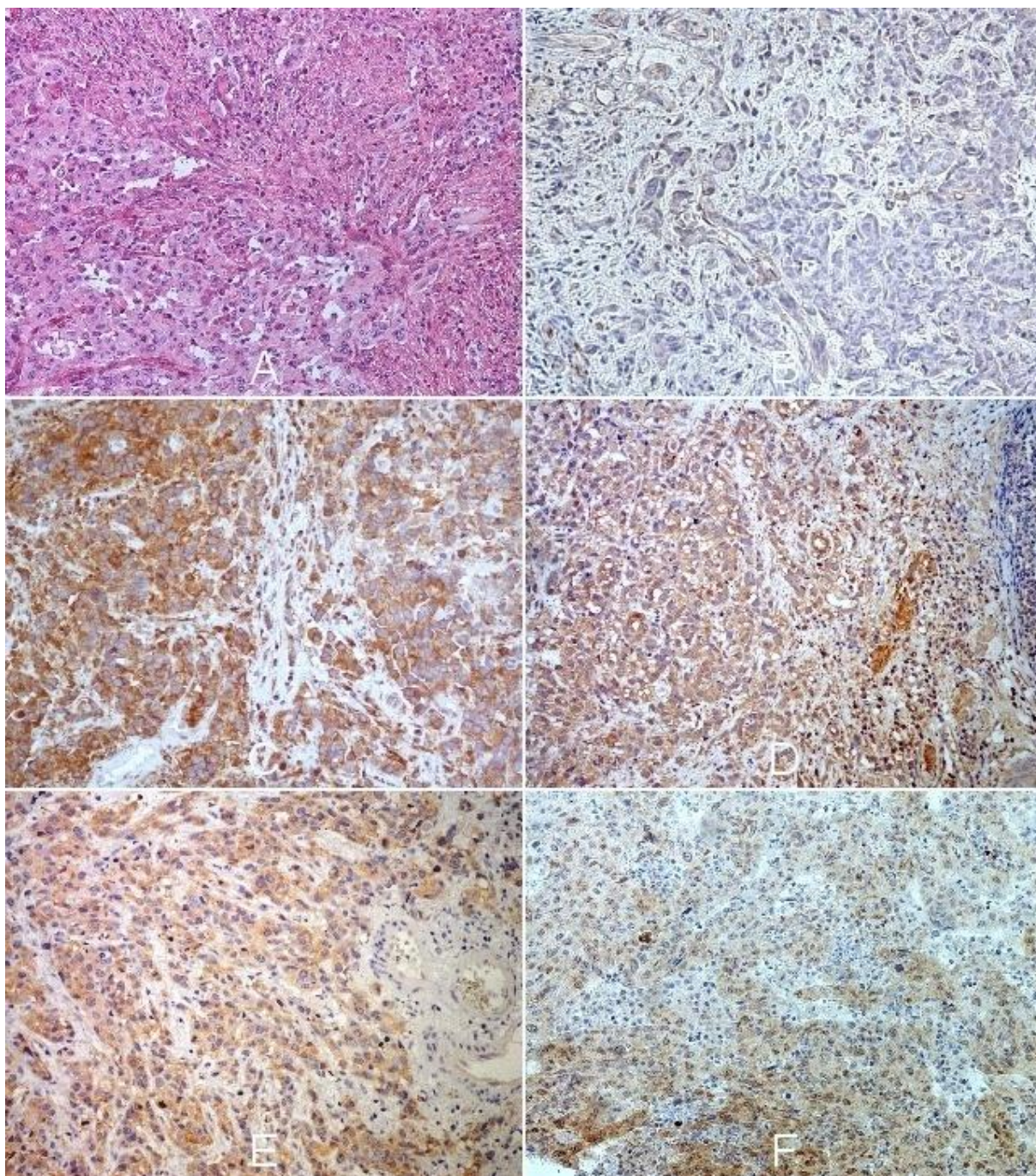
Ekspresija TGF- $\beta$ 1 značajno korelira sa ekspresijom DR5 ( $p=0.006$ ), kao i sa ekspresijom receptora FAS ( $p=0,030$ ), dok asocijacija sa DR4 nije statistički značajna. Međutim, ekspresija sekundarnog prenosioca signala TGF- $\beta$ 1 - Smad4 značajno je direktno asocirana sa ekspresijom sva tri receptora smrti, DR4 ( $p<0,001$ ), DR5 ( $p=0,016$ ) i FAS ( $p<0,001$ ). Redom, 80,7%, 74,1% i 63,3% tumora sa visokom ekspresijom Smad4 istovremeno ekspresira i DR4, DR5 i FAS. Sa druge strane, ekspresija EZH2 povezana je samo sa ekspresijom FAS ( $p<0,001$ ).

Tabela 28. Međusobna povezanost ekspresije markera									
ekspresija	ukupno	TGF- $\beta$ 1		DR4		DR5		FAS	
		Visoka	<i>p</i>	Visoka	<i>p</i>	Visoka	<i>p</i>	Visoka	<i>p</i>
N (%)	647 (100)	430 (66.5)		454 (70.2)		452 (69.9)		354 (54.7)	
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>									
visoka	430 (66.5)	-		298 (65.6)	0.279	315 (69.7)	<b>0.006</b>	247 (69.8)	<b>0.030</b>
niska	217 (33.5)	-		156 (34.4)		137 (30.3)		107 (30.2)	
<b>SMAD4</b>									
visoka	305 (47.1)	192(44.7)	<b>0.044</b>	246 (54.2)	<b>&lt;0.001</b>	226 (50.0)	<b>0.016</b>	193 (54.5)	<b>&lt;0.001</b>
niska	342 (52.9)	238 (55.3)		208 (45.8)		226 (50.0)		161 (45.5)	
<b>EZH2</b>									
visoka	252 (38.9)	184 (42.8)	<b>0.003</b>	174 (38.3)	0.340	184 (40.7)	0,095	164 (46.3)	<b>&lt;0.001</b>
niska	395 (61.1)	246 (57.2)		280 (61.7)		268 (59.3)		190 (53.7)	
<b>DR4</b>									
visoka	454 (70.2)	298 (69.3)	0.279	-		352 (77.9)	<b>0.000</b>	276 (77.9)	<b>0.000</b>
niska	193 (29.8)	132 (30.7)		-		100 (22.1)		78 (22.1)	
<b>DR5</b>									
visoka	452 (69.9)	315 (73.3)	<b>0.006</b>	352 (77.5)	<b>0.000</b>	-		264 (74.6)	<b>0.003</b>
niska	195 (30.1)	115 (26.7)		102 (22.5)		-		90 (25.4)	
<b>FAS</b>									
visoka	354 (54.7)	247 (57.4)	<b>0.030</b>	276 (60.8)	<b>0.000</b>	264 (58.4)	<b>0.003</b>	-	
niska	293 (45.3)	183 (42.6)		178 (39.2)		188 (41.6)		-	



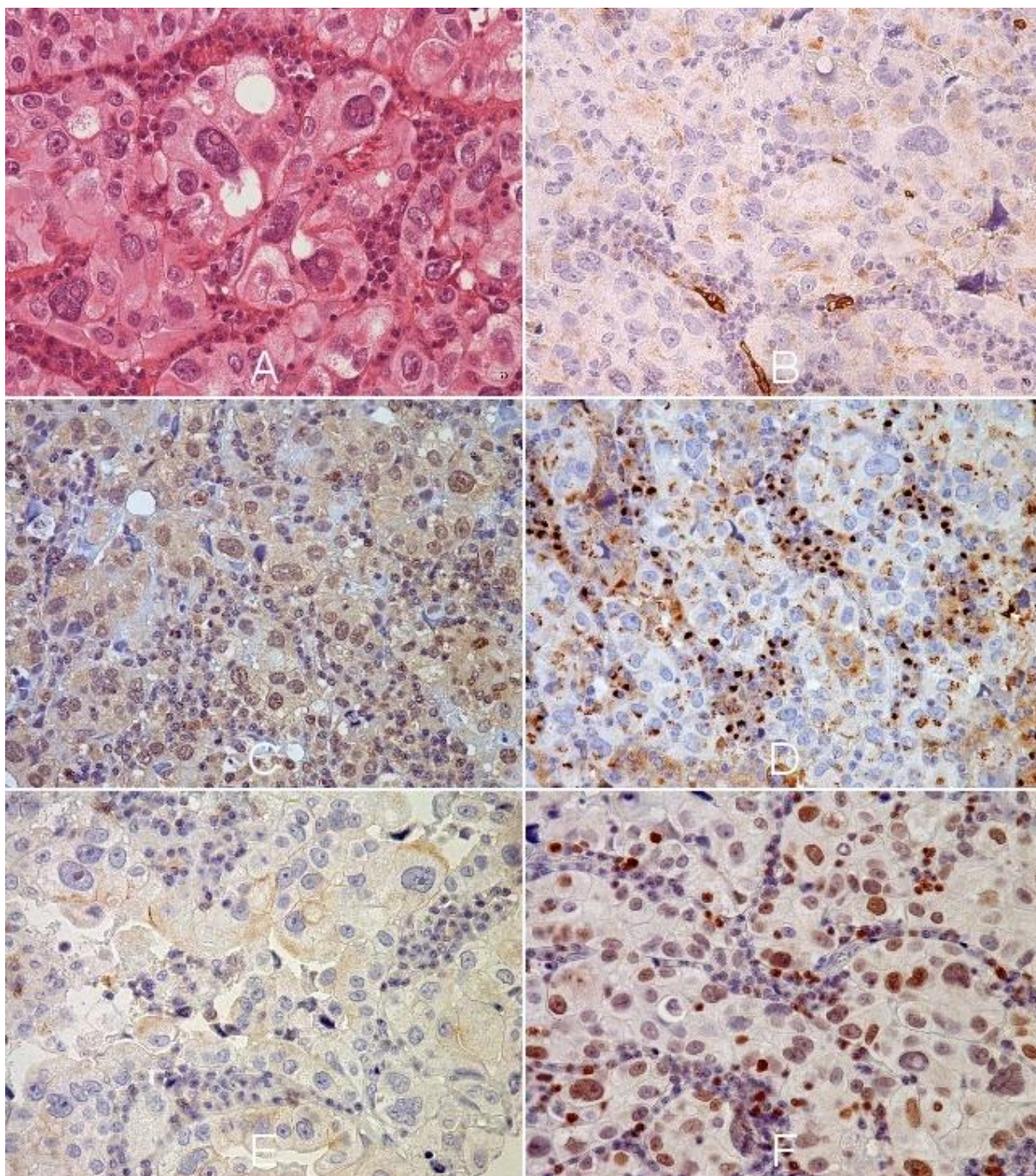
**Slika 21. Primer imunoprofila neinvazivnog papilarnog urotelnog karcinoma.** U ovom tumoru pored očuvane ekspresije receptora smrti, što je svojstveno neinvazivnim neoplazmama, nađena je visoka ekspresija i svih ostalih analiziranih markera. A) H&E bojenje; B) difuzna membranska ekspresija TGF- $\beta$ 1; C) difuzna ekspresija receptora smrti DR4 i D) DR5 u tumorskim ćelijama; E) visoka ekspresija Smad4; F) difuzno nuklearno bojenje na EZH2. (Originalno uvećanje x200).





**Slika 22. Primer imunoprofila infiltrativnog urotelnog karcinoma sa invazijom lamine proprije.** U ovom TGF- $\beta$ 1 negativnom tumoru nađena je simultana ekspresija receptora smrti DR4, DR5 i FAS. A) H&E bojenje; B) negativno bojenje na TGF- $\beta$ 1; C) difuzna ekspresija receptora smrti DR4, D) DR5 i E) FAS u tumorskim ćelijama; F) heterogeno nuklearno i citoplazmatsko bojenje na Smad4. (Originalno uvećanje x200).





**Slika 23. Primer imunoprofila infiltrativnog urotelnog karcinoma sa invazijom tunike muskularis.** Prikazan je slabo diferentovani tumor urotela, mestimično sa gigantskim tumorskim ćelijama i bogatim limfocitnim infiltratom u tumorskoj stromi. A) H&E bojenje; B) fokalna pozitivnost na TGF- $\beta$ 1; C) difuzna citoplazmatska i nuklearna ekspresija Smad4; D) redukovana, fokalna i zrnasta ekspresija DR4, izraženija u limfocitima strome nego u tumorskim ćelijama i E) redukovana ekspresija FAS; F) heterogeno nuklearno bojenje na EZH2, u finalnom skoru reč je o visokoj ekspresiji. (Originalno uvećanje x400).



## 5. 7. Multivarijantna analiza

Multivarijantna analiza uticaja prognostičkih faktora na ukupno OS pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bešike identifikovala je, pored dobro poznatih činilaca udruženih sa kraćim OS (biološka starost pacijenata, visok histološki gradus i invazivni tumorski rast, odnosno visok patološki stadijum) ekspresiju TGF- $\beta$ 1, FAS i EZH2 kao nezavisne prognostičke faktore za OS ( $p=0,017$ ,  $p=0,008$  i  $p=0,016$ , po redosledu). Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 i EZH2 su nepovoljni prognostički faktori, povezani sa kraćim OS, dok visoka ekspresija FAS ima značajno protektivno dejstvo i udružena je sa dužim OS pacijenata.

<b>Tabela 29. Multivarijantna analiza uticaja prognostičkih faktora na ukupno preživljavanje pacijenata – OS (N=647)</b>				
<b>Parametar</b>	<b>Koeficijent B</b>	<b>Koeficijent rizika</b>	<b>Interval poverenja (95% CI)</b>	<b><i>p</i> vrednost</b>
<b>Starost</b> ( $\geq 66$ god)	0.716	2.046	1.552 – 2.697	<b>0.000</b>
<b>Histološki gradus</b> (visok)	0.684	1.982	1.348 – 2.914	<b>0.001</b>
<b>Patološki stadijum</b> (pT1)	0.758	2.135	1.359 – 3.352	<b>0.001</b>
<b>Patološki stadijum</b> (pT2)	1.574	4.826	2.926 – 7.959	<b>0.000</b>
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b> (visoka ekspresija)	0.372	1.451	1.068 – 1.970	<b>0.017</b>
<b>SMAD4</b> (visoka ekspresija)	-0.138	0.871	0.674 – 1.125	0.290
<b>DR4</b> (visoka ekspresija)	-0.043	0.958	0.737 – 1.246	0.750
<b>DR5</b> (visoka ekspresija)	-0.077	0.926	0.713 – 1.203	0.566
<b>FAS</b> (visoka ekspresija)	-0.339	0.713	0.555 – 0.916	<b>0.008</b>
<b>EZH2</b> (visoka ekspresija)	0.305	1.357	1.058 – 1.741	<b>0.016</b>

Multivarijantna analiza uticaja prognostičkih faktora na preživljavanje pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bežike do pojave recidiva nije ukazala ni na jedan faktor koji statistički značajno predviđa RFS. Visoka ekspresija DR5 za 26,5% povećava rizik za kraće RFS, ali ovaj uticaj se ne može smatrati nezavisnim ( $p=0,126$ ).

<b>Tabela 30. Multivarijantna analiza uticaja prognostičkih faktora na preživljavanje pacijenata do pojave recidiva – RFS (N=647)</b>				
<b>Parametar</b>	<b>Koeficijent B</b>	<b>Koeficijent rizika</b>	<b>Interval poverenja (95% CI)</b>	<b><i>p</i> vrednost</b>
<b>Starost</b> ( $\geq 66$ god)	-0.056	0.946	0.730 – 1.225	0.671
<b>Histološki gradus</b> (visok)	-0.035	0.965	0.700 – 1.331	0.830
<b>Patološki stadijum</b> (pT1)	0.036	1.036	0.747 – 1.437	0.831
<b>Patološki stadijum</b> (pT2)	-0.305	0.737	0.448 – 1.214	0.231
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b> (visoka ekspresija)	-0.101	0.904	0.684 – 1.193	0.475
<b>SMAD4</b> (visoka ekspresija)	0.192	1.212	0.931 – 1.577	0.153
<b>DR4</b> (visoka ekspresija)	-0.230	0.794	0.590 – 1.070	0.130
<b>DR5</b> (visoka ekspresija)	0.235	1.265	0.936 – 1.709	0.126
<b>FAS</b> (visoka ekspresija)	0.031	1.032	0.788 – 1.351	0.820
<b>EZH2</b> (visoka ekspresija)	0.053	1.054	0.785 – 1.417	0.725

## 6. Diskusija

---

Svake godine dijagnostikuje se oko 430.000 slučajeva karcinoma mokraćne bešike širom sveta. Od toga 70-80% pacijenata ima površne urotelne tumore, odnosno urotelne karcinome koji infiltruju samo laminu propriju mukoze bešike, bez invazije mišićnog sloja. Oko polovine novodijagnostikovanih pacijenata će u narednih pet godina od dijagnoze razviti relaps bolesti, odnosno recidiv, dok će 10-30% imati progresiju u sekundarni mišićno-invazivni tumor. Na kraju, 10-15% pacijenata koji dobiju dijagnozu NMIBC umire od karcinoma bešike (345, 346).

Ovo istraživanje obuhvatilo je 647 urotelnih karcinoma mokraćne bešike, konsekutivno dijagnostikovanih u toku šestogodišnjeg perioda kod pacijenata iz regiona Jugoistočne Srbije. Skoro polovina pacijenata sa NMIBC (49,1%) razvila je recidiv bolesti u toku perioda praćenja, od čega trećina pacijenata čak i multiple recidive. Udeo mišićno-invazivnih tumora pri inicijalnoj transuretralnoj resekciji je bio 23,2%, što je slično rezultatima u drugim evropskim populacijama (345, 346).

Specifičnost grupe ispitivane u ovom istraživanju jeste da je značajan udeo tumora (12,4%) dijagnostikovanih kod pacijenata poreklom sa geografskih područja balkanske endemske nefropatije, odnosno iz naselja u slivu Južne Morave koja su epidemiološkim studijama označena kao endemska ili hipoendemska za BEN (339, 341). BEN je familijarna hronična tubulo-intersticijska bolest bubrega, podmuklog početka i hroničnog toka, sa razvojem terminalne bubrežne insuficijencije u šestoj ili sedmoj dekadi života, udružena sa visokom incidencom urotelnih tumora gornjeg urotelijuma (339-342). BEN je u drugoj polovini XX veka imao visoku prevalencu u slivovima reka Dunava, Save i Južne Morave. Iako je prevalenca u opadanju, obimna istraživanja etiologije i patogeneze BEN rezultovala su zaključkom da je BEN jedno od lica nefropatije uzrokovane hroničnom intoksikacijom aristolohijskom kiselinom, što je svrstalo BEN u grupu rasprotranjene, a relativno slabo razjašnjene i često neprepoznate aristolohijske nefropatije koja je odgovorna za bubrežnu insuficijenciju i nastanak karcinoma gornjeg urotela na globalnom nivou (347, 348). Kancerogeno dejstvo aristolohijske kiseline bazira se na formiranju DNK-*adukta* deoksiadenozin-aristolaktama, kao i na mutacionoj transverziji A:T → T:A na *TP53* tumor supresorkom genu (348). Nađeno je da tumori gornjeg urotela obolelih sa endemskih područja imaju specifične molekularne abnormalnosti, uključujući i poremećaj unutrašnjeg,

mitohondrijalnog puta apoptoze (347, 349). Iako još uvek nije jasno dokazana asocijacija endemske nefropatije i urotelnih tumora mokraćne bešike, u ovoj studiji posebno je analizirana ekspresija ispitivanih markera u tumorima pacijenata poreklom sa endemskih područja. Tumori obolelih sa endemskih područja imali su značajno nižu ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u odnosu na ostale tumore (55,0% vs. 68,1%), dok je nasuprot tome ekspresija Smad4 bila viša u endemskim tumorima, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Endemska nefropatija karakteriše se izraženim fibroziranjem bubrežnog intersticijuma, te bi prekomerno stvaranje TGF- $\beta$ 1, koji je ključni pokretač fibroze u hroničnoj inflamaciji, mogao biti zajednička determinanta koja povezuje endemsku nefropatiju i urotelnu karcinogenezu. Niska ekspresija TGF- $\beta$ 1 u tumorima sa endemskih područja mogla bi da bude uzrokovana saturacijom tumorske mikrookoline visokim nivoima TGF- $\beta$ 1 koje sekretuje okolna stroma. Nije nađena razlika u ekspresiji receptora smrti među tumorima porekla sa endemskih in ne-endemskih područja. Ovakvi rezultati bi indirektno mogli da upućuju na saznanje da urotelni karcinomi mokraćne bešike nastali u endemskom području imaju slične molekularne karakteristike kao tumori gornjeg urotela, te da je u njihovoj patogenezi dominantna disrupcija mitohondrijalnog puta apoptoze, na šta ukazuju alteracije p53, Bax i Survivina (347, 349).

Prema aktuelnim podacima, ukupno petogodišnje preživljavanje za pacijente sa karcinomom bešike je 77%, za mišićno-invazivnu bolest 69%, lokalno proširenu sa zahvatanjem okolnih limfnih nodusa 35%, a sa udaljenim metastazama svega 5% (4). Dužina preživljavanja kod pacijenata u našem istraživanju je nešto kraća (Tabela 9). Faktori koji ovu diskrepancu objašnjavaju su brojni, a pre svega posledica kontinuiranog, progresivnog napretka u dijagnostici i lečenju malignih bolesti, koje je bazirano na širokim osnovama socio-ekonomskog napretka i podizanja svesti o preventabilnosti i lečivosti kancera i opštoj zdravstvenoj kulturi u generalnoj populaciji. Pacijenti koji su obuhvaćeni ovim istraživanjem dijagnostikovani su i lečeni pre više od decenije, a mnogi od njih su navodili višegodišnje prisustvo krvi u mokraći kao vodeći simptom, koji je, nažalost, često bio ignorisan. Pored toga, ova studija je bazirana na hirurškim tkivnim uzorcima dobijenim transuretralnom resekcijom, koja je bila dijagnostička. Rezultat limitacije histopatološke analize resekata tumorskog tkiva je da su tumori označeni kao grupa sa patološkim stadijumom  $\geq$ pT2 u stvari heterogena populacija neoplazmi, koja verovatno dominantno obuhvata pT2 mišićno-invazivne tumore, ali i karcinome sa infiltracijom perivezikalnog masnog tkiva i lokalnim i udaljenim, metastatskim širenjem.

Iako su ukupne stope smrtnosti u stalnom padu za sve maligne bolesti, socio-ekonomske nejednakosti su sve izraženije na globalno nivou, te se jaz u stopama mortaliteta za mnoge tumore čak i produbljuje, kao što je to slučaj kod karcinoma grlića materice i karcinoma pluća i jetre koji imaju 40% veći mortalitet u siromašnim i nerazvijenim zemljama (4). Pored fundamentalne važnosti dostupnosti i kvaliteta zdravstvene zaštite, i drugi faktori imaju značaj u dužini preživljavanja, na prvom mestu same inherentne, biološke karakteristike malignog tumora. Analiza trenda petogodišnjeg preživljavanja kod karcinoma mokraćne bešike u Sjedinjenim Američkim Državama u periodu od 1973. do 2009. godine pokazala je da je preživljavanje sve duže u svakom od stadijuma bolesti, izuzev za metastatski karcinom bešike, gde nije zabeležen značajniji pomak (350). Jasno je da su nužni novi i inovativni terapijski pristupi kako bi se pobedila ova smrtonosna bolest. Nova saznanja o molekularnim karakteristikama i heterogenosti urotelnog karcinoma otvaraju nove mogućnosti ne samo za personalizovan i efikasniji terapijski pristup, već i za bolju i precizniju prognozu i praćenje bolesti. Zato je analiza ekspresije biomarkera značajnih za patogenezu tumora osnovni istraživački princip u bazičnim naukama, čija bi translacija u kliničku praksu mogla imati neprocenjivi značaj.

## **6.1. Analiza ekspresije TGF- $\beta$ 1 i značaj TGF- $\beta$ signalizacije u urotelnom karcinomu**

TGF- $\beta$  se u fiziološkim uslovima i ranim fazama razvoja karcinoma ponaša kao moćni tumor-supresor. Citostatski efekti TGF- $\beta$ , koji podrazumevaju inhibiciju ćelijskog ciklusa stimulacijom ekspresije inhibitora ciklin zavisnih inaza, indukciju apoptoze i prevenciju imortalizacije ćelija obično bivaju izgubljeni tokom progresije bolesti. Većina kancera u humanoj patologiji je rezistentna na citostatske efekte TGF- $\beta$  usled genetskih i epigenetskih modifikacija komponenti TGF- $\beta$  signalnog puta ili razvije rezistenciju usled aktivacije proonkogenih signalnih puteva (MAPK; PI3K, Ras, c-MYC), koji onda jednostavno prevaziđu inhibitorne signale, uključujući TGF- $\beta$ /Smad signalizaciju (248, 299). U međuvremenu prevladaju drugi odgovori TGF- $\beta$  signalizacije, nevezani za tumor-supresorske efekte, koji deluju u korist tumorske progresije i metastaziranja.

TGF- $\beta$  signalni put uključen je u različite aspekte patoloških procesa razvoja tumora, promocije tumorskog rasta i metastatskog širenja, uključujući tumorigenezu i progresiju urotelnog karcinoma mokraćne bešike. Nekoliko studija ispitalo je uticaj genetske



varijabilnosti komponenti TGF- $\beta$  puta na rizik za razvoj karcinoma mokraćne bešike (259, 258, 260). Iako je u drugim tumorima utvrđeno da genetski polimorfizmi jednog nukleotida koji se javljaju na genima za receptore TGFBR1 i TGFBR2 značajno povećavaju rizik za nastanak karcinoma, pre svega tumora dojke i jajnika, ova asocijacija kod tumora bešike nije nađena. Studija koja je ispitivala 7 različitih varijanti receptora za TGF- $\beta$  pokazala je da ni jedan od ispitivanih SNP u genima za receptore ne povećava rizik za razvoj tumora, ali zato polimorfizam za *TGFBR1*: rs868, koji je lociran na 3' regionu gena koji se ne prevodi u aminokiselinsku sekvencu, značajno ukazuje na veći kancer-specifični mortalitet u grupi mišićno invazivnih tumora (358). Analiza SNP u genu *RUNX3*, koji je jedna od najznačajnijih nishodnih meta TGF- $\beta$ , a jedan je od značajnijih tumor supresora u humanom genomu, pokazala je da je SNP7 rs760805 AA genotip značajno povećava rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike (260). Nedavno objavljena studija obuhvatila je najširu analizu značaja genetske varijabilnosti u komponentama TGF- $\beta$  puta na urotelni karcinom mokraćne bešike (259). Autori su identifikovali 356 SNP-a u 37 ključnih gena uključenih u TGF- $\beta$  signalizaciju i analizirali njihovu učestalost i značaj kod 801 pacijenta sa karcinomom bešike i isto toliko zdravih ljudi. Iako je inicijalno 41 SNP prepoznat kao značajan za rizik od karcinoma, nakon prilagođavanja rezultata u odnosu na multiple parametre, nađeno je da devet polimorfizama značajno povećava rizik za nastanak karcinoma bešike, a oni su locirani na genima *SMAD3*, genu za epidermalni faktor rasta *EGFR*, kao i genu za izoformu vaskularnog faktora rasta *VEGFC* (259).

TGF- $\beta$  put ima dualne anti- i pro-tumorske uloge i aktivnosti na nivou kancerske ćelije koje zavise od stadijuma tumora i mreže genetskih alteracija. Između različitih tipova tumora su uglavnom na animalnim modelima utvrđene mehanicističke razlike u načinu transformacije TGF- $\beta$  signalizacije. Dok kod kolorektalnog karcinoma i karcinoma pankreasa dolazi do inaktivacije antitumorskih aktivnosti TGF- $\beta$  puta tako što dolazi do alteracija u ključnim komponentama TGF- $\beta$  signalizacije, kao što su *TGFBR2* ili *SMAD4*, u drugim tumorima, kao što su karcinomi dojke, prostate, kod melanoma i glioma mozga, ove ključne komponente TGF- $\beta$  ostaju intaktne, već do deregulacije dolazi na nivou neke od nishodnih grana signalne kaskade, koja ima tumor supresorsku ulogu. Zbog ove složenosti same TGF- $\beta$  signalizacije u kanceru, a u kombinaciji sa genetskom heterogenošću tumora, veoma je teško predvideti efekte TGF- $\beta$  puta u kancerskoj ćeliji (219, 224, 351).

TGF- $\beta$  paradoks je deskriptivni pojam kojim se označava funkcionalni prekidač koji podrazumeva transformaciju aktivnosti TGF- $\beta$  signalizacije iz anti-tumorske u onkogenu.

Skup genetskih i epigenetskih alteracija i aberacija u tumorskoj mikrosredini koalesciraju da omogućuće ovu suštinsku promenu aktivnosti TGF- $\beta$  (238). TGF- $\beta$  zatim usmerava metastatsku progresiju putem stimulacije EMT, koja omogućava kancerskim ćelijama da napuste polarizovani epitelni fenotip u korist apolarnih mezenhimnih fenotipova. Ovaj kompleksan transdiferencijacioni proces indukovano TGF- $\beta$  odvija se uz učešće brojnih signalnih molekula, transkripcionih faktora, mikroRNK. Pored toga što EMT osposobljava tumorske ćelije da izmenom fenotipskih svojstava vrše invaziju i sistemski se diseminuju, ona takođe daje transformisanim ćelijama i svojstva matičnosti, odnosno karakteristike stem ćelija, uključujući sposobnost za samoobnavljanje, tumor–inicirajući kapacitet i hemorezistenciju (220, 236–238).

TGF- $\beta$  signalizacija odvija se putem Smad–zavisnih, takozvanih kanonskih ili klasičnih TGF- $\beta$  puteva, ili putem Smad–nezavisnih puteva. TGF- $\beta$  signalizacija posredovana je TGF- $\beta$  ligandima, receptorima tipa I i tipa II, Smad i brojnim non-Smad proteinima. Najznačajniji medijatori ne–kanonske TGF- $\beta$  signalizacije su Akt, ekstracelularnim signalom regulisana kinaza (ERK1/2) i p38 mitogenom aktivirana protein kinaza. U humanim ćelijama postoji tri izoforme TGF- $\beta$  lignada, čiju sintezu kodira tri različita gena i koji funkciju ostvaruju kroz iste signalne kaskadne sisteme, ali je najzastupljeniji i najznačajniji TGF- $\beta$ 1, koji je ujedno najčešće prekomerno eksprimiran u kancerskoj ćeliji (235). Stoga je cilj ovog istraživanja bila upravo analiza TGF- $\beta$ 1, ključne efektorske komponente TGF- $\beta$  signalizacije. Rezultati su pokazali da je TGF- $\beta$ 1 široko eksprimiran u urotelnom karcinomu, u formi membranskog i citoplazmatskog bojenja, koje se detektuje u dve trećine tumora (Slike 15, 21–23). Ekspresija TGF- $\beta$ 1 zabeležena je ne samo u tumorskom parenhimu, već i u okolnoj stromi, u vidu imunoreaktivnosti fibrilarnih komponenti ekstracelularnog matriksa, ali i kao membransko bojenje imunih i vezivnotkivnih ćelija.

Jedna od najranijih studija koja je ispitivala ekspresiju TGF- $\beta$ 1 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike, utvrdila je q-PCR metodom da je nivo ekspresije TGF- $\beta$ 1 mnogo veći u kancerskom tkivu nego u okolnom normalnom urotelu (262). U ovom istraživanju nađeno je da je nivo ekspresije TGF- $\beta$ 1 u tumorima visokog gradusa i uznapredovalog patološkog stadijuma relativno nizak, ali da je ekspresija povišena kod neoplazmi niskog histološkog gradusa i kod pTa i pT1 tumora. Miyamoto i saradnici zaključili su da je visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 stoga marker ranih faza tumorigeneze urotelnog karcinoma. Rezultat naše studije ukazuju na potpuno suprotne zaključke. Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 nedvosmisleno je udružena sa tumorima visokog histološkog gradusa i mišićno–invazivnim stadijumom tumora,

iako značajan procenat neinvazivnih, papilarnih neoplazmi takođe pokazuje difuznu TGF- $\beta$ 1 ekspresiju. Ove diskrepance mogu biti posledica brojnih faktora, pre svega metodoloških razlika. U ovom istraživanju korišćen je imunohistohemijski metod za analizu TGF- $\beta$ 1, dok su japanski naučnici kvantitativnom PCR metodom ispitali nivo ekspresije TGF- $\beta$ 1, ali u daleko manjem studijskom uzorku. Pored toga, od vremena kada je ova pionirska studija izvedena došlo je do velikih saznanja o etiopatogenezi i molekularnom profilu karcinoma bešike, koji se više ne može posmarati kao homogeni patološki entitet. Miyamoto i kolege grupisali su kao rane tumore karcinome stadijuma pTa i pT1, a u savremenoj uropatologiji ova dva entiteta se značajno razlikuju. Naime, pT1 tumori, karcinomi koji su infiltrisali laminu popriju mukoze, dominantno su tumori visokog gradusa i mogu se stratifikovati prema dubini invazije proprije i molekularnom profilu a više grupe, te su često sličniji svojim osobinama i ponašanjem mišićno–invazivnim tumorima, nego LG papilarnim neoplazmama bešike. Pored toga, u japanskoj studiji ispitivani su samo karcinomi klasične urotelne histologije, jer su tumori sa varijantnom skvamoznom diferencijacijom isključeni iz studije, na osnovu prethodno objavljenih rezultata da je u skvamocelularnom karcinomu glave i vrata zabeležen visok nivo TGF- $\beta$ 1, što utiče na selektivnost uzorka (262). Sa druge strane, nalaz visoke ekspresije TGF- $\beta$ 1 u tumorima različitih stadijuma, tj. i u neinvazivnim i u mišićno-infiltrativnim tumorima, može da predstavlja refleksiju divergentne uloge TGF- $\beta$  u različitim fazama tumorskog razvoja, odnosno da odražava izraziti plejotropizam TGF- $\beta$ 1, koji može imati kompletno suprotne uloge u urotelnoj karcinogenezi, supresivne u ranim fazama tumorigeneze, a suportivne i pro-tumorske u uznapredovalim stadijumima tumorske progresije.

U studiji Kima i saradnika (263) imunohistohemijski je analizirana ekspresija TGF- $\beta$ 1 i njegovih receptora TGFBR1 i TGFBR2 kod 80 uzoraka urotelnog karcinoma mokraćne bešike dobijenih radikalnom cistektomijom sa resekcijom regionalnih limfnih nodusa. U njihovoj studiji ekspresija TGF- $\beta$ 1 je bila izmenjena u 64% slučajeva ispitivanih tumora, što je slično rezultatima ovog istraživanja. Pored toga, prekomerna ekspresija TGF- $\beta$ 1 značajno je korelirala sa invazivnim tumorskim stadijumom. Naime, Kim i saradnici stratifikovali su tumore u samo dve grupe, prvu koja je obuhvatana neinvazivne i superficijalno invazivne tumore (pTa, CIS, pT1) i drugu grupu gde su svrstavani tumori sa invazijom mišićnog sloja detrusora i okolnih tkiva (pT2-pT4). U ovom istraživanju klasifikacija umora je bila preciznija, tumori su stratifikovani na osnovu aktuelnog izdanja WHO klasifikacije tumora bešike, bez agregacije biološki različitih neoplazmi u jedinstvenu grupu, npr. CIS, koji je

visoko gradusni tumor sa velikom stopom progresije i pTa papilarnih tumora, sa stopom progresije oko 10%. Naši rezultati pokazuju da i kada se primenjuje ovako precizna stadijumska klasifikacija urotelnih tumora, postoji značajna korelacija imunohistohemijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa stadijumom. Naime, TGF- $\beta$ 1 je kod nas bio pozitivan u 47.8% neinvazivnih tumora, 73.6% tumora sa infiltracijom subepitelnog vezivnog tkiva beške i 77.3% mišićno-invazivnih tumora, sa visoko značajnom razlikom između superficijalnih i infiltrativnih urotelnih tumora.

Za razliku od studije Kima i saradnika (263) koji nisu pronašli asocijaciju tumorskog gradusa i ekspresije TGF- $\beta$ 1, u našem istraživanju TGF- $\beta$ 1 je sa visokom značajnošću korelirao sa visokim histološkim gradusom. Ovakve razlike bi mogle biti posledica dihotomizacije tumora u odnosu na korišćen sistem gradusne klasifikacije urotelnih karcinoma. Dok smo mi podelili tumore na tumore niskog i visokog histološkog gradusa, u skladu sa aktuelnim klasifikacijama (17, 55), kod američkih autora objedinjeni su tumori gradusa 1 i 2, a drugu grupu činili su tumori gradusa 3. Danas je usvojeno da je preciznija stratifikacija tumora gradusa 2 neophodna, jer ovakva oznaka pokriva spektar neoplazmi koje se danas dele na LG i HG tumore. Između ostalog, Kim i saradnici su utvrdili da je prekomerna ekspresija TGF- $\beta$ 1 statistički značajno udružena sa redukcijom i gubitkom ekspresije receptora TGFBR1 i TGFBR2 (263).

Jedan od osnovnih ciljeva ove studije bio je određivanje prognostičkog značaja imunohistohemijske ekspresije TGF- $\beta$ 1. Rezultati su pokazali da ekspresija TGF- $\beta$ 1 predstavlja nezavisni prediktor kraćeg ukupnog preživljavanja pacijenata i lošije prognoze. Utvrđeno je da postoji značajna razlika u preživljavanju pacijenata sa TGF- $\beta$ 1 negativnim tumorima ili tumorima sa slabom ekspresijom, koji imaju prosečno 8 meseci duže preživljavanje od pacijenata sa visokom tumorskom ekspresijom TGF- $\beta$ 1. Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 značajno je asocirana sa kancer-specifičnim mortalitetom. Čak 76,5% pacijenata koji su umrli od posledica karcinoma imali su visoku ekspresiju TGF- $\beta$ 1 nasuprot 64,3% onih koji su živi na kraju perioda praćenja.

Prva studija koja je ispitivala prognostički značaj TGF- $\beta$ 1 u kohorti pacijenata sa dugogodišnjim praćenjem nakon radikalne cistektomije, obuhvatila je 80 uzoraka karcinoma koji su imunohistohejski analizirani na ekspresiju TGF- $\beta$ 1 i njegovih receptora (263). Analiza kliničkog ishoda bolesti u funkciji imunohistohemijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 pokazala je da postoji značajna korelacija prekomerne ekspresije TGF- $\beta$ 1 i povećane verovatnoće za

tumorsku progresiju. U multivarijantnoj Cox proporcionalnoj analizi rizika koja je uključivala patološki stadijum, gradus, limfovaskularnu invaziju, status limfnih nodusa i tri ispitivana TGF- $\beta$  asocirana molekula, TGFBR1 bio je jedini nezavisni prognostički indikator progresije bolesti i smrtnog ishoda povezanog sa urotelnim karcinomom. Međutim, za razliku od gubitka TGFBR1 koji je značajno ukazivao na kraće kancer-specifično preživljavanje, u toj studiji TGF- $\beta$ 1 status nije bio asociran značajno sa kancer specifičnim preživljavanjem. Nasuprot tome, naši rezultati analize 647 tumora mokraćne beške su pokazali da postoji značajna korelacija TGF- $\beta$ 1 sa kliničkim ishodom bolesti.

U studiji koja je analizirala značaj TGF- $\beta$  signalizacije *in vivo*, na mišjem animalnom modelu karcinoma mokraćne beške indukovanim N-butil-N-4-hidroksibutil nitrozaminom (BBN), ispitana je uloga TGF- $\beta$  u invazivnosti i progresiji tumora (269). Deplecija receptora za TGF- $\beta$ , TGFBR2, rezultovala je smanjenjem invazivnosti kod infiltrativnih urotelnih karcinoma prouzrokovanih BBN-om. Pored toga, hemijska inhibicija TGF- $\beta$ , aplikacijom specifičnog sintetskog inhibitora TGF- $\beta$  receptora 1, takođe je smanjivala progresiju karcinoma beške. Inhibicija TGFBR2 u eksperimentalnom animalnom modelu dovela je i do nishodne regulacija fosforilisanog oblika proteina Smad2 u tumorskim ćelijama, što je bilo u korelaciji sa porastom apoptoze i smanjenjem proliferacije.

Indukcija EMT je jedan od mehanizama kojim TGF- $\beta$  može da stimuliše tumorski invazivni rast i omogući metastatsku diseminaciju. Epitelne tumorske ćelije koje prolaze EMT zadobijaju nova fenotipska svojstva koja ih čine invazivnijim, što omogućava veći motilitet kancerskih ćelija i njihovo širenje sa primarne lokalizacije u udaljena tkiva i organe. TGF- $\beta$  indukuju ekspresiju svih poznatih transkripcionih faktora udruženih sa EMT, uključujući Snail, Slug, Zeb. Aktivacija ovih faktora odvija se putem Smad signalizacije, klasičnim TGF- $\beta$  putem aktivacije, ili indirektnim mehanizima, putem aktivacije drugih transkripcionih faktora ili prekidom represije njihove transkripcije (219, 236).

Zbog ključnog značaja TGF- $\beta$  signalizacije u progresiji i invazivnosti urotelnog karcinoma mokraćne beške, komponente TGF- $\beta$  signalnog puta imaju ulogu važnih kandidata za potencijalne terapijske mete u razvoju novih strategija za lečenje karcinoma mokraćne beške. Inhibitori TGF- $\beta$  su već u kliničkim istraživanjima za lečenje različitih neoplazmi, a njihov osnovni cilj je uticaj na tumorsku mikrookolinu inhibicijom fibroze, angiogeneze, metastaziranja, kao i aktivacija imunog odgovora domaćina na neoplastični rast (224).



TGF $\beta$ R/ALK1 inhibitor PF-03446962 odobren je za fazu II studije u lečenju karcinoma mokraćne bešike (351).

Na nivou tumorske mikrosredine TGF- $\beta$  izaziva i posreduje širok spektar interakcija tumora i strome kako u ranim, tako i u kasnim fazama tumora, stvarajući povoljnu mikrosredinu za inicijaciju tumora, rast kancerskih ćelija i metastaziranje. TGF- $\beta$  signalizacija uspostavlja ključnu nit pro-tumorskih aktivnosti kroz sve stepenike karcinogeneze. Ovo uzrokuje međuzavisnost između kancerskih ćelija koje izmenjeno reaguju na TGF- $\beta$  ili na njega uopšte ne reaguju, i TGF- $\beta$ -stimulisanih i responsivnih stromalnih ćelija. Zato ciljna terapija usmerena na TGF- $\beta$  može da pogodi kancersku ćeliju ili direktnim putem ili indirektno, posredstvom mehanizama tumorske mikrookoline kroz sve stepenike karcinogeneze.

Iako je poznato da TGF- $\beta$  povećava motilitet i stimuliše nakupljanje i regrutovanje imunih ćelija u tumorskoj stromi (224, 235, 352), dok direktno inhibiše njihove anti-tumorske efektorske funkcije, rezultati ovog istraživanja nisu ukazali na značajnu korelaciju obimnog inflamatornog infiltrata u tumorskoj stromi sa ekspresijom TGF- $\beta$ 1 u tumorskim ćelijama. Izostanak statistički značajne korelacije ne isključuje uticaj TGF- $\beta$  na strukturu i funkciju imunokompetentnih ćelija u tumoru. S druge strane, nađena je statistički značajna asocijacija redukcije ili gubitka Smad4 sa prisustvom obilnog limfocitog infiltrata u tumorskoj stromi, što imponuje kao kontradiktoran nalaz, ali može ukazivati na to da se TGF- $\beta$  uticaj na sastav inflamatornog infiltrata u tumorskoj mikrookolini ne odvija putem signalizacije Smad ili da je i u nju, kao i u većinu TGF- $\beta$  odgovora, uključen veliki broj modulatora koji čine signalizaciju praktično nepredvidivom. Visoka ekspresija receptora smrti sa snažnim imunomodulatornim dejstvom FAS, kao i epigenetskog regulatora EZH2 u tumoru takođe su značajno udruženi sa prisustvom markantnog mononuklearnog infiltrata u tumorskoj stromi. S obzirom na to da ova dva molekula imaju suprotne biološke efekte u tumoru, jedan je značajno povezan sa dobrom, a drugi sa lošom prognozom, u svetlu sve značajnije uloge imunih ćelija tumorske strome koje su danas važne terapijske mete, ove relacije zaslužuju dalja i detaljnija ispitivanja.

Imunomodulatorno dejstvo i uloga TGF- $\beta$  u kontekstu svojstva da indukuje EMT, te promoviše invazivnost tumorskih ćelija i metastaziranje, ispitivano je u nedavno objavljenoj studiji (353). TGF- $\beta$  indukuje imunotolerantni fenotip u imunogenim dendritičnim ćelijama posredstvom molekula Indolamin 2,3-dioksigenaza (IDO), putem aktivacije PI3K/Akt puta. IDO je enzim koji katalizuje razgradnju aminokiseline triptofan i smatra se molekulom sa

važnim imunomodulatornim svojstvima i ulogama u izbegavanju antitumorskog odgovora imunog sistema, odbacivanju transplantata i autoimunim bolestima. Zato se 1-metil-D-triptofan, kompetitivni inhibitor IDO, intenzivno ispituje kao antikancerski agens u različitim solidnim tumorima (354). Utvrđeno je da T24 ćelijska linija karcinoma mokraćne bešike u kulturi konstitutivno proizvodi IDO, koji stimuliše proliferaciju tumorskih ćelija, a inhibiše apoptozu mehanizmima nezavisnim od imunomodulatornog dejstva (355). U studiji koja je procenjivala efekat metil-triptofana, koji blokira IDO u kulturi karcinoma bešike T24, utvrđeno je da inkubacija ovih ćelija istovremeno sa TGF- $\beta$ 1 i metil-triptofanom značajno snižava aktivnost IDO *in vitro*, a da pri tom indukuje EMT, što se evidentira u ekspresiji markera EMT (356). Inhibicija enzima IDO kombinacijom metil-triptofana i TGF- $\beta$ 1 udružena je sa pokretanjem EMT u T24 ćelijskoj liniji karcinoma mokraćne bešike i inhibicijom Akt ne-kanonskog signalnog puta TGF- $\beta$ 1, što ukazuje na to da je potreban poseban oprez pri primeni blokatora IDO u terapijske svrhe kod karcinoma bešike, kako bi se prevazišao beg od imunog odgovora. Blokada ovog enzima koji je medijator nekih imunomodulatornih funkcija TGF- $\beta$ 1 može da potencira druge efekte TGF- $\beta$ 1, poput EMT, što može rezultovati većom štetom od koristi primenjene terapije.

Prva studija koja se bavila karakterizacijom uloge TGF- $\beta$  *in vivo* objavljena je tek nedavno (269). U ovoj studiji je na eksperimentalnom mišjem modelu u kome je N-butil-N-4-hidroksibutil nitrozaminom indukovani karcinom mokraćne bešike ispitivana uloga TGF- $\beta$ . Kondicionalnom ablacijom TGF- $\beta$  signalizacije, pomoću *knockout*-a TGF- $\beta$  receptora *TGFBR2*, Liang i kolege su ukazali na to da bi isključenje TGF- $\beta$  signalizacije moglo da inhibira progresiju i invaziju karcinoma bešike *in vivo*. Pored toga, ablacija TGF- $\beta$  rezultovala je i redukcijom populacije kancerskih stem ćelija i EMT. Naime, kod tumora sa kondicionom ablacijom TGF- $\beta$  signalizacije blokadom receptora ili isključenjem ekspresije *TGFBR2* nađena je povećana ekspresija E-kaderina, dok je ekspresioni nivo mezenhimnih markera, poput *Vimentina*, i transkripcionih faktora *Slug*, *Snail*, *Twist*, *Zeb1* bio značajno snižen u tumorima životinja kod kojih je postojala TGF- $\beta$  ablacija. Ovi rezultati važan su indikator asocijacije ekspresije TGF- $\beta$  u tumoru i agresivnog ponašanja tumora, a koja je sa više značajnih relacija zabeležena u ovoj studiji.

Smad4 kao nishodni signalni molekul u kanonskoj TGF- $\beta$  signalizaciji bio je značajno povezan sa neinvazivnim tumorima i niskim histološkim gradusom. Gubitak ili redukcija ekspresije Smad4 bila je povezana sa porastom stadijuma, visokim histološkim gradusom, nalazom CIS u okolini infiltrativnog karcinoma i kancer-specifičnim mortalitetom. Osim toga,

visoka ekspresija Smad4 je nezavistan prediktor dobre prognoze, jer pacijenti sa visokom ekspresijom Smad4 u tumoru imaju značajno duže ukupno preživljavanje u odnosu na one sa niskom ili izgubljenom Smad4 ekspresijom. Ovakva odrednica Smad4 kao dobroćudnog igrača u TGF- $\beta$  signalizaciji može da imponuje kontradiktorno. Međutim, s obzirom na kompleksnost TGF- $\beta$  puteva (Slika 10), jasno je da direktna korelacija nivoa imunohistohemijske ekspresije TGF- $\beta$  i Smad4 nije obavezna. Naprotiv, naši rezultati su u skladu sa dobro dokumentovanom tumor supresorskom ulogom Smad4. Naime, poznato je da su germinativne inaktivirajuće mutacije *SMAD4/DPC4* gena u osnovi familijarne juvenilne polipoze, autuzomno dominantnog sindroma koji se karakteriše nastankom brojnih hamartomatoznih tumora u gastrointestinalnom traktu i postojanjem povećane predispozicije za nastanak kancera (357). Smad4, čija je sinteza kodirana ovim genom, važan je tumor supresor, a njegove funkcije su rasvetljene na animalnim modelima. Korišćenjem murinih modela za familijarnu juvenilnu polipozu koji su genetskim inženjeringom modifikovani tako da imaju specifičnu deleciju *SMAD4* gena ili unutar T-ćelija ili unutar populacija epitelnih ćelija, uključujući i epitel crevne mukoze, pokazano je da je selektivna ablacija Smad4 aktivnosti unutar T-ćelijske loze sasvim dovoljna da indukuje razvoj hamartomatoznih lezija i karcinoma na nivou mukoze gastrointestinalnog trakta. Ovo nije bio slučaj kada je postojala samo epitel-specifična delecija *SMAD4* (358). To je dovelo do zaključka da je Smad4-zavisna signalizacija u T limfocitima neophodna za održavanje imune homeostaze i supresiju nastanka tumora na nivou mukoza, kao i da alteracije TGF- $\beta$  signalizacije u mikrosredini doprinose stvaranju sredinskog konteksta koji pogoduje razvoju kancera.

U studiji koja je obuhvatila 34 urotelna karcinoma bubrežne karlice i uretera (359), ekspresija Smad4 detektovana je u 17,6% slučajeva, što je značajno manje od utvrđena pozitivnost na Smad4 u ovoj studiji, gde je skoro polovina tumora pokazivala imunoreaktivnost u više od 50% tumorskih ćelija. Ova razlika može se pripisati brojnim faktorima, pre svega specifičnoj lokalizaciji urotelnih tumora (gornji vs. donji urotel), malom broju uzoraka u starijoj studiji, korišćenju različitih antitela na Smad4. U obe studije ekspresija Smad4 zabeležena je i u citoplazmi i u jedru tumorskih ćelija urotelnih karcinoma. Nema podataka o značaju obrasca imunohistohemijskog bojenja, odnosno subcelularnoj lokalizaciji na kojoj se detektuje ekspresija Smad4. U ovoj studiji citoplazmatsko bojenje je po pravilu opservirano istovremeno sa nuklearnim (Slika 16). Ovo je u skladu sa saznanjem da je Smad4 molekul koji obavlja svoje funkcije u transmisiji signala tako što se vezuje za DNK vlakno zajedno sa brojnim kofaktorima, nakon svoje translokacije iz citoplazme u jedro.

Smad4 je jedini od ispitivanih molekula u ovom istraživanju koji je bio značajan prediktor rekurentne bolesti. Visoka ekspresija Smad4 u tumorskim ćelijama bila je značajno povezana sa pojavom recidiva tumora, ali ona ne predviđa vreme preživljavanja do pojave recidiva. Iako pacijenti sa visokom Smad4 ekspresijom imaju kraće vreme do pojave recidiva u odnosu na one koji su izgubili Smad4 pozitivnost, ova razlika nije statistički značajna.

## 6.2. TGF- $\beta$ 1, ćelijski receptori smrti i apoptoza

Nauka još uvek nije dala odgovor na pitanje šta određuje da li će ćelija na koju deluje TGF- $\beta$ 1 umreti apoptozom ili preživeti. Jedno od mogućih objašnjenja raznovrsnosti dejstva TGF- $\beta$ 1 na apoptozu u zavisnosti od tipa ćelija i u zavisnosti od konteksta u kome se dejstvo ostvaruje bazira se na aktivnosti i uključenosti različitih intracelularnih signalnih puteva u određenoj ćeliji u njenoj specifičnoj mikrookolini (297). Uprkos velikom broju radova i istraživanja vezanih za ovu temu, molekularni mehanizmi koji su u osnovi uloge TGF- $\beta$ 1 u apoptozi nedovoljno su rasvetljeni.

Put apoptoze koji se pokreće aktivacijom receptora smrti indukuje se dejstvom signala kao što su FASL ili TRAIL nakon čega dolazi do agregacije receptora u kompleks koji se naziva DISC, koji održava visoku lokalnu koncentraciju prokaspaze 8. Akumulacija prokaspaze 8 dovodi do njene aktivacije i oslobađanja iz DISC-a, a zatim i do aktivacije efektorskih kaspaza. Svojstvo je određene ćelije da dozvoli komunikaciju između puta receptora smrti i mitohondrijalnog apoptotskog puta. Naime, u ćelijama u kojima je manje prokaspaze 8 raspoloživo za formaciju DISC-a, dolazi do aktivacije proteina Bid, pro-apoptotskog člana Bcl-2 familije, koji amplifikuje apoptotski signal aktivirajući apoptotsku mašineriju mitohondrija. Pored toga, i drugi intracelularni molekuli mogu da regulišu ovaj apoptotski put, poput proteina FLIP, koji inhibira FASL/TRAIL-om indukovanu apoptozu. Interakcija FLIP-a sa adaptivnim molekulom FADD inhibira stvaranje kompleksa DISC tako što sprečava vezivanje FADD za prokaspazu 8. FLIP može da aktivira i druge signale preživljavanja, poput NF- $\kappa$ B i ERK, inhibirajući put apoptoze pokrenut putem receptora smrti (297).

Apoptoza koju indukuje TGF- $\beta$  u najvećoj meri je posredovana TRAIL/receptorskim sistemom. Studije su ukazale na to da se apoptoza pokrenuta sa TGF- $\beta$  odvija sporo, ima odložen početak, jer zahteva TGF- $\beta$ -posredovanu aktivaciju transkripcije kako bi se sintetisala kritična količina molekula u ćeliji koji deluju kao medijatori apoptoze i aktiviraju kaskadu

efektorskih kaspaza. TGF- $\beta$  može da reguliše nivo TRAIL, a sami tim i apoptoze, na nekoliko različitih nivoa, ali je ključno mesto delovanja TGF- $\beta$  aktivacija transkripcije gena za TRAIL koja je posredovana TGF- $\beta$  indukcijom promotorske sekvence. S druge strane, TGF- $\beta$  ne doprinosi stabilizaciji novonastalog transkripta mRNA (311, 312). *In vitro* istraživanja ukazala su na to da TGF- $\beta$  značajno indukuje transkripciju TRAIL i povećava njegovu ekspresiju na površini tumorskih ćelija, ali da tretman tumorskih ćelija u kulturi sa TGF- $\beta$  ne dovodi do povećanja niti nivoa mRNA niti površinske proteinske ekspresije receptora DR4 i DR5 (311).

Rezultati našeg istraživanja idu u prilog činjenici da TGF- $\beta$  indukuje ekspresiju TRAIL, ali ne i receptora za ovaj ligand, receptora smrti DR4 i DR5. Analiza međusobne povezanosti nivoa imunohistoheijske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i DR4 nije pokazala značajnu korelaciju, ali TGF- $\beta$ 1 i DR5 jeste. Sa druge strane, visoka ekspresija Smad4 pokazala je visoko značajnu korelaciju sa ekspresijom sva tri analizirana receptora smrti. Ovakvi rezultati mogli bi da sugerišu da TGF- $\beta$ 1 putem Smad signalizacije ostvaruje uticaj na ekspresiju receptora smrti. Pošto TGF- $\beta$ 1 ima brojne i plejotropne funkcije, neće svaki njegov porast linearno rezultovati pokretanjem Smad transdukcijske kaskade, ali će kanonski put TGF- $\beta$ 1/Smad4 potencijalno dovesti do povećanja ekspresije receptora smrti. Da li porast ekspresije receptora podrazumeva i više apoptoze u tumoru, povoljnije biološke efekte i bolji odgovor na antineoplastičnu terapiju zaslužuje da bude predmet budućih istraživanja.

Biološki značaj efekta TGF- $\beta$  na porast nivoa TRAIL je kompleksan i može imati različite svrhe u zavisnosti od ćelijske mikrookoline i statusa osetljivosti na TRAIL. Povećanje nivoa TRAIL na normalnim ćelijama sprečava razvoj tumora i metastaziranje, dok odsustvo TRAIL-a rezultuje povećanjem metastaziranja. Međutim, kod ćelija koje su razvile TRAIL-rezistentan fenotip, TGF- $\beta$  indukovana ekspresija TRAIL može čak i da stimuliše progresiju tumora putem negativne regulacije imunog odgovora, tako što će stvoreni TRAIL da izaziva apoptozu u imunim ćelijama koje infiltrišu tumor, a osetljive su na TRAIL-om indukovanu apoptozu za razliku od tumorskih ćelija (311). Inhibitori proteazoma senzibilišu tumorsku ćeliju na apoptozu indukovanu TRAIL-om tako što smanjuju nivo Bcl-xl usled smanjenja aktivnosti NF $\kappa$ B ili pojačanim oslabljavanjem Smac/Diablo, nezavisnim od NF $\kappa$ B. Sa druge strane, aktivacija nuklearnog faktora  $\kappa$ B odgovorna je za ushodnu regulaciju DR4 i DR5 receptora u kulturi ćelija karcinoma grlića materice (360). Inhibitori proteazoma takođe uzrokuju ushodnu regulaciju receptora smrti DR4 i DR5 pre svega u ćelijskim linijama koje su rezistentne na apoptozu indukovanu TRAIL-om i senzibilišu ove ćelije na apoptozu koja se



odvija ovim ligand/receptorskim sistemom. Tretiranje kancerskih ćelija u kulturi sa TGF- $\beta$  pokreće apoptozu tako što dominantno deluje na porast TRAIL, stimulišući njegovu sintezu na nivou transkripcije. Ako se TRAIL blokira, smanjuje se nivo kaspaze 8 i cepanja PARP. Međutim, TGF- $\beta$  ne povećava u kulturi sintezu mRNA receptora za TRAIL, niti njihovu ekspresiju na površini ćelije. Ovo potvrđuje i činjenica da dodavanje TGF- $\beta$  u kulturu ćelija rezistentnih na TRAIL-om indukovanu apoptozu ne dovodi do senzitivizacije ćelija na dejstvo TRAIL.

TRAIL sistem indukcije apoptoze je od svog otkrića privlačio pažnju istraživača zbog svoje sposobnosti da pokreće apoptozu prevashodno u tumorskim ćelijama, dok je većina normalnih, neizmenjenih ćelija rezistentno na TRAIL-om indukovanu apoptozu (311, 361). Ovaj ubistveni efekat TRAIL-a na tumorske ćelije ispitan je i dokazan i u *in vitro* i u *in vivo* uslovima. Zbog ovog svog svojstva selektivne, a moćne aktivacije programirane ćelijske smrti, terapijski potencijal TRAIL-a i receptora smrti predmet su intenzivnih ispitivanja. Iako TRAIL može da ostvaruje interakciju sa pet različitih receptora (DR4, DR5, DcR1, DcR2, i solubilni osteoprotegerin), samo DR4 i DR5 sadrže intracelularni domen smrti neophodan za transmisiju apoptotskog signala nakon vezivanja liganda za receptor. TRAIL-R3 i TRAIL-R4 ne mogu da pokrenu apoptozu uslednog kompletnog, odnosno parcijalnog nedostatka intracelularnog domena smrti. U spoljašnjem, ekstrinzičnom putu apoptoze TRAIL se u obliku homotrimeru vezuje za ekstracelularne domene DR4 i DR5, što dovodi do trimerizacije receptora smrti, a zatim i sklapanja signalnog kompleksa koji indukuje ćelijsku smrt (DISC). Unutar DISC-a adaptorni protein FADD deluje kao most između receptorskog kompleksa i kaspaze 8. Aktivirana kaspaza 8 vrši proteolitičko cepanje i aktivaciju nishodnih kaspaza 3, 6 i 7 koje izvršavaju apoptozu. Kaspaza 8 učestvuje i u cepanju proteina Bid, čime se ukrštaju spoljašnji i unutrašnji, mitohondrijalni put apoptoze i višestruko pojačava efektorska faza apoptoze. Ne samo da inhibira tumorski rast, već TRAIL prisutan u solubilnom obliku ili eksprimiran na površini imunih ćelija (T limfocita, NK ćelija, monocita, makrofaga, dendritičnih ćelija i neutrofila) igra važne uloge u antitumorskom imunitetu, imunološkom nadzoru i odbrani od tumora.

*In vitro* analiza indukcije apoptoze pomoću TRAIL (282) ukazala je da su ćelije dobro diferentovanog karcinoma mokraćne bešike u kulturi (ćelijska linija SW780) osetljive na apoptozu idukovanu TRAIL-om i da je ovaj efekat dozno zavisna, tj. procenat ćelija u apoptozu raste sa povećanjem koncentracije TRAIL-a do nivoa kada se postiže plato i nema dajeg porasta apoptotskog efekta. Kancerske ćelije iz ćelijskih linija umereno i slabo

diferentovanog karcinoma bešike (647V i T24) bile su rezistentne na apoptozu indukovanu TRAIL-om. Autori su pomoću flow citometrije ispitali površinsku ekspresiju receptora smrti na ćelijskim linijama, kako bi utvrdili mehanizam osetljivosti, odnosno rezistencije na TRAIL-indukovanu apoptozu. Ekspresija DR4 detektovana je na manje od 5% ćelija u svim ispitivanim linijama. Nasuprot tome, DR5 je pokazao snažnu ekspresiju na senzitivnim SW780 ćelijama, dok su ćelije ostalih linija rezistentnih na TRAIL imale nizak nivo ekspresije ovog receptora. Rezultati studije ukazali su na ključnu ulogu receptora DR5 u osetljivosti kancerskih ćelija na TRAIL. Inače, gen koji kodira sintezu ovog receptora smrti smešten je u regionu 8p21-22 koji je često izgubljen u karcinomu mokraćne bešike. Iz ovoga proizilazi da se osetljivost tumorskih ćelija na TRAIL može povećati primenom hemoterapeutika i jonizujućeg zračenja koji indukuju ekspresiju DR5 na površini ćelije i time oplemenjuju terapijski potencijal TRAIL-a (362).

U studiji koja je ispitivala citocidni potencijal istovremene primene TRAIL i inhibitora histonske deacetilaze (HDACi) kod tumora bešike rezistentnih na TRAIL pokazala je da primena inhibitora HDAC u netoksičnim dozama uzokuje porast TRAIL-om indukovane apoptoze u prethodno rezistentnoj kancerskoj liniji T24, ali nema efekta na senzibilizaciju normalnih, netransformisanih urotelnih ćelija (363). Inhibicija HDAC dovodi do povećane transkripcije gena *TRAILR2*, što korelira sa povećanom površinskom ekspresijom DR5. Povećan nivo DR5 korelira sa ubrzanom formacijom DISC kompleksa, aktivacijom kaspaza, gubitkom potencijala mitohondrijalne membrane, što sve doprinosi ćelijskoj smrti. Ove studije ukazuju na to da nivo ekspresije DR5 na tumorskim ćelijama može da bude pouzdani indikator citotoksičnog efekta koji može da se ostvari terapijom rekombinantnim solubilnim TRAIL-om ili agonističkim antitelom na receptor smrti.

Studije koje su ispitivale ekspresiju DR4 i DR5 na humanom materijalu karcinoma mokraćne bešike su veoma malobrojne (282, 343). Analiza imunohistohemijske ekspresije DR4 i DR5 na parafinskim uzorcima 229 tumora mokraćne bešike dobijenim transuretralnom resekcijom pokazala je da su ovi markeri ekspimirani u 75,1%, odnosno 74,2% urotelnih karcinoma (343). Ove vrednosti su veoma slične rezultatima naše studije, gde je procenat ekspresije oba receptora samo diskretno niži, 70,2% za DR4 i 69,9% za DR5. U našem istraživanju ekspresija DR4 je snažno korelirala sa niskim histološkim gradusom tumora, a oba receptora pokazala su snažnu asocijaciju sa patološkim stadijumom. U skladu sa rezultatima *in vitro* i *in vivo* studija o funkciji i značaju receptora smrti, redukcija ili gubitak ekspresije receptora smrti za TRAIL značajno korelira sa mišićno-invazivnom bolešću. Pored toga, ekspresija

DR4 identifikovana je kao marker kancer specifičnog mortaliteta, s kojim je značajno inverzno povezana. Pacijenti sa visokom DR4 ekspresijom imaju značajno duže ukupno preživljavanje, čak 14 meseci u proseku duže žive oboleli sa DR4 pozitivnim tumorima u odnosu na one sa DR4 negativnim tumorima. Međutim, multivarijantna analiza nije potvrdila značaj DR4 u smislu nezavisnog prognostičkog faktora za preživljavanje kod karcinoma bešike. Iako je u prethodno objavljenoj studiji (343) ekspresija DR4 i DR5 bila udružena sa dužim vremenom preživljavanja bez pojave recidiva, naši rezultati nisu potvrdili takvu asocijaciju.

TGF- $\beta$  u kooperaciji sa FASL/FAS sistemom reguliše imunološku toleranciju u tumorskoj mikrookolini. Regulacija zavisi od tipa tumorskog tkiva i senzitivnosti tumorsih ćelija i TILs na FAS-om posredovanu apoptozu (273). Mutacije molekula FAS imaju potencijal da omoguće beg tumorskih ćelija od imunološkog nadzora, što rezultuje rezistencijom na FAS ligand i inhibira napad od strane T-limfocita i NK ćelija. Rezistencija na FAS-om posredovanu apoptozu omogućava tumorskoj ćeliji da poveća ekspresiju FASL i aktivira protivnapad usmeren na FAS-senzitivne imune ćelije, što dovodi do progresije tumora i razvoja metastaza. Mutacije FAS nađene su u brojnim humanim neoplazmama, uključujući karcinom mokraćne bešike, koji je prvi solidni kancer u kome su ove mutacije opisane (364). Za razliku od melanoma i hepatocelularnog karcinoma gde su mutacije FAS veoma retke, karcinom mokraćne bešike je često povezan sa mutacijom ovog receptora smrti, u skoro 30% slučajeva, i najčešće su u pitanju pogrešno smislene mutacije smeštene u regionu koji kodira domen smrti odgovoran za transdukciju apoptotskog signala. Nedavno je utvrđeno da polimorfizmi gena za FAS/FASL imaju prognostički značaj u proceni terapijskog odgovora kod pacijenata na BCG terapiji sa visoko rizičnim ne-mišićno invazivnim karcinomom bešike (365). BCG terapija nije efikasna kod 30-40% lečenih pacijenata, te je identifikacija pacijenata koji neće odreagovati na terapiju od velikog značaja, jer se time izbegava odlaganje inicijacije agresivnije i efikasnije terapije, npr. rane cistektomije. Pacijenti koji su homozigoti na polimorfizam *FAS A-670G* slabije su reagovali na BCG terapiju i ranije su razvijali relaps bolesti (365).

Tumorske ćelije mogu da nishodnom regulacijom FAS receptora postanu manje osetljive na FAS-om indukovanu apoptozu i time pospeše imunološku privilegovanost koja omogućava tumorski rast i progresiju. S druge strane, proinflamatorni citokini (interleukin 10, prostaglandini, reaktivne vrste kiseonika), a pre svega TGF- $\beta$ , mogu da indukuju ushodnu regulaciju ekspresije FASL. Produkcija citokina u specifičnoj tumorskoj mikrookolini, kojom

vladaju hipoksija i acidoza, tj. oslobađanje citokina od strane stromalnih ćelija aktivira fosforilaciju Akt, što podržava preživljavanje tumorskih ćelija putem nishodne regulacije FAS i ushodne regulacije FASL u tumorskim ćelijama. Stoga, TGF- $\beta$  i Akt deluju kolaboracionalistički u progresiji tumora i metastaziranju, obezbeđujući tumorskim ćelijama da izbegnu imuni odgovor domaćina (273). Povećano stvaranje TGF- $\beta$  i njegovo autokrino i parakrino dejstvo u tumorskoj mikrookolini inhibira sekreciju interferona gama iz citotoksičnih T limfocita, koji vrši snažnu ushodnu regulaciju FAS receptora.

Studije su pokazale da rezistencija na apoptozu izazvana blokadom FAS može imati važnu ulogu u tumorigenezi i progresiji tumora u malignoj boesti (292, 295). U normalnom urotelu FAS se eksprimira u citoplazmi i na membrani ćelija, uglavnom homogeno i difuzno, dok u tumorima ekspresija može biti heterogena ili fokalna ili da u potpunosti nedostaje (Slika 19). Imunohistohemijska studija ekspresije FAS i FASL koja je obuhvatila 40 urotelnih karcinoma mokraćne bešike različitih stadijuma ukazala je da u tkivu karcinoma bešike postoji značajna redukcija ekspresije FAS, dok je ekspresija FASL povećana. FAS je bio pozitivan u svega 37,5% karcinoma, dok se u okolnom peritumorskom urotelu FAS ekspimirao u 87,5%, a u normalnom tkivu bešike dobijenom od zdravih kontrola u čak 95% (294). Studija koja je analizirala ekspresiju FAS globalno u urotelnim karcinomima (N=123) različitih lokalizacija (mokraćna bešika, ureteri, pijeločastični sistem bubrega) utvrdila je da se FAS eksprimira u nešto većem procentu, u 58% slučajeva. Naši rezultati su pokazali da je ekspresija FAS očuvana u najmanje 25% tumorskog tkiva u većini neoplazmi, 54,7%.

Prethodno objavljene studije su pokazale da je ekspresija FAS značajno niža u tumorima višeg histološkog gradusa, tumorima većeg stadijuma i kod pacijenata sa multiplim, multifokalnim tumorima (294, 295). Međutim, u ovom istraživanju nije potvrđena značajna korelacija FAS i histološkog gradusa, ali je gubitak ekspresije FAS bio značajno povezan sa mišićno-invazivnim tumorima. Išezavanje FAS receptora smrti sa membrane tumorske ćelije može biti rezultat kancerske progresije koja se najjasnije manifestuje dediferencijacijom kancerskih ćelija. Inverzna korelacija FAS sa tumorskim stadijumom ukazuje na to da FAS u urotelnom karcinomu ima pre svega ulogu receptora smrti pokretača apoptoze, te redukcija ekspresije FAS doprinosi postizanju većeg malignog potencijala tumorskih ćelija. Prethodne studije pokazale su da ekspresija FAS opada u rekurentnim tumorima, tj. da je ekspresija statistički značajno redukovana u recidivantnim tumorima u odnosu na primarne (294). Međutim, u našem istraživanju FAS ni na koji način nije bio povezan sa recidivom bolesti.

Gubitak FAS ne samo da može da učini tumorske ćelije otpornijim na apoptozu indukovanu FASL, već u kombinaciji sa povećanom ekspresijom FASL koja je takođe zabeležena u urotelnom karcinomu može da facilitira putem moćnog apoptotskog sistema FASL/FAS ubijanje imunih ćelija koje infiltrišu tumor, odnosno beg od imunološkog nadzora i antitumorskog imuniteta. U prilog ovoj hipotezi govori i opservacija da u karcinomu bešike postoji inverzna korelacija između ekspresije FAS i stope apoptoze tumor infiltrišućih limfocita (294). U našoj studiji nađeno je da ekspresija FAS direktno korelira sa prisustvom obilnog mononuklearnog inflamatornog infiltrata tumorske strome. Prisustvo mnogobrojnih limfocita u okolini tumorskih ćelija ne implicira nužno i efikasan tumorski imunitet, niti isključuje destrukciju tumor infiltrišućih limfocita posredstvom FAS sistema. Dalje studije su potrebne kako bi se razjasnio značaj ove asocijacije.

Podaci o prognostičkom značaju FAS u urotelnom karcinomu mokraćne bešike su veoma oskudni. Praktično je opisana povezanost FAS sa preživljavanjem pacijenata bez progresije bolesti u samo jednoj studiji koja je ispitivala ekspresiju FAS u 123 urotelna karcinoma gornjeg i donjeg urotela. Pacijenti sa FAS pozitivnim tumorima imali su statistički značajno bolju prognozu u odnosu na one sa gubitkom FAS (295). Naši rezultati su pokazali da visoka ekspresija FAS u tumoru značajno korelira sa dužim ukupnim preživljavanjem pacijenata. Multivarijantna analiza potvrdila je da je ekspresija FAS nezavisni prediktor bolje prognoze kod pacijenata sa urotelnim karcinomom u do sada najobimnijoj ispitivanoj grupi.

Gubitak ekspresije FAS je prepoznat kao znak tumorske progresije i nepovoljnog ishoda bolesti i u karcinomu dojke, karcinomu jajnika, nekim tipovima leukemija i drugim malignim neoplazmama (366). Zanimljivo je da solubilni FAS detektovan u jutarnjem urinu pacijenata sa ne-mišićno-invazivnim karcinomom mokraćne bešike imunoenzimskim esejem značajno korelira sa višim stadijumom bolesti i pojavom recidiva, kao i vremenom do pojave recidiva bolesti (367). Povezanost gubitka FAS i lošije prognoze mogla bi biti povezana sa izbegavanjem apoptoze od strane tumorskih ćelija gašenjem potentnog mehanizma indukovanog preko FAS. Međutim, iako je FAS široko eksprimiran na neoplastičnim i normalnim ćelijama, ekspresija ovog proteina ne mora sa velikom sigurnošću da predviđa osetljivost ćelije na apoptozu. Eksperimentalnom primenom FAS-aktivirajućeg monoklonalnog antitela u kombinaciji sa niskim dozama adrijamicina, zapažen je snažan sinergistički antikancerski efekat citostatika, ali u uslovima gde nije zabeleženo povećanje ekspresije FAS (295). Ovo upućuje na zaključak da indukcija apoptoze ne mora nužno da zavisi od kvantiteta FAS receptora i da bi glavni regulatorni mehanizam mogao biti



pozicioniran negde nishodno u signalnoj kaskadi FAS. Sinergistički efekat antitela na FAS i citostatika adriamicina bi se mogao objasniti amplifikacijom nishodne apoptotske kaskade putem konvergencije unutrašnjeg i spoljašnjeg puta apoptoze koji aktiviraju FAS i adriamicin. Pritom, tačka konvergencije je najverovatnije mitohondrijalni protein Bid, proapoptotski regulatorni molekul nishodnog signala apoptoze koji pripada Bcl-2 familiji proteina. Ovakav efekat citostatika za koji je neophodna makar i mala i ograničena ekspresija FAS, mogla bi se primenjivati u razvoju novih terapijskih strategija za lečenje pacijenata sa karcinomom bešike koji imaju tumore rezistentne na konvencionalne hemoterapeutike.

*In vivo* studija ne-sitnoćelijskog karcinoma pluća na miševima pokazala je da lečenje cisplatinom ili vinkristinom relativno brzo dovodi do razvoja rezistencije na primenjenu terapiju nishodnom regulacijom FAS puta (368). Rezistencija na cisplatinu, koja je jedan od osnovnih hemoterapeutika u lečenju uznapredovalog urotelnog karcinoma, razvija se postepeno, da bi posle sedmog ciklusa postala kompletna. Utvrđeno je da je razvoj ove rezistencije snažno udružen sa smanjenjem citostatikom-indukovane apoptoze, koja se manifestuje redukcijom i gubitkom FAS signalizacije, a koja podrazumeva smanjenje nivoa ekspresije receptora FAS i FAS-liganda. Kao posledica smanjenja nivoa receptora smrti, smanjuje se nivo apoptoze i aktivnost egzekutorskih kaspaza (368). Ovi rezultati potvrdili su značaj apoptotskog puta pokrenutog receptorima smrti u nastanku rezistencije na konvencionalnu hemoterapiju.

### **6.3. EZH2 i Smad4 interakcija – epigenetska regulacija TGF- $\beta$ signalizacije i ekspresije receptora smrti**

Nedavno je otkriveno da je EZH2 jedan od glavnih regulatora ekspresije Smad4 u karcinomu mokraćne bešike. *In vitro* je ChiP esejem dokazano da EZH2 direktno reguliše Smad4 u ćelijama karcinoma bešike. Naime, Zhu i saradnici ispitivali su ulogu i značaj novoidentifikovane duge nekodirajuće RNK(lncRNA) AWPPH u karcinomu mokraćne bešike (369). LncRNA su RNK molekuli sužine preko 200 nukleotida koje predstavljaju važan mehanizam epigenetske regulacije. Utvrđeno je da je AWPPH, kao i EZH2, koji je glavni epigenetski sajler genske ekspresije, prekomerno eksprimirana u tkivu karcinoma mokraćne bešike, kao i u kancerskim ćelijskim linijama RT4 i T24. AWPPH je dovodila do inhibicije apoptoze, a povećanja vijabilnosti ćelija i ćelijske migracije i autofagije. Analiza hromatinskim imunoprecipitacionim esejem pokazala je da AWPPH ima sposobnost da se

vezuje za EZH2. Vezivanje dovodi do ushodne regulacije EZH2, što stimuliše autofagiju, a inhibiše apoptozu u kancerskim ćelijama.

Ova studija pokazala je da je nivo ekspresije Smad4 značajno snižen u kancerskim tkivima i ćelijama (369). Rezultati su ukazali na to da ispitvana lncRNA inhibira apoptozu u kancerskim ćelijama karcinoma mokraćne bešike tako što povećava enzimsku aktivnost EZH2, koji zatim dovodi do represije gena za Smad4, smanjujući njegov efekat u indukciji apoptoze. Nishodna regulacija Smad4, koji je važan tumor supresor i osnovni prenosilac TGF- $\beta$  signala, modifikuje ekspresiju različitih proteina koji učestvuju u ćelijskoj migraciji i proliferaciji. Stoga gubitak Smad4 može da doprinese proliferaciji i migraciji kancerskih ćelija. S obzirom da je kod ćelija karcinoma mokraćne bešike stimulacijom ekspresije *SMAD4* većina pro-tumorskih efekata AWPPH bilo inhibirano, osnovni mehanizam kojim ova lncRNA stimuliše proliferaciju ćelija, autofagiju i migraciju jeste inhibicija Smad4 putem EZH2 (369).

Sve je više dokaza da se TGF- $\beta$  signalni putevi ukrštaju sa ključnim epigenetskim mehanizmima kontrole. Naime, Smad proteinski kompleksi koji nastaju u citoplazmi ulaze u jedro i uz učešće kofaktora vezuju se za hromatinsko vlakno i aktiviraju transkripciju raznovrsih ciljnih gena. Neretko angažuju i druge transkripcione faktore. Nedavno je sugerisano da Smad2 i Smad4 mogu da vežu EZH2 i da ga kroz fizičku interakciju dislociraju sa određenih genskih lokusa. Naime, poznato je da interleukin 9, jedan proalergijski citokin, sekretuje subset T limfocita koji se naziva Th9, koji nastaje tretmanom naivnih T ćelija sa TGF- $\beta$  i IL-4. TGF- $\beta$  aktivira Smad2 i Smad4, transkripcione faktore neophodne za diferencijaciju Th9 *in vitro*. Deficit i ablacija Smad2 i Smad4 remeti ekspresiju IL-9, a udružena je sa povećanim prisustvom represivne hromatinske modifikacije trimetilacijom histona H3K27 i pojačanim vezivanjem EZH2 za lokus *IL9*. Farmakološka inhibicija EZH2 kod Smad-deficijentnog miša dovodi do parcijalnog uspostavljanja ekspresije IL-9. To ukazuje na činjenicu da Smad2 i Smad4 mogu da vežu EZH2 i direktno dislociraju EZH2 sa *IL9*. Ovi zaključci ukazuju na to da se TGF- $\beta$ /Smad signalni put reguliše produkciju interleukina putem epigenetskog mehanizma, dislokacijom histon modifikujućeg enzima H3K27-specifične metilaze EZH2 sa *IL9* lokusa tokom Th9 diferencijacije (370).

Iz svega navedenog, jasno je da TGF- $\beta$ /Smad i EZH2 imaju kompleksan odnos u vidu petlje uzajamne negativne regulacije, gde EZH2 učestvuje u inhibiciji ekspresije Smad4, a samim tim i kanonskih TGF- $\beta$  odgovora, dok sa druge strane TGF- $\beta$  putem Smad molekula može da

reguliše aktivnost EZH2 na epigenetskom utišavanju ekspresije drugih gena. Ovaj inverzni odnos između EZH2 i Smad4 bio je evidentan na nivou rezultata ovog istraživanja u smislu da su ekspresija Smad4 i EZH2 imale potpuno suprotne prognostičke predznake. Dok je visoka Smad4 ekspresija bila povezana sa niskim gradusom i stadijumom tumora i dužim ukupnim preživljavanjem, ekspresija EZH2 je bila značajno asocirana sa parametrima agresivnosti tumora, kao što su visok histološki gradus i patološki stadijum, prisustvo CIS, kancer-specifični mortalitet i kraće preživljavanje pacijenata. Štaviše, multivarijanatna analiza faktora sa potencijalnim nezavisnim uticajem na ukupno preživljavanje pacijenata identifikovala je visoku ekspresiju EZH2 kao nezavisan faktor loše prognoze kod urotelnog karcinoma bešike. Ekspresija EZH2 u urotelnom karcinomu za 35,7% povećava rizik od neželjenog ishoda bolesti kod obolelih.

Odsustvo genetskih promena rezultuje izrazito indolentnim fenotipom urotelnog karcinoma, dok kombinovane genetske i epigenetske alteracije doprinose agresivnim svojstvima tumora i mogu nositi dodatnu prognostičku vrednost (155). Aktivacija mehanizama imortalizacije koje su u osnovi maligne transformacije ne počiva samo na strukturnim promenama u genomu. Danas je dobro poznato da postoje brojni alternativni mehanizmi aktivacije telomeraza i tumorskih onkogeni, kao i supresije kancer supresorskih molekula, koji se odvijaju epigenetskim mehanizmima, u uslovima kada primarna struktura DNK ostaje intaktna. Hipermetilacija je jedan od fundamentalnih mehanizama epigenetske kontrole i predstavlja dinamički i progresivni proces koji utiče na biološko ponašanje i maligni potencijal tumora.

Mutacije gena uključene u epigenetsku regulaciju nađene su kod većine urotelnih karcinoma, sa većom učestalošću kod mišino-invazivnih tumora. Kod njih su najčešće bili mutirani geni *MLL2*, *ARID1A*, *KDM6A* i *EP300*, a najčešći tip mutacija bile su besmislene mutacije, sa skraćanjem proteinskog produkta gena. Brojni epigenetski regulatori takođe su mutirani sa nešto nižom učestalošću. U karcinomu bešike posebno su česte mutacije u hromatin regulatornim genima koje nisu tihe, već rezultuju izmenjenim, najčešće skraćenim, defektnim proteinskim produktom. Ovakav tip mutacija koje nisu tihe na genima uključenim u modifikaciju proteina nađen je širom celokupnog protein-kodirajućeg dela genoma urotelnog karcinoma mnogo češće nego kod ostalih tumora koje su analizirani u projektu Atlasa kancerskog genoma (149).

Sedamdeset i šest procenata invazivnih karcinoma mokraćne bešike ima inaktivirajuće mutacije u jednom ili više hromatin regulišućih gena, a 41% tumora ima najmanje dve takve mutacije.

Mutacioni spektar karcinoma mokraćne bešike je bogat mutacijama u hromatin regulatornim genima. Pored toga, integrativna analiza pokazala je da ove mutacije imaju veliki uticaj na nivo aktivnosti različitih transkripcionih faktora i puteva uključenih u kancersku evoluciju. Nedavno je razvijena klasa lekova koja se kompetitivno vezuje za acetil-lizin prepoznavajuće motive, takozvane bromodomene, koji bi mogli biti korisni u lečenju grupe karcinoma bešike koji imaju abnormalnosti u hromatin-modifikujućim enzimima (371). S obzirom na izrazito visoku učestalost alteracija u epigenetskim putevima, urotelni karcinom mokraćne bešike je glavni kandidat za dalje istraživanje ovakvog terapijskog pristupa.

Epigenetski mehanizmi značajno doprinose disregulaciji apoptoze, fenomenu koji omogućava ćelijama da izbegnu prirodnu smrt. Hromozomski region 8p21.2 na kojem su mešteni geni za receptore smrti TRAIL-R1 i TRAIL-R2 veoma je često funkcionalno ugašen u kanceru, uključujući i tumore moračne bešike. Mehanizam isključivanja gena iz funkcije i posledično smanjenje ekspresije DR4 može biti posledica delecije kratkog kraka hromozoma 8, a može biti uzrokovana i epigenetskim utišavanjem genske ekspresije. Istraživanja na karcinomu jajnika ukazala su na to da je epigenetski mehanizam skoro podjednako zastupljen kao strukturni gubitak kodirajućih gena, u uzrokovanju nishodne regulacije ekspresije DR4, koja je inače ključna determinantna osetljivosti na TRAIL-om pokrenutu apoptozu u karcinomu jajnika (286). Hipermetilacija promotera gena za DR4 nađena je kao dominantni mehanizam gubitka aktivnosti DR4 i neosetljivosti na TRAIL apoptozu uglavom kod mlađih pacijentkinja, kod onih koje su dobile karcinom pre menopauze. Hipermetilacija DR4 promotera nađena je kod više od 70% astrocitnih glioma pa je epigenetsko utišavanje prepoznato kao ključni mehanizam neosetljivosti na apoptozu koji uzrokuje rezistenciju na savremene hemoterapeutike (372). Poslednjih decenija razvijeni su novi antikancerski lekovi koji u pretkliničkim istraživanjima pokazuju dobru efikasnost i malu toksičnost u odnosu na klasičnu hemoterapiju, a osnova njihove delotvornosti jeste osetljivost kancerskih ćelija na TRAIL-om indukovanu i receptorima smrti posredovanu apoptozu. Rekobinantni humani TRAIL i monoklonalna antitela koji ciljaju receptore smrti DR4 i DR5 indukuju apoptozu selektivno u tumorskim ćelijama, uz poštedu normalnog tkiva. U ranim kliničkim istraživanjima antitela na receptore smrti pokazala su superiornu efikasnost u odnosu na TRAIL, verovatno zbog njegovog veoma kratkog poluživota u telu. Trenutno se u kliničkim studijama ispituju antitelo mapatumumab na DR4 i čak pet agonističkih antitela na DR5: leksatumumab, drozitumumab, konatumumab, tigatuzumab i LBY-135. S obzirom da epigenetski mehanizmi mogu da snažno umanje ekspresiju receptora smrti, primena

demetilišućih agenasa zajedno sa ovom novom i obećavajućom terapijom mogla bi da donese revoluciju u lečenje kancera (372, 373). S obzirom na visoku stopu ekspresije receptora smrti u urotelnim tumorima, karcinom mokraćne bešike bi bio odličan kandidat za ovakav oblik savremene molekularne terapije.



## 7. Zaključak

---

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

1. Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 je značajno učestalija u urotelnom karcinomu mokraćne bešike nepušača, starijem uzrastu i značajno je povezana sa visokim histološkim gradusom i mišićno invazivnom bolešću, dok je redukcija ekspresije TGF- $\beta$ 1 prisutna u tumorima obolelih sa područja endemske nefropatije u odnosu na ostale tumore.
2. Redukcija/gubitak ekspresije Smad4, prenosioca signala u kanonskoj TGF- $\beta$ 1 signalizaciji, značajno je povezana sa visokim tumorskim gradusom i patološkim stadijumom, skvamoznom diferencijacijom u tumoru, prisustvom *carcinoma in situ* u okolini infiltrativnog urotelnog karcinoma, kao i sa prisustvom obilnog limfocitog infiltrata u tumorskoj stromi.
3. Visoka ekspresija DR4 u urotelnom karcinomu mokraćne bešike je značajno povezana sa izloženošću obolelih poznatim karcinogenima. Ekspresija receptora smrti DR4, DR5 i FAS je značajno povezana sa patološkim stadijumom tumora. Mišićno-invazivni urotelni karcinomi pokazuju značajnu redukciju ili gubitak ekspresije receptora smrti, dok histološki gradus tumora inverzno korelira sa ekspresijom DR4. Skvamozna diferencijacija u tumoru korelira sa gubitkom ekspresije DR4 i FAS. Visoka ekspresija FAS receptora direktno korelira sa varijantnom morfologijom urotelnog karcinoma, prisustvom *carcinoma in situ*, kao i prisustvom zapaljenskih ćelija u stromi tumora.
4. Visoka nuklearna ekspresija EZH2 je značajno povezana sa divergentnom diferencijacijom i varijantnom morfologijom urotelnog karcinoma, prisustvom *carcinoma in situ* u okolini tumora, kao i izraženim limfocitnim i granulocitnim infiltratom u tumorskoj stromi. Ekspresija EZH2, epigenetskog regulatora uključenog u TGF- $\beta$ 1 signalizaciju, inverzno korelira sa ekspresijom Smad4.
5. Ekspresija TGF- $\beta$ 1 pozitivno korelira sa ekspresijom Smad4, EZH2 i receptorima DR5 i FAS. Ekspresija sva tri ispitivana receptora smrti, DR4, DR5 i FAS, je veoma značajno međusobno povezana, a takođe je njihova ekspresija značajno

povezana sa ekspresijom sekundarnog prenosioca TGF- $\beta$  signala – Smad4. Ekspresija EZH2 povezana je samo sa ekspresijom FAS.

6. Kod pacijenata sa visokom ekspresijom DR4, a niskom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 kliničko lečenje podrazumeva najčešće samo transuretralnu resekciju, dok su pacijenti sa visokom ekspresijom Smad4 u tumoru lečeni intravezikalnom BCG imunoterapijom sa najvećom verovatnoćom. Radikalna cistektomija i sistemska radioterapija i/ili hemoterapija, kao modaliteti lečenja su sa najvećom verovatnoćom primenjeni kod pacijenata sa visokom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i EZH2. Gubitak ekspresije Smad4, DR4 i FAS receptora u tumoru je snažan prediktor radikalne cistektomije.
7. Na pojavu recidiva bolesti značajan uticaj ima visoka ekspresija Smad4. Međutim, ni Smad4 niti ostali ispitivani markeri ne koreliraju značajno sa dužinom preživljavanja do pojave recidiva bolesti.
8. Ukupno preživljavanje se statistički značajno razlikuje u odnosu na ekspresiju TGF- $\beta$ 1, Smad4, EZH2 i receptora smrti DR4 i FAS u tumorskim ćelijama. Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 i EZH2 je povezana sa kraćim preživljavanjem pacijenata, dok su značajni indikatori bolje prognoze i dužeg preživljavanja visoka ekspresija Smad4, DR4 i FAS u urotelnom karcinomu. Nezavisni prediktori lošije prognoze su TGF- $\beta$ 1 i EZH2, dok je nezavisni prediktor dužeg preživljavanja visoka ekspresija receptora smrti FAS.
9. Kancer-specifični mortalitet je direktno povezan sa visokom ekspresijom TGF- $\beta$ 1 i EZH2, dok značajno inverzno korelira sa ekspresijom Smad4, DR4 i FAS.

Ova studija identifikovala je ekspresiju TGF- $\beta$ 1, FAS i EZH2 kao nezavisne prognostičke faktore za ukupno preživljavanje pacijenata sa urotelnim karcinomom mokraćne bešike. Visoka ekspresija TGF- $\beta$ 1 i EZH2 u tumorima ukazuje na kraće preživljavanje i lošiju prognozu, dok visoka ekspresija receptora smrti FAS ima značajni protektivni efekat i udružena je sa dužim ukupnim preživljavanjem pacijenata.

Produbljanje saznanja o kompleksnim ulogama i značaju TGF- $\beta$  signalizacije u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i apoptozi koja se odvija preko receptora smrti mogla bi da ima značajne implikacije za prognostičku stratifikaciju pacijenata i odlučivanje o njihovom

lečenju. Analiza i procena imunohistohemijskog statusa TGF- $\beta$  i receptora smrti mogla bi imati važnu ulogu u identifikaciji pacijenata koji bi imali najviše koristi od personalizovane ciljane terapije usmerene na TGF- $\beta$  signalnu kaskadu i receptore smrti.

## 8. Literatura

---

1. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol* 2017; 71(1):96–108.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2):87–108.
3. Wong MCS, Fung FDH, Leung C, Cheung WWL, Goggins WB, Ng CF. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep* 2018; 8(1):1129.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69(1):7–34.
5. Leal J, Luengo-Fernandez R, Sullivan R, Witjes JA. Economic burden of bladder cancer across the European Union. *Eur Urol* 2016; 69(3):438–47.
6. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, Odeljenje za prevenciju i kontrolu nezaraznih bolesti. Incidencija i mortalitet od raka u Centralnoj Srbiji 2015. Registar za rak u Centralnoj Srbiji. Izveštaj br. 17; Beograd, 2017. ISSN (online) 2560-4651.
7. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013; 63(2):234–41.
8. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JW, La VC. The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis: A comparison of exposures and meta-analysis of incidence and mortality risks. *Eur Urol* 2016; 70(3):458–66.
9. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 2011; 306(7):737–45.
10. Botelho MC, Alves H, Richter J. Halting *Schistosoma haematobium*–associated bladder cancer. *Int J Cancer Manag* 2017; 10(9). pii: e9430.
11. Salem HK, Mahfouz S. Changing patterns (age, incidence, and pathologic types) of schistosoma–associated bladder cancer in Egypt in the past decade. *Urology* 2012; 79(2):379–83.

12. Vlaanderen J, Straif K, Ruder A, Blair A, Hansen J, Lynge E, et al. Tetrachloroethylene exposure and bladder cancer risk: a meta-analysis of dry-cleaning-worker studies. *Environ Health Perspect* 2014; 122(7):661–6.
13. Purdue MP, Hutchings SJ, Rushton L, Silverman DT. The proportion of cancer attributable to occupational exposures. *Ann Epidemiol* 2015; 25(3):188–92.
14. Antonova O, Toncheva D, Grigorov E. Bladder cancer risk from the perspective of genetic polymorphisms in the carcinogen metabolizing enzymes. *J BUON* 2015; 20(6):1397–406.
15. Lewis JD, Habel LA, Quesenberry CP, Strom BL, Peng T, Hedderson MM, et al. Pioglitazone use and risk of bladder cancer and other common cancers in persons with diabetes. *JAMA* 2015; 314(3):265–77.
16. Lerner SP, Robertson AG. Molecular Subtypes of Non-muscle Invasive Bladder Cancer. *Cancer Cell* 2016; 30(1):1–3.
17. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter V. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, 4th edition; Lyon, France: IARC press, 2016.
18. Compérat EM, Burger M, Gontero P, Mostafid AH, Palou J, Rouprêt M, et al. Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016". *Eur Urol Focus* 2019; 5(3):457–66.
19. Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström PU, Choi W, et al. Bladder cancer. *Lancet* 2016; 388(10061):2796–810.
20. Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumours. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1973.
21. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. Tumors of the urinary system. In: World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon, France: IARC Press 2004: p.89–123.
22. MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur Urol* 2007; 51(4):889–97.
23. Burger M, van der Aa MN, van Oers JM, Brinkmann A, van der Kwast TH, Steyerberg EC, et al. Prediction of progression of non-muscle-invasive bladder cancer by WHO 1973 and 2004 grading and by FGFR3 mutation status: a prospective study. *Eur Urol* 2008; 54(4):835–43.

24. Chen Z, Ding W, Xu K, Tan J, Sun C, Gou Y, et al. The 1973 WHO Classification is more suitable than the 2004 WHO Classification for predicting prognosis in non-muscle-invasive bladder cancer. *PLoS One* 2012; 7(10): e47199.
25. Samaratunga H, Makarov DV, Epstein JI. Comparison of WHO/ISUP and WHO classification of noninvasive papillary urothelial neoplasms for risk of progression. *Urology* 2002; 60(2):315–19.
26. Babjuk M, Bohle A, Burger M, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016. *Eur Urol* 2017; 71(3):447–61.
27. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(1):25–41.
28. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(12):1435–48.
29. Pan CC, Chang YH, Chen KK, Yu HJ, Sun CH, Ho DM. Prognostic significance of the 2004 WHO/ISUP classification for prediction of recurrence, progression, and cancer-specific mortality of non-muscle-invasive urothelial tumors of the urinary bladder: a clinicopathologic study of 1515 cases. *Am J Clin Pathol* 2010; 133(5):788–95.
30. Samaratunga H, Makarov DV, Epstein JI. Comparison of WHO/ISUP and WHO classification of noninvasive papillary urothelial neoplasms for risk of progression. *Urology* 2002; 60(2):315–9.
31. Comp erat E, Larre S, Roupret M, Neuzillet Y, Pignot G, Quintens H, et al. Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old. *Virch Arch* 2015; 466(5):589–94.
32. Barbisan F, Santinelli A, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, et al. Strong immunohistochemical expression of fibroblast growth factor receptor 3, superficial staining pattern of cytokeratin 20, and low proliferative activity define those papillary urothelial neoplasms of low malignant potential that do not recur. *Cancer* 2008; 112(3):636–44.
33. Lee H, Jun SY, Lee YS, Lee HJ, Lee WS, Park CS. Expression of miRNAs and ZEB1 and ZEB2 correlates with histopathological grade in papillary urothelial tumors of the urinary bladder. *Virchows Arch* 2014; 464(2):213–20.



34. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition: Expert Consult - Online and Print (Robbins Pathology) 8th (eighth) edition Hardcover. Philadelphia, PA, USA: Saunders Elsevier, 2009: 974-91.
35. Breyer J, Shalekenov S, Aziz A, van Rhijn BWG, Bründl J, Lausenmeyer E, et al. Increased proliferation as independent predictor of disease recurrence in initial stage pTa urothelial bladder cancer. *Bladder Cancer* 2017; 3(3):173–80.
36. Hurle R, Pasini L, Lazzeri M, Colombo P, Buffi N, Lughezzani G, et al. Active surveillance for low-risk non-muscle-invasive bladder cancer: mid-term results from the Bladder cancer Italian Active Surveillance (BIAS) project. *BJU Int* 2016; 118(6):935–9.
37. McKenney JK, Gomez JA, Desai S, Lee MW, Amin MB. Morphologic expressions of urothelial carcinoma in situ: a detailed evaluation of its histologic patterns with emphasis on carcinoma in situ with microinvasion. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(3):356–62.
38. Mai KT, Flood TA, Williams P, Kos Z, Belanger EC. Mixed low- and high-grade papillary urothelial carcinoma: histopathogenetic and clinical significance. *Virchow Arch* 2013; 463(4):575–81.
39. Reis LO, Taheri D, Chaux A, Guner G, Mendoza Rodriguez MA, Bivalacqua TJ, et al. Significance of a minor high-grade component in a low-grade noninvasive papillary urothelial carcinoma of bladder. *Human Pathol* 2016; 47(1):20–5.
40. Gofrit ON, Pizov G, Shapiro A, Duvdevani M, Yutkin V, Landau EH, et al. Mixed high and low grade bladder tumors—are they clinically high or low grade? *J Urol* 2014; 191(6):1693–6.
41. Downes MR, Weening B, van Rhijn BW, Have CL, Treurniet KM, van der Kwast TH. Analysis of papillary urothelial carcinomas of the bladder with grade heterogeneity: supportive evidence for an early role of CDKN2A deletions in the FGFR3 pathway. *Histopathology* 2017; 70(2):281–9.
42. Dyrskjot L, Reinert T, Algaba F, Christensen E, Nieboer D, Hermann GG, et al. Prognostic impact of a 12-gene progression score in non-muscle-invasive bladder cancer: a prospective multicentre validation study. *Eur Urol* 2017; 72(3):461–9.
43. Meeks JJ, Carneiro BA, Pai SG, Oberlin DT, Rademaker A, Fedorchak K, et al. Genomic characterization of high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget* 2016; 7(46):75176–84.
44. Pietzak EJ, Bagrodia A, Cha EK, Drill EN, Iyer G, Isharwal S, et al. Next-generation sequencing of nonmuscle invasive bladder cancer reveals potential biomarkers and rational therapeutic targets. *Eur Urol* 2017; 72(6):952–9.

45. Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Høyer S, Ulhøi BP, et al. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell* 2016; 30(1):27–42.
46. van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boevé ER, Jöbsis AC, et al. FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64(6):1911–4.
47. Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, Knowles MA. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J Pathol* 2007; 213(1):91–8.
48. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 2001; 158(6):1955–9.
49. Hansel DE, Amin MB, Comperat E, Cote RJ, Knüchel R, Montironi R, et al. A contemporary update on pathology standards for bladder cancer: transurethral resection and radical cystectomy specimens. *Eur Urol* 2013; 63(2):321–32.
50. Miyamoto H, Sharma RB, Illei PB, Epstein JI. Pitfalls in the use of smoothelin to identify muscularis propria invasion by urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(3):418–22.
51. Paner GP, Brown JG, Lapetino S, Nese N, Gupta R, Shen SS, et al. Diagnostic use of antibody to smoothelin in the recognition of muscularis propria in transurethral resection of urinary bladder tumor (TURBT) specimens. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(6):792–9.
52. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BW, Compérat E, et al. European Association of Urology. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol* 2013; 64(4):639–53.
53. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Schilsky RL, Gaspar LE, Washington M. *AJCC cancer staging manual*. New York, NY: Springer, 2017.
54. Magers MJ, Lopez-Beltran A, Montironi R, Williamson SR, Kaimakliotis HZ, Cheng L. Staging of bladder cancer. *Histopathology* 2019; 74(1):112–34.
55. Brierly JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th ed; Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2017.
56. Tilki D, Svatek RS, Novara G, Seitz M, Godoy G, Karakiewicz PI, et al. Stage pT0 at radical cystectomy confers improved survival: an international study of 4,430 patients. *J. Urol* 2010; 184(3):888–94.

57. Palapattu GS, Shariat SF, Karakiewicz PI, Bastian PJ, Rogers CG, Amiel G, et al. Cancer specific outcomes in patients with pT0 disease following radical cystectomy. *J Urol* 2006; 175(5):1645–9.
58. Raza SJ, Al-Daghmin A, Zhuo S, Mehboob Z, Wang K, Wilding G, et al. Oncologic outcomes following robot-assisted radical cystectomy with minimum 5-year follow-up: the Roswell Park cancer institute experience. *Eur Urol* 2014; 66(5):920-8.
59. Petrelli F, Coinu A, Cabiddu M, Ghilardi M, Vavassori I, Barni S. Correlation of pathologic complete response with survival after neoadjuvant chemotherapy in bladder cancer treated with cystectomy: a meta-analysis. *Eur Urol* 2014; 65(2):350–7.
60. Kassouf W, Spiess PE, Brown GA, Munsell MF, Grossman HB, Siefker-Radtke A, et al. P0 stage at radical cystectomy for bladder cancer is associated with improved outcome independent of traditional clinical risk factors. *Eur Urol* 2007; 52(3):769–74.
61. Shariat SF, Palapattu GS, Amiel GE, Karakiewicz PI, Rogers CG, Vazina A, et al. Characteristics and outcomes of patients with carcinoma in situ only at radical cystectomy. *Urology* 2006; 68(3):538–42.
62. Chade DC, Shariat SF, Godoy G, Savage CJ, Cronin AM, Bochner BH, et al. Clinical outcomes of primary bladder carcinoma in situ in a contemporary series. *J Urol* 2010; 184(1):74–80.
63. Tilki D, Reich O, Svatek RS, Karakiewicz PI, Kassouf W, Novara G, et al. Characteristics and outcomes of patients with clinical carcinoma in situ only treated with radical cystectomy: an international study of 243 patients. *J Urol* 2010; 183(5):1757–63.
64. Moschini M, Shariat SF, Abufaraj M, Soria F, Klatte T, Croce G, et al. The presence of carcinoma in situ at radical cystectomy increases the risk of urothelial recurrence: implications for follow-up schemes. *Urol Oncol* 2017; 35(4):151.e17–151.e23.
65. Kang HW, Kim YH, Jeong P, Park C, Kim WT, Ryu DH, et al. Expression levels of FGFR3 as a prognostic marker for the progression of primary pT1 bladder cancer and its association with mutation status. *Oncol Lett* 2017; 14(3):3817-24.
66. Compérat E, Egevad L, Lopez-Beltran A, Camparo P, Algaba F, Amin M, et al. An interobserver reproducibility study on invasiveness of bladder cancer using virtual microscopy and heatmaps. *Histopathology* 2013; 63(6):756–66.
67. Cheng L, Montironi R, Davidson DD, Lopez-Beltran A. Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Mod Pathol* 2009; 22(Suppl2):S70-95.
68. Lopez-Beltran A, Cheng L. Stage pT1 bladder carcinoma: diagnostic criteria, pitfalls and prognostic significance. *Pathology* 2003; 35(6):484–91.

69. Andius P, Johansson SL, Holmang S. Prognostic factors in stage T1 bladder cancer: tumor pattern (solid or papillary) and vascular invasion more important than depth of invasion. *Urology* 2007; 70(4):758–62.
70. Mhawech P, Iselin C, Pelte MF. Value of immunohistochemistry in staging T1 urothelial bladder carcinoma. *Eur Urol* 2002; 42(5): 459–63.
71. Tamas EF, Epstein JI. Detection of residual tumor cells in bladder biopsy specimens: pitfalls in the interpretation of cytokeratin stains. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(3):390–7.
72. van der Aa MN, van Leenders GJ, Steyerberg EW, van Rhijn BW, Jöbsis AC, Zwarthoff EC, et al. A new system for substaging pT1 papillary bladder cancer: a prognostic evaluation. *Hum Pathol* 2005; 36(9):981–6.
73. McKenney JK, Gomez JA, Desai S, Lee MW, Amin MB. Morphologic expressions of urothelial carcinoma in situ: a detailed evaluation of its histologic patterns with emphasis on carcinoma in situ with microinvasion. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(3):356–62.
74. Bertz S, Denzinger S, Otto W, Wieland WF, Stoehr R, Hofstaedter F, et al. Substaging by estimating the size of invasive tumour can improve risk stratification in pT1 urothelial bladder cancer – evaluation of a large hospital-based single-centre series. *Histopathology* 2011; 59(4):722–32.
75. van Rhijn BW, van der Kwast TH, Alkhateeb SS, Fleshner NE, van Leenders GJ, Bostrom PJ, et al. A new and highly prognostic system to discern T1 bladder cancer substage. *Eur Urol* 2012; 61(2):378–4.
76. Chang WC, Chang YH, Pan CC. Prognostic significance in substaging of T1 urinary bladder urothelial carcinoma on transurethral resection. *Am J Surg Pathol* 2012; 36(3):454–61.
77. 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.
78. Lopez-Beltran A, Cheng L, Andersson L, Brausi M, de Matteis A, Montironi R, et al. Preneoplastic non-papillary lesions and conditions of the urinary bladder: an update based on the Ancona International Consultation. *Virchows Arch* 2002; 440(1):3–11.
79. Younes M, Sussman J, True LD. The usefulness of the level of the muscularis mucosae in the staging of invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 1990; 66(3):543–8.
80. Cheng L, Weaver AL, Neumann RM, Scherer BG, Bostwick DG. Substaging of T1 bladder carcinoma based on the depth of invasion as measured by micrometer: a new proposal. *Cancer* 1999; 86(6):1035–43.

81. Paner GP, Ro JY, Wojcik EM, Venkataraman G, Datta MW, Amin MB. Further characterization of the muscle layers and lamina propria of the urinary bladder by systematic histologic mapping: implications for pathologic staging of invasive urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(9):1420–9.
82. Orsola A, Werner L, de Torres I, Martin-Doyle W, Raventos CX, Lozano F, et al. Reexamining treatment of high-grade T1 bladder cancer according to depth of lamina propria invasion: a prospective trial of 200 patients. *Br J Cancer* 2015; 112(3):468–74.
83. Paner GP, Montironi R, Amin MB. Challenges in pathologic staging of bladder cancer: proposals for fresh approaches of assessing pathologic stage in light of recent studies and observations pertaining to bladder histoanatomic variances. *Adv Anat Pathol* 2017; 24(3):113–27.
84. Brimo F, Wu C, Zeizafoun N, Tanguay S, Aprikian A, Mansure JJ, et al. Prognostic factors in T1 bladder urothelial carcinoma: the value of recording millimetric depth of invasion, diameter of invasive carcinoma, and muscularis mucosa invasion. *Hum Pathol* 2013; 44(1):95–102.
85. Fransen van de Putte EE, Behrendt MA, Pigot GL, van der Kwast TH, van Rhijn BW. Prognostic significance of substage and WHO classification systems in T1 urothelial carcinoma of the bladder. *Curr Opin Urol* 2015; 25(5):427–35.
86. Leivo MZ, Sahoo D, Hamilton Z, Mirsadraei L, Shabaik A, Parsons JK, et al. Analysis of T1 bladder cancer on biopsy and transurethral resection specimens: comparison and ranking of T1 quantification approaches to predict progression to muscularis propria invasion. *Am J Surg Pathol* 2018; 42(1):e1–e10.
87. Boudreaux KJ Jr, Clark PE, Lowrance WT, Rumohr JA, Barocas DA, Cookson MS, et al. Comparison of American Joint Committee on Cancer pathological stage T2a versus T2b urothelial carcinoma: analysis of patient outcomes in organ confined bladder cancer. *J Urol* 2009; 181(2):540–5; discussion 546.
88. Cheng L, Neumann RM, Scherer BG, Weaver AL, Leibovich BC, Nehra A, et al. Tumor size predicts the survival of patients with pathologic stage T2 bladder carcinoma: a critical evaluation of the depth of muscle invasion. *Cancer* 1999; 85(12):2638–47.
89. Zarei S, Frank I, Boorjian SA, Thompson RH, Kim S, Weight C, et al. Prognostic significance of measured depth of invasion of urothelial carcinoma of the bladder compared to the 2010 American Joint Committee on Cancer pT2 and pT3 classifications. *J Urol* 2012; 188(5):1706–11.

90. Sonpavde G, Khan MM, Svatek RS, Lee R, Novara G, Tilki D, et al. Prognostic risk stratification of pathological stage T2N0 bladder cancer after radical cystectomy. *BJU Int* 2011; 108(5):687–92.
91. Ghoneim MA, Abdel-Latif M, el-Mekresh M, Abol-Enein H, Mosbah A, Ashamallah A, et al. Radical cystectomy for carcinoma of the bladder: 2,720 consecutive cases 5 years later. *J Urol* 2008; 180(1):121–7.
92. Ananthanarayanan 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(2):167–75.
93. Neuzillet Y, Leuret T, Molinie V, Yonneau L, Herve JM, Theodore C, et al. Perivesical fat invasion in bladder cancer: implications for prognosis comparing pT2b, pT3a and pT3b stages and consequences for adjuvant chemotherapy indications. *BJU Int* 2012; 110(11):1736–41.
94. Montironi R, Cheng L, Mazzucchelli R, Scarpelli M, Kirkali Z, Montorsi F, et al. Critical evaluation of the prostate from cystoprostatectomies for bladder cancer: insights from a complete sampling with the whole mount technique. *Eur Urol* 2009; 55(6):1305–9.
95. Knoedler JJ, Boorjian SA, Tollefson MK, Cheville JC, Thapa P, Tarrell RF, et al. Urothelial carcinoma involving the prostate: the association of revised tumour stage and coexistent bladder cancer with survival after radical cystectomy. *BJU Int* 2014; 114(6):832–6.
96. Ayyathurai R, Gomez P, Luongo T, Soloway MS, Manoharan M. Prostatic involvement by urothelial carcinoma of the bladder: clinicopathological features and outcome after radical cystectomy. *BJU Int* 2007; 100(5):1021–5.
97. Daneshmand S, Stein JP, Lesser T, Quek ML, Nichols PW, Miranda G, et al. Prognosis of seminal vesicle involvement by transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2004; 172(1):81–4.
98. May M, Brookman-May S, Burger M, Gilfrich C, Fritsche HM, Rink M, et al. Concomitant seminal vesicle invasion in pT4a urothelial carcinoma of the bladder with contiguous prostatic infiltration is an adverse prognosticator for cancer-specific survival after radical cystectomy. *Ann Surg Oncol* 2014; 21(12):4034–40.
99. Salem H, El-Mazny A. A clinicopathologic study of gynecologic organ involvement at radical cystectomy for bladder cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2011; 115(2):188–90.



100. Reyes MC, Park KJ, Lin O, Ioffe O, Isacson C, Soslow RA, et al. Urothelial carcinoma involving the gynecologic tract: a morphologic and immunohistochemical study of 6 cases. *Am J Surg Pathol* 2012; 36(7):1058–65.
101. Aziz A, Shariat SF, Roghmann F, Brookman-May S, Stief CG, Rink M, et al. Prediction of cancer specific survival after radical cystectomy in pT4a urothelial carcinoma of the bladder: development of a tool for clinical decision-making. *BJU Int* 2016; 117(2):272–9.
102. May M, Bastian PJ, Brookman-May S, Fritsche HM, Tilki D, Otto W, et al. Gender-specific differences in cancer-specific survival after radical cystectomy for patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder in pathologic tumor stage T4a. *Urol Oncol* 2013; 31(7):1141–7.
103. 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.
104. Nuhn P, May M, Fritsche HM, Buchner A, Brookman-May S, Bolenz C, et al. External validation of disease-free survival at 2 or 3 years as a surrogate and new primary endpoint for patients undergoing radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol* 2012; 38(7):637–42.
105. Liberman D, Alasker A, Sun M, Ismail S, Lughezzani G, Jeldres C, et al. Radical cystectomy for patients with pT4 urothelial carcinoma in a large population-based study. *BJU Int* 2011; 107(6):905–11.
106. O’Sullivan B, Brierley JD, D’Cruz AK., Fey MF, Pollock R, Vermorken JB, et al. *UICC Manual of Clinical Oncology*, 9th ed. International Union Against Cancer: Wiley-Blackwell, 2015.
107. 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(1):106–19.
108. Linder BJ, Frank I, Cheville JC, Thompson RH, Thapa P, Tarrell RF, et al. Outcomes following radical cystectomy for nested variant of urothelial carcinoma: a matched cohort analysis. *J Urol* 2013; 189(5):1670–5.
109. 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(2):405–9.

- 110.Xylinas E, Rink M, Robinson BD, Lotan Y, Babjuk M, Brisuda A, et al. Impact of histological variants on oncological outcomes of patients with urothelial carcinoma of the bladder treated with radical cystectomy. *Eur J Cancer* 2013; 49(8):1889–97.
- 111.Krasnow RE, Drummb M, Roberts HJ, Niemierko A, Wu CL, Wu S, et al. Clinical outcomes of patients with histologic variants of urothelial cancer treated with trimodality bladder-sparing therapy. *Eur Urol* 2017; 72(1):54–60.
- 112.Zargar-Shoshtari K, Sverrisson EF, Sharma P, Gupta S, Poch MA, Pow-Sang JM, et al. Clinical outcomes after neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy in the presence of urothelial carcinoma of the bladder with squamous or glandular differentiation. *Clin Genitourin Cancer* 2016; 14(1):82–8.
- 113.Gulmann C, Paner GP, Parakh RS, Hansel DE, Shen SS, Ro JY, et al. Immunohistochemical profile to distinguish urothelial from squamous differentiation in carcinomas of urothelial tract. *Hum Pathol* 2013; 44(2):164–72.
- 114.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(7):1473–82.
- 115.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(11):1534–42.
- 116.Zaghloul MS, Nouh A, Nazmy M, Ramzy S, Zaghloul AS, Sedira MA, et al. Long-term results of primary adenocarcinoma of the urinary bladder: A report on 192 patients. *Urol Oncol* 2006; 24(1):13–20.
- 117.el-Mekresh MM, el-Baz MA, Abol-Enein H, Ghoneim MA. Primary adenocarcinoma of the urinary bladder: a report of 185 cases. *Br J Urol* 1998; 82(2):206–12.
- 118.Lopez-Beltran A, Cheng L, Raspollini M, Canas-Marques R, Scarpelli M, Cimadamore A, et al. Variants of Bladder Cancer: The Pathologist's Point of View. *Eur Urol Supplements* 2017; 16(12): 210–22.
- 119.Kunze E, Francksen B, Schulz H. Expression of MUC5AC apomucin in transitional cell carcinomas of the urinary bladder and its possible role in the development of mucus-secreting adenocarcinomas. *Virchows Arch* 2001; 439(5): 609–15.
- 120.Tuna B, Yörükoğlu K, Mungan U, Kirkali Z. Urothelial carcinoma of the bladder with trophoblastic differentiation: a case report. *Int Urol Nephrol* 2004; 36(4):529-31.

121. Douglas J, Sharp A, Chau C, Head J, Drake T, Wheeler M, et al. Serum total hCG beta level is an independent prognostic factor in transitional cell carcinoma of the urothelial tract. *Br J Cancer* 2014; 110(7):1759–66.
122. Monn MF, Kaimakliotis HZ, Pedrosa JA, Cary KC, Bihrlé R, Cheng L, et al. Contemporary bladder cancer: variant histology may be a significant driver of disease. *Urol Oncol* 2015; 33(1):18.e15-20.
123. Solomon JP, Lowenthal BM, Kader AK, Parsons JK, Flaig TW, Siefker-Radtke AO, et al. Challenges in the diagnosis of urothelial carcinoma variants: can emerging molecular data complement pathology review? *Urology* 2017; 102:7–16.
124. Lopez Beltran A, Cheng L, Montironi R, Blanca A, Leva M, Rouprêt M, et al. Clinicopathological characteristics and outcome of nested carcinoma of the urinary bladder. *Virchows Arch* 2014; 465(2):199–205.
125. Linder BJ, Frank I, Cheville JC, Thompson RH, Thapa P, Tarrell RF, et al. Outcomes following radical cystectomy for nested variant of urothelial carcinoma: a matched cohort analysis. *J Urol* 2013; 189(5):1670–5.
126. Cox R, Epstein JI. Large nested variant of urothelial carcinoma: 23 cases mimicking von Brunn nests and inverted growth pattern of noninvasive papillary urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2011; 35(9):1337–42.
127. Comperat E, McKenney JK, Hartmann A, Hes O, Bertz S, Varinot J, et al. Large nested variant of urothelial carcinoma: a clinicopathological study of 36 cases. *Histopathology* 2017; 71(5):703–10.
128. Zhong M, Tian W, Zhuge J, Zheng X, Huang T, Cai D, et al. Distinguishing nested variants of urothelial carcinoma from benign mimickers by TERT promoter mutation. *Am J Surg Pathol* 2015; 39(1):127–31.
129. Lopez-Beltran A, Montironi R, Cheng L. Microcystic urothelial carcinoma: morphology, immunohistochemistry and clinical behavior. *Histopathology* 2014; 64(6):872–9.
130. Willis DL, Flaig TW, Hansel DE, Milowsky MI, Grubb RL, Al-Ahmadie HA, et al. Micropapillary bladder cancer: current treatment patterns and review of the literature. *Urol Oncol* 2014; 32(6):826-32.
131. Sangoi AR, Beck AH, Amin MB, Cheng L, Epstein JI, Hansel DE, et al. Interobserver reproducibility in the diagnosis of invasive micropapillary carcinoma of the urinary tract among urologic pathologists. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(9):1367–76.

132. Comperat E, Roupret M, Yaxley J, Reynolds J, Varinot J, Ouzaïd I, et al. Micropapillary urothelial carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathological analysis of 72 cases. *Pathology* 2010; 42(7):650–4.
133. Amin A, Epstein JI. Noninvasive micropapillary urothelial carcinoma: a clinicopathologic study of 18 cases. *Hum Pathol* 2012; 43(12):2124–8.
134. Guo CC, Dadhania V, Zhang L, Majewski T, Bondaruk J, Sykulski M, et al. Gene expression profile of clinically aggressive micropapillary variant of bladder cancer. *Eur Urol* 2016; 70(4):611–20.
135. Ross JS, Wang K, Gay LM, Al-Rohil RN, Nazeer T, Sheehan CE, et al. A high frequency of activating extracellular domain ERBB2 (HER2) mutation in micropapillary urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2014; 20(1):68–75.
136. 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(8):828–34.
137. 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.
138. Kaimakliotis HZ, Monn MF, Cheng L, Masterson TA, Cary KC, Pedrosa JA, et al. Plasmacytoid bladder cancer: variant histology with aggressive behavior and a new mode of invasion along fascial planes. *Urology* 2014; 83(5):1112–6.
139. Dayyani F, Czerniak BA, Sircar K, Munsell MF, Millikan RE, Dinney CP, et al. Plasmacytoid urothelial carcinoma, a chemosensitive cancer with poor prognosis, and peritoneal carcinomatosis. *J Urol* 2013; 189(5):1656–61.
140. 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.
141. Keck B, Stoehr R, Wach S, Rogler A, Hofstaedter F, Lehmann J, et al. The plasmacytoid carcinoma of the bladder – rare variant of aggressive urothelial carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 129(2):346–54.
142. Sanfrancesco J, McKenney JK, Leivo MZ, Gupta S, Elson P, Hansel DE. Sarcomatoid urothelial carcinoma of the bladder: analysis of 28 cases with emphasis on clinicopathologic features and markers of epithelial-to-mesenchymal transition. *Arch Pathol Lab Med* 2016; 140(6):543–51.

143. 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.
144. Samaratunga H, Delahunt B, Egevad L, Adamson M, Hussey D, Malone G, et al. Pleomorphic giant cell carcinoma of the urinary bladder: an extreme form of tumour dedifferentiation. *Histopathology*. 2016; 68(4):533-40.
145. Lopez-Beltran A, Cheng L, Comperat E, Roupre<sup>^</sup>t M, Blanca A, Menendez CL, et al. Large cell undifferentiated carcinoma of the urinary bladder. *Pathology* 2010; 42(4):364–8.
146. Kawano H, Tanaka S, Ishii A, Cui D, Eguchi S, Hashimoto O, et al. Osteoclast-rich undifferentiated carcinoma of the urinary bladder: an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 2011; 207(11):722-7.
147. Knez VM, Barrow W, Lucia MS, Wilson S, La Rosa FG. Clear cell urothelial carcinoma of the urinary bladder: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep* 2014; 8:275.
148. Lopez-Beltran A, Amin MB, Oliveira PS, Montironi R, Algaba F, McKeeney JK, et al. Urothelial carcinoma of the bladder, lipid cell variant: clinicopathologic findings and LOH analysis. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(3):371–6.
149. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014; 507(7492):315-22.
150. Williams SV, Hurst CD, Knowles MA. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum Mol Genet* 2013; 22(4):795–803.
151. Singh D, Chan JM, Zoppoli P, Niola F, Sullivan R, Castano A, et al. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science* 2012; 337(6099):1231–5.
152. Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun* 2013; 4:2185.
153. Bell RJ, Rube HT, Xavier-Magalhães A, Costa BM, Mancini A, Song JS, et al. Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. *Mol Cancer Res* 2016 Apr; 14(4):315-23.
154. Jeong DE, Woo SR, Nam H, Nam DH, Lee JH, Joo KM. Preclinical and clinical implications of TERT promoter mutation in glioblastoma multiforme. *Oncol Lett* 2017; 14(6):8213-9.

155. Leão R, Lee D, Figueiredo A, Hermanns T, Wild P, Komosa M, et al. Combined genetic and epigenetic alterations of the TERT promoter affect clinical and biological behavior of bladder cancer. *Int J Cancer* 2019; 144(7):1676-84.
156. Descotes F, Kara N, Decaussin-Petrucci M, Piaton E, Geiguer F, Rodriguez-Lafrasse C, et al. Non-invasive prediction of recurrence in bladder cancer by detecting somatic TERT promoter mutations in urine. *Br J Cancer* 2017; 117(4):583-7.
157. Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahloun AG, Harris BT, et al. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science* 2011; 333(6045): 1039–43.
158. Balbas-Martinez C, Sagrera A, Carrillo-de-Santa-Pau E, Earl J, Márquez M, Vazquez M, et al. Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. *Nat Genet* 2013; 45(12):1464–9.
159. Taylor CF, Platt FM, Hurst CD, Thygesen HH, Knowles MA. Frequent inactivating mutations of STAG2 in bladder cancer are associated with low tumour grade and stage and inversely related to chromosomal copy number changes. *Hum Mol Genet* 2014; 23(8):1964–74.
160. Helsten T, Elkin S, Arthur E, Tomson BN, Carter J, Kurzrock R. The FGFR landscape in cancer: analysis of 4,853 tumors by next-generation sequencing. *Clin Cancer Res* 2016; 22(1):259–67.
161. Williams SV, Hurst DC, Knowles MA. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum Mol Genet* 2013; 22(4):795–803.
162. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2016; 387(10031):1909–20.
163. Van Allen EM, Mouw KW, Kim P, Iyer G, Wagle N, Al-Ahmadie H, et al. Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Cancer Discov* 2014; 4(10):1140–53.
164. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014; 25(2):152–65.
165. 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(8):3110–5.



166. Sjö Dahl G, Lovgren K, Lauss M, Patschan O, Gudjonsson S, Chebil G, et al. Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma. *Am J Pathol* 2013; 183(3): 681–91.
167. Amin MB, Smith SC, Reuter VE, Epstein JI, Grignon DJ, Hansel DE, et al. Update for the practicing pathologist: The International Consultation On Urologic Disease-European association of urology consultation on bladder cancer. *Mod Pathol* 2015; 28(5):612–30.
168. Hurst CD, Knowles MA. Molecular subtyping of invasive bladder cancer: time to divide and rule? *Cancer Cell* 2014; 25(2):135–6.
169. Volkmer JP, Sahoo D, Chin RK, Ho PL, Tang C, Kurtova AV, et al. Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(6):2078–83.
170. Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(33):14016–21.
171. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008; 452(7184):230–3.
172. Jones R, Latinovic R, Charlton J, Gulliford MC. Alarm symptoms in early diagnosis of cancer in primary care: cohort study using General Practice Research Database. *BMJ* 2007; 334:1040.
173. Ngo B, Papa N, Perera M, Bolton D, Sengupta S. Bladder cancer diagnosis during haematuria investigation - implications for practice guidelines. *BJU Int* 2017; 119(Suppl 5):53–4.
174. Krogsbøll LT, Jørgensen KJ, Gøtzsche PC. Screening with urinary dipsticks for reducing morbidity and mortality. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 1:CD010007.
175. Bangma CH, Loeb S, Busstra M, Zhu X, El Bouazzaoui S, Refos J, et al. Outcomes of a bladder cancer screening program using home hematuria testing and molecular markers. *Eur Urol* 2013; 64(1):41–7.
176. Pesch B, Nasterlack M, Eberle F, Bonberg N, Taeger D, Leng G, et al; UroScreen Group. The role of haematuria in bladder cancer screening among men with former occupational exposure to aromatic amines. *BJU Int* 2011; 108(4):546–52.
177. Steiner H, Bergmeister M, Verdorfer I, Granig T, Mikuz G, Bartsch G, et al. Early results of bladder-cancer screening in a high-risk population of heavy smokers. *BJU Int* 2008; 102(3):291–96.

178. Jancke G, Rosell J, Jahnson S. Impact of tumour size on recurrence and progression in Ta/T1 carcinoma of the urinary bladder. *Scand J Urol Nephrol* 2011; 45(6):388–92.
179. Burger M, Grossman HB, Droller M, Schmidbauer J, Hermann G, Drăgoescu O, et al. Photodynamic diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer with hexaminolevulinate cystoscopy: a meta-analysis of detection and recurrence based on raw data. *Eur Urol* 2013; 64(5):846–54.
180. Schmitz-Dräger BJ, Droller M, Lokeshwar VB, Lotan Y, Hudson MA, van Rhijn BW, et al. Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus. *Urol Int* 2015; 94(1):1–24.
181. Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 2003; 61(1):109–18.
182. Chou R, Gore JL, Buckley D, Fu R, Gustafson K, Griffin JC, et al. Urinary biomarkers for diagnosis of bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2015; 163(12):922–31.
183. Chung W, Bondaruk J, Jelinek J, Lotan Y, Liang S, Czerniak B, et al. Detection of bladder cancer using novel DNA methylation biomarkers in urine sediments. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(7):1483-91.
184. Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, Gontero P, Brausi MA, van Andel G, et al. EORTC nomograms and risk groups for predicting recurrence, progression, and disease-specific and overall survival in non-muscle-invasive stage Ta-T1 urothelial bladder cancer patients treated with 1–3 years of maintenance bacillus Calmette-Guerin. *Eur Urol* 2016; 69(1):60–9.
185. Gontero P, Sylvester R, Pisano F, Joniau S, Vander Eeckt K, Serretta V, et al. Prognostic factors and risk groups in T1G3 non-muscle-invasive bladder cancer patients initially treated with Bacillus Calmette-Guérin: results of a retrospective multicenter study of 2451 patients. *Eur Urol* 2015; 67(1):74–82.
186. Kamat AM, Witjes JA, Brausi M, Soloway M4, Lamm D5, Persad R6, et al. Defining and treating the spectrum of intermediate risk nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2014; 192(2):305–15.
187. Martinez Rodriguez RH, Buisan Rueda O, Ibarz L. Bladder cancer: Present and future. *Med Clin (Barc)* 2017; 149(10):449-55.

- 188.Sfakianos JP, Kim PH, Hakimi AA, Herr HW. The effect of restaging transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with nonmuscle invasive bladder cancer treated with intravesical bacillus Calmette-Guérin. *J Urol* 2014; 191(2):341–45.
- 189.Sylvester RJ, Oosterlinck W, Holmang S, Sydes MR, Birtle A, Gudjonsson S, et al. Systematic review and individual patient data meta-analysis of randomized trials comparing a single immediate instillation of chemotherapy after transurethral resection with transurethral resection alone in patients with stage pTa-pT1 urothelial carcinoma of the bladder: which patients benefit from the instillation? *Eur Urol* 2016; 69(2):231–44.
- 190.Bosschieter J, van Moorselaar RJA, Vis An, van Ginkel T, Lissenberg-Witte BI, Beckers GMA, et al. The effect of timing of an immediate instillation of mitomycin C after transurethral resection in 941 patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int* 2018; 122(4): 571–5.
- 191.Bellmunt J, Orsola A, Leow JJ, Wiegel T, De Santis M, Horwich A; ESMO Guidelines Working Group. Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25(Suppl 3):iii40–8.
- 192.Kamat AM, Porten S. Myths and mysteries surrounding bacillus Calmette-Guérin therapy for bladder cancer. *Eur Urol* 2014; 65(2):267–69.
- 193.Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA, Kurth K. Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2005; 174(1):86–91.
- 194.Segal R, Yafi FA, Brimo F, Tanguay S, Aprikian A, Kassouf W. Prognostic factors and outcome in patients with T1 high-grade bladder cancer: can we identify patients for early cystectomy? *BJU Int* 2012; 109(7):1026–30.
- 195.Kamat AM, Sylvester RJ, Böhle A, Palou J, Lamm DL, Brausi M, et al. Definitions, end points and clinical trial designs for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): recommendations from the International Bladder Cancer Group (IBCG). *J Clin Oncol* 2016; 34(16):1935–44.
- 196.Alfred Witjes J, Lebre T, Compérat EM, Cowan NC, De Santis M, Bruins HM, et al. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol* 2017; 71(3):462–75.
- 197.Chou R, Selph SS, Buckley DI, Gustafson KS, Griffin JC, Grusing SE, et al. Treatment of muscle-invasive bladder cancer: A systematic review. *Cancer* 2016; 122(6):842–51.

198. Gore JL, Lai J, Setodji CM, Litwin MS, Saigal CS; Urologic Diseases in America Project. Mortality increases when radical cystectomy is delayed more than 12 weeks: results from a Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare analysis. *Cancer* 2009; 115(5):988–96.
199. Aziz A, May M, Burger M, Palisaar RJ, Trinh QD, Fritsche HM, et al; PROMETRICS 2011 research group. Prediction of 90-day mortality after radical cystectomy for bladder cancer in a prospective European multicenter cohort. *Eur Urol* 2014; 66(1):156–63.
200. Bochner BH, Dalbagni G, Sjoberg DD, Silberstein J, Keren Paz GE, Donat SM, et al. Comparing open radical cystectomy and robot-assisted laparoscopic radical cystectomy: a randomized clinical trial. *Eur Urol* 2015; 67(6):1042–50.
201. Nieuwenhuijzen JA, de Vries RR, Bex A, van der Poel HG, Meinhardt W, Antonini N, et al. Urinary diversions after cystectomy: the association of clinical factors, complications and functional results of four different diversions. *Eur Urol* 2008; 53(4):834–42.
202. Skinner EC, Fairey AS, Groshen S, Daneshmand S, Cai J, Miranda G, et al. Randomized Trial of Studer Pouch versus T-Pouch Orthotopic Ileal Neobladder in Patients with Bladder Cancer. *J Urol* 2015; 194(2):433–9.
203. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* 2001; 19(3):666–75.
204. Solsona E, Iborra I, Collado A, Rubio-Briones J, Casanova J, Calatrava A. Feasibility of radical transurethral resection as monotherapy for selected patients with muscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2010; 184(2):475–80.
205. Chung PW, Bristow RG, Milosevic MF, Yi QL, Jewett MA, Warde PR, et al. Long-term outcome of radiation-based conservation therapy for invasive bladder cancer. *Urol Oncol* 2007; 25(4):303–9.
206. Ploussard G, Daneshmand S, Efsthathiou 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.
207. Giacalone NJ, Shipley WU, Clayman RH, Niemierko A, Drumm M, Heney NM, et al. Long-term Outcomes After Bladder-preserving Tri-modality Therapy for Patients with Muscle-invasive Bladder Cancer: An Updated Analysis of the Massachusetts General Hospital Experience. *Eur Urol* 2017; 71(6):52–960.

208. Christodouleas JP, Baumann BC, He J, Hwang WT, Tucker KN, Bekelman JE, et al. Optimizing bladder cancer locoregional failure risk stratification after radical cystectomy using SWOG 8710. *Cancer* 2014; 120(8):1272–80.
209. Sternberg CN, Skoneczna I, Kerst JM, Albers P, Fossa SD, Agerbaek M, et al; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Cancers Group, and the Groupe d'Etude des Tumeurs Urogénitales, and the National Cancer Research Institute Bladder Cancer Study Group, and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, and the German Association of Urologic Oncology. Immediate versus deferred chemotherapy after radical cystectomy in patients with pT3-pT4 or N+ M0 urothelial carcinoma of the bladder (EORTC 30994): an intergroup, open-label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(1):76–86.
210. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(21):4602–8.
211. Galsky MD, Hahn NM, Rosenberg J, Sonpavde G, Hutson T, Oh WK, et al. A consensus definition of patients with metastatic urothelial carcinoma who are unfit for cisplatin-based chemotherapy. *Lancet Oncol* 2011; 12(3):211–4.
212. De Santis M, Bellmunt J, Mead G, Kerst JM, Leahy M, Maroto P, et al. Randomized phase II/III trial assessing gemcitabine/carboplatin and methotrexate/carboplatin/vinblastine in patients with advanced urothelial cancer who are unfit for cisplatin-based chemotherapy: EORTC study 30986. *J Clin Oncol* 2012; 30(2):191–9.
213. Yafi FA, North S, Kassouf W. First- and second-line therapy for metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Curr Oncol* 2011; 18(1):e25–34.
214. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2011; 29(9):1125–32.
215. van Kessel KEM, Zuiverloon TCM, Alberts AR, Boormans JL, Zwarthoff EC. Targeted therapies in bladder cancer: an overview of in vivo research. *Nat Rev Urol* 2015; 12(12):681–94.
216. Rayn KN, Hale GR, Grave GP, Agarwal PK. New therapies in nonmuscle invasive bladder cancer treatment. *Indian J Urol* 2018; 34(1):11–19.

217. Netto GJ. Role for anti-PD-L1 immune checkpoint inhibitor in advanced urothelial carcinoma. *Lancet* 2016; 387(10031):1881–2.
218. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016; 8(5).
219. Wakefield LM, Hill CS. Beyond TGF $\beta$ : roles of other TGF $\beta$  superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(5):328–41.
220. Sakaki-Yumoto M, Katsuno Y, Derynck R. TGF- $\beta$  family signaling in stem cells. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(2):2280–96.
221. Travis MA, Sheppard D. TGF- $\beta$  activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol* 2014; 32:51-82.
222. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 2019; 50(4):924–40.
223. Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, et al. Latent TGF- $\beta$  structure and activation. *Nature* 2011; 474(7351):343–9.
224. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, et al. Targeting the TGF $\beta$  pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2015; 147:22–31.
225. Budi EH, Duan D, Derynck R. Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends Cell Biol* 2017; 27(9):658–72.
226. Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ, Lovén J, Kumar RM, Bilodeau S, et al. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- $\beta$  signaling. *Cell* 2011; 147(3):565–76.
227. Mullen AC, Wrana JL. TGF- $\beta$  family signaling in embryonic and somatic stem-cell renewal and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9(7)pii:a022186.
228. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(3):178–96.
229. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008; 454(7200):56–61.
230. Tripathi V, Sixt KM, Gao S, Xu X, Huang J, Weigert R, et al. Direct regulation of alternative splicing by SMAD3 through PCBP1 is essential to the tumor-promoting role of TGF- $\beta$ . *Mol Cell* 2016; 64(3):549–64.
231. Nakano N, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akatsu R, Nakata M, et al. C18 ORF1, a novel negative regulator of transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J Biol Chem* 2014; 289(18):12680–92.



232. Budi EH, Muthusamy BP, Derynck R. The insulin response integrates increased TGF- $\beta$  signaling through Akt-induced enhancement of cell surface delivery of TGF- $\beta$  receptors. *Sci Signal* 2015; 8(396):ra96.
233. Costanza B, Umelo IA, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A. Stromal Modulators of TGF- $\beta$  in Cancer. *Clin Med* 2017; 6(1).pii:E7.
234. He K, Yan X, Li N, Dang S, Xu L, Zhao B, et al. Internalization of the TGF- $\beta$  type I receptor into caveolin-1 and EEA1 double-positive early endosomes. *Cell Res* 2015; 25(6):738–52.
235. Liu S, Chen S, Zeng J. TGF- $\beta$  signaling: A complex role in tumorigenesis (Review). *Mol Med Rep* 2018; 17(1):699–704.
236. Padua D, Massagué J. Roles of TGF beta in metastasis. *Cell Res* 2009; 19(1):89–102.
237. Drabsch Y, ten Dijke P. TGF- $\beta$  signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31(3-4):553–68.
238. Wendt MK, Tian M, Schiemann WP. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF- $\beta$ -induced EMT during cancer progression. *Cell Tissue Res* 2012; 347(1):85–101.
239. Morris JP 4th, Wang SC, Hebrok M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(10):683–95.
240. Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massagué J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* 2002; 110(1):19–32.
241. Scandura JM, Boccuni P, Massagué J, Nimer SD. Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(42):15231–6.
242. López-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 2009; 1(6-7):303–14.
243. Dunér S, LopatkoLindman J, Ansari D, Gundewar C, Andersson R. Pancreatic cancer: the role of pancreatic stellate cells in tumor progression. *Pancreatology* 2010; 10(6):673–81.
244. van Meeteren LA, Goumans MJ, ten Dijke PJ. TGF- $\beta$  receptor signaling pathways in angiogenesis; emerging targets for anti-angiogenesis therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12(12):2108–20.
245. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 2010; 31(6):220–7.

246. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer* 2018; 18(2):128–34.
247. Derynck R, Akhurst RJ. Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol* 2007; 9(9):1000–4.
248. Neel JC, Humbert L, Lebrun JJ. The Dual Role of TGFβ in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Mol Biol* 2012; 2012:381428.
249. Thuault S, Valcourt U, Petersen M, Manfioletti G, Heldin CH, Moustakas A. Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 2006; 174(2):175–83.
250. Portella G, Cumming SA, Liddell J, Cui W, Ireland H, Akhurst RJ, et al. Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ* 1998; 9(5):393–404.
251. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62(6):1613–8.
252. Christoffersen NR, Silaharoglu A, Orom UA, Kauppinen S, Lund AH. miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFH1B. *RNA* 2007; 13(8):1172–8.
253. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455(7209):58–63.
254. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008; 9(6):582–9.
255. Katz LH, Li Y, Chen JS, Muñoz NM, Majumdar A, Chen J, et al. Targeting TGF-β signaling in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2013; 17(7):743–60.
256. Serova M, Tijeras-Raballand A, Dos Santos C, Albuquerque M, Paradis V, Neuzillet C, et al. Effects of TGF-beta signalling inhibition with galunisertib (LY2157299) in hepatocellular carcinoma models and in ex vivo whole tumor tissue samples from patients. *Oncotarget* 2015; 6(25):21614–27.
257. Oyanagi J, Kojima N, Sato H, Higashi S, Kikuchi K, Sakai K, et al. Inhibition of transforming growth factor-β signaling potentiates tumor cell invasion into collagen matrix induced by fibroblast-derived hepatocyte growth factor. *Exp Cell Res* 2014; 326(2):267–79.

258. Castillejo A, Rothman N, Murta-Nascimento C, Malats N, Garcia-Closas M, Gómez-Martínez A, et al. TGFB1 and TGFBR1 polymorphic variants in relationship to bladder cancer risk and prognosis. *Int J Cancer* 2009; 124(3):608–13.
259. Wei H, Kamat AM, Aldousari S, Ye Y, Huang M, Dinney CP, et al. Genetic variations in the transforming growth factor beta pathway as predictors of bladder cancer risk. *PLoS One* 2012; 7(12):e51758.
260. Zhang Z, Wang S, Wang M, Tong N, Fu G, Zhang Z. Genetic variants in RUNX3 and risk of bladder cancer: a haplotype-based analysis. *Carcinogenesis* 2008; 29(10):1973–8.
261. Bian J, Li B, Zeng X, Hu H, Hong Y, Ouyang H, et al. Mutation of TGF- $\beta$  receptor II facilitates human bladder cancer progression through altered TGF- $\beta$ 1 signaling pathway. *Int J Oncol* 2013; 43(5):1549–59.
262. Miyamoto H, Kubota Y, Shuin T, Torigoe S, Dobashi Y, Hosaka M. Expression of transforming growth factor-beta 1 in human bladder cancer. *Cancer* 1995; 75(10):2565–70.
263. Kim JH, Shariat SF, Kim IY, Menesses-Diaz A, Tokunaga H, Wheeler TM, et al. Predictive value of expression of transforming growth factor-beta(1) and its receptors in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 2001; 92(6):1475–83.
264. Huang TB, Dong CP, Lu SM, Luan Y, Gu X, Zhou GC, et al. A novel 13-gene signature of TGF-beta pathway correlates with tumor stage and grade and predicts poor survival for bladder cancer patients. *Int J Clin Exp Med* 2017; 10(1):608–17.
265. Eder IE, Stenzl A, Hobisch A, Cronauer MV, Bartsch G, Klocker H. Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 in serum and urine from patients with bladder carcinoma. *J Urol* 1996; 156(3):953–7.
266. Mousa H, Jassem A, Hussain M. Role of TGF- $\beta$ 1 in Urinary Bladder Carcinoma. *Baghdad Sci J* 2014; 11(4):1481–5.
267. Wu G, Yin Y, Bai P. TGF- $\beta$ 1 regulates invasion and migration of human bladder cancer cells T24 through epithelial mesenchymal transition. *Biomed Res* 2017; 28(20): 8735–40.
268. Fan Y, Shen B, Tan M, Mu X, Qin Y, Zhang F, et al. TGF- $\beta$ -induced upregulation of malat1 promotes bladder cancer metastasis by associating with suz12. *Clin Cancer Res* 2014; 20(6):1531–41.
269. Liang Y, Zhu F, Zhang H, Chen D, Zhang X, Gao Q, et al. Conditional ablation of TGF- $\beta$  signaling inhibits tumor progression and invasion in an induced mouse bladder cancer model. *Sci Rep* 2016; 6:29479.

270. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012; 45(6):487–98.
271. Lopez J, Tait SW. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer* 2015; 112(6):957–62.
272. Pennarun B, Meijer A, de Vries EG, Kleibeuker JH, Kruyt F, de Jong S. Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805(2):123–40.
273. Kim R, Emi M, Tanabe K, Uchida Y, Toge T. The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy. *Cancer* 2004; 100(11):2281–91.
274. Hazra A, Chamberlain RM, Grossman HB, Zhu Y, Spitz MR, Wu X. Death receptor 4 and bladder cancer risk. *Cancer Res* 2003; 63(6):1157–9.
275. Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Roehrborn CG, et al. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. *Lancet Oncol* 2007; 8(2):128–36.
276. Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol* 2018; 8(5).pii:180002.
277. Stojnev S, Golubović M, Babović P. TP53 gene mutations—from guardian of the genome to oncogene. *Acta Medica Medianae* 2009; 48(4):59–63.
278. Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 2003; 22(53):8628–33.
279. Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(10):782–98.
280. Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K, et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature Med* 2007; 13(9):1070–7.
281. Zhang XD, Franco A, Myers K, Gray C, Nguyen T, Hersey P. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res* 1999; 59(11):2747–53.
282. Szliszka E, Mazur B, Zydowicz G, Czuba ZP, Król W. TRAIL-induced apoptosis and expression of death receptor TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in bladder cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2009; 47(4):579–85.

283. Wolf S, Mertens D, Pscherer A, Schroeter P, Winkler D, Gröne HJ, et al. Ala228 variant of trail receptor 1 affecting the ligand binding site is associated with chronic lymphocytic leukemia, mantle cell lymphoma, prostate cancer, head and neck squamous cell carcinoma and bladder cancer. *Int J Cancer* 2006; 118(7):1831–5.
284. Fisher MJ, Virmani AK, Wu L, Aplenc R, Harper JC, Powell SM, et al. Nucleotide substitution in the ectodomain of trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(6):1688–97.
285. Shin M, Kim HS, Lee SH, Park WS, Kim SY, Park JY, et al. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res* 2001; 61(13):4942–6.
286. Horak P, Pils D, Haller G, Pribill I, Roessler M, Tomek S, et al. Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2005; 3(6):335–43.
287. Morales JC, Ruiz-Magaña MJ, Ruiz-Ruiz C. Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis in human primary T lymphocytes: role of NF-kappaB inhibition. *Morales Mol Immunol* 2007; 44(10):2587–97.
288. Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 2004; 6(3):297–305.
289. Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Trail induces cell migration and invasion in apoptosis resistant cholangiocarcinoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290(1):G129–36.
290. Lane D, Robert V, Grondin R, Rancourt C, Piché A. Malignant ascites protect against TRAIL-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* 2007; 121(6):1227–37.
291. Samuels Y, Diaz LA Jr, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005; 7(6):561–73.
292. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Müller M, Otto G, Strand D, et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996; 2(12):1361–6.
293. Whiteside TL. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin Cancer Biol* 2002; 12(1):43–50.

294. Li J, Zhou Y, Li Q, Zhang J, Sun W, Dai C, et al. Expression of Fas/FasL and c-myc in bladder cancer and their correlation with tumor immune function. *Int J Clin Exp Pathol* 2016; 9(6):6357–63.
295. Yamana K, Bilim V, Hara N, Kasahara T, Itoi T, Maruyama R, et al. Prognostic impact of FAS/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression. *Br J Cancer* 2005; 93(5):544–51.
296. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J* 2009; 23(6):1625–37.
297. Sánchez-Capelo A. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16(1):15–34.
298. Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 2001; 3(8):708–14.
299. Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol* 2002; 4(1):51–8.
300. Ramesh S, Wildey GM, Howe PH. Transforming growth factor beta (TGFbeta)-induced apoptosis: the rise & fall of Bim. *Cell Cycle* 2009; 8(1):11–7.
301. Larisch S, Yi Y, Lotan R, Kerner H, Eimerl S, Tony Parks W, et al. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat Cell Biol* 2000; 2(12):915–21.
302. Atfi A, Buisine M, Mazars A, Gespach C. Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor-beta through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway. *J Biol Chem* 1997; 272(40):24731–4.
303. Wang J, Yang L, Yang J, Kuropatwinski K, Wang W, Liu XQ, et al. Transforming growth factor beta induces apoptosis through repressing the phosphoinositide 3-kinase/AKT/survivin pathway in colon cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68(9):3152–60.
304. Valderrama-Carvajal H, Cocolakis E, Lacerte A, Lee EH, Krystal G, Ali S, et al. Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol* 2002; 4(12):963–9.
305. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM Jr, Ko TC, Luo K. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol* 2004; 6(4):366–72.



306. Yang J, Song K, Krebs TL, Jackson MW, Danielpour D. Rb/E2F4 and Smad2/3 link survivin to TGF-beta-induced apoptosis and tumor progression. *Oncogene* 2008; 27(40):5326–38.
307. Korah J, Falah N, Lacerte A, Lebrun JJ. A transcriptionally active pRb-E2F1-P/CAF signaling pathway is central to TGFβ-mediated apoptosis. *Cell Death Dis* 2012; 3:e407.
308. Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, et al. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev* 2006; 20(22):3130–46.
309. Guasch G, Schober M, Pasolli HA, Conn EB, Polak L, Fuchs E. Loss of TGFbeta signaling destabilizes homeostasis and promotes squamous cell carcinomas in stratified epithelia. *Cancer Cell* 2007; 12(4):313–27.
310. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-B in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(11):807–21.
311. Herzer K, Ganten TM, Schulze-Bergkamen H, Grosse-Wilde A, Koschny R, Krammer PH, et al. Transforming growth factor beta can mediate apoptosis via the expression of TRAIL in human hepatoma cells. *Hepatology* 2005; 42(1):183–92.
312. Herzer K, Grosse-Wilde A, Krammer PH, Galle PR, Kanzler S. Transforming growth factor-beta-mediated tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression and apoptosis in hepatoma cells requires functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1. *Mol Cancer Res* 2008; 6(7):1169–77.
313. Liao JH, Zhou BH, Chai MQ, Song JG. Cycloheximide blocks TGF-beta1-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22(2):176–82.
314. Kim SG, Jong HS, Kim TY, Lee JW, Kim NK, Hong SH, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 2004; 15(2):420–34.
315. Chen WJ, Wahl SM. TGF-b: the missing link in CD4+ CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(2):85–9.
316. Magnus T, Chan A, Grauer O, Toyka KV, Gold R. Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to downregulation of microglial immune activation. *J Immunol* 2001; 167(9):5004–10.
317. Maedler K, Fontana A, Ris F, Sergeev P, Toso C, Oberholzer J, et al. FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(12):8236–41.

318. Porten SP. Epigenetic Alterations in Bladder Cancer. *CurrUrol Rep* 2018; 19(12):102.
319. Li HT, Duymich CE, Weisenberger DJ, Liang G. Genetic and Epigenetic Alterations in Bladder Cancer. *Int Neurourol J* 2016; 20(Suppl 2):S84–94.
320. Wolff EM, Chihara Y, Pan F, Weisenberger DJ, Siegmund KD, Sugano K, et al. Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. *Cancer Res* 2010; 70(20):8169–78.
321. Marsit CJ, Houseman EA, Christensen BC, Gagne L, Wrensch MR, Nelson HH, et al. Identification of methylated genes associated with aggressive bladder cancer. *PLoS One* 2010; 5(8):e12334.
322. Wolff EM, Byun HM, Han HF, Sharma S, Nichols PW, Siegmund KD, et al. Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. *PLoS Genet* 2010; 6(4):e1000917.
323. Shang D, Liu Y, Matsui Y, Ito N, Nishiyama H, Kamoto T, et al. Demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine enhances susceptibility of bladder transitional cell carcinoma to cisplatin. *Urology* 2008; 71(6):1220–5.
324. Faleiro I, Leão R, Binnie A, de Mello RA, Maia AT, Castelo-Branco P. Epigenetic therapy in urologic cancers: an update on clinical trials. *Oncotarget* 2017; 8(7):12484–500.
325. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128(4):693–705.
326. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, et al. Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer. *Cell* 2017; 171(3):540–56.
327. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Boumber Y, Charo C, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet* 2008; 40(6):741–50.
328. Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat Genet* 2011; 43(9):875–8.
329. Martínez-Fernández M, Rubio C, Segovia C, López-Calderón FF, Dueñas M, Paramio JM. EZH2 in Bladder Cancer, a Promising Therapeutic Target. *Int J Mol Sci* 2015; 16(11):27107–32.

330. Grzenda A, Lomberk G, Svingen P, Mathison A, Calvo E, Iovanna J, et al. Functional characterization of EZH2 $\beta$  reveals the increased complexity of EZH2 isoforms involved in the regulation of mammalian gene expression. *Epigenet Chromatin* 2013; 6(1):3.
331. Asangani IA, Ateeq B, Cao Q, Dodson L, Pandhi M, Kunju LP, et al. Characterization of the EZH2-MMSET histone methyltransferase regulatory axis in cancer. *Mol Cell* 2013; 49(1):80-93.
332. Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science* 2012; 338(6113):1465–9.
333. Quan J, Pan X, Zhao L, Li Z, Dai K, Yan F, et al. LncRNA as a diagnostic and prognostic biomarker in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2018; 11:6415–24.
334. Berrondo C, Flax J, Kucherov V, Siebert A, Osinski T, Rosenberg A, et al. Expression of the Long Non-Coding RNA HOTAIR Correlates with Disease Progression in Bladder Cancer and Is Contained in Bladder Cancer Patient Urinary Exosomes. *PLoS One* 2016; 11(1):e0147236.
335. Liu Q, Liu H, Cheng H, Li Y, Li X, Zhu C. Downregulation of long noncoding RNATUG1 inhibits proliferation and induces apoptosis through the TUG1/miR-142/ZEB2 axis in bladder cancer cells. *Onco Targets Ther* 2017; 10:2461–71.
336. Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, et al. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res* 2009; 69(6):2623–9.
337. Adam L, Zhong M, Choi W, Qi W, Nicoloso M, Arora A, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15(16):5060–72.
338. Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, Kawahara K, Uchida Y, Nishiyama K, et al. miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer. *Br J Cancer* 2010; 102(5):883–91.
339. Stefanovic 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(5):409–18.
340. Pavlović NM. Balkan endemic nephropathy—current status and future perspectives. *Clin Kidney J* 2013; 6(3):257–65.

341. Stefanovic V, Radovanovic Z. Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2008; 5(2):105–12.
342. Jankovic Velickovic L, Dolicanin Z, Stefanovic V. Endemic nephropathy and upper urothelial carcinoma-new insights in molecular biology. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* 2014; 35(1):57–64.
343. Li Y, Jin X, Li J, Jin X, Yu J, Sun X, et al. Expression of TRAIL, DR4, and DR5 in bladder cancer: correlation with response to adjuvant therapy and implications of prognosis. *Urology* 2012; 79(4):968.e7–15.
344. Wang H, Albadine R, Magheli A, Guzzo TJ, Ball MW, Hinz S, et al. Increased EZH2 protein expression is associated with invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Urol Oncol* 2012; 30(4):428–33.
345. Chamie K, Litwin MS, Bassett JC, Daskivich TJ, Lai J, Hanley JM, et al. Recurrence of high-risk bladder cancer: a population-based analysis. *Cancer* 2013; 119(17):319–27.
346. van den Bosch S, Alfred Witjes J. Long-term cancer-specific survival in patients with high-risk, non-muscle-invasive bladder cancer and tumour progression: a systematic review. *Eur Urol* 2011; 60(3):493–500.
347. Jankovic Velickovic L, Hattori T, Stefanovic V. Molecular markers in upper urothelial carcinoma associated to Balkan endemic nephropathy. Aristolochic acid as the major risk factor of the worldwide disease. *ScientificWorldJournal* 2009; 9:1360–73.
348. Han J, Xian Z, Zhang Y, Liu J, Liang A. Systematic Overview of Aristolochic Acids: Nephrotoxicity, Carcinogenicity, and Underlying Mechanisms. *Front Pharmacol* 2019; 10:648.
349. Jankovic-Velickovic L, Stojnev S, Ristic-Petrovic A, Dolicanin Z, Hattori T, Mukai K, et al. Pro- and antiapoptotic markers in upper tract urothelial carcinoma associated with Balkan endemic nephropathy. *ScientificWorldJournal* 2011; 11:1699–711.
350. Abdollah F, Gandaglia G, Thuret R, Schmitges J, Tian Z, Jeldres C, et al. Incidence, survival and mortality rates of stage-specific bladder cancer in United States: a trend analysis. *Cancer Epidemiol* 2013; 37(3):219–25.
351. Ghosh M, Brancato SJ, Agarwal PK, Apolo AB. Targeted therapies in urothelial carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2014; 26(3):305–20.
352. Ivanova K, Manolova I, Ignatova MM, Gulubova M. Immunohistochemical Expression of TGF- $\beta$ 1, SMAD4, SMAD7, TGF $\beta$ R2 and CD68-Positive TAM Densities in Papillary Thyroid Cancer. *Open Access Maced J Med Sci* 2018; 6(3):435–41.

353. Belladonna ML, Orabona C, Grohmann U, Puccetti P. TGF- $\beta$  and kynurenines as the key to infectious tolerance. *Trends Mol Med* 2009; 15(2):41–9.
354. Soliman HH, Jackson E, Neuger T, Dees EC, Harvey RD, Han H, et al. A first in man phase I trial of the oral immunomodulator, indoximod, combined with docetaxel in patients with metastatic solid tumors. *Oncotarget* 2014; 5(18):8136–46.
355. Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun* 1986; 53(2):347–51.
356. Brito RB, Malta CS, Souza DM, Matheus LH, Matos YS, Silva CS, et al. 1-Methyl-D-tryptophan potentiates TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in T24 human bladder cancer cells. *PLoS One* 2015; 10(8):e0134858.
357. Brosens LA, Langeveld D, van Hattem WA, Giardiello FM, Offerhaus GJ. Juvenile polyposis syndrome. *World J Gastroenterol* 2011; 17(44):4839–44.
358. Kim BG, Li C, Qiao W, Mamura M, Kasprzak B, Anver M, et al. Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. *Nature* 2006; 441(7096):1015–9.
359. Kong C, Zhang X, Takenaka I. Apoptotic cell death and Smad4 expression in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Int J Urol* 2001; 8(7):386–90.
360. Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng Q, Mookerjee B, Gelinas C, et al. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Nat Cell Biol* 2001; 3(4):409–16.
361. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumorcidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999; 5(2):157–63.
362. O'Kane HF, Watson CJ, Johnston SR, Petak I, Watson RW, Williamson KE. Targeting death receptors in bladder, prostate and renal cancer. *J Urol* 2006; 175(2):432–8.
363. Earel JK Jr, VanOosten RL, Griffith TS. Histone deacetylase inhibitors modulate the sensitivity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-resistant bladder tumor cells. *Cancer Res* 2006; 66(1):499–507.
364. Lee SH, Shin MS, Park WS, Kim SY, Dong SM, Pi JH, et al. Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder. *Cancer Res* 1999; 59(13):3068–72.

365. Ceylan C, Yahşi S, Doğan S, Öztürk E, Ceylan G. Emphasis of FAS/FASL gene polymorphism in patients with non-muscle invasive bladder cancer. *Ir J Med Sci* 2018; 187(4):1115–9.
366. Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ* 2015; 22(4):549–59.
367. Yang H, Li H, Wang Z, Gao J, Guo Y. Is urinary soluble Fas an independent predictor of non-muscle-invasive bladder cancer? A prospective chart study. *Urol Int* 2013; 91(4):456–61.
368. Okouoyo S, Herzer K, Ucur E, Mattern J, Krammer PH, Debatin KM, et al. Rescue of death receptor and mitochondrial apoptosis signaling in resistant human NSCLC in vivo. *Int J Cancer* 2004; 108(4):580–7.
369. Zhu F, Zhang X, Yu Q, Han G, Diao F, Wu C, et al. LncRNA AWPPH inhibits SMAD4 via EZH2 to regulate bladder cancer progression. *J Cell Biochem* 2018; 119(6):4496–505.
370. Wang A, Pan D, Lee YH, Martinez GJ, Feng XH, Dong C. Cutting edge: Smad2 and Smad4 regulate TGF- $\beta$ -mediated Il9 gene expression via EZH2 displacement. *J Immunol* 2013; 191(10):4908–12.
371. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010; 468(7327):1067–73.
372. Elias A, Siegelin MD, Steinmüller A, von Deimling A, Lass U, Korn B, et al. Epigenetic silencing of death receptor 4 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in gliomas. *Clin Cancer Res* 2009; 15(17):5457–65.
373. Ralff MD, El-Deiry WS. TRAIL pathway targeting therapeutics. *Expert Rev Precis Med Drug Dev* 2018; 3(3):197–204.



## Biografija autora

Slavica Stojnev rođena je 16. avgusta 1981. godine u Pančevu. Detinjstvo je provela u Bavaništu, u južnobanatskom okrugu, a od 1996. godine živi u Nišu. Osnovnu školu i Gimnaziju Stevan Sremac završila je sa odličnim uspehom, kao nosilac Vukove diplome. Integrisane studije medicine na Medicinskom fakultetu u Nišu završila je 10.03.2008. sa prosečnom ocenom 9,84. U toku studija bila je student–demonstrator na predmetu patologija i dobitnik brojnih stipendija i nagrada. Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu u Nišu, smer molekularna medicina, upisuje 2008/09. godine, da bi joj 2013. bio odobren prelazak na Doktorske akademske studije – medicinske nauke. Položila je sve predviđene ispite sa prosečnom ocenom 10. Specijalizaciju iz patologije završila je 10.09.2018. godine sa odličnim uspehom.

Slavica Stojnev izabrana je 2012. godine u zvanje saradnika u nastavi na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta u Nišu, nakon višegodišnjeg volonterskog angažovanja. Trenutno je zaposlena kao istraživač–saradnik u Naučnoistraživačkom centru za biomedicinu Medicinskog fakulteta. Angažovana je kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (br.OI175092) i na internim projektima Medicinskog fakulteta u Nišu.

Usavršavala se u dva navrata na Šiga Univerzitetu Medicinskih nauka u Japanu. Autor je i koautor 32 rada kategorije M20, 8 radova kategorije M50, kao i većeg broja saopštenja na međunarodnim i nacionalnim kongresima, od kojih je nekoliko usmenih izlaganja na Evropskim kongresima patologije. Tokom specijalizacije bila je nacionalni predstavnik u Komitetu specijalizanata Evropskog udruženja patologa. Član je Lekarske komore, Udruženja patologa i citologa Srbije i Evropskog udruženja patologa.

## Izjava 1.

### IZJAVA O AUTORSTVU

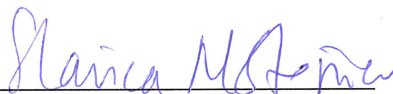
Izjavljujem da je doktorska disertacija, pod naslovom **Analiza ekspresije transformišućeg faktora rasta beta i ćelijskih receptora smrti u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i njihov prognostički značaj**, koja je odbranjena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu:

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da ovu disertaciju, ni u celini, niti u delovima, nisam prijavljivao/la na drugim fakultetima, niti univerzitetima;
- da nisam povredio/la autorska prava, niti zloupotrebio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, koji su u vezi sa autorstvom i dobijanjem akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada, i to u katalogu Biblioteke, Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Nišu, kao i u publikacijama Univerziteta u Nišu.

U Nišu, \_\_\_\_\_

Potpis autora disertacije:

  
(Ime, srednje slovo i prezime)

**Izjava 2.**


**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ELEKTRONSKOG I ŠTAMPANOG OBLIKA  
DOKTORSKE DISERTACIJE**

**Naslov disertacije: Analiza ekspresije transformišućeg faktora rasta beta i ćelijskih receptora smrti u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i njihov prognostički značaj**

Izjavljujem da je elektronski oblik moje doktorske disertacije, koju sam predao/la za unošenje u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, istovetan štampanom obliku.

U Nišu, \_\_\_\_\_

Potpis autora disertacije:

  
\_\_\_\_\_  
(Ime, srednje slovo i prezime)

### Izjava 3.

## IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Nikola Tesla“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu unese moju doktorsku disertaciju, pod naslovom: **Analiza ekspresije transformišućeg faktora rasta beta i ćelijskih receptora smrti u urotelnom karcinomu mokraćne bešike i njihov prognostički značaj.**

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom obliku, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, unetu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, mogu koristiti svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade (CC BY-NC-ND)

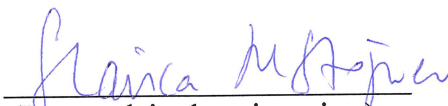
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerade (CC BY-ND)

6. Autorstvo – делити под istim условима (CC BY-SA)

U Nišu, \_\_\_\_\_

Potpis autora disertacije:

  
\_\_\_\_\_  
(Ime, srednje slovo i prezime)