Miofibroblastična i upalna reakcija strome u neinvazivnom (Ta) i invazivnom (T1) papilarnom urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura

Marušić, Zlatko

Doctoral thesis / Disertacija

2010

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:359939

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



Središnja medicinska knjižnica

Marušić, Zlatko (2010) ***Miofibroblastična i upalna reakcija strome u neinvazivnom (Ta) i invazivnom (T1) papilarnom urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura [Myofibroblastic and inflammatory stromal reaction in non-invasive (pTa) and invasive (pT1) papillary urothelial carcinoma of the urinary bladder].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/854

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Zlatko Marušić

Miofibroblastična i upalna reakcija strome u neinvazivnom (Ta) i invazivnom (T1) papilarnom urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura

DISERTACIJA

Zagreb, 2010. godine

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Zlatko Marušić

Miofibroblastična i upalna reakcija strome u neinvazivnom (Ta) i invazivnom (T1) papilarnom urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura

DISERTACIJA

Zagreb, 2010. godine

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničke bolnice „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu

Voditelj rada: Dr. sc. Davor Tomas

Zahvaljujem se dr. sc. Davoru Tomasu, vjerojatno jednom od najboljih disertacijskih mentora te prof. dr. sc. Boži Krušlinu na korisnim savjetima, materijalnoj i moralnoj pomoći u provedbi istraživanja. Također se zahvaljujem svim djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“.

Ovaj rad je posvećen mojoj obitelji – majci i ocu zbog svih napora koje su uložili, Antoniji (3 god.) i Juraju (1.5 god.) zbog toga što je uz njih teško biti loše raspoložen i Katarini zbog toga što je uz nju lako biti sretan.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD 1
1.1. ANATOMIJA MOKRAĆNOG MJEHURA 1
1.2. HISTOLOGIJA MOKRAĆNOG MJEHURA 2
1.3. EMBRIOLOGIJA MOKRAĆNOG MJEHURA 5
1.4. NENEOPLASTIČNE PROMJENE UROTELA 5
1.5. BENIGNE EPITELNE NEOPLAZME I PREKURSORI KARCINOMA 5
1.5.1. PAPILOM 9
1.5.2. INVERTIRANI PAPILOM 9
1.5.3. UROTELNA DISPLAZIJA 11
1.6. RAK MOKRAĆNOG MJEHURA 12
1.6.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA 12
1.6.2. KLINIČKA SLIKA I RANO OTKRIVANJE BOLESTI 15
1.6.3. STUPNJEVANJE BOLESTI 18
1.6.4. PATOHISTOLOŠKA SLIKA 20
1.6.5. POSEBNI OBLICI PRIMARNOG KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA 27
1.6.6. MOLEKULARNE I GENETSKE PROMJENE POVEZANE S KARCINOMOM MOKRAĆNOG MJEHURA 30
1.6.7. PROGNOSTIČKI ČIMBENICI 32
1.6.8. TERAPIJA I PROGNOZA 33
1.7. MIOFIBROBLASTI 34
1.8. UPALNA REAKCIJA STROME NA NEOPLAZIJU 37
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA 41
2.1. HIPOTEZA 41
2.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 42
3. BOLESNICI I METODE 43
3.1. BOLESNICI 43
3.2. METODE 43
3.2.1. HISTOKEMIJSKA I IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA 44
3.2.2. PROCJENA UPALNE REAKCIJE I INFILTRACIJA EOZINOFILA 45
3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 46
4. REZULTATI 47
4.1. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA 60
5. RASPRAVA 63
6. ZAKLJUČCI 74
7. SAŽETAK 77
8. SUMMARY 79
9. LITERATURA 80
10. ŽIVOTOPIS 99

POPIS OZNAKA I KRATICA

ALA – 5-aminolevulinska kiselina
BCG – Bacillus Calmette-Guérin
BM – bazalna membrana
CIS – karcinom in situ
CK – citokeratin
CDKN2A – od engl. „cycline-dependent kinase inhibitor 2A“
DNA – deoksiribonukleinska kiselina (od engl. „deoxyribonucleic acid“)
ECP – eozinofilni kationski protein
FGFR3 – receptor fibroblastičnog faktora rasta 3
HE – hemalaun-eozin
ISUP – od engl. „International Society of Urological Pathologists“
IP – invertirani papilom
MBP – od engl. „major basic protein“
PUNLMP – papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala
SMA – alfa glatkomišićni aktin (od engl. „smooth muscle actin“)
SZO – Svjetska zdravstvena organizacija
TABE – od engl. „tumor-associated blood eosinophillia“
TATE – od engl. „tumor-associated tissue eosinophillia“
TUR – transuretralna resekcija

1. UVOD

1.1. ANATOMIJA MOKRAĆNOG MJEHURA

Mokraćni mjehur je neparni šuplji organ mišićne stijenke koji u praznom stanju ima oblik obrnute četverostrane piramide. Funkcija mu je skladištenje i voljno pražnjenje mokraće. U dojenčadi i manje djece je uvijek dijelom smješten u abdomenu, čak i u praznom stanju. Oko 6. godine života ulazi u veliku zdjelicu i tamo je jednim dijelom smješten sve do kraja puberteta. U odraslih se nalazi u prednjem donjem dijelu male zdjelice, dok se u punom stanju, u kojem može sadržavati 400 do 500 mL mokraće bez znatnijeg povišenja intraluminalnog tlaka, nalazi unutar trbušne šupljine dopirući sve do razine pupka (1).

S prednje strane mokraćnog mjehura nalazi se simfiza stidne kosti, uz koju je dijelom fiksiran pubovezikalnim ligamentom u žena, odnosno puboprostatičnim ligamentom u muškaraca. Mokraćni mjehur je s gornje i stražnje strane prekriven parijetalnim listom potrbušnice koji u žena straga prelazi na prednju stranu trupa maternice, a u muškaraca na rektum. S donje strane mokraćnog mjehura u muškaraca se nalazi prostata, uz koju se sa stražnje strane mjehura nalaze sjemeni mjehurići i sjemenovodi (2).

Mokraćni mjehur sastoji se od tri osnovna dijela: vrha (apeksa) baze (fundusa) i tijela (korpusa). Apeks je točka mokraćnog mjehura smještena najkranijalnije i mjesto s kojeg prema pupku polazi obliterirana embrionalna struktura urahus. U području fundusa nalazi se složena anatomska struktura oblika trokuta zvana trigonum. Na vrhovima trigonuma lateralno ulaze mokraćovodi, a dalje se nastavlja mokraćna cijev (3).

Za dinamiku pražnjenja mokraće najbitnija je muskulatura mokraćnog mjehura koja je sastavljena od mišićnih niti smještenih u tri međusobno povezana sloja. Površni sloj prostire se uzdužno, a osobito je izražen na prednjoj i stražnjoj strani. U području fundusa u muškaraca se isprepliće s

mišićnim nitima rektuma i prostate, a u žena s mišićima rodnice. U navedenom području površni uzdužni se nastavlja u kružni sloj, koji zatim prelazi u unutarnji uzdužni sloj (4).

U proksimalnim i lateralnim dijelovima trigonuma ureteri ulaze u mokraćni mjehur pod kosim kutem. Mišićni sloj stijenke ispod submukoze u ovoj regiji kombinacija je glatkog mišića longitudinalnog mišićnog sloja intramuralnog uretera i detrusora mokraćnog mjehura. Intramuralni dio uretera okružen je fibromuskularnom ovojnicom (Waldeyerova ovojnica) s kojom se stapa u mišićni sloj stijenke uretera. To fibromuskularno tkivo fiksira intramuralni ureter za mokraćni mjehur. Širenjem mokraćnog mjehura okolna muskulatura vrši pritisak na koso smješteni intramuralni ureter, zatvarajući lumen uretera, što sprječava povrat mokraće u ureter (2).

Glavnina arterijske krvi u mokraćni mjehur dolazi putem donje vezikalne arterije, ogranka unutarnje ilijačne arterije, dok ostatak arterijske krvi mjehur dobiva putem gornje vezikalne, obturatorne i donje glutealne arterije, te uterine i vaginalne arterije u žena. Venska krv iz mokraćnog mjehura odlazi u vezikalni pleksus te preko njega u ilijakalne vene. Limfna drenaža završava u limfnim čvorovima smještenim uz vanjsku i unutarnju ilijačnu arteriju. Mokraćni mjehur je inerviran simpatičkim (Th11-L2), parasimpatičkim (S2-S4) i senzornim živčanim vlaknima. Impuls iz sakralnog dijela leđne moždine proveden parasimpatičkim vlaknima potiče kontrakciju mišićnih vlakana muskularis proprije koja uzrokuju mokrenje. Smatra se da u početku mokrenja ulogu ima i voljna relaksacija mišića dna zdjelice i pritisak prednje trbušne stijenke (5).

1.2. HISTOLOGIJA MOKRAĆNOG MJEHURA

Histološki gledano, mokraćni mjehur je na presjeku sastavljen od 4 sloja. Unutarnji sloj je epitelni pokrov kojem potporu daje lamina proprija, sloj rahlijeg veziva, ispod koje se nalazi muskularis proprija, tj. mišićni sloj stijenke mjehura koji s vanjske strane pokriva četvrti sloj, adventicija. Ova

podjela koristi se za stupnjevanje bolesti u terapijske i prognostičke svrhe kod bolesnika koji boluju od karcinoma mokraćnog mjehura. Stoga je bitno pravilno mikroskopski raspoznati slojeve mokraćnog mjehura (6).

Epitel mokraćnog mjehura naziva se „prijelaznim“ ili „tranzicionalnim“ epitelom. Taj je termin skovan zato što epitel koji oblaže mokraćni mjehur svojim mikroskopskim izgledom dijelom podsjeća na nekeratinizirajući višeslojni pločasti, a dijelom na pseudostratificirani cilindrični epitel. Mnogi histolozi i patolozi preferiraju naziv „urotel“ pred ovim relativno općenitim terminom. Valja spomenuti da se u području trigonuma i vrata mokraćnog mjehura nalazi manje područje nekeratinizirajućeg pločastog epitela koje je najizraženije u žena u postmenopauzi i perimenopauzi. Spomenuti epitel obiluje glikogenom te sadrži estrogenske i progesteronske receptore. Sličan epitel također može biti nešto izraženiji u muškaraca koji primaju estrogensku terapiju karcinoma prostate (7).

Debljina urotela umnogome ovisi o stupnju distenzije mokraćnog mjehura. U potpuno distendiranom mjehuru urotel se sastoji od svega 2-3 sloja spljoštenih stanica, dok se u kontrahiranom mjehuru nalazi 7-8 slojeva stanica koje se mogu podijeliti na jedan sloj površinskih stanica, zatim podležeće intermedijarne stanice te jedan sloj bazalnih stanica. Lažnu sliku zadebljalog urotela u histološkom preparatu može stvoriti tangencijalni presjek kroz slojeve mjehura (8).

Površinske stanice su u kontaktu sa sadržajem mokraćnog mjehura. To su velike, eliptične stanice koje poput kišobrana prekrivaju manje intermedijarne stanice. U distendiranom mjehuru postaju spljoštene i jedva uočljive. Njihova prisutnost ili odsutnost ne može biti shvaćena kao nedvosmislen znak benignosti ili malignosti u patohistološkoj analizi, obzirom da u benignih promjena mogu biti odljuštene prilikom instrumentacije, a isto tako, nekad se nalaze kod karcinoma, prekrivajući nedvojbeno maligne stanice (2).

Intermedijarni sloj epitela sastoji se od najviše 5 slojeva intermedijarnih stanica. Jezgre ovih stanica su ovalne, fino raspršenog kromatina i bez uočljivih jezgrica. Citoplazma je obilna i može biti vakuolizirana.

Citoplazmatske membrane su jasno izražene, a stanice su međusobno povezane dezmosomima. Kao i površni sloj, ovaj sloj u distendiranom stanju može biti izrazito stanjen (9).

Bazalne stanice su kubične, i vidljive su samo u kontrahiranom mjehuru. One se nalaze na tankoj, kontinuiranoj bazalnoj membrani sastavljenoj od 3 sloja: lamine lucide, lamine dense i sidrećih fibrila.

Lamina proprija smještena je između epitela s jedne i mišićnog sloja s druge strane. Sastavljena je od rahlijeg veziva koje sadrži gustu krvožilnu mrežu, limfne žile, završetke senzornih živaca i elastična vlakna. Debljina lamine proprije varira ovisno o lokaciji – uglavnom je nešto tanja u području trigonuma i vrata mokraćnog mjehura. Isto tako, u bolesnika sa smetnjama otjecanja urina lamina proprija može biti stanjena do te mjere da muskularis proprija prividno počinje neposredno ispod epitela (3).

U središnjem dijelu lamine proprije nalaze se srednje velike arterije i vene. U okolini spomenutih krvnih žila često se nalaze snopovi glatkih mišićnih stanica, nevezanih uz muskularis propriju koji uglavnom čine izolirani i diskontinuirani, a tek vrlo rijetko kontinuirani sloj. U posljednjem slučaju za taj se sloj rabi naziv „muskularis mukoze“ (10-11). Praktično gledano, izrazito je bitno ne zamijeniti rijetka glatka mišićna vlakna muskularis mukoze za muskularis propriju, pravi mišićni sloj stijenke mjehura. Takva zabuna, ili čak nedovoljna preciznost u izražavanju od strane patologa mogu imati ozbiljne medicinske i zakonske posljedice (12).

Smatra se da se muskularis proprija sastoji od 3 glatka mišićna sloja – unutarnjeg i vanjskog uzdužnog sloja te središnjeg kružnog sloja. U stvarnosti, ovi se slojevi nalaze samo u području vrata mokraćnog mjehura. Na preostalim mjestima, uzdužni i kružni slojevi slobodno se miješaju (13). Kao i u ostalih slojeva, debljina muskularis proprije ovisi ponajprije o stupnju distenzije mokraćnog mjehura (14). Unutar muskularis proprije, lamini proprije i seroze mogu se naći manje nakupine masnog tkiva (15).

1.3. EMBRIOLOGIJA MOKRAĆNOG MJEHURA

Kloaka je fetalna struktura koja se rano u embriogenezi podijeli u prednji dio zvan urogenitalni sinus i stražnji dio iz kojeg nastaje rektum. Urogenitalni sinus je osnova iz koje se razvija mokraćni mjehur, proksimalni dio mokraćne cijevi i urahus, privremena fetalna struktura koja povezuje mokraćni mjehur s pupkom (16). Distalni kraj urogenitalnog sinusa dolazi u kontakt s invaginacijom urogenitalne membrane, formirajući uretru. Urahus postupno involuira i zaostaje kao medijani umbilikalni ligament. Iz fetalnog mokraćnog mjehura proksimalno se pružaju epitelni izdanci koji ulaskom u nefrogenu zonu potaknu formaciju metanefrosa, primitivne strukture bubrega. Histološki gledano, epitel mokraćnog mjehura nastaje iz endoderma, a lamina proprija, muskularis proprija i adventicija razvijaju se iz visceralnog mezenhima (17).

1.4. BENIGNE EPITELNE NEOPLAZME I PREKURSORI KARCINOMA

Bitna značajka urotela je da u sklopu reakcije na lokalni podražaj ili ozljedu može reagirati promjenom izgleda. Ta osobina rezultira nizom benignih morfoloških promjena. Koss (18) je u 100 postmortalno pregledanih mokraćnih mjehura bez vidljivih makroskopskih promjena našao dolje spomenute mikroskopske promjene u vidu Brunnovih gnijezda, pločaste metaplazije i *cystitis cystica* u čak 93%.

Brunnova gnijezda predstavljaju najčešću reaktvnu proliferativnu promjenu urotela i, prema nekim istraživanjima (18-19), nalaze se u većini mokraćnih mjehura (89%-94%), najčešće u području trigonuma. Riječ je o gnijezdolikim invaginacijama urotela u podležeću laminu propriju. Spomenuta gnijezda ponekad gube kontakt s površinom te mogu nalikovati na invazivan tumor, no citološke karakteristike, pravilnost i glatka kontura gnijezda uvijek

govore u prilog benigne promjene. Kronično oštećenje uzrokovano upalom uzrokuje nastanak upalne kripte urotela. Spomenuta kripta predstavlja nezrelu cistu, a Brunnova gnijezda predstavljaju dio presjeka navedene ciste (19).

Nakupljanjem staničnog detritusa ili mucina unutar ciste/gnijezda s vremenom dolazi do cističnog proširenja pa se takva promjena naziva *cystitis cystica*. U nekim slučajevima dolazi do žljezdane metaplazije epitela koji oblaže ciste, što se označava nazivom *cystitis glandularis.* U sklopu žljezdane metaplazije može doći do intestinalne metaplazije, tj. žljezdani epitel može nalikovati na epitel crijeva (2).

Floridna Brunnova gnijezda mogu nalikovati na tzv. „nested“ varijantu urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura, a razlikovanje može biti zahtjevno. Kriteriji za malignitet su manja, nepravilnije raspoređena gnijezda koja pokazuju izraženiju razliku u veličini. Ujedno, floridna Brunnova gnijezda ne pokazuju osobine infiltracije okolnog tkiva (17).

U većini istraživanja ove se reaktivne promjene nalaze u sklopu upale, no neki autori (18) opisali su ih i u potpunoj odsutnosti upale, što otvara mogućnost da je riječ o sasvim normalnim varijantama histološkog izgleda mokraćnog mjehura. Visoka pojavnost ovih promjena u normalnom mokraćnom mjehuru ukazuje da se najvjerojatnije ne radi o premalignim promjenama i da nema uzročno-posljedične veze između njihove pojave i pojave karcinoma (20). Ponekad se navedene promjene nalaze uz karcinom, no vjerojatnije je da se u tim slučajevima radi o reakciji na upalu, tj. oštećenje urotela koje izazove karcinom.

Metaplazija je proces pretvorbe jedne vrste tkiva u drugo koje nije karakteristično za lokaciju na kojoj se pretvorba zbiva. Urotel često podliježe metaplaziji, najčešće pločastoj ili žljezdanoj. U podlozi metaplazije nalaze se kronični upalni procesi, kateterizacija i druge kronične ozljede.

Pločasta metaplazija najčešće se nalazi u području trigonuma mjehura u žena, no može se naći i na drugim mjestima unutar sluznice. Ponekad može biti prisutna keratinizacija epitela, parakeratoza i naglašen granularni sloj. Sama po sebi, pločasta metaplazija ne predstavlja premalignu promjenu,

no bolesnici s keratinizirajućom metaplazijom trebaju biti klinički praćeni jer imaju povećani rizik za pojavu karcinoma pločastih stanica (21).

Kod žljezdane metaplazije pokrovni epitel postaje visoki cilindričan, nalik na onaj u gastrointestinalnom traktu, uz žarišnu pojavu vrčastih stanica te se ovaj tip metaplazije ponekad naziva i „intestinalni tip“. Kao i pločasta metaplazija, žljezdana metaplazija sama po sebi najvjerojatnije nije prekanceroza, no ipak postoje proturiječna tumačenja o riziku za nastanak adenokarcinoma u osoba sa žljezdanom metaplazijom (22-23). Obzirom na oskudnost istraživanja u literaturi, pitanje je još uvijek otvoreno i postoji potreba kliničkih kontrola bolesnika dok se konačne smjernice ne postave (24).

Nefrogeni adenom predstavlja specifičan tip metaplazije. U sklopu kronične upale sluznice ili cijeljenja rane nakon traume odnosno operacije, urotel može biti zamijenjen jednim slojem kubičnih stanica. Te stanice proliferiraju čineći papile na površini i tubule ili mikrociste u lamini propriji. Stoga je naziv poprilično neprecizan, budući da proliferacija nije nefrogena već urotelnog porijekla, a nije ni riječ o neoplazmi pa adenom nije najprikladniji naziv (17).

Oko dvije trećine pacijenata s nefrogenim adenomom su muškarci, a razlog je taj što su u njih češći operativni zahvati u mokraćnom mjehuru zbog benignih promjena prostate i praćenja prethodnog karcinoma mokraćnog mjehura ili prostate (25). Isto tako, nefrogeni adenom sve se češće opisuje u imunokompromitiranih bolesnika, osobito nakon transplantacije organa. Obično se klinički prezentira nadražajnim simptomima ili hematurijom (17).

Obzirom na mikroskopsku sliku i ponekad egzofitičan makroskopski izgled, bitno je ne zamijeniti nefrogeni adenom za adenokarcinom. Diferencijalno dijagnostički, nefrogenom adenomu je izgledom najbliži svijetlostanični karcinom mokraćnog mjehura i adenokarcinom prostate. Glavne razlike su u obilnoj upali u podlozi nefrogenog adenoma, prisutnosti bazalne membrane oko tubula i odsutnosti mitoza. Zbog navedenih karakteristika, razlikovanje rijetko predstavlja problem (26).

Pitanje da li nefrogeni adenom može biti prekursor adenokarcinomu mokraćnog mjehura još je otvoreno (17).

Kao što je prije spomenuto, urotel praznog mjehura u normalnim uvjetima čini 7-8 slojeva stanica. Sve više od toga u odsutnosti displazije definirano je kao urotelna hiperplazija. Hiperplazija može biti ravnog oblika ili papilarna. Površina urotela je obično valovita. Ukoliko je riječ o papilarnom obliku, mogu biti prisutne sitne kapilare na bazi papila (27).

Po definiciji, jednostavna hiperplazija, bila ravna ili papilarna, ne posjeduje displastičnu komponentu no u hiperplastičnom urotelu može doći do pojave displazije, najčešće u blizini urotelnog karcinoma. Klinički značaj ravne hiperplazije nije poznat, osim što se dovodi u vezu s upalnim poremećajima poput litijaze i endometrioze te s novotvorinama. Veza papilarne hiperplazije i papilarne neoplazije niskog gradusa nije još ustanovljena (28).

Nema dokaza da hiperplazija posjeduje maligni potencijal, no pojedine studije pokazuju da u slučajevima kad postoji konkomitantni papilarni karcinom hiperplazija s karcinomom dijeli određeni stupanj klonalnosti (29).

Jedan od entiteta koji valja spomenuti pri opisivanju neneoplastičnih promjena urotela svakako je pseudokarcinomatozna epitelna hiperplazija. Riječ je o promjeni koju su kao zasebni entitet 2000. godine prvi put opisali Baker i Young (30) u sklopu promjena nakon radioterapije karcinoma u području zdjelice. Slične promjene opisane su i nakon kemoterapije (31) te u odsutnosti terapije (32). Mikroskopski, u površnim dijelovima lamine proprije nalaze se nakupine epitelnih stanica nepravilnog oblika i rasporeda. Opisane stanice pokazuju umjerenu do jako izraženu pleomorfiju i ponekad, žarišnu pločastu diferencijaciju te uglavnom okružuju krvne žile čije su stijenke prožete fibrinom. U sklopu promjene opisano je nakupljanje upalnih stanica, edem, kongestija i prisutnost atipičnih fibroblasta u lamini propriji (30-32).

1.5. BENIGNE UROTELNE NEOPLAZME I PREKURSORI KARCINOMA

1.5.1. PAPILOM

Urotelni papilom je egzofitični tumor građen od rahle fibrovaskularne strome obložene epitelom koji u potpunosti nalikuje na običan urotel. Predstavlja nešto manje od 1% svih urotelnih neoplazmi, a nalazi se najčešće u mlađih osoba i u djece. Odnos zahvaćenosti muškog i ženskog spola iznosi 1.9:1. Papilarni izdanci strome su nježni, uz blago naglašeno grananje, ali nikad nema fuzije papila. Površinske stanice često su istaknute. U stromi se mogu naći edem i pojačana prisutnost upalnih stanica. Urotel nikad nema znakova atipije, a mitoze su ograničene isključivo na bazalni sloj stanica (28).

Bitne diferencijalno dijagnostičke imunohistokemijske značajke papiloma uključuju nizak proliferativni indeks mjeren s Ki-67 (33) i specifičnu izraženost citokeratina 20 (34). Naime, u papilomu, kao i u normalnom urotelu, površinske stanice za razliku od intermedijarnih stanica pokazuju izrazito pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na citokeratin 20.

S molekularnog stajališta, urotelni papilomi često pokazuju mutacije receptora faktora rasta fibroblasta 3 (FGFR3), po čemu su slični papilarnoj urotelnoj neoplazmi niskog malignog potencijala (PUNLMP) i papilarnom urotelnom karcinomu niskog gradusa (35). U papilomima se ne susreću mutacije p53 (33). Papilom tek rijetko recidivira (u oko 8% slučajeva) (28).

1.5.2. INVERTIRANI PAPILOM

Invertirani papilom (IP) je benigni papilomatozni tumor koji, za razliku od egzofitičnog papilomatoznog načina rasta uobičajenog za većinu urotelnih

tumora, pokazuje endofitičnu osobinu rasta urastanjem urotela u podležeću stromu. Spada u skupinu rjeđih novotvorina (čini <1% svih urotelnih tumora) (17), a nalazi se najčešće u starijih odraslih osoba. Odnos zahvaćenosti muškog i ženskog spola iznosi 4.5:1. Histološki, za invertirani papilom karakteristična je relativno glatka kontura površine prekrivena arhitekturalno i citološki normalnim urotelom. Od površine polaze otočići ili trake urotela širine 7-10 stanica i urastaju u podležeću laminu propriju. Periferne bazalne stanice često su raspoređene palisadno, a unutarnje stanice poprimaju vretenast i izduljen izgled. Stanice tumora su jednolike, a mitoze su rijetke. Često se nalaze žarišta pločaste diferencijacije. Stroma tumora je rahla vezivna i sadrži brojne tankostijene krvne žile (36).

Unatoč više izvještaja o malignoj alteraciji IP unutar mokraćnog sustava (37-39), mogućnost maligne alteracije i dalje je dvojbena. Prije svega, za razliku od običnog papiloma, u do 15% IP mogu se naći citološke atipije izražene do određene mjere, što može dovesti do pogrešne dijagnoze karcinoma. Broussard i sur. (40) opisali su 11 slučajeva IP sa citološkom atipijom. Njihovi bolesnici bili su klinički praćeni u razdoblju od 5 mjeseci do 7 godina. U svim slučajevima, područja s atipijom bila su žarišna i sastojala su se od stanica prominentnih jezgrica, stanica s atipičnom pločastom metaplazijom, displastičnih i multinuklearnih orijaških stanica. Ki-67 je bio blago povišen u nekim slučajevima. U dva slučaja bila je izražena imunohistokemijska reakcija na p53. Niti jedan od bolesnika nije imao prethodan niti naknadan tumor mokraćnog mjehura (40).

Nadalje, moguće je da neki od prikazanih slučajeva IP s malignom alteracijom zapravo predstavljaju jedan od dva maligna patološka entiteta (tzv. „nested“ varijanta urotelnog karcinoma i invertirani tip urotelnog karcinoma) koje je moguće pogrešno dijagnosticirati zbog nekonvencionalnog, invertiranog načina rasta. „Nested“ varijanta urotelnog karcinoma se razlikuje od IP po nepravilnom rasporedu, obliku i gustom rasporedu gnijezda, a često i po prisutnosti invazije mišićnog sloja (41). Prema Aminu i sur. (42), u diferencijalnoj dijagnozi IP i invertiranog tipa urotelnog karcinoma valja usmjeriti pažnju na arhitekturalne i citološke

značajke lezije. Urotelni karcinom s invertiranim načinom rasta pruža deblje trake u laminu propriju, a širina traka je nejednolika te postoji prijelaz traka i tračaka u solidnije nakupine. Karakteristično pravilno sazrijevanje, vretenaste stanice i palisadiranje perifernih stanica koje možemo naći u IP su općenito odsutni ili neuočljivi u karcinomu s invertiranim načinom rasta. Ukoliko postoji nedvojbena invazija u laminu propriju ili mišićni sloj stijenke, dijagnoza IP je isključena (42).

Zanimljiva molekularno-patološka studija prikazana je 2005. na godišnjem sastanku Akademije patologije Sjedinjenih država i Kanade (USCAP). Tom prilikom je objavljeno istraživanje o razlici u ekspresiji gena između IP i urotelnog karcinoma s invertiranim načinom rasta (43). Istraživane su mutacije gena za FGFR3 koje su dio patogenetske sekvence u nastanku urotelnog karcinoma te izražaj proliferacijskog markera Ki-67. Razlika u učestalosti mutacije FGFR3 i izražaju Ki-67 između IP i invertiranog urotelnog karcinoma bila je statistički značajna, a prisutnost mutacije i ekspresija Ki-67 u >5% stanica mogle su razlučiti karcinom od papiloma s osjetljivošću od 69% i specifičnošću od 91%. Zaključak studije bio je da je IP benigna lezija koja ne prikazuje specifične genetske promjene koje se mogu naći u neinvazivnim egzofitičnim papilarnim urotelnim tumorima (43).

1.5.3. UROTELNA DISPLAZIJA

Displazija je lezija ograničena na urotel sa citološkim i arhitekturalnim karakteristikama koje ukazuju na preneoplaziju, ali nedovoljno izražena za dijagnozu karcinoma in situ (CIS). Displastični urotel sadrži međusobno povezane stanice karakterizirane promjenama jezgre poput nepravilnog gomilanja i hiperkromazije. Jezgrice mogu biti istaknute, a mitoze, ukoliko su prisutne, uglavnom su smještene bazalno. Površinske stanice uglavnom su prisutne. Većina staničnih abnormalnosti u displaziji ograničena je na bazalni i intermedijarni sloj stanica (44-45).

Reaktivna atipija u sklopu upale razlikuje se od displazije po prisutnosti jednoliko velikih jezgara istaknute jezgrice s rahlim i pravilno raspoređenim kromatinom. S druge strane, CIS se od displazije razlikuje pleomorfizmom, izraženo hiperkromatskim jezgrama diljem epitela, mitozama u gornjim slojevima i mjestimičnom diskohezivnošću stanica (46-47). Imunohistokemijski, citokeratin 20 je u CIS-u izražen u svim slojevima urotela, a ne samo u površinskim stanicama kao u normalnom urotelu (48).

Ocjena prisutnosti displazije vrlo je bitna u terapiji neinvazivnih papilarnih tumora. Displazija koja se susreće u okolini takvih tumora naziva se sekundarnom displazijom, ukazuje na nestabilnost urotela diljem mjehura i na povećanu mogućnost recidiva i progresije tumora (49). *De novo* (primarna) displazija je rjeđa i njen klinički tijek rasvijetljen je tek nedavno kada je ustanovljeno da u otprilike 5–19% slučajeva napreduje u neoplaziju (50-51).

1.6. RAK MOKRAĆNOG MJEHURA

1.6.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Svake godine u prosjeku se dijagnosticira oko 330 000 slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura u svijetu (52). Ako se izuzmu tumori kože, karcinom mokraćnog mjehura je po incidenciji ukupno deveti najčešći maligni tumor u oba spola te sedmi najčešći u muškaraca (53). Odnos zahvaćenosti muškog i ženskog spola je otprilike 3.5:1. Iako se smatra relativno rijetkim u žena, broj bolesnica približan je onom oboljelih od karcinoma vrata maternice i karcinoma jajnika (54).

Incidencija bolesti u posljednjih nekoliko desetljeća pokazuje blagi porast, kao i velike regionalne razlike unutar svijeta. Najviša je incidencija za oba spola zabilježena u zemljama Europske Unije, sjeverne Amerike i sjeverne Afrike, dok je bolesti nešto rjeđa u Aziji. Najčešća je u bijelaca. U

razdoblju od 1999-2003. prosječna dob bolesnika (uključujući oba spola) pri postavljanju dijagnoze bila je 73 godine (55).

Od svih histoloških oblika, najčešći je urotelni karcinom, koji čini oko 90% svih oblika karcinoma mokraćnog mjehura. Manje su zastupljeni karcinom pločastih stanica (oko 5%), adenokarcinom (2%), karcinom malih stanica i drugi. Procjenjuje se da od svih bolesnika s novootkrivenim urotelnim karcinomom mokraćnog mjehura njih 70-80% ima neinvazivni ili rano invazivni karcinom, tj. onaj koji odgovara stadiju Ta, Tis, ili T1 (28).

Čak i u bolesnika u kojih je karcinom otkriven u nekom od navedenih ranijih stadija, nakon liječenja može se očekivati recidiv bolesti u 50–70% slučajeva, a napredovanje bolesti u 15–25% (56). Zbog visoke stope recidiva i potencijalno agresivnog tijeka bolesti, potrebno je intenzivno kliničko praćenje bolesnika. U Sjedinjenim američkim državama se na karcinom mokraćnog mjehura od dijagnoze do smrti potroši više novčanih sredstava po bolesniku nego u bilo koje druge maligne bolesti (57).

Postoji niz čimbenika rizika za razvoj karcinoma mokraćnog mjehura, od kojih se najvažnijim smatraju pušenje cigareta i profesionalna izloženost određenim karcinogenima, ponajprije anilinskim bojama. Bitno je naglasiti da je većina potencijalnih karcinogena inaktivna, a aktiviraju se uspomoć enzima koji pokazuju genetski definirane razlike u aktivnosti. Iz ovog razloga osjetljivost na karcinogene varira između pojedinaca i populacija (58).

Pušenje cigareta dovodi se u vezu s karcinomom mokraćnog mjehura od 60-tih godina prošlog stoljeća (59); smatra se da je taj čimbenik rizika odgovoran za pojavu čak 66% svih slučajeva u muškaraca i 30% u žena (60). Pušači imaju 2 do 6 puta viši rizik za nastanak karcinoma mokraćnog mjehura od nepušača. Rizik je veći i u nekadašnjih pušača, u kojih iznosi oko 1.9:1. Ustanovljeno je da je potrebno oko 20 godina pušenja cigareta za razvoj karcinoma, a rizik raste s brojem popušenih cigareta dnevno (61). U pušača sa neinvazivnim karcinomom mokraćnog mjehura remisija bolesti dulja je u onih bolesnika koji prestanu pušiti nakon dijagnoze. Točan mehanizam kojim duhanski proizvodi uzrokuju karcinom mokraćnog mjehura

nije sasvim razjašnjen, no implicira se uključenost karcinogena poput akroleina, 4-amino-bifenila, arilamina i slobodnih kisikovih radikala (59-61).

Profesionalna izloženost anilinskim bojama koje se koriste u industriji boja, gume i tekstila smatra se čimbenikom rizika za razvoj karcinoma mokraćnog mjehura od 1895., kad je Ludwig Rehn objavio izvješće o tri slučaja tumora mokraćnog mjehura u radnika u proizvodnji fuksina, jednog od derivata anilina i drugih aromatskih amina. Najkancerogeniji aromatski amin je benzidin, koji se koristi u proizvodnji boja i kao očvrščivać u industriji guma (62).

Epidemiološka povezanost pojave karcinoma i profesionalne izloženosti ovisi o nivou industrijalizacije. U visoko industrijaliziranim društvima, čak četvrtina urotelnih karcinoma pripisuje se profesionalnoj izloženosti. Period latencije između izloženosti i pojave karcinoma obično je produljen. Aromatski amini danas su zabranjeni, no kemijske supstance koje nastaju izgaranjem ugljena također povećavaju rizik nastanka karcinoma mokraćnog mjehura. Pojava karcinoma također je primijećena u plinskih radnika, soboslikara i frizera (60).

Mehanizam kemijske karcinogeneze u mokraćnom mjehuru donekle je rasvijetljen brojnim istraživanjima. Uloga nokse pripisuje se kemijskim spojevima iz skupine arilamina koji se u jetri konjugiraju s N-glukuronskom kiselinom te se kao topljivi konjugati pri normalnom pH izlučuju mokraćom (63). No ukoliko je pH mokraće snižen, dolazi do hidrolize konjugata koja rezultira stvaranjem N-hidroksiarilamina, spojeva koji se kovalentno vežu na DNA urotelnih stanica i ostvaruju direktni mutageni i karcinogeni učinak (64). Osim pušenja i profesionalne izloženosti anilinskim bojama, spominju se i neki dodatni čimbenici rizika koji doprinose pojavi manjeg dijela karcinoma mokraćnog mjehura u koje se ubrajaju: kronična infekcija mokraćnog mjehura (65) i shistosomijaza mokraćnog mjehura (66), oboje povezani sa karcinomom pločastih stanica mokraćnog mjehura; zatim izloženost spojevima arsena u pitkoj vodi (67), pretjerana uporaba analgetika koji sadrže fenacetin (68) te terapijska uporaba ciklofosfamida (69). Unos kofeina je impliciran kao čimbenik rizika, no čini se da se većina tog utjecaja može

pripisati pušenju, budući da pušači unose više kofeina od nepušača (70). Isto tako, postoje istraživanja provedena na glodavcima u kojima je uspješno induciran karcinom mokraćnog mjehura uz pomoć umjetnih zaslađivača na bazi saharina (71), no epidemiološke studije nisu ukazale na kompatibilnost tih eksperimentalnih modela s razvojem tumora mokraćnog mjehura u ljudi (72).

Za razliku od mnogih drugih malignih bolesti, nasljedni čimbenici ne igraju izraženu ulogu u nastanku karcinomu mokraćnog mjehura. Podaci koji to najzornije pokazuju nalaze se u istraživanju Kiemeney i sur. (73), koji su proučili medicinsku dokumentaciju više od 12 000 srodnika 190 bolesnika oboljelih od karcinoma mokraćnog mjehura na Islandu od 1983 do 1992. Iako je rizik pojave karcinoma bio blago veći u srodnika, relativni rizik bio je viši u srodnika u drugom i trećem koljenu negoli u onih u prvom koljenu, što govori protiv jasno objašnjivog nasljednog utjecaja.

1.6.2. KLINIČKA SLIKA I RANO OTKRIVANJE BOLESTI

Izraženost i vrsta kliničkih znakova i simptoma raka mokraćnog mjehura ovisi o proširenosti i mjestu nastanka tumora. U oko 85% slučajeva, prvi znak raka mokraćnog mjehura je bezbolna hematurija (4). U suštini, praktički u svih bolesnika sa cistoskopski vidljivim karcinomom nalazi se barem mikrohematurija ukoliko se ispita dovoljno uzoraka mokraće (74). Međutim, ta je hematurija često intermitentna, tako da test na hematuriju napravljen na jednom ili dva uzorka nema dovoljno visoku negativnu prediktivnu vrijednost da bi se isključilo postojanje raka (75). Prema tome, ukoliko stariji bolesnik ima makro ili mikrohematuriju nepoznatog uzroka, a pri ponovnom testiranju nema krvi u mokraći, ipak valja pristupiti cistoskopskom pregledu (76). Isto tako, u pojedinaca starijih od 60 godina i u mlađih pušača te u osoba izloženih karcinogenima valja inzistirati na cistoskopiji već u početnoj fazi obrade (77).

Nešto rjeđe, simptomi mogu biti dizurične prirode. Ova klinička slika češće se nalazi u bolesnika s difuznim karcinomom in situ ili invazivnim karcinomom. Ipak, ovi simptomi gotovo su uvijek praćeni barem mikroskopskom hematurijom. Ostali, rjeđi znaci i simptomi raka mokraćnog mjehura su bol u slabinama zbog opstrukcije mokraćovoda, edem donjih ekstramiteta i nalaz tumora u zdjelici. Tumori koji infiltriraju vezikoureteralno ušće mogu dovesti do pojave hidronefroze, koja se smara lošim prognostičkim znakom. Vrlo rijetko, bolesnici se pojavljuju sa simptomima uznapredovale bolesti, poput gubitka na težini, boli u kostima ili trbušnoj šupljini.

Osim detekcije hematurije, postoji još nekoliko dijagnostičkih oruđa koja se mogu koristiti u ranom otkrivanju raka mokraćnog mjehura, kao što su citologija, protočna citometrija i kvantitativna analiza slika uz pomoć fluorescentnih DNA proba.

Mikroskopskim pregledom sedimenta urina ili ispirka mokraćnog mjehura moguće je dokazati maligne stanice, koje obično imaju nešto veće, hiperkromatske jezgre i oskudniju citoplazmu. Bolje diferencirani tumori imaju kohezivnije stanice koje se slabije odvajaju u mokraću, a istodobno su više nalik normalnim urotelnim stanicama. Stoga citologija ima nisku osjetljivost za tumore niskog gradusa. Osjetljivost za tumore visokog gradusa je najviše 80% (78), međutim specifičnost je vrlo visoka (79). Smatra se da je otkrivanje raka mokraćnog mjehura citološkim metodama isplativo samo u rizičnih skupina bolesnika, a ne u općoj populaciji (80).

Protočna citometrija mjeri sadržaj deoksiribonukleinske kiseline (DNA) u stanicama čije su jezgre obojene fluorescentnom bojom koja se veže na DNA. Na taj način može se odrediti količina aneuploidnih stanica, kao i proliferativna aktivnost tumora. Poboljšanje osjetljivosti i specifičnosti protočne citometrije moguće je primjenom mnogostrukih parametara. Na primjer, protočni citometar može se programirati da mjeri samo količinu DNA u stanicama pozitivnim na citokeratine (epitelnim stanicama) (81). Tim pristupom izbačene su stanice koje mogu lažno utjecati na rezultat, poput upalnih stanica. Dobro diferencirani tumori često su diploidni i slabije

prepoznatljivi ovom metodom, tako da se osjetljivost i specifičnost protočne citometrije uvelike poklapa s onom citologije urina (82). Općenito govoreći, protočna citometrija nije se pokazala klinički upotrebljivijom od citologije u ranom otkrivanju raka mokraćnog mjehura.

Mikroskopski razmazi stanica obojani fluorescentnim bojama koje se vežu na DNA mogu se analizirati računalnim putem kako bi se procijenio sadržaj DNA u pojedinoj stanici (citometrija analizira populacije stanica, ne pojedinačne stanice). Dodatnom primjenom monoklonalnih protutijela postiže se bolja osjetljivost ove metode u otkrivanju tumora niskog gradusa u usporedbi s citologijom i protočnom citometrijom (83).

Iako se sumnja na rak mokraćnog mjehura ujedno može postaviti i ultrazvučnim pregledom ili kompjutoriziranom tomografijom, posljednja karika u postavljanju dijagnoze je uvijek cistoskopija. Prilikom cistoskopije, izvrši se biopsija ili transuretralna resekcija (TUR) tumora, pri čemu valja ići dovoljno duboko da se dobiju uzorci mišićnog sloja stijenke. Obzirom da postoji niz stanja koja makroskopski, pa i histološki mogu nalikovati na karcinom, konačna dijagnoza dobiva se patohistološkom analizom.

Zbog moguće multicentričnosti promjena, prilikom cistoskopije preporučljivo je uzeti nekoliko biopsija sluznice iz područja uz tumor, kao i iz područja suprotne strane mjehura, trigonuma, fundusa i prostatičnog dijela uretre. Jasno je da kod ovakvih nasumičnih biopsija postoji relativno velika mogućnost da dijelovi sluznice s premalignim ili malignim promjenama ne budu zamijećeni.

Kako bi se pospješila osjetljivost cistoskopije u otkrivanju mjesta pogodnih za biopsiju, smišljena je metoda koja koristi svojstvo urotelnih tumora da upijaju fluorescentne derivate porfirina. Uspomoć cistoskopije koja koristi plavo svjetlo valne duljine 375 do 440 nm, može se vizualizirati nakupljanje intravezikalno primijenjene 5-aminolevulinske kiseline (ALA), prekursora protoporfirina IX. Na taj način mogu se primijetiti neke lezije nevidljive prilikom konvencionalne cistoskopije (84-87). Ipak, broj neprimijećenih tumora nije sasvim jasan, a čak pola uzoraka bioptiranih zbog fluorescencije histološki ne pokazuje nikakve znakove malignosti. Doduše,

moguće je da ta područja sadrže stanice koje su krenule putem tumorigeneze, a još su nepromijenjenog fenotipa. Najbitnija je činjenica da TUR potpomognut fluorescencijom smanjuje vjerojatnost recidiva bolesti (86).

1.6.3. STUPNJEVANJE BOLESTI

Za ocjenu stadija karcinoma mokraćnog mjehura od strane patologa, u uporabi je sljedeća patološka TNM (pTNM) klasifikacija, izdana od strane Međunarodne organizacije za borbu protiv raka (UICC) (6):

Tumor

TX: Tumor se ne može procijeniti
T0: Nema dokaza tumora
Ta: Neinvazivni papilarni karcinom
Tis: Karcinom «in situ»; «ravni tumor»
T1: Invazija tumora u subepitelno vezivo
T2: Invazija tumora u mišićni sloj mjehura
T3: Invazija tumora u perivezikalno tkivo
T4: Invazija tumora u prostatu, maternicu, vaginu, zid zdjelice ili zid abdomena

Nodus (limfni čvor)

NX: Regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
N0: Nema metastaza u regionalne limfne čvorove
N1: Stanice karcinoma mokraćnog mjehura pronađene u jednom limfnom čvoru čiji je promjer dva centimetra ili manji

N2: Stanice karcinoma mokraćnog mjehura pronađene u jednom ili više limfnih čvorova od kojih nijedan nije veći od pet centimetara u promjeru

N3: Stanice karcinoma mokraćnog mjehura pronađene u jednom ili više limfnih čvorova koji mjere više od pet centimetara u promjeru

Metastaze

MX: Širenje karcinoma ne može se procijeniti

M0: Nema udaljenih metastaza

M1: Dokazano postojanje metastaza

Kao i u ostalih karcinoma, osim TNM klasifikacije, u prognostičke i terapijske svrhe koristi se i određivanje gradusa tumora prema stupnju diferenciranosti, odnosno prema stupnju nalikovanja na normalno tkivo. Trenutna klasifikacija tumora prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) (28) koristi dva gradusa, niski i visoki:

Niski gradus : Postoje varijacije u polarnosti jezgara, njihovoj veličini, obliku i izgledu kromatina. Jezgre su jednoliko povećane, s blagim razlikama u obliku, konturi i distribuciji kromatina. Jezgrice mogu biti prisutne, ali su neupadljive. Mitoze su rijetke i mogu biti prisutne u bilo kojem sloju epitela, ali su češće bazalno.

Visoki gradus : Prisutne su izražene varijacije u polarnosti jezgara, njihovoj veličini, obliku i izgledu kromatina. Jezgre su često pleomorfne s umjerenom do izraženom varijacijom u veličini te nepravilnom distribucijom kromatina. Jezgrice su prominentne. Mitoze su česte, ponekad atipične i pojavljuju se u svim slojevima epitela, uključujući površinu.

1.6.4. PATOHISTOLOŠKA SLIKA

Temelj za podjelu urotelnih tumora desetljećima je bila klasifikacija SZO iz 1973. Potreba za novom, boljom stratifikacijom papilarnih tumora dovela je do dvije značajne konferencije, konsenzusne konferencije 1997. i ISUP 1998. (od engl. International Society of Urological Pathology), sa sudjelovanjem patologa, urologa i onkologa . Ove su konferencije urodile prijedlogom za novu SZO klasifikaciju 2004 (28).

Prema novoj klasifikaciji, papilarni tumori podijeljeni su u 4 kategorije: papilom; papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala (PUNLMP, od engl. „papillary urothelial neoplasm of low malignant potential“); karcinom niskog gradusa; i karcinom visokog gradusa. Kao rezultat, nekadašnji karcinomi gradusa 1 prema SZO klasifikaciji iz 1973 reklasificirani su kao PUNLMP ili karcinom niskog gradusa; karcinomi gradusa 2 spadaju u karcinome niskog ili visokog gradusa; a karcinomi gradusa 3 nazivaju se karcinomima visokog gradusa (28).

Glavna razlika klasifikacija iz 1973. i 2004. je uvođenje pojma PUNLMP, s namjerom da se razdvoji skupina neinvazivnih papilarnih neoplazma čije je biološko ponašanje znatno manje agresivno od karcinoma.

Iako je prošlo već više od desetljeća od spomenutih temeljnih konferencija, klasifikaciju mnogi još uvijek smatraju „radnom“ zbog potrebe za većim brojem kliničkih i molekularnih studija koje bi dale detaljnije prognostičke i terapijske smjernice u određenim slučajevima (36).

Prema obliku rasta, karcinome mokraćnog mjehura možemo podijeliti na one s papilarnim rastom i one koji rastu kao ravne, infiltrativne lezije. Obje vrste karcinoma mogu rasti kao invazivni ili neinvazivni tumori. Prema tome, postoje i neinvazivni ekvivalenti za oba tipa rasta tumora. Smatra se da „ravni“ oblik invazivnog karcinoma nastaje iz karcinoma in situ (CIS), a invazivni oblik papilarnog karcinoma nastaje iz neinvazivnog, pTa stadija papilarnog karcinoma prema TNM klasifikaciji. Papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala ima znatno bolju prognozu od karcinoma

mokraćnog mjehura, no opisana je u ovom poglavlju zbog svoje sklonosti recidivima, kao i mogućnosti napredovanja u gradusu, koje je srećom nešto rjeđe.

Papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala (PUNLMP) je donekle kontroverzan patološki entitet definiran kao neinvazivni papilarni urotelni tumor koji nalikuje na egzofitični urotelni papilom, no pokazuje povećani broj slojeva stanica (88) u odnosu na normalni urotel. Ovaj entitet bi prema staroj SZO klasifikaciji urogenitalnih tumora iz 1973 odgovarao neinvazivnom papilarnom urotelnom karcinomu gradusa 1. To su većinom solitarni tumori, a često su smješteni u lateralnom ili posteriornom dijelu mokraćnog mjehura, u blizini ušća uretera. Češći su u starijih osoba, a odnos zahvaćenosti muškog i ženskog spola iznosi 4.5:1 (89).

Histološki, papile su tanke, nefuzionirane, a obložene su urotelom koji sadrži više slojeva nego normalan urotel, no citološka atipija je odsutna ili minimalna. Postoji dojam prevladavajućeg reda, s tek minimalnim varijacijama u arhitekturi i izgledu jezgara. Jezgre su blago uvećane u odnosu na normalne. Bazalni sloj stanica palisadira, a sloj površnih stanica najčešće je prisutan. Mitoze su rijetke i smještene su bazalno. Površinske stanice su uglavnom prisutne (17).

U istraživanju objavljenom 2008., Barbisan i sur. (90) zaključili su da su značajke nerecidivirajućih PUNLMP izražena imunohistokemijski pozitivna reakcija na FGFR3, pozitivnost površinskih slojeva na CK20 i nizak proliferacijski indeks.

Prognoza u bolesnika s PUNLMP je odlična. Do povrata bolesti može doći, no znatno rjeđe nego u bolesnika s neinvazivnim papilarnim urotelnim karcinomom (91). Rijetko, obično više godina nakon dijagnoze, može doći do pojave tumora višeg gradusa/stupnja bolesti u istog bolesnika. Srednje vrijednosti recidiva tumora, progresije u viši stupanj bolesti, i tumor-specifičnog mortaliteta iznose otprilike 35%, 4% i 2% (89, 92-93).

Karcinom in situ (CIS) predstavlja proliferaciju citološki malignih urotelnih stanica ograničenih na sluznički epitel. U manje od 10% slučajeva pojavljuje se *de novo*, dok ostatak bolesnika s CIS ima povijest prethodnog ili istodobnog karcinoma (94). CIS je značajan čimbenik rizika za pojavu invazivnog karcinoma, koji nastaje u čak 80% bolesnika unutar 4 godine. Progresija bolesti češća je u bolesnika s multifokalnim CIS (95).

Histološki, CIS je ravna lezija u kojoj površinski epitel sadrži citološki izrazito atipične stanice. Iako promjene obično obuhvaćaju cijelu debljinu epitela, to nije nužno za dijagnozu (51, 96). Karakterističan je gubitak polarnosti i kohezivnosti stanica. Stanice tumora obično su velike i pleomorfne, imaju umjereno obilnu do obilnu citoplazmu, iako mogu biti i manje sa povećanim odnosom veličine jezgre prema citoplazmi. Kromatin je grublji, grudast. Jezgrice su obično veće i naglašene, barem u većini stanica, a mogu biti i višestruke. Mogu se naći atipične mitoze i u najpovršnijim slojevima epitela. Površinske stanice mogu biti prisutne u CIS.

Posljednjih godina definirane su neke vrste rasta CIS. Kod tzv. „pagetoidnog“ oblika rasta pojedinačne tumorske stanice raspršene su između normalnih urotelnih stanica. U jednom dijelu CIS dolazi do izraženog gubitka kohezivnosti, što rezultira tzv. „denudacijskim“ oblikom rasta. Isto tako, opisane su varijante CIS malih i velikih stanica. CIS se može naći i unutar neneoplastičnih invaginacija urotela poput von Brunnovih gnijezda ili cystitis cystica (17).

Imunohistokemijska reakcija na citokeratin 20 u CIS-u mokraćnog mjehura prisutna je u svim slojevima urotela, a prekomjerna ekspresija p53 je također prisutna (48). Analiza kromosoma u CIS-u mokraćnog mjehura pokazuje da je aneuploidija učestala i da su najčešći gubici 14q, 8p, 17p, 13q, 11p i 4p (97).

Otprilike 45–65% bolesnika sa CIS i konkomitantnim invazivnim tumorom umrijet će od bolesti, za razliku od 7–15% bolesnika s primarnim CIS-om sa ili bez konkomitantnog neinvazivnog papilarnog tumora (98). Čini se da CIS s aneuploidnim kariotipom nosi viši rizik za progresiju bolesti (99).

Neinvazivni papilarni karcinom niskog gradusa odlikuje se uskim papilama koje se granaju bez ili s minimalnim međusobnim spajanjem. Ti tumori ostavljaju dojam pravilnog izgleda s jasno prepoznatljivim citološkim i arhitekturalnim varijacijama, čak i pri malom povećanju. Za razliku od PUNLMP, varijacije u veličini i obliku jezgara te rasporedu kromatina jasno su vidljive.

Jezgre su jednoliko povećane, s manjim razlikama u obliku, obrisima i rasporedu kromatina. Jezgrice mogu biti prisutne, ali su neuočljive. Mitoze nisu česte i mogu se pojaviti u bilo kojem sloju, ali češće u bazalnim slojevima. Bitna napomena je da se izgled papila u mikroskopskom preparatu procjenjuje na mjestima uzdužnog prereza kroz fibrovaskularnu stromu. U suprotnom, može se steći krivi dojam povećane celularnosti, gubitka polarnosti jezgara i izraženije mitotske aktivnosti. Postoje tumori koji unatoč općem pravilnom izgledu žarišno pokazuju područja visokog gradusa; u ovim slučajevima tumoru se dodjeljuje visoki gradus.

Porastom gradusa dolazi do gubitka ekspresije CD44 u bazalnom sloju epitela, ekspresije citokeratina 20 (CK) u svim slojevima epitela i gubitka ekspresije p63 (100-101). Tumori unutar ove skupine obično su diploidni, no neke genetske studije pokazuju gubitak 9.kromosoma i učestalu pojavu mutacije FGF3 (102).

Povrat bolesti, napredovanje u stadiju i tumor-specifični mortalitet za ovaj entitet iznose otprilike 50%, 10% i 5% (8).

Neinvazivni papilarni karcinom visokog gradusa odlikuje se papilama koje se opsežnije granaju i češće su spojene. Prevladava dojam nepravilnosti s izraženim arhitekturalnim i citološkim varijacijama, čak i pri malom povećanju. Za razliku od karcinoma niskog gradusa, jasno je prepoznatljiv nuklearni polimorfizam, umjerena do jaka anizokarioza i nepravilna distribucija kromatina. Jezgrice su izražene. Mitoze su česte, a mogu biti atipične i pojavljivati se u bilo kojem sloju, čak i površinskom. Debljina urotela često varira kao rezultat diskohezije stanica. Unutar ove kategorije postoji široki spektar atipije, od slabije izražene atipije do potpuno anaplastičnh

karcinoma. Kao i u karcinoma niskog gradusa, treba procjenjivati papile na uzdužnim prerezima kroz fibrovaskularnu stromu. Zbog visoke vjerojatnosti pridružene invazije, bitno je pregledati sva suspektna žarišta (28).

Papilarni karcinomi visokog gradusa često su imunohistokemijski izrazito pozitivni na p53 i CK20 (48). Vrlo su često na nekoliko kromosoma prisutni gubici (2q, 5q, 10q, 18q) i dobici (5p and 20q) genetskog materijala. Ove promjene znatno se razlikuju od onih zabilježenih u neinvazivnim papilarnim karcinomima niskog gradusa, no slične su onima zabilježenim u invazivnim urotelnim karcinomima (103). Još jedan nalaz koji ih razlikuje od neinvazivnih karcinoma niskog gradusa je znatno rjeđa prisutnost mutacije FGFR3 (104).

Invazivni urotelni karcinom ima znatno lošiju prognozu od neinvazivnog. Tumori koji razviju sposobnost prodora kroz bazalnu membranu i invazije lamine proprije, odnosno dubljih slojeva stijenke proporcionalno čine manje od 50% svih karcinoma mokraćnog mjehura. Većina pT1 karcinoma su papilarni, visokog ili niskog gradusa, dok je većina pT2-pT4 karcinoma ravnog načina rasta i visokog gradusa (17).

U većini slučajeva prisutna je solitarna lezija, ponekad uz satelitske čvoriće. Na periferiji tumora mogu se naći displazija ili CIS, kao i na drugim mjestima prekrivenim urotelom, kao što su distalni mokraćovod, prostatični dio mokraćne cijevi, ili distalni prostatični duktus. Ponekad se *in situ* lezije mogu širiti čak i kroz *ductus ejaculatorius* i zahvatiti sjemene mjehuriće, no ipak, češći put zahvaćanja svih navedenih organa je izravnim širenjem karcinoma kroz stijenku mokraćnog mjehura.

Prepoznavanje invazije urotelnog karcinoma u laminu propriju često predstavlja jedan od najzahtjevnijih zadataka u kirurškoj patologiji i treba biti zasnovano na preciznim kriterijima.

Pri procjeni invazije tumora bitno je znati nekoliko pojedinosti. U svim papilarnim karcinomima visokog gradusa postoji visoka mogućnost invazije, na što treba obratiti pozornost. Iako invazija karcinoma niskog gradusa nije sasvim neuobičajena, ipak je znatno češća u onih visokog gradusa i prema

nekim izvještajima nalazi se čak u njih 70–96% (8). Kod tangencijalno presječenih neinvazivnih papilarnih tumora, granica strome i epitela djeluje glatko i pravilno. U slučajevima prave invazije, vjerojatniji je nalaz gnijezda nepravilnog oblika i raznolike veličine ili pojedinačnih tumorskih stanica koje prodiru kroz stromu. Kod tangencijalnog prereza kroz neinvazivni tumor i kod karcinoma koji se pojavljuje u Brunnovom gnijezdu, bazalna membrana zadržava pravilan oblik, dok je često odsutna ili prekinuta u slučajevima prave invazije (8).

Invazivnu frontu tumora mogu sačinjavati pojedinačne stanice ili nepravilno oblikovana gnijezda, a ponekad se s baze papila u podležeću stromu odvajaju prstoliki tračci. Invazivna gnijezda često se razlikuju izgledom od stanica neinvazivne komponente tumora u smislu da stanice imaju obilniju citoplazmu i izraženiji polimorfizam jezgara. U nekim slučajevima, osobito u mikroinvazivnim tumorima, invazivne stanice imaju obilnu eozinofilnu citoplazmu što se naziva paradoksalnom diferencijacijom. Ultrastrukturno, invazivne stanice često pokazuju redukciju broja dezmosoma što utječe na smanjenu kohezivnost tumorskih stanica (105).

Uz invazivni karcinom često se nalaze histološke promjene nastale kao posljedica prethodnih biopsija, intravezikalne terapije BCG-om, radioterapijom ili kemoterapijom (106). Spomenute promjene mogu biti toliko izražene da prikrivaju istovremenu prisutnost karcinoma. U takvim slučajevima, imunohistokemijska pretraga reaktivnosti na citokeratin može biti od pomoći. Imunohistokemijska analiza može pomoći i u diferencijaciji invazivnog, slabo diferenciranog karcinoma prostate od slabo diferenciranog urotelnog karcinoma, od kojih potonji pokazuje pozitivnu reakciju na 34βE12 (107).

Stromalna reakcija u lamini propriji invazivnih tumora može biti upalna, miksoidna ili vezivna te može predstavljati bitan dijagnostički trag. Iako većina tumora mjehura s nedvojbenom invazijom lamine proprije pokazuje neku vrst stromalne reakcije, ta reakcija ne mora biti izražena, što čini prepoznavanje težim.

U nekim slučajevima dolazi do retrakcije strome oko pojedinih površinski invazivnih tumora, što se može zamijeniti s invazijom limfnih žila. U dvojbenim slučajevima može se upotrijebiti imunohistokemijsko bojanje biljezima za limfne žile, poput D2-40. Retrakcija bi mogla biti jedan od ranih znakova invazije u laminu propriju. Invazija u laminu propriju može potaknuti izraženu upalnu reakciju strome. Brojne upalne stanice u lamini propriji mogu otežati prepoznavanje pojedinačnih tumorskih stanica. U rijetkim slučajevima tumor inducira naglašenu proliferaciju fibroblasta, koji mogu pokazivati izražene atipije. Ta proliferacija ne smije se zamijeniti za vretenastu komponentu sarkomatoidnog tipa urotelnog karcinoma (8).

Pošto je dubina invazije najznačajniji prognostički i terapijski čimbenik (8), najbitniji dio izvještaja patologa osim postavljanja same dijagnoze je pažljiva procjena prisutnosti i dubine invazije. Prema Ro i sur. (10), u čak 91% bioptiranih pacijenata prisutan je sloj glatkog mišića unutar lamine proprije. Odsutnost tog sloja u pojedinim biopsijama objašnjava se činjenicom da je često u manjem ili većem dijelu diskontinuiran. Taj je sloj najčešće sastavljen od tankih snopova mišićnih vlakana, iako u pojedinim slučajevima snopovi mogu biti deblji i nalikovati na muskularis propriju. Stoga je potreban poseban oprez u interpretaciji invazije u mišićni sloj. Pretraživanjem literature mogu se naći pojedini medicinsko-pravni slučajevi u kojima je zbog nepreciznog izražavanja patologa vezanog uz navedeni tanki mišićni sloj došlo do nepotrebno radikalne operacije i znatnog narušenja kvalitete života bolesnika (12).

Mišićni sloj stijenke (muskularis proprija) sastoji se od snopova mišićnih vlakana većeg promjera. Prisutnost ili odsutnost muskularis proprije treba uvijek biti naznačena u patohistološkom izvještaju, budući da dokumentira dubinu urološkog zahvata i mogućnost ili nemogućnost procjene invazije dubljih slojeva stijenke. Otprilike 80% bolesnika s invazijom karcinoma u mišićni sloj (pT2) ima spomenuti stupanj invazije od početka, dok se u ostalih radi o progresiji karcinoma nižeg stadija. Trenutno jedan od najvećih izazova kirurške patologije mokraćnog mjehura je procjena

mogućnosti pojedinih pTa i pT1 karcinoma da recidiviraju i invadiraju u mišićni sloj stijenke (108).

Urotelni karcinom koji invadira mišićni sloj stijenke raste u obliku gnijezda, tračaka, manjih nakupina ili pojedinačnih stanica koje su često razdvojene dezmoplastičnom stromom. Citoplazma je obično srednje obilna do obilna, amfofilna ili eozinofilna, a jezgre su velike, hiperkromatske, nepravilne i pleomorfne. Prisutnost i izgled jezgrica varijabilni su. Mitoze, osobito patološke, su vrlo česte.

Invazijom kroz cijelu muskularis propriju karcinom se širi u perivezikalno masno tkivo (pT3). Zbog prisutnosti masnog tkiva u svim slojevima stijenke, uključujući i laminu propriju, valja biti oprezan u procjeni dubine zahvaćenosti u materijalu dobivenom TUR-om (2).

Karcinomi mokraćnog mjehura koji invadiraju u mišić i izvan njega često pokazuju dediferencijaciju tumorskih stanica te se uz konvencionalni oblik urotelnog karcinoma visokog gradusa u čak 37% slučajeva mogu naći posebni oblici karcinoma (109).

1.6.5. POSEBNI OBLICI PRIMARNOG KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Ova skupina uključuje tumore koji prema klasifikaciji SZO iz 2004. (28) pripadaju u kategoriju urotelnih karcinoma, ali s posebnom diferencijacijom.

Prema toj klasifikaciji, postoje histološki zasebni oblici karcinoma poput pločastog karcinoma mokraćnog mjehura koji ne pripadaju skupini urotelnih karcinoma. Zasebni oblici razlikuju se od urotelnog karcinoma po čimbenicima rizika, patogenezi i prognozi te prelaze okvire ove disertacije.

Prepoznavanje podvarijanti urotelnog karcinoma bitno je jer se obično radi o tumorima koji imaju nešto lošiju prognozu, a često se nalaze kao manja komponenta tumora unutar konvencionalnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura. Najčešći oblik divergentne diferencijacije je pločasti, a

slijedi ga žljezdani tip diferencijacije. U ovu skupinu ne pripada sitnostanični karcinom, budući da prisutnost i najmanje količine te komponente nosi znatno lošiju prognozu od ostalih oblika i traži drugačiju terapiju bolesti (28).

Pločasta diferencijacija definirana je prisutnošću intercelularnih mostića ili keratinizacije i susreće se u 21% svih urotelnih karcinoma mokraćnog mjehura (110). Iako klinički značaj pločaste diferencijacije nije u potpunosti razjašnjen, čini se da je riječ o tumorima s nešto lošijom prognozom od konvencionalnih urotelnih karcinoma, što se objašnjava češćom pojavnošću u karcinomima visokog gradusa (111).

Žljezdana diferencijacija nalazi se u oko 6% urotelnih karcinoma i očituje se pojavom tubularnih žlijezda ili žlijezda enteričnog tipa koje luče sluz. Ponekad se nalaze mucinozna varijanta rasta i varijanta sa stanicama tipa prstena pečatnjaka. Oskudna citoplazmatska sluz može se naći u preko polovice urotelnih karcinoma i ne smatra se znakom žljezdane diferencijacije. Klinički značaj žljezdane diferencijacije nije razjašnjen (110).

Tzv. „nested“ varijanta urotelnog karcinoma opisana je tek u oko 60 slučajeva, od kojih je oko 50% dokumentirano nakon 2000. godine (17), no bitna je zbog prividno benignog izgleda. Riječ je o manjim gnijezdima tumorskih stanica čije jezgre većinom ne pokazuju znakove atipije, iako se pažljivim pregledom uvijek nalaze žarišta nedvojbeno anaplastičnih stanica prominentnih nukleola, a često i invazija mišićnog sloja stijenke. Bitno je razlikovati „nested“ varijantu od Brunnovih gnijezda, nefrogenog adenoma i paraganglioma. Prognoza je izrazito loša, pa čak oko 70% bolesnika umre unutar 3 godine od postavljanja dijagnoze (41).

Mikropapilarna varijanta je još jedna rjeđa varijanta urotelnog karcinoma, opisana u oko 70 slučajeva od 1994. godine, koja se posljednjih godina nešto učestalije prepoznaje (112). Arhitekturalno, ovaj oblik karcinoma nalikuje na serozni karcinom jajnika, rastući u obliku sitnih, nježnih papila. Na mjestima invazije dolazi do karakteristične retrakcije oko spomenutih papila, koja može nalikovati na vaskularnu invaziju. Invazija u mišićni sloj stijenke gotovo je pravilo. Imunohistokemijski, ova je varijanta slična uobičajenom urotelnom karcinomu (CK 7 i CK 20 pozitivna, 34βE12

pozitivna). Ukoliko u primljenom materijalu nema mišićnih uzoraka, a na površini tumora se nalazi mikropapilarna komponenta, postoji apsolutna indikacija za rebiopsiju. Mikropapilarni karcinom često metastazira i ima visoku smrtnost. Stoga postoje preporuke da se kod ove varijante liječenje provodi radikalnom cistektomijom, osobito jer je bolest otporna na liječenje BCG-om (113).

Mikrocistična varijanta urotelnog karcinoma je rijetka, s manje od 20 opisanih slučajeva. Zbog malog broja slučajeva još uvijek nije sasvim poznat očekivani tijek bolesti. Trenutno je u središtu interesa prepoznavanje ove varijante i razlikovanje iste od adenokarcinoma. Mikrociste su obložene atipičnim epitelnim stanicama, no ne predstavljaju prave žlijezde kakve se nalaze u adenokarcinomu (17).

Karcinom nalik limfoepiteliomu je nediferencirani maligni epitelni tumor koji je histološki sličan istoimenom nazofaringealnom tumoru. Opisano je oko 50 slučajeva do sad. Sastavljen je od nakupina slabo diferenciranih stanica krupnih jezgara i prominentnih nukleola okruženih obilnom limfatičnom stromom. Imunohistokemijski, tumorske stanice pokazuju reaktivnost na citokeratin. *In situ* hibridizacijom nije nađena povezanost s Epstein-Barrovim virusom. Diferencijalno dijagnostički može doći do zamjene spomenutog karcinoma s floridnim cistitisom ili limfomom mokraćnog mjehura. Od prvog se karcinom nalik na limfoepiteliom razlikuje kvantitativno, dok se od limfoma razlikuje po pristnosti i B i T limfocita. Čisti oblik tumora dobro reagira na kemoterapiju i ima bolju prognozu, dok oni slučajevi u kojima je riječ o manjoj komponenti unutar urotelnog karcinoma imaju sličnu prognozu kao i osnovni tumor (114).

Sarkomatoidna varijanta urotelnog karcinoma je bifazična maligna neoplazma koja pokazuje morfološke i/ili imunohistokemijske značajke epitelne i mezenhimalne diferencijacije. Molekularna istraživanja ukazuju na monoklonalno porijeklo obje komponente. Ujedno mogu, ali i ne moraju biti prisutni heterologni elementi s pravom sarkomskom slikom, najčešće slikom osteosarkoma. U bolesnika sa sarkomatoidnom varijantom čest je anamnestički podatak o prethodnoj radijaciji i terapiji ciklofosfamidom.

Metastaze u limfne čvorove i udaljene organe česte su, a čak 70% bolesnika umre unutar 2 godine od postavljanja dijagnoze (115).

Osim ovih, postoje neke rjeđe varijante, koje će biti ukratko opisane. Plazmacitoidni i limfoidni oblik je rijedak, i u maloj biopsiji može se zamijeniti s plazmacitomom ili limfomom. U nekim urotelnim karcinomima nalaze se orijaške stanice ili stanica sa diferencijacijom u smjeru trofoblasta. U svijetlostaničnom karcinomu u citoplazmi se nalaze obilne nakupine glikogena, dok se u lipoidnom obliku nalaze vakuole masti (28).

1.6.6. MOLEKULARNE I GENETSKE PROMJENE POVEZANE S KARCINOMOM MOKRAĆNOG MJEHURA

Razumijevanje biologije nastanka i napredovanja karcinoma mokraćnog mjehura ključno je da bi se poboljšao pristup dijagnozi i terapiji ove bolesti. Otkrivanje složenih bioloških mehanizama uključenih u patogenetske procese trebalo bi olakšati bolju identifikaciju prognostičkih čimbenika i pospješiti pronalazak novih terapijskih mogućnosti.

Zaključak znatnog broja istraživanja je da se neinvazivni papilarni urotelni karcinom (pTa) razlikuje od karcinoma *in situ* (CIS) i karcinoma koji invadiraju mišić (pT2-nadalje) u pogledu molekularne patogeneze i puteva progresije. Broj genetskih promjena viši je u invazivnim tumorima, no čini se da postoji i kvalitativna razlika u smislu prisutnosti specifičnih genetskih promjena. Postoje barem dva značajnija genetska puta uključena u razvoj i progresiju bolesti (35, 116-117).

Prvi, izražen u neinvazivnim papilarnim tumorima, uključuje gubitak genetskog materijala 9. kromosoma s inaktivacijom ciklin-ovisnog inhibitora kinaze 2A (CDKN2A) (p16) na 9p. Ujedno se nalazi aktivacija gena za proteine HRAS i FGFR3 na telomerama 9q (118-119).

Drugi molekularni put uključuje inaktivaciju tumor-supresorskog gena *p53* na 17. kromosomu (17p11.3) i *Rb* gena na 13q14, što se susreće u

karcinomima se ravnim oblikom rasta i papilarnim karcinomima od stupnja pT1 nadalje (120-121).

Pažnja molekularnih biologa i patologa u posljednjem desetljeću osobito je usmjerena na drugi put. Proteini p53 i pRb koče prijelaz iz G1 u S fazu staničnog ciklusa, čime vrše bitnu ulogu u njegovoj regulaciji. Nekoliko studija pokazalo je da je pojačana imunohistokemijska reaktivnost tumorskih jezgara na p53 protein važan prediktor relapsa bolesti u bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura. Isto tako, kod bolesti ograničene na mokraćni mjehur, akumulacija p53 u jezgri je jedini neovisni prediktor napredovanja bolesti, kad se uzmu u obzir stadij i gradus (120, 122-124).

Proteinski produkt *Rb* gena je pRb protein, koji je uključen u interakciju s brojnim proteinima regulatorima staničnog ciklusa. U bolesnika sa imunohistokemijski utvrđenim gubitkom ekspresije pRb-a (nastale zbog mutacija ili delecija unutar *Rb* gena) češća je progresija bolesti nego u bolesnika s normalnom ekspresijom pRb (121, 125).

Imunohistokemijskom analizom ekspresije p53, pRb i još jednog bitnog regulatora staničnog ciklusa, p21, može se prilično precizno procijeniti očekivano 5-godišnje preživljenje bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura. Iste studije pokazale su da je u spomenutom načinu procjenjivanja prognostički bitniji broj mutiranih gena od toga koji je gen zahvaćen (126-127).

Od ostalih molekularnih čimbenika koji bi mogli imati bitnu ulogu u invaziji, metastaziranju i progresiji bolesti, valja spomenuti proto-onkogen *c-erbB-2* (poznat i kao *Her2-neu*), receptor za epidermalni čimbenik rasta (EGFR), čimbenici rasta peptida i adhezijske molekule, poput E-kadherina i integrina (128). Ujedno, pokazano je da su *ICAM1*, *MAP2K6,* i *KDR* ključne molekule uključene u proces metastaziranja u limfne čvorove (129).

Jedno od aktualnijih područja je primjena terapije na temelju molekularnih značajki tumora. Odnedavno postoje dokazi da mutacije p53 proteina u tumorskim stanicama mogu izazvati selektivnu osjetljivost na određene kemoterapeutike, pogotovo one koji uzrokuju oštećenje DNA (npr. cisplatin), odnosno mikrotubula (npr. paklitaksel) ili inhibiraju prijelaz iz G2 u

M fazu staničnog ciklusa (128). Istraživanje Cote i sur. pokazala su da su karcinomi mokraćnog mjehura s promjenama p53 osobito osjetljivi na kemoterapijske protokole koji sadrže cisplatin (130).

1.6.7. PROGNOSTIČKI ČIMBENICI

Određivanjem prognostičkih čimbenika pokušava se predvidjeti tijek i ishod bolesti. Korištenje do sada poznatih i pronalaženje novih prognostičkih čimbenika ima veliko kliničko i terapijsko značenje jer njihovo korištenje omogućava stvaranje individualnog terapijskog pristupa ovisno o kliničkim, morfološkim i molekularnim obilježjima svakog pojedinog karcinoma. Vrlo dobar primjer takvog pristupa kod karcinoma mokraćnog mjehura je primjena cisplatina u bolesnika s promjenama p53 (130).

Prognostički čimbenici mogu se podijeliti na kliničke, morfološke i molekularne čimbenike.

Koristeći isključivo kliničke čimbenike, općenito gledano, ne može se s preciznošću odrediti pojedinačna prognoza infiltrativnog karcinoma. Multifokalnost tumora, tumori veći od 3 cm i istodobni karcinom *in situ* označeni su kao čimbenici rizika za recidiv i progresiju (131). Širenje tumora izvan mokraćnog mjehura, infiltracija ušća uretera, metastaze u limfne čvorove i prisutnost diseminacije karcinoma povezani su s lošom prognozom (28).

Osim gradusa i stadija, postoje još neka specifična morfološka obilježja koja se mogu koristiti u prognostičke svrhe. Određivanje gradusa bitnije je u pT1 tumora, budući da su u pravilu svi tumori od pT2 nadalje visokog gradusa, tako da u njih gradus nema funkciju neovisnog prognostičkog čimbenika (28).

Prisutnost i dubina invazije daleko su najbitniji prognostički čimbenici. U pokušajima da se pT1 kategorija dodatno stratificira, predložena je substratifikacija tumora ovisna o dubini prodora u laminu propriju. Tumori koji infiltriraju muskularis mukoze imaju viši stupanj progresije (132-133). Dubina

prodora u laminu propriju može se odrediti i na temelju mjerenja dubine invazije uspomoć mikrometra spojenog s mikroskopom (134).

Karcinom *in situ* češće se nalazi uz tumore višeg gradusa i stadija, a prisutnost limfatične ili vaskularne invazije negativno utječe na petogodišnje preživljenje (44% u 5 godina) (45).

Posebne histološke varijante poput karcinoma malih stanica, sarkomatoidnog karcinoma, tzv. „nested“ varijante, mikropapilarnog karcinoma i karcinoma nalik na limfoepiteliom mogle bi biti klinički bitne. Isto tako, stanje rubova resekcije nakon cistektomije bitan je prognostički predskazatelj (135).

Od ostalih čimbenika, ističe se način rasta tumora. Tumori sa širokom frontom invazije pokazuju bolju prognozu od onih koji rastu u obliku sitnih infiltrativnih nakupina (28).

1.6.8. TERAPIJA I PROGNOZA

Terapija i prognoza karcinoma mokraćnog mjehura trenutno ponajprije ovise o stadiju, a dijelom i o gradusu. Valja spomenuti da, iako je invazija prilično loš prognostički znak, u dijelu institucija i zemalja postoji običaj podjele karcinoma na *površinski* i *duboko invazivni*. Prvi uključuje karcinome bez invazije (pTa) i s invazijom u laminu propriju (pT1), dok se drugi odnosi na bolesnike s invazijom u muskularis propriju (pT2) nadalje (128).

Pritom se smatra da su površinski karcinomi prikladni za liječenje transuretralnom resekcijom i instilacijom BCG (cjepiva protiv tuberkuloze), dok se duboko invazivni liječi cistektomijom i nekom od adjuvantnih terapija.

Pojedini autori (136) osporavaju ovakvu podjelu, s argumentom da se karcinomi s invazijom u laminu propriju ne mogu smatrati površinskim te smatraju da je najprikladnije razdvojiti sve tumore s invazijom od neinvazivnih. Kakva god da je dubina invazije, ona nosi znatno lošiji dugotrajni ishod bolesnicima u odnosu na one s neinvazivnim tumorima .

Zbog različitosti ova dva pristupa, još uvijek postoje različiti pristupi liječenju pT1 karcinoma, osobito onih visokog gradusa i s invazijom u sloj lamine proprije ispod muskularis mukoze (137).

Petogodišnje preživljenje iznosi oko 95% za papilarne neinvazivne tumore niskog gradusa, oko 75% za tumore s invazijom u laminu propriju, dok se kod tumora s invazijom u mišićni sloj stijenke i probojem kroz isti očekuje preživljenje između 21-63% bolesnika, ovisno o dubini invazije i stupnju zahvaćenosti okolnih organa. U bolesnika sa zahvaćenim limfnim čvorovima, šansa za petogodišnje preživljenje iznosi oko 35% (138).

1.7. MIOFIBROBLASTI

Miofibroblasti su otkriveni 1971. elektronskom mikroskopijom granulacijskog tkiva u eksperimentalno izazvanim ranama (139). Tijekom sljedećih godina stečena su mnoga saznanja o njihovoj prisutnosti, distribuciji i ulozi u normalnim, kao i u patološkim tkivima.

Po definiciji, miofibroblast je mezenhimalna stanica vretenasta oblika koja dijeli histološka, imunohistokemijska i ultrastrukturna obilježja glatkomišićne stanice i fibroblasta. Imunohistokemijski, miofibroblasti pokazuju pozitivnu reakciju na glatkomišićni aktin (SMA) i vimentin dok je reakcija na citokeratin, kalponin i dezmin negativna. Njihovo podrijetlo je još uvijek predmet rasprave i postoji nekoliko teorija o njihovom nastanku (140-142).

Miofibroblasti se nalaze u mnogim normalnim ljudskim i životinjskim tkivima, kao što su folikuli jajnika, crijevna sluznica, septa plućnih alveola, pupkovina i druga (2). Isto tako, oni su bitna sastavnica granulacijskog tkiva, u kojem imaju ulogu u kontrakciji i zatvaranju rane (143).

Patološki procesi u kojima je zabilježena prisutnost miofibroblasta su također brojni, a mogu se podijeliti u 3 vrste: a) procesi povezani s upalom,

reparacijom i remodeliranjem, b) kvazineoplastična proliferativna stanja i c) stromalna reakcija na tumore.

Ukratko, prva skupina uključuje stanja poput ciroze (144), tenosinovitisa (145), astme (146) i brojnih drugih, u kojima miofibroblasti igraju jednu od središnjih uloga u stvaranju ekstracelularnog matriksa.

U drugoj skupini su vrlo česte i značajne mekotkivne proliferacije svrstane pod nazivom „fibromatoze“, koje su sastavljene uglavnom od miofibroblasta, a posjeduju određeni proliferativni potencijal, no ne invadiraju niti metastaziraju (147).

Treća skupina patoloških procesa u koje su uključeni miofibroblasti i kojoj se u posljednje vrijeme posvećuje sve veća pažnja jest stromalna reakcija koja se pojavljuje u sklopu lokalnog širenja i rasta mnogih malignih tumora (148).

Reakcija strome na invaziju tumorskim stanicama uzrok je općepoznatoj tvrdoj konzistenciji invazivnih i metastatskih tumora, kao i svojstvu istih da uzrokuju retrakciju (privlačenje) okolnog tkiva. Tipični primjeri su retrakcija kože ili bradavice u invazivnom duktalnom karcinomu dojke, rigidna stijenka u karcinomu želuca koji raste tzv. *linitis plastica* načinom, anularni stenozirajući karcinom kolona i dr. Svi ovi fenomeni dijelom su rezultat djelovanja miofibroblasta (2).

Miofibroblasti su osobito brojni u stromi primarnih invazivnih i metastatskih karcinoma s fenomenom retrakcije, a obično se ne nalaze u stromi uz žarišta *in situ* karcinoma (149-152), iako je pojačano nakupljanje miofibroblasta opisano u pojedinim istraživanjima i u karcinomima in situ (153). U tumorima dojke i debelog crijeva akumulacija miofibroblasta je najizraženija na invazivnoj fronti tumora (148, 154-155).

U istraživanjima strome u invazivnim karcinomima mokraćnog mjehura, dokazane su promjene fenotipa stromalnih stanica u smislu gubitka određenih biljega fibroblasta poput CD34 i pojave miofibroblastičnih biljega (156), kao i promjena rasporeda stromalnih miofibroblasta u odnosu na neinvazivne karcinome (157).

Kao što je već spomenuto, podrijetlo miofibroblasta još uvijek je temelj rasprave, no bitan dio njih zasigurno nastaje iz fibroblasta vezivnog tkiva. Naime, u određenim *in vitro* uvjetima kulture tkiva moguće je postići da fibroblasti razviju fenotipske osobine miofibroblasta, poput prisutnosti stresnih vlakana i izraženosti glatkomišićnog aktina (158).

Nedavno je dokazano da tumorske epitelne stanice imaju sposobnost aktiviranja fibroblasta i njihovog pretvaranja u miofibroblaste. Pritom postoji više čimbenika za koje se smatra da *in vivo* uvjetuju prijelaz fibroblasta u miofibroblaste. Glavne uloge imaju mehaničko naprezanje, transformirajući faktor rasta β1 (TGF-β1), PDGF (od engl. „platelet-derived growth factor“) te stanični fibronektin. TGF- β1 i PDGF se također mogu smatrati i ključnim molekulama koje sintetiziraju tumorske stanice, a čija je glavna uloga promjena strome domaćina i omogućavanje progresije tumora (159).

Tuxhorn i sur. (160) ukazali su na bitnu ulogu miofibroblasta u napredovanju neoplazije. Prema njihovom istraživanju, epitelne stanice karcinoma prostate nemaju sposobnost rasta i progresije bez pomoći stromalnih stanica tumora. Inokulacija samo epitelnih tumorskih stanica u tzv. „gole miševe“ nije dovela do razvoja i rasta tumora. U slučaju kada su uz epitelne tumorske stanice miševima inokulirani i miofibroblasti, fibroblasti i Matrigel u odgovarajućem omjeru došlo je do rasta i širenja tumora (160).

Nedavno su neki od mehanizama uključenih u spomenutu komunikaciju tumorskih stanica i miofibroblasta pojašnjeni. Čini se da istodobna proizvodnja faktora rasta i citokina (poput TGF- β1, faktora rasta hepatocita i drugih) te određenih komponenata ekstracelularnog matriksa (poput fibronektina, tenascina, versikana i matriks metaloproteinaza) potiče invazivnost malignih epitelnih stanica (161-162). U stromi invazivnih karcinoma mokraćnog mjehura također je uočena pojačana ekspresija navedenih biljega (163-164).

Miofibroblasti ujedno štite tumorske stanice od imunih i upalnih stanica domaćina. Zaštita se odvija u najvećoj mjeri prevencijom direktnog kontakta između tumorskih epitelnih stanica i obrambenih stanica. Mikroskopski je uočeno da u tumorima u kojima je mreža miofibroblasta slabo razvijena

tumorske i upalne stanice dolaze u direktni kontakt, dok je u tumorima s dobro razvijenom mrežom miofibroblasta taj kontakt onemogućen i upalne stanice se ne nalaze ili se nalaze u malom broju u direktnom kontaktu s tumorskim stanicama (165).

1.8. UPALNA REAKCIJA STROME NA NEOPLAZIJU

Postoje dvije linije obrane organizma od karcinoma. Prva je preventivna i djeluje na staničnoj razini, a čine je tumor supresorski geni. Jedan dio njih regulira staničnu proliferaciju, a ostali popravljaju oštećenja DNA. Drugu liniju obrane predstavlja imuni sustav koji je primarno usmjeren na obranu organizma od biokemijski stranih tvari zvanih antigeni, bili oni ksenogeni (porijekla druge vrste), alogeni (porijekla druge jedinke) ili izmijenjeni autogeni (vlastitog porijekla). Obrambena reakcija protiv tumorskih stanica najmanje je izražena od sve tri; iako se tumorske i normalne stanice poprilično razlikuju izgledom, biokemijske razlike između njih su vrlo suptilne i ne dozvoljavaju uvijek sigurno razlikovanje malignog od normalnog, što je preduvjet za učinkovitu obranu (166).

Svojstvo odbacivanja tumorskih presadaka u srodnih miševa (unatoč činjenici da su transplantati kože bili prihvaćeni) dovelo je do spoznaja o postojanju tzv. tumor-specifičnih antigena (TSA) koji uzrokuju imunosni odgovor, a ne nalaze se u normalnim stanicama. Postoji popularna teorija imunosnog nadzora po kojoj počevši već od fetalnog doba zbog oštećenja DNA u organizmu konstantno nastaju stanice s tumorskim potencijalom koje imunosni sustav prepoznaje i uklanja. Isto tako, imunosni sustav posredno smanjuje opasnost od tumora boreći se protiv tumorigenih virusa. Ipak, postoje mnogi načini na koji tumori mogu izbjeći imunosni odgovor domaćina, npr. smanjenom ekspresijom molekula MHC I klase na površini stanica, lučenjem topljivih ekstracelularnih antigena koji preusmjeravaju pažnju imunog sustava te induciranjem imunosupresije i imunotolerancije (167).

Upalni odgovor, makar blago izražen, praktički se uvijek nalazi unutar malignih tumora. Zastupljenost pojedinih vrsta stanica često je različita ovisno o vrsti i mjestu nastanka tumora, no postoje neke opće spoznaje o upalnom odgovoru u stromi tumora. Protutumorski imunosni odgovor je predominantno stanični – tumorske stanice uglavnom su napadnute od strane CD8+ citotoksičnih limfocita i NK stanica. Iako se može dokazati stvaranje protutijela usmjerenih protiv tumorskih stanica, ono nema učinkovitu ulogu u obrani organizma (167).

Makrofazi su uvijek prisutni u stromi tumora, a u nekim tumorima čine čak do 80 % svih stanica i do 65% ukupnog volumena tumora. Neke vrste malignih stanica *in vitro* luče monocitni kemoatraktantni protein čija količina korelira s intenzitetom infiltrata makrofaga (168). Uloga makrofaga u stromi tumora vjerojatno je proizvodnja citokina i ostalih posrednika upale, od kojih su najvažniji interferon, interleukin 12 i čimbenik nekroze tumora alfa (TNF-α). Spomenute molekule posreduju protutumorski učinak makrofaga, no isto tako makrofazi ponekad mogu pogodovati tumoru lučeći čimbenike rasta i potičući angiogenezu (169). U najvećem broju makrofazi se nalaze u karcinomu bubrežnih stanica, melanomu i karcinomu debelog crijeva, tj. tumorima koji pokazuju najbolji odgovor na imunoterapiju (170).

Limfociti T koji su najbitnija poluga stanične imunosti najčešće se nalaze u velikom broju unutar i oko tumora. Od solidnih tumora, izražena infiltracija limfocitima tipična je za seminom, no uzrok infiltracije prema trenutnom tumačenju nije u užem smislu obrana od tumora, već odgovor na antigene zametnih stanica koji u fiziološkim uvjetima nisu dostupni imunom sustavu (8).

Medularni karcinom dojke je još jedan od tumora za koji je tipična obilna infiltracija limfocitima. On ima znatno povoljniju prognozu od ostalih karcinoma dojke, unatoč općenito slabijoj diferencijaciji (128). Ipak, uloga limfocita u obrani od karcinoma općenito gledano nije toliko uspješna koliko bi se dalo zaključiti iz same prisutnosti unutar karcinoma. To potvrđuje vrlo znakovit eksperiment u kojem citotoksični CD8+ T limfociti iz određenog

tumora uspješno razaraju tumorske stanice *in vitro*, ali ne i *in vivo*, što ukazuje na disfunkciju imunog sustava u bolesnika s karcinomom (171).

Pozitivna korelacija između infiltracije upalnim stanicama i prognoze zabilježena je u karcinomu debelog crijeva (172) i pluća (128), no za neke druge karcinome, uključujući i karcinome mjehura korelacija ili nije prisutna ili je prisutna u nekim, a odsutna u drugim istraživanjima (173-175).

Eozinofili su polimorfonuklearni leukociti čija je najznačajnija uloga obrana od parazita. Ime duguju karakterističnim eozinofilnim citoplazmatskim granulima koja sadrže nekoliko pozitivno nabijenih proteina. Najznačajniji su glavni bazični protein (MBP, od engl. „major basic protein“) i eozinofilni kationski protein (ECP, od engl „eosinophilic cationic protein“) koji posjeduju znatnu larvicidnu aktivnost (167). Eozinofili čine samo 1-3% leukocita u krvi, no u tkivima su znatno zastupljeniji od neutrofila zbog duljeg životnog vijeka od nekoliko tjedana (2).

Postoje dva pojma koja se odnose na nakupljanje eozinofila u sklopu reakcije na zloćudne tumore, a to su tkivna eozinofilija povezana s tumorom (TATE, od engl. „tumor-associated tissue eosinophilia“) i krvna eozinofilija povezana s tumorom (TABE, od engl. „tumor-associated blood eosinophilia“). Općenito gledano, prva je uglavnom povoljan prognostički faktor, dok druga ukazuje na rasap tumorskih stanica i nepovoljnu prognozu (176). Najizraženije nakupljanje eozinofila nalazi se u karcinomima velikih keratinizirajućih stanica poput pločastog karcinoma kože, usne šupljine, vanjskih genitalija i anusa (177). Prema istraživanju Cormier i sur. (178), nakupljanje eozinofila u tumorima neovisno je o djelovanju pomagačkih Th2 limfocita i predstavlja kontinuiran i dinamičan proces tijekom razvoja tumora.

Nekoliko istraživanja u proteklom desetljeću odnosi se na eozinofile kao posredni i potvrdni biljeg tumorske invazije u biopsijama. Ustanovljeno je da povećan broj eozinofila ukazuje na invaziju u karcinomu stidnice (179), vrata maternice (180), glave i vrata (181) i usne šupljine (182). U bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura koncentracija ECP u urinu znatno je viša nego u onih u kontrolnoj skupini (183). Naše istraživanje govori u prilog

korištenja eozinofila kao biljega invazije lamine proprije u papilarnom urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura (184).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. HIPOTEZA

Jedan od najvažnijih zadataka u histopatološkoj evaluaciji papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura predstavlja procjenu invazije tumora u laminu propriju budući da je prognoza u bolesnika s invazivnim karcinomom (pT1) znatno lošija, a mogućnost recidiva i progresije znatno viša nego u bolesnika bez invazije (pTa) (4, 17, 28, 108, 128, 136, 185).

Spomenuti zadatak ujedno je jedan od težih u urološkoj patologiji zbog tangencijalnog rezanja preparata, osobito u papilarnih tumora, termičkog i/ili mehaničkog oštećenja tkiva te izraženog upalnog infiltrata koji može prikriti tumorske stanice (8, 17, 28, 44-45, 56, 184).

Novija istraživanja ukazuju na blisku povezanost reakcije strome i invazije karcinoma, pri čemu važnu ulogu imaju miofibroblasti i upalni odgovor u stromi (151-152, 156-157, 160-161, 165, 173, 175, 178-182, 185). Malo je istraživanja koja se bave miofibroblastičnom i upalnom reakcijom strome u urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura (156-157, 173, 175), i većinom se bave spomenutim reakcijama kao prognostičkim pokazateljima, a manje kao dijagnostičkim. Nije razjašnjeno da li je moguće razlikovati pTa od pT1 karcinoma na temelju izraženosti miofibroblastične i upalne reakcije strome.

Hipoteza ovog istraživanja je da u stromi invazivnog (pT1) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura postoji izraženija miofibroblastična i upalna reakcija u odnosu na laminu propriju neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura koja se može prikazati histološki, histokemijski i imunohistokemijski te upotrijebiti u diferencijalnoj dijagnozi ta dva stadija karcinoma.

2.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na temelju postavljene hipoteze ciljevi ovog istraživanja su:

1. analizirati i usporediti intenzitet zelenog obojenja lamine proprije Malloryevom trikrom metodom u invazivnom (pT1) i neinvazivnom (pTa) papilarnom urotelnom karcinomu.

2. analizirati i usporediti izraženost vimentina, dezmina i SMA u lamini propriji invazivnog (pT1) i neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura.

3. analzirati raspodjelu miofibroblasta u u lamini propriji invazivnog (pT1) i neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura.

4. analizirati i usporediti izraženost upalne reakcije u lamini propriji invazivnog (pT1) i neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura.

5. analizirati i usporediti broj eozinofila u lamini propriji invazivnog (pT1) i neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura.

3. BOLESNICI I METODE

3.1. BOLESNICI

U retrospektivnom istraživanju je korišten arhivski materijal dobiven nakon transuretralne resekcije tumora te histološki potvrđene dijagnoze neinvazivnog ili invazivnog papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura na Kliničkom zavodu za patologiju «Ljudevit Jurak» Kliničke bolnice «Sestre milosrdnice» u Zagrebu. Analizirano je:

- 50 uzoraka neinvazivnog papilarnog urotelnog karcinoma
- 50 uzoraka invazivnog papilarnog urotelnog karcinoma

Korišteni su uzorci od uzastopnih bolesnika s dijagnozom neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma i invazivnog (pT1) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura kod kojih je napravljena transuretralna resekcija tumora (TUR) između 1. siječnja 2005. i 31. prosinca 2006. Iz istraživanja je isključen manji broj karcinoma (oko 5% ukupnog broja resekcija) u kojih količina lamine proprije nije bila dostatna za zadovoljavajuću analizu. Bolesnicima koji su uključeni u istraživanje bila je to prva biopsija i prethodno nisu dobivali nikakvu terapiju. Niti u jednog od bolesnika klinički kao ni patološki nisu bile prisutne metastaze u limfne čvorove niti udaljene metastaze.

3.2. METODE

Materijal je obrađen standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove,

rezanje na debljinu 5 µm, deparafiniziranje i bojenje standardnom metodom hemalaun eozin (HE).

3.2.1. HISTOKEMIJSKA I IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA

Stromalna reakcija analizirana je histokemijski pomoću Mallory trikrom metode koja je napravljena prema standardnoj proceduri i imunohistokemijski upotrebom monoklonskih protutijela na vimentin (monoklonski mišji; klon V9; kod M 0725; razrjeđenje 1:50; Dako Epos, Danska), glatkomišićni aktin (SMA) (monoklonski mišji; klon 1A4; kod M 0851; razrjeđenje 1:50; Dako Epos, Danska) i dezmin (monoklonski mišji; klon D33; kod M 0760; razrjeđenje 1:100; Dako Epos, Danska).

Mallory trikromnom metodom glatki mišići muskularis mukoze i muskularis proprije obojeni su crveno dok su kolagena vlakna obojena zeleno (186). Analizirano je nasumce odabrano područje u deset velikih vidnih polja (400x) u pTa papilarnom urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura i u područjima nedvojbene invazije strome u pT1 karcinomu.

Obojenost kolagenih vlakana izražena je semikvantitativno i to kao: 0. za odsutnost zelenog obojenja; 1, za slabo izraženo zeleno obojenje; 2, za umjereno izraženo zeleno obojenje i 3, za jako izraženo zeleno obojenje (151-152).

Imunohistokemijska analiza strome u pTa i pT1 karcinomu na vimentin, SMA i dezmin učinjena je na Dako TechMate TM automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu MSIP (od engl. „Microwave Streptavidin ImmunoPeroxidase“) protokola uz diaminobenzidin (DAB) kao vizualizacijski sistem.

Kao pozitivne kontrole korišteni su: za vimentin - tkivo miometrija (citoplazmatska reakcija), za SMA – tkivo leiomioma (citoplazmatska reakcija), za dezmin – tkivo leomioma (citoplazmatska reakcija).

Miofibroblasti strome su pozitivni na vimentin i SMA dok je reakcija na dezmin negativna. Glatki mišići strome pokazuju pozitivnu reakciju na SMA i dezmin, a reakcija na vimentin je negativna (151-152, 154, 159-160).

Rezultati imunohistokemijske analize za sve navedene biljege prikazani su semikvantitativno određivanjem postotka imunoreaktivnih stanica. Postotak imunoreaktivnih stanica određen je u područjima koja su prethodno označena na preparatima bojenim Mallory trikromskom metodom i to na 10 velikih vidnih polja (400x), a označen je kao: 0. za odsutnost reakcije; 1 za slabo izraženu reakciju, do 33% pozitivnih stanica; 2 za umjereno izraženu reakciju, >33%- 66% pozitivnih stanica; 3 za jako izraženu reakciju, preko 66% pozitivnih stanica (151-152).

Analizirana je i raspodjela miofibroblasta unutar lamine proprije koja je ocijenjena promatranjem rasporeda stromalnih stanica pozitivnih na glatkomišićni aktin te stromalnih stanica pozitivnih na vimentin (157). Raspodjela je označena kao: 1, za organiziranu (retikularnu) raspodjelu, i 2 za neorganiziranu (fascikularnu) raspodjelu.

3.2.2. PROCJENA UPALNE REAKCIJE I INFILTRACIJA EOZINOFILA

Za procjenu upalne reakcije korišteni su HE preparati. Opća izraženost upalne reakcije mjerena je u jednom velikom vidnom polju (400X) s najvećim brojem upalnih stanica i u okolnih devet vidnih polja pod velikim povećanjem. Rezultati su izraženi semikvantitativno, kao 0 = nema upale, 1 = slaba, 2 = umjerena, 3 = jaka upalna reakcija.

Infiltracija eozinofilima mjerena je na način da je određeno polje pod velikim vidnim povećanjem (400X) s najvećim brojem eozinofila i označeno E_{max} te se broju eozinofila u tom polju pribrojio broj eozinofila u 9 okolnih velikih vidnih polja, a dobivena vrijednost označena je E_{uk}.

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

U statističkoj analizi korišteni su Smirnov-Kolmogorovljev test za procjenu distribucije. Medijan s interkvartilnim rasponom korišten je za opis numeričkih vrijednosti. Kao neparametrijski testovi korišteni su χ^2 test, Mann-Whitneyev U test i Spearmanov test korelacije.

Razlike su smatrane statistički značajnim uz razinu vjerojatnosti $p<0.05$.

Za statističku analizu dobivenih podataka korišten je računalni program SPSS (verzija 15.0 za Windowse).

4. REZULTATI

U istraživanju je analizirano 50 uzoraka tkiva mokraćnog mjehura s invazivnim (pT1) papilarnim urotelnim karcinomom mokraćnog mjehura i kontrolna skupina sastavljena od 50 uzoraka tkiva mokraćnog mjehura s neinvazivnim (pTa) papilarnim urotelnim karcinomom mokraćnog mjehura.

Bolesnici s pT1 karcinomom bili su u dobi od 35 do 86 godina (medijan 71.5 godina, interkvartilni raspon 64-76 godina), a bolesnici s pTa karcinomom u dobi od 39 do 87 godina (medijan 68 godina, interkvartilni raspon 56-74 godina). Raspodjela bolesnika po spolu i gradusu tumora prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Raspodjela po spolu i gradusu tumora

	Spol		Gradus		Ukupno
	M	Ž	Nizak	Visok	
Invazivni	40 (80%)	10 (20%)	5 (10%)	45 (90%)	50
Neinvazivni	40 (80%)	10 (20%)	35 (70%)	15 (30%)	50
Ukupno	80 (80%)	10 (10%)	40 (40%)	60 (60%)	100

Prisutnost muskularis mukoze i muskularis proprije u dobivenom materijalu prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Prisutnost muskularis mukoze i muskularis proprije

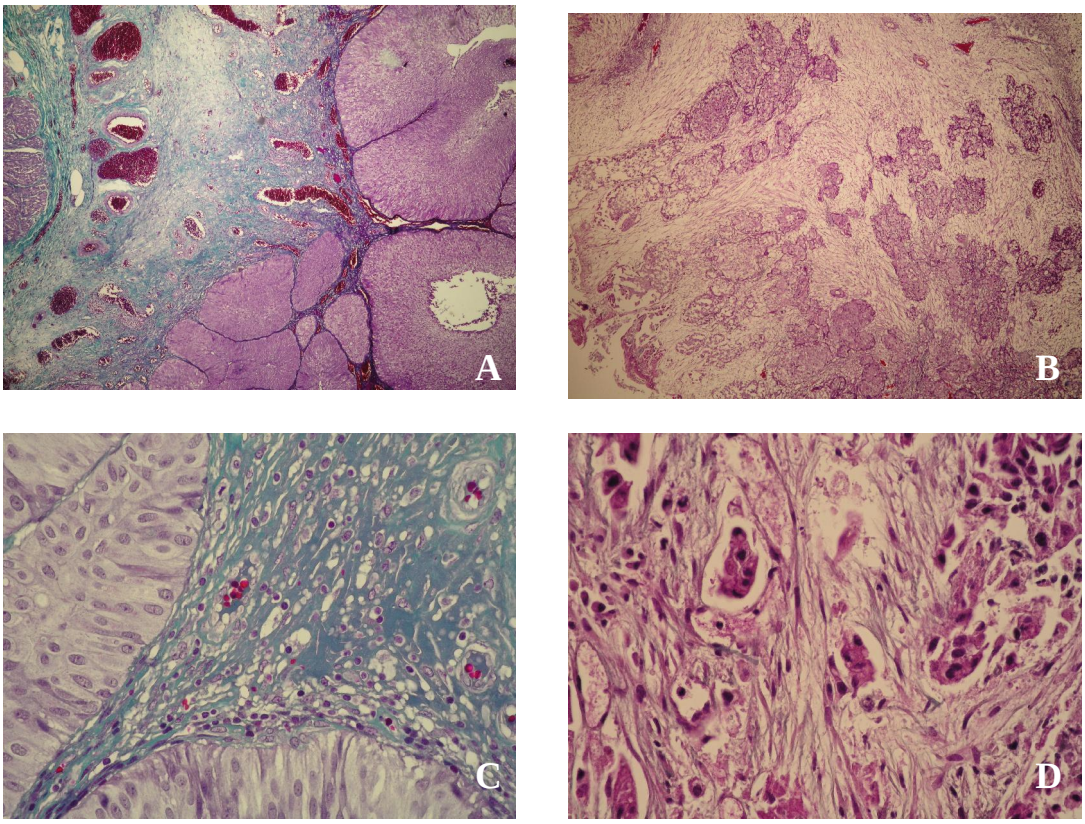
	Muskularis mukoze		Muskularis proprije		Ukupno
	Ima	Nema	Ima	Nema	
Invazivni	36 (72%)	14 (28%)	39 (78%)	11 (22%)	50
Neinvazivni	38 (76%)	12 (24%)	33 (66%)	17 (34%)	50
Ukupno	74 (74%)	26 (26%)	72 (72%)	28 (28%)	100

Rezultati obojenja kolagenih vlakana strome u invazivnom i neinvazivnom karcinomu Mallory trikrom metodom prikazani su u tablici 3 i na slikama 1A,B,C i D.

Tablica 3. Intenzitet zelenog obojenja lamine proprije Mallory trikrom metodom u invazivnom i neinvazivnom karcinomu

	Invazivni	Neinvazivni
0	35 (70%)	0 (0%)
1	13 (26%)	16 (32%)
2	2 (4%)	27 (54%)
3	0 (0%)	7 (14%)
Ukupno	50 (100%)	50 (100%)

0 - odsutnost zelenog obojenja
1 - slabo izraženo zeleno obojenje
2 - umjereno izraženo zeleno obojenje
3 - jako izraženo zeleno obojenje



Slika 1. Zeleno obojenje Mallory trikrom metodom je intenzivno u lamini propriji neinvazivnog karcinoma (A,C), a odsutno u lamini propriji invazivnog karcinoma (B,D) (mikroslike A i B snimljene su pod vidnim povećanjem 40X, a C i D pod vidnim povećanjem 400X).

Rezultati imunohistokemijske analize stromalnih biljega u invazivnom i neinvazivnom karcinomu prikazani su u tablici 4 i na slikama 2A,B,C,D,E i F.

Tablica 4. Imunohistokemijska izraženost stromalnih biljega u invazivnom i neinvazivnom karcinomu

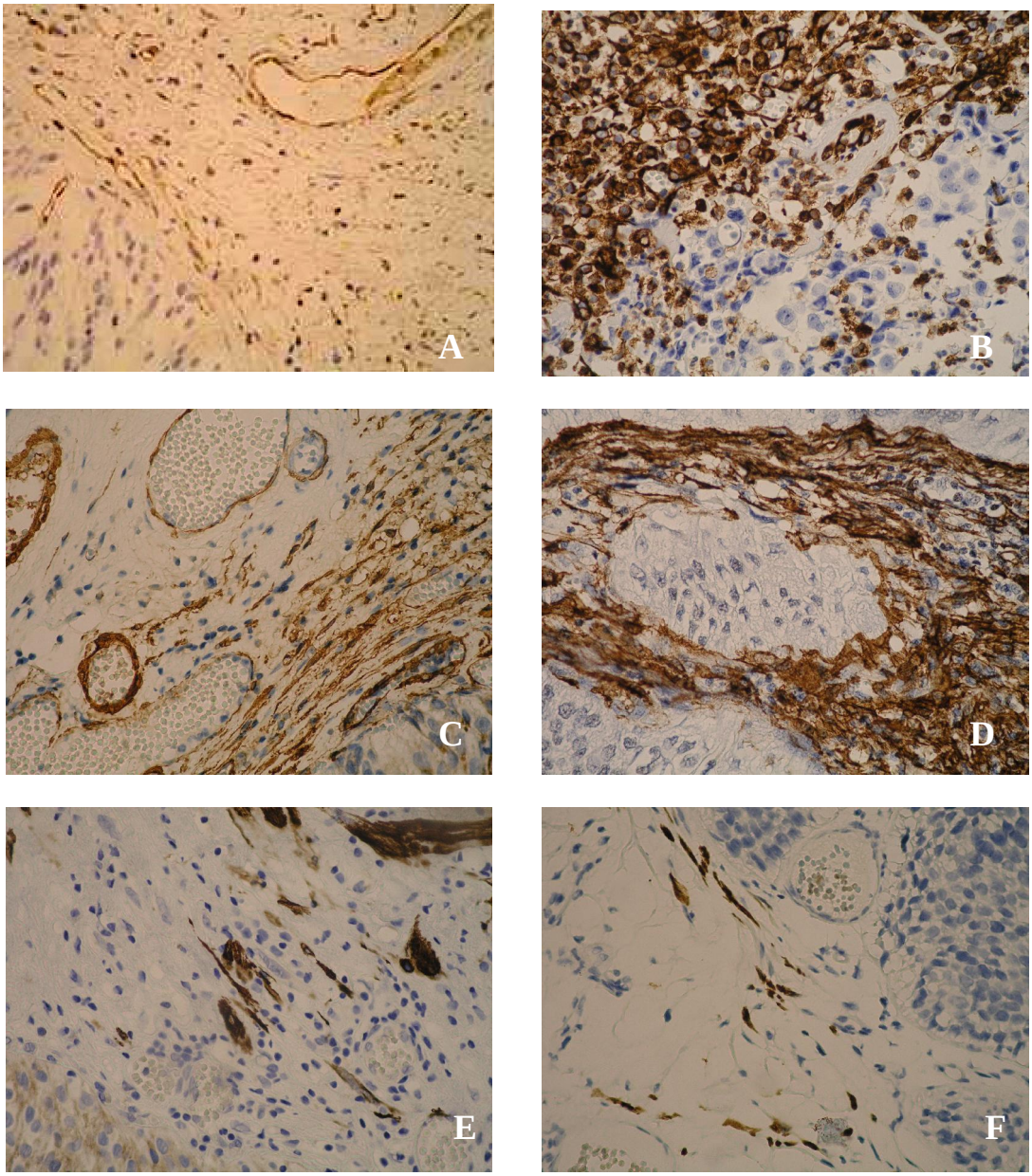
	Invazivni (pT1) karcinom			Nenvazivni (pTa) karcinom		
	vimentin	SMA	dezmin	vimentin	SMA	dezmin
0	0 (0%)	0 (0%)	8 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (26%)
1	2 (4%)	8 (16%)	34 (68%)	26 (52%)	35 (70%)	32 (64%)
2	21 (42%)	14 (28%)	8 (16%)	21 (42%)	11 (22%)	5 (10%)
3	27 (54%)	28 (56%)	0 (0%)	3 (6%)	4 (8%)	0 (0%)
Ukupno	50	50	50	50	50	50

0 - odsutna reakcija

1 - slabo izražena reakcija, do 33% pozitivnih stanica

2 - umjereno izražena reakcija, >33%- 66% pozitivnih stanica

3 - jako izražena reakcija, preko 66% pozitivnih stanica



Slika 2. Imunohistokemijska izraženost vimentina (A,B), SMA (C,D) i dezmina (E,F) u neinvazivnom (A,C,E) i invazivnom karcinomu (B,D,F). Nalazi se izraženija reakcija na vimentin i SMA u stromi invazivnog (B,D) u odnosu na neinvazivni karcinom (A,C). Izraženost dezmina nije se razlikovala između neinvazivnog (E) i invazivnog karcinoma (F)
(sve mikroslike napravljene su pod velikim vidnim povećanjem, 400X).

Rezultati raspodjele vimentin pozitivnih i SMA pozitivnih stanica unutar lamine proprije prikazani su u tablici 3 i slikama 3A,B,C i D. Raspodjela je bila organizirana (retikularna) ili neorganizirana (fascikularna).

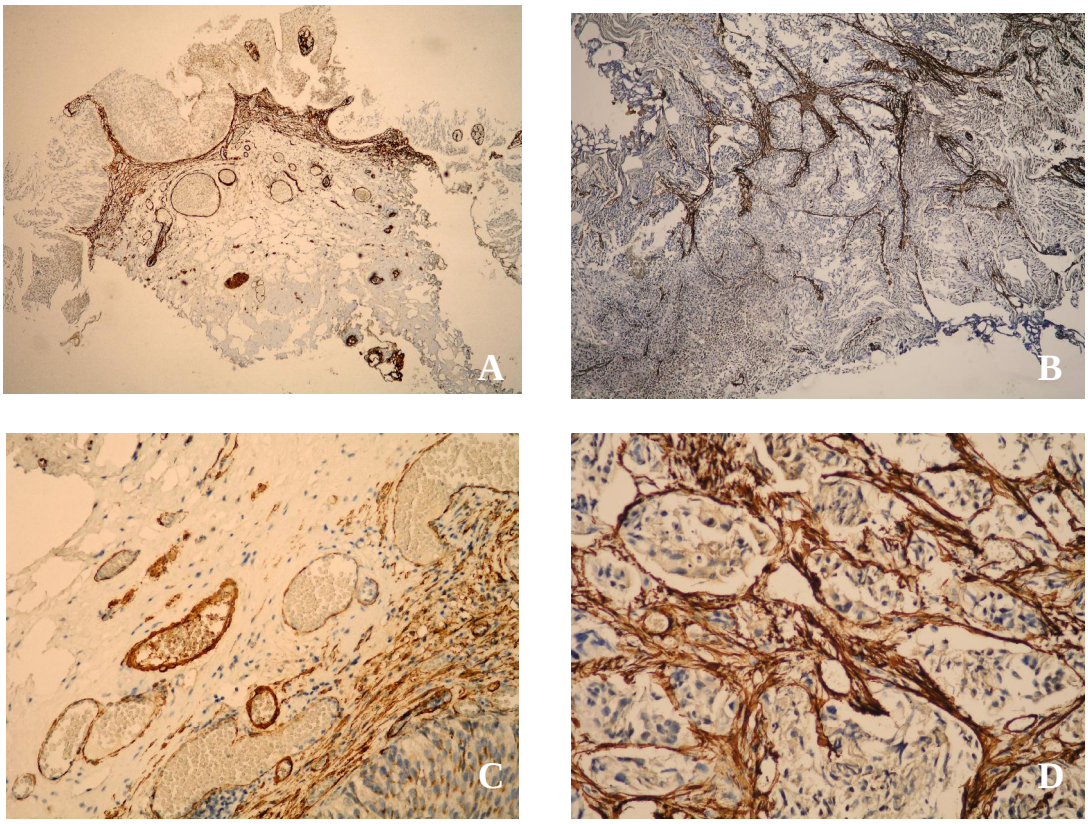
Retikularnu raspodjelu odlikuje prisutnost pojedinačnih imunohistokemijski pozitivnih stanica u pravilnim paralelnim redovima u površinskom dijelu lamine proprije te oko velikih krvnih žila u dubljem sloju lamine proprije.

U fascikularnom obliku raspodjele miofibroblasti se organiziraju u deblje snopove (fascikule), gube paralelan raspored i rasprostiru se diljem lamine proprije, kako u površnom, tako i u dubljem sloju.

Tablica 5. Raspodjela vimentin pozitivnih i SMA pozitivnih stanica unutar lamine proprije

	Vimentin		SMA		Ukupno
	R	F	R	F	
Invazivni	10 (20%)	40 (80%)	10 (20%)	40 (80%)	50
Neinvazivni	39 (78%)	11 (22%)	41 (82%)	9 (18%)	50

R = retikularan, F = fascikularan



Slika 3. Raspodjela SMA-pozitivnih stanica unutar lamine proprije neinvazivnog (A,C) i invazivnog karcinoma (B,D). U neinvazivnom karcinomu raspored miofibroblasta je retikularan – koncentrirani su suburotelno i raspoređeni u tankim paralelnim redovima. U invazivnom karcinomu raspored miofibroblasta je fascikularan – raspoređeni su u deblje snopove i gube paralelan raspored (mikroslike A i B snimljene su pod vidnim povećanjem 40X, a C i D pod vidnim povećanjem 400X).

Rezultati izraženosti opće upalne reakcije u invazivnom i neinvazivnom karcinomu prikazani su u tablici 6 i na slikama 4A i B.

Tablica 6. Intenzitet upalne reakcije u invazivnom i neinvazivnom karcinomu

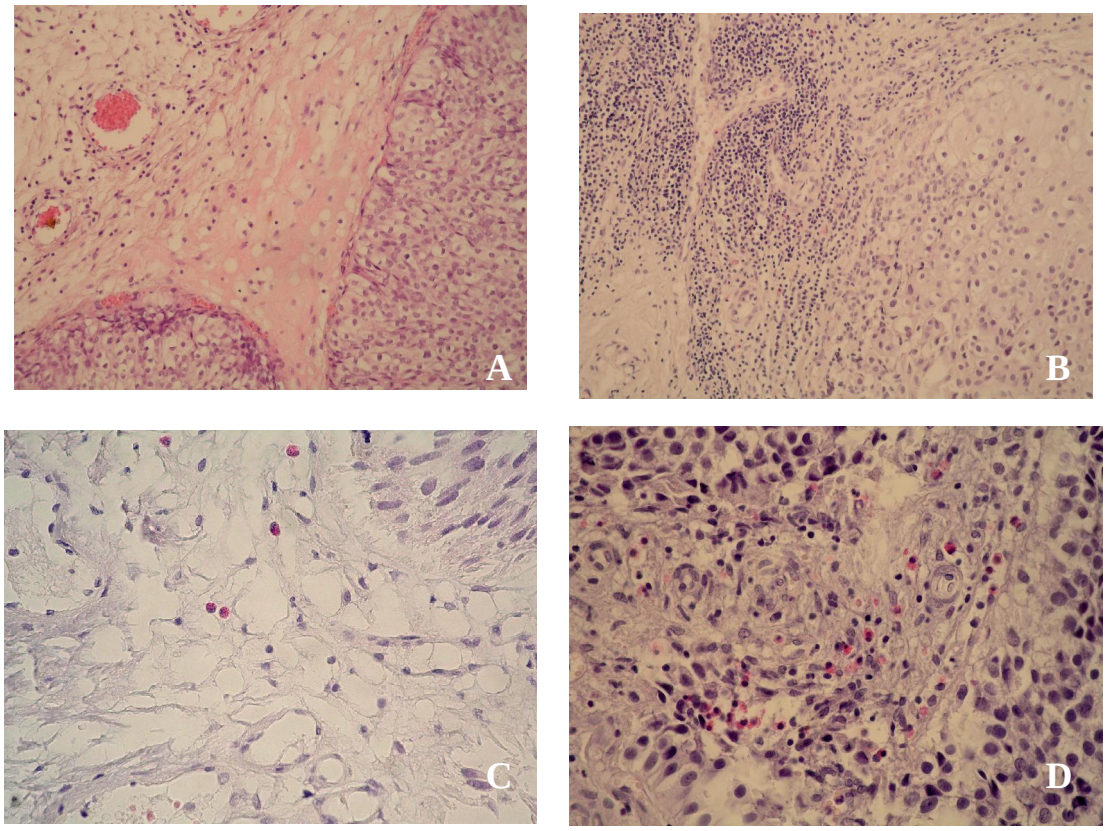
	Invazivni	Neinvazivni
0	0 (0%)	4 (8%)
1	21 (42%)	28 (56%)
2	21 (42%)	15 (30%)
3	8 (16%)	3 (6%)
Ukupno	50 (100%)	50 (100%)

0 – nema upalne reakcije

1 - slabo izražena upalna reakcija

2 - umjereno izražena upalna reakcija

3 - jako izražena upalna reakcija



Slika 4. Općenita upalna reakcija (A,B) i infiltracija eozinofila (C,D). Lamina proprija neinvazivnog karcinoma manje je infiltrirana upalnim stanicama (A) i eozinofilima (C) u odnosu na invazivni karcinom (B,D) (mikroslike A i B snimljene su pod vidnim povećanjem 200X, a C i D pod vidnim povećanjem 400X).

Rezultati analize broja eozinofila u jednom i deset vidnih polja pod velikim povećanjem (400X) prikazani su u tablici 7, a osjetljivost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrijednost za dijagnozu invaziju u tablici 8.

Tablica 7. Vrijednosti broja eozinofila u jednom vidnom polju pod velikim povećanjem (400X) - E_{max} i u deset vidnih polja pod velikim povećanjem – E_{uk}

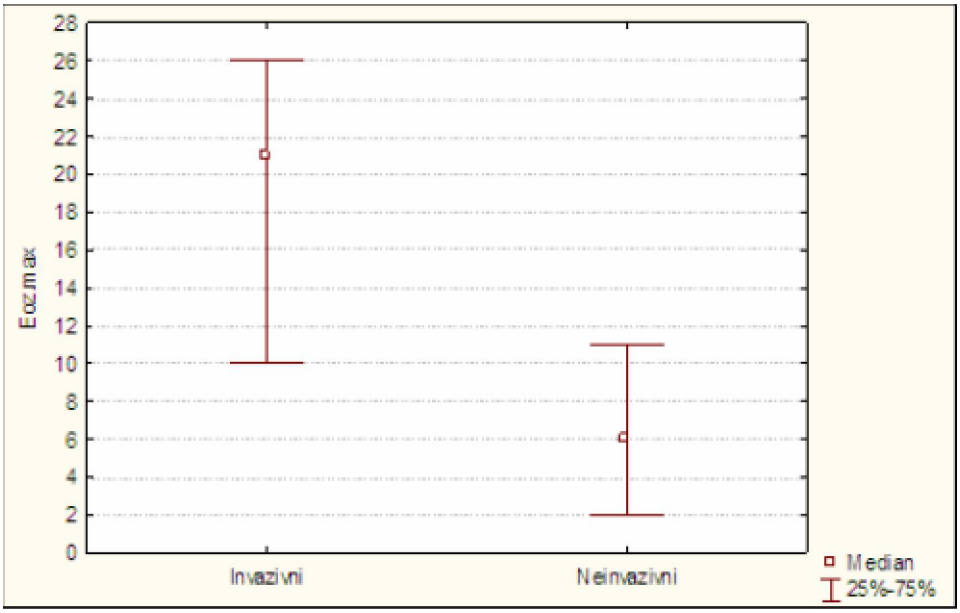
	Skupina	Broj	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum
E_{max}	Invazivni	50	19.9	13.1	0	47
	Neinvazivni	50	7.5	6.7	0	35
E_{uk}	Invazivni	50	74.5	65.4	0	321
	Neinvazivni	50	22.1	20.9	0	98

Tablica 8. Osjetljivost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrijednost broja stromalnih eozinofila u dijagnozi invazije u laminu propriju

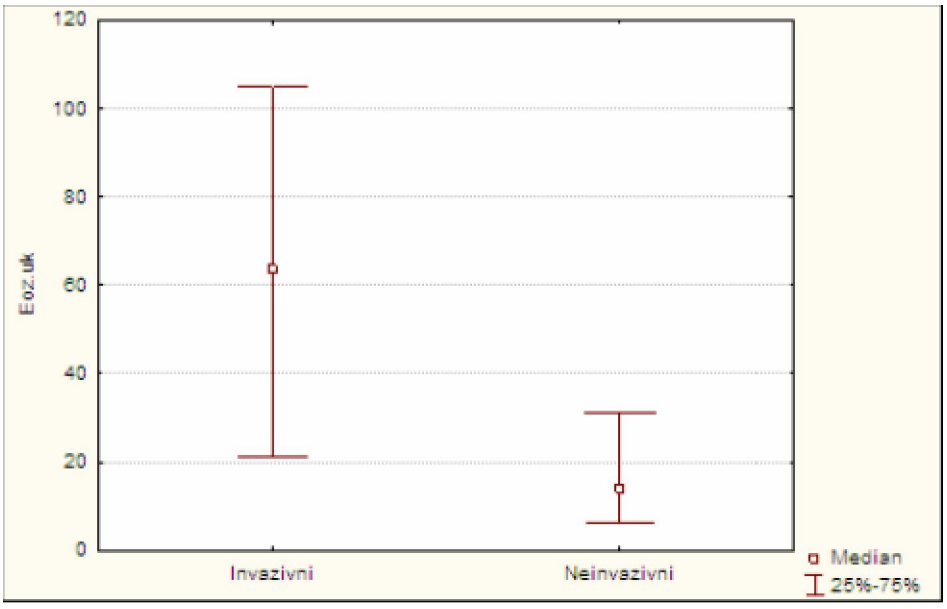
	Osjetljivost	Specifičnost	PPV	NPV
E_{max}*	54%	96%	93%	68%
E_{uk}**	52%	94%	90%	66%

* ≥20 eozinofila/VVP, ** ≥60 eozinofila/10VVP

Rezultati raspona 25.-75. percentile vrijednosti E_{max} i E_{uk} prikazani su na slikama 5 i 6.



Slika 5. Raspon 25-75. percentile vrijednosti E_{max} u invazivnom i neinvazivnom karcinomu



Slika 6. Raspon 25-75. percentile vrijednosti E_{uk} u invazivnom i neinvazivnom karcinomu

Rezultati Spearmanovog koeficijenta korelacije za odabrane parametre u invazivnom (pT1) karcinomu prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Prikaz Spearmanovog koeficijenta korelacije za odabrane parametre u invazivnom (pT1) karcinomu

	Vimentin	SMA	Dezmin	Upala	Eozinofili max	Eozinofili ukupno
Mallory	-0,062	0,124	-0,074	-0,006	-0,058	0,035
Vimentin		0,108	-0,233	0,171	-0,002	0,096
SMA			0,145	-0,071	0,117	0,073
Dezmin				-0,210	-0,196	-0,225
Upala					0,134	0,177
Eozinofili max						0,916*

*p<0.001

Rezultati Spearmanovog koeficijenta korelacije za odabrane parametre u neinvazivnom (pTa) karcinomu prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Prikaz Spearmanovog koeficijenta korelacije u neinvazivnom (pTa) karcinomu

	Vimentin	SMA	Dezmin	Upala	Eozinofili max	Eozinofili ukupno
Mallory	0,177	-0,002	0,294**	0,065	0,242	0,100
Vimentin		0,437*	0,203	0,069	0,037	-0,018
SMA			0,241	-0,026	-0,005	-0,042
Dezmin				-0,142	0,147	0,079
Upala					0,306**	0,356**
Eozinofili max						0,914*

*p<0.001, **p<0.05

4.1. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

Statističkom obradom podataka bolesnici s invazivnim (pT1) karcinomom nisu se značajno razlikovali po dobi (Mann-Whitney U test, $p>0.05$) ni po spolu od bolesnika s neinvazivnim (pTa) karcinomom, kao ni po prisutnosti muskularis mukoze i muskularis proprije u primljenim uzorcima (χ^2-test, $p>0.05$). U skupini bolesnika s invazivnim karcinomom broj karcinoma visokog gradusa bio je značajno viši nego u bolesnika s neinvazivnim karcinomom (χ^2-test, $p<0.001$).

Intenzitet zelenog obojenja strome Mallory trikrom metodom u invazivnom i neinvazivnom karcinomu prikazana je u tablici 3.

Analizom dobivenih rezultata utvrđena je statistički značajna razlika u intenzitetu zelenog obojenja lamine proprije između invazivnog i neinvazivnog karcinoma (χ^2-test, $p<0.001$). Lamina proprija invazivnih karcinoma Mallory trikrom metodom pokazala je znatno manji intenzitet zelenog obojenja u usporedbi s laminom proprijom neinvazivnog karcinoma. U velikom broju invazivnih karcinoma (35 uzoraka, 70%) zeleno obojenje Mallory trikrom metodom nije bilo prisutno.

Imunohistokemijska izraženost stromalnih biljega u invazivnom i neinvazivnom karcinomu prikazana je u tablici 4.

Izraženost vimentina i glatkomišićnog aktina bila je statistički značajno različita u invazivnom karcinomu u usporedbi s neinvazivnim (χ^2-test, $p<0.001$), dok značajne razlike u izraženosti dezmina između dviju ispitanih skupina nije bilo (χ^2-test, $p=0.378$).

U lamini propriji invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura bio je statistički značajno veći postotak vimentin pozitivnih stanica u usporedbi s neinvazivnim karcinomom. Slično, u lamini propriji invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura bio je statistički značajno veći postotak SMA pozitivnih stanica u usporedbi s neinvazivnim karcinomom.

Lamina proprija invazivnih i neinvazivnih karcinoma nije se razlikovala samo po postotku stanica pozitivnih na spomenute biljege, već i po načinu

distribucije vimentin pozitivnih stanica i stanica pozitivnih na SMA unutar lamine proprije. Raspored vimentin pozitivnih i SMA pozitivnih stanica unutar lamine proprije prikazan je u tablici 5.

Fascikularan/neorganiziran raspored vimentin pozitivnih stanica unutar lamine proprije nađen je u statistički značajno većem broju invazivnih karcinoma (χ^2-test, $p<0.001$), dok je u neinvazivnom karcinomu bio značajno veći broj uzoraka s retikularnim/organiziranim rasporedom. Raspored SMA pozitivnih stanica bio je također statistički značajno češće fascikularan u invazivnom karcinomu za razliku od neinvazivnog karcinoma, u kojem je pretežno bio retikularan (χ^2-test, $p<0.001$).

Opća izraženost upalne reakcije u invazivnom i neinvazivnom karcinomu prikazana je u tablici 6.

U invazivnom karcinomu upalna reakcija u lamini propriji bila je izraženija nego u neinvazivnom karcinomu.

Utvrđena je statistički značajna razlika u općoj izraženosti upalne reakcije u invazivnom i neinvazivnom karcinomu (χ^2-test, $p<0.05$).

Distribucija vrijednosti E_{max} i E_{uk} (tablice 7 i 8) odredjena je Smirnov-Kolmogorovljevim testom.

Medijan vrijednosti (s interkvartilnim rasponom) E_{max} bio je 21 (10-26.5) eozinofil po vidnom polju s velikim povećanjem (VVP) u skupini invazivnih karcinoma, za razliku od 6 (2-11) eozinofila/VVP u skupini neinvazivnih karcinoma, što predstavlja statistički značajnu razliku (Mann-Whitney U test, $p<0.001$).

Medijan vrijednosti (s interkvartilnim rasponom) E_{uk} bio je 63.5 (21-106.75) eozinofila/10VVP u skupini invazivnih karcinoma, što je statistički bilo znatno više od 14 (6-31.75) eozinofila/10VVP u skupini neinvazivnih karcinoma (Mann-Whitney U test, $p<0.001$).

Ujedno su izračunate osjetljivost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrijednost i negativna prediktivna vrijednost brojanja eozinofila u lamini propriji u razlikovanju invazivnih od neinvazivnih karcinoma. Granične vrijednosti odabrane su obzirom na medijane vrijednosti E_{max} i E_{uk}, a iznose 20 eozinofila/VVP i 60 eozinofila/10VVP.

Spearmanov test korelacije za odabrane parametre u skupini invazivnih karcinoma prikazan je u tablici 9.

Spearmanovim testom korelacije u skupini invazivnih karcinoma utvrđena je statistički značajna negativna korelacija fascikularnog rasporeda SMA pozitivnih stanica i intenziteta zelenog obojanja lamine proprije Mallory trikrom metodom ($p<0.05$). Stupanj izraženosti dezmina pozitivno je korelirao s prisutnošću muskularis mukoze ($p<0.001$).

U istoj skupini utvrđena je pozitivna međusobna korelacija E_{max} i E_{uk} ($p<0.001$), kao i negativna korelacija dobi s E_{max} i E_{uk} ($p<0.05$). Nije bilo korelacije upale s E_{max} i E_{uk}.

Spearmanov test korelacije za odabrane parametre u skupini neinvazivnih karcinoma prikazan je u tablici 10.

Spearmanovim testom korelacije u skupini neinvazivnih karcinoma intenzitet zelenog obojanja lamine proprije Mallory trikrom metodom pokazao je pozitivnu korelaciju s izraženosti dezmina ($p<0.05$). Prisutnost muskularis mukoze pozitivno je korelirala sa stupnjem izraženosti dezmina ($p<0.001$).

Vrijednosti E_{max} i E_{uk} pozitivno su korelirale međusobno ($p<0.001$). Za razliku od skupine invazivnih karcinoma, u skupini neinvazivnih karcinoma vrijednosti E_{max} i E_{uk} pokazale su pozitivnu korelaciju sa stupnjem izraženosti upalne reakcije, a nije bilo statistički značajne korelacije s dobi.

5. RASPRAVA

Iako je karcinom mokraćnog mjehura po incidenciji deveti najčešći maligni tumor u oba spola te sedmi najčešći u muškaraca (53), na njegovo liječenje se od dijagnoze do smrti potroši više novčanih sredstava po bolesniku nego u bilo koje druge maligne bolesti (57).

U posljednjih 50-tak godina uvelike su rasvijetljeni rizični faktori za nastanak karcinoma mokraćnog mjehura, pa čak i mehanizam samog nastanka (55, 58-61, 63-65, 71-72, 93). Međutim, mehanizam razvoja i širenja bolesti nije u potpunosti razjašnjen. Novije spoznaje iz istraživanja provedenih na različitim vrstama karcinoma govore u prilog teze da je osim epitelnog i stromalni dio tumora jednako važan u rastu, razvoju i širenju tumora (148-152, 160). Slični zaključci dobiveni su i iz istraživanja provedenih na karcinomu mokraćnog mjehura (156-157, 173).

Stroma tumora (od grč. στρ μα = krevet) je vezivno tkivo koje u obliku mreže okružuje tumorske stanice i pruža im funkcionalnu potporu. Građena je od fibroblasta, miofibroblasta, endotelnih i upalnih stanica koje luče humoralne čimbenike kao što su čimbenici rasta i enzimi koji razgrađuju izvanstanični matriks. Na taj način stromalne stanice mogu predstavljati bitne čimbenike u rastu i širenju tumora. Smatra se da miofibroblasti predstavljaju jednu od najvažnijih, ako ne i najvažniju vrstu stanica u tom procesu (161, 165, 167).

Po definiciji, miofibroblast je mezenhimalna stanica vretenasta oblika koja dijeli histološka, imunohistokemijska i ultrastrukturna obilježja glatkomišićne stanice i fibroblasta (2). Novija istraživanja ukazuju na komunikaciju miofibroblasta i tumorskih stanica i značaj mehanizama uspomoć kojih se ta komunikacija odvija. Čini se da istodobno lučenje faktora rasta i/ili citokina (poput transformirajućeg čimbenika rasta beta – TGFβ i čimbenika rasta hepatocita) i sinteza komponenata izvanstaničnog matriksa (poput tenascina) od strane stromalnih miofibroblasta stimulira invazivnost malignih epitelnih stanica. Spomenuta komunikacija slična je onoj koja se

odvija tijekom embriogeneze, u kojoj stromalne stanice imaju također presudnu ulogu za pravilan rast i razvoj tkiva (142, 162, 187).

Miofibroblasti su osobito brojni u stromi dezmoplastičnih primarnih invazivnih i metastatskih karcinoma. Također su opisani u blizini neinvazivnih neoplastičnih promjena poput skvamoznih intraepitelnih lezija vrata maternice (CIN I-III), gdje su smješteni pod bazalnom laminom, u većem broju i intenzivnije obojani u lezijama s višim gradusom displazije (153). Ipak, općenito gledano, miofibroblasti se znatno rjeđe nalaze u stromi koja okružuje neinvazivne karcinome, što upućuje da miofibroblastičnu stromalnu reakciju potiče disrupcija bazalne membrane i širenje karcinoma u podležeće vezivo (149-150, 157).

Miofibroblasti nisu jednoliko raspoređeni unutar strome dezmoplastičnih karcinoma. Prema istraživanju Schurcha i sur. (155) provedenom na invazivnom duktalnom karcinomu dojke, miofibroblasti su najbrojniji unutar mlade mezenhimalne strome, zatim unutar područja koja odgovaraju ranoj stromalnoj invaziji i unutar periferne invazivne fronte tumorskih stanica. U centralnim sklerotičnim područjima tih karcinoma broj miofibroblasta je značajno smanjen, što je vjerojatno posljedica apoptoze (155).

Prema istom istraživanju, u invazivnom duktalnom karcinomu dojke postoje tri tipa miofibroblastične stromalne reakcije: (a) preuranjena, u kojoj miofibroblasti ulaze u okolno tkivo dublje nego karcinomske stanice; (b) istovremena, u kojoj su miofibroblasti raspoređeni između karcinomskih stanica; i (c) kasna, u kojoj se miofibroblasti nalaze centralno od od invazivne fronte karcinomskih stanica. Istovremena reakcija obično je najizraženija. Analizom kolagenog matriksa, nađena je povećana količina kolagena tipa III unutar mlade mezenhimalne strome koja sadrži najviše miofibroblasta. S druge strane, kolagen tipa I je najistaknutiji unutar središnje sklerotične zone karcinoma dojke, u kojoj su miofibroblasti zamijenjeni fibroblastima (155).

Prisutnost miofibroblasta dokazana je i u stromi karcinoma mokraćnog mjehura (11, 156-157, 188). U ovom istraživanju, miofibroblastična reakcija strome procjenjivana je uspomoć izraženosti imunohistokemijske reakcija

stanica lamine proprije na vimentin i glatkomišićni aktin (SMA), a ujedno je učinjeno imunohistokemijsko bojanje dezminom kako bi se razlikovali miofibroblasti od glatkomišićnih stanica muskularis mukoze. Izraženost spomenutih biljega analizirana je u prethodno označenim područjima na preparatima bojenim Mallory trikrom metodom. Miofibroblasti pokazuju pozitivnu reakciju na vimentin i SMA dok je reakcija na dezmin negativna. Fibroblasti su pozitivni na vimentin, a negativni na SMA i dezmin. Glatki mišići su pozitivni su na SMA i dezmin, a reakcija na vimentin je negativna.

U 48 (96%) uzoraka invazivnih (pT1) karcinoma izraženost vimentina bila je umjerena ili jaka, dok je u neinvazivnih (pTa) karcinoma umjerena ili jaka reakcija zabilježena u 24 (48%) uzorka. Izraženost SMA bila je umjerena ili jaka u 42 (94%) uzorka invazivnih karcinoma, dok je u neinvazivnih (pTa) karcinoma umjerena ili jaka reakcija zabilježena tek u 15 (30%) uzoraka. Izraženost dezmina nije pokazivala znatnije razlike između ispitivanih skupina – umjerena reaktivnost zabilježena je u 8 (16%) invazivnih i 5 (10%) neinvazivnih karcinoma, dok jaka reaktivnost nije zabilježena.

Statističkom obradom podataka u ovom je istraživanju po prvi put potvrđena značajno izraženija reakcija na vimentin i SMA u lamini propriji invazivnih (pT1) karcinoma u odnosu na neinvazivne (pTa) karcinome, što ukazuje da se pri invaziji urotelnog papilarnog karcinoma u lamini propriji povećava broj miofibroblasta.

Prvi opis miofibroblasta u lamini propriji invazivnih karcinoma dali su 2006. Shimasaki i sur. (157), čije je istraživanje provedeno s nešto drugačijim imunohistokemijskim biljezima i na znatno manjem broju uzoraka. Njihovo istraživanje provedeno je na 6 uzoraka invazivnog i 19 neinvazivnog karcinoma pri čemu tumori nisu subklasificirani obzirom na papilarni i ravan način rasta, a u skupinu invazivnih tumora uključen je i manji broj karcinoma koji nisu bili urotelne diferencijacije. U njihovom istraživanju elektronskom i imunoelektronskom mikroskopijom potvrđeno je da SMA pozitivne i h-kaldezmon negativne stanice u lamini propriji imaju ultrastrukturna obilježja miofibroblasta, no nije kvantificirana izraženost miofibroblastičnih biljega u lamini propriji (157).

U istraživanju provedenom 2007., Nimphius i sur. (156) utvrdili su razlike u zastupljenosti CD34-pozitivnih fibrocita i SMA-pozitivnih miofibroblasta u lamini propriji uzoraka mokraćnog mjehura sa i bez tumora. Prema njima, u mokraćnom mjehuru bez tumora postoji populacija CD34-pozitivnih i SMA-negativnih fibrocita smještenih u dubljem dijelu lamine proprije. Stanice sa spomenutim fenotipom zadužene su za sintezu izvanstaničnog matriksa. Tijekom nastanka tumora, ova populacija stanica mijenja fenotip i prelazi u CD34-negativne, SMA-pozitivne miofibroblaste. Iako je u njihovom istraživanju pokazana statistički značajna razlika u izraženosti SMA u uzorcima bez tumora i sa tumorom, nije bilo značajne razlike u pTa i pT1 karcinomima, što može biti rezultat nešto manjeg broja uzoraka (11 pTa uzoraka, 17 pT1 uzoraka) (156).

Izraženost dezmina u stromi papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura s invazijom nije se razlikovala od izraženosti u stromi karcinoma bez invazije. Imunoreaktivnost na dezmin bila je prisutna u području koje je odgovaralo glatkim mišićnim stanicama muskularis mukoze Prema Council i sur. (188), miofibroblasti u mokraćnom mjehuru ne izražavaju dezmin. Pošto se u ovom istraživanju prisutnost muskularis mukoze nije statistički značajno razlikovala unutar ispitivanih skupina, očekivano je da se ni izraženost dezmina ne razlikuje.

U ovom istraživanju, distribucija vimentin pozitivnih stanica unutar lamine proprije bila je organizirana/retikularna u svega 10 (20%) uzoraka invazivnog karcinoma i 39 (78%) uzoraka neinvazivnog karcinoma, dok je bila neorganizirana/fascikularna u preostalom broju slučajeva. Distribucija SMA-pozitivnih stanica bila je slična: retikularna u 10 (20%) invazivnih i 41 (82%) neinvazivnom karcinomu.

Budući da se radi o statističkoj značajnosti visoke razine ($p<0.001$), zaključak ovog istraživanja u skladu je sa zaključkom Shimasakija i sur. (157) da je raspodjela miofibroblasta fascikularna u invazivnom, a retikularna u neinvazivnom karcinomu mokraćnog mjehura. Na osnovi dobivenih rezultata možemo zaključiti da procjena raspodjele miofibroblasta može pomoći u dijagnozi invazije u laminu propriju.

U ovom istraživanju rezultati histokemijskog bojenja strome Mallory trikrom metodom u skupini invazivnih karcinoma i skupini neinvazivnih, koja je služila kao kontrolna skupina, pokazali su da se stroma invazivnih karcinoma statistički značajno slabije boji zeleno u usporedbi sa laminom proprijom mokraćnog mjehura bez invazije.

U velikom broju invazivnih karcinoma, čak 35 (70%) tumorskih uzoraka uopće nije bilo zelenog obojenja lamine proprije, dok nije bilo nijednog uzorka neinvazivnog karcinoma bez zelenog obojenja lamine proprije. Umjereno i izraženo obojenje bilo je prisutno u 34 (68%) neinvazivna uzorka, a u skupini invazivnih karcinoma tek u 2 (4%) uzorka.

Obzirom na statistički značajnu razliku u rezultatima histokemijskog bojenja strome dviju ispitivanih grupa, može se zaključiti da je u lamini propriji s invazivnim karcinomom došlo do promjena u odnosu na laminu propriju karcinoma bez invazije. Pošto se Mallory trikrom metodom kolagena vlakna boje zeleno, a mišićna vlakna crveno (186), odsutnost ili oskudnost zelenog obojenja ukazuje da u lamini propriji mokraćnog mjehura s invazivnim karcinomom dolazi do promjene u količini ili sastavu kolagena.

Koristeći korelaciju patohistološke slike i Raman spektroskopije, metode koja otkriva biokemijski sastav tkiva, de Jong i sur. (189) utvrdili su da je u biopsijama karcinoma mokraćnog mjehura smanjena količina kolagena u odnosu na biopsije mokraćnog mjehura bez tumora. Ovo istraživanje ne može u potpunosti pomoći u interpretaciji rezultata Mallory trikrom bojenja budući da autori nisu stratificirali skupinu karcinoma obzirom na invaziju, no ipak ukazuje da se u sklopu karcinogeneze u mokraćnom mjehuru smanjuje količina kolagena (189).

Istraživanja o promjenama kolagena u karcinomu mokraćnog mjehura koja koriste konvencionalnije patohistološke metode odnose se isključivo na kolagene tipa IV i VII koji su prisutni u bazalnoj membrani. Smatra se da imunohistokemijsko bojanje na spomenute tipove kolagena može pomoći u dijagnozi invazije karcinoma, no valja naglasiti da reakcija na spomenute tipove kolagena može biti odsutna u slučajevima s izraženom suburotelnom upalom, koja često prati karcinom *in situ* i papilarne tumore (190). Također,

takva istraživanja ne mogu pomoći u interpretaciji rezultata Mallory trikrom bojenja jer su kolagen IV i VII prisutni u bazalnoj membrani, a najzastupljeniji intersticijski kolageni stijenke mokraćnog mjehura su kolagen tipa I i III (191).

Iscrpnom pretragom literature nisu pronađena istraživanja o promjenama intersticijskih tipova kolagena u karcinomu mokraćnog mjehura te u sklopu ove disertacije nije moguće naći direktno objašnjenje rezultata Mallory trikrom bojenja. Ipak, poznato je da stanice urotelnog karcinoma u *in vitro* uvjetima imaju sposobnost razgradnje izvanstaničnog matriksa (192). Isto tako, detekcijom mRNA iz područja odabranog laserskom mikrodisekcijom utvrđeno je da za razliku od normalnog veziva, stroma urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura pokazuje visoku izraženost matriks metaloproteinaze 1 (MMP-1) koja je najznačajnija kolagenaza iz skupine MMP, i to osobito u tumora visokog gradusa (193). Moguće objašnjenje promjena uočenih bojanjem Mallory trikromnom metodom u invazivnom karcinomu je rezultat djelovanja MMP i razgradnje kolagena u invazivnom karcinomu.

U istraživanju stromalne reakcije na neoplaziju ponekad se koriste histokemijska trikrom bojenja. U istraživanju stromalne reakcije u karcinomu prostate iz 2004. godine Tomas i Krušlin (151) koristili su Mallory trikrom metodu. Oni su utvrdili da reaktivna stroma adenokarcinoma prostate pokazuje jače zeleno obojenje od strome benigne hiperplazije prostate i peritumorskog tkiva. Slične rezultate na nešto manjem broju uzoraka dobili su Tuxhorn i sur. (194) koristeći Massonovu trikrom metodu. Ti rezultati suprotni su od rezultata ovog istraživanja, no postoje značajne razlike u histološkom sastavu lamine proprije mokraćnog mjehura i prostatične strome koje bi mogle biti uzrokom spomenute razlike.

Rezultati Spearmanovog testa korelacije pokazuju da u skupini invazivnih karcinoma fascikularna/neorganizirana raspodjela miofibroblasta korelira sa slabijim obojenjem lamine proprije Mallory trikromnom metodom. To ukazuje da bi promjene kolagena u određenoj mjeri mogle biti povezane s miofibroblastičnom reakcijom strome. Odsutnost korelacije svih miofibroblastičnih biljega sa Mallory trikromnom metodom može biti odraz

činjenice da jedan dio enzima iz skupine MMP, osobito one odgovorne za razgradnju kolagena, proizvode same tumorske stanice (151, 193).

U skupini neinvazivnih karcinoma, intenzitet zelenog obojenja korelira s izraženošću dezmina, što ukazuje da se u odsutnosti invazije jače izražena kolagena vlakna nalaze u onim slučajevima u kojima postoji i jače izražen sloj muskularis mukoze.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s podacima iz literature o stromalnim promjenama u urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura (156-157, 190, 192-193), a stromalna reakcija na karcinom uključuje miofibroblaste u značajnoj mjeri, što je potvrđeno imunohistokemijom. Ujedno, promjene uočene Mallory trikrom metodom ukazuju na razliku u količini ili sastavu kolagena kod invazivnih karcinoma, što može biti rezultat djelovanja miofibroblasta ili samih tumorskih stanica.

Činjenica da se stroma invazivnog karcinoma može razlikovati histokemijski i imunohistokemijski od strome neinvazivnog karcinoma je značajna jer se može iskoristiti u dijagnostičke svrhe, posebice kada se radi o dvojbenim slučajevima odnosno tzv. „mikroinvazivnom karcinomu“.

Mallory trikrom metoda podjednako je uspješna, ako ne i uspješnija u otkrivanju strome invazivnog karcinoma kao i imunohistokemijske metode pa bi se zbog svoje jednostavnosti i niske cijene te kratkog vremena koje je potrebno za njeno provođenje mogla gotovo rutinski koristiti u dijagnozi invazije karcinoma mokraćnog mjehura.

Primarna uloga imunološkog sustava je razlikovanje normalnog vlastitog tkiva od promijenjenog, što predstavlja temeljnu obranu organizma od nastanka zloćudnih tumora. Smatra se da temelj razlikovanja tumora od vlastitog normalnog tkiva čine tumor specifični antigeni (TSA). Upalna reakcija na tumore uglavnom je stanična, a u puno manjoj mjeri humoralna. Na nesreću, uspjeh upalnih stanica u suzbijanju zloćudnih tumora znatno je izraženiji *in vitro* nego *in vivo* zbog nikad sasvim razjašnjenih čimbenika koji najvjerojatnije uključuju neku vrstu disfunkcije imunološkog sustava domaćina (136, 166-167).

U ovom istraživanju izraženost upalne reakcije bila je umjerena ili jaka u 29 (58%) uzoraka invazivnog pT1 karcinoma te u 18 (36%) uzoraka neinvazivnog karcinoma, što je predstavljalo statistički značajnu razliku (χ^2-test, $p<0.05$). Iako ta razlika ne predstavlja vrlo sigurno dijagnostičko oruđe, rezultat sugerira pomnije traženje invazije u području s izraženom upalnom reakcijom prilikom patohistološke analize.

Eozinofili su polimorfonuklearni leukociti čija je najznačajnija evolucijska uloga obrana od parazita, a imaju važnu ulogu i u patogenezi alergijskih bolesti. Oni često infiltriraju zloćudne tumore, osobito one epitelnog porijekla, a najizraženije nakupljanje eozinofila zabilježeno je u karcinomima velikih keratinizirajućih stanica poput pločastog karcinoma kože, usne šupljine, vanjskih genitalija i anusa (177).

Istraživanje Simsona i sur. iz 2007. (195) pokazalo je da eozinofili imaju bitnu ulogu u imunološkom nadzoru tumora. Oni su tretirali miševe metilkolantrenom pokušavajući izazvati fibrosarkom. Eksperiment je proveden s istim dozama karcinogena u skupini miševa divljeg tipa i nekoliko skupina transgeničnih miševa; IL-5 transgeničnih miševa koji imaju visoku razinu cirkulirajućih eozinofila, zatim u miševa s nokautiranim genom za kemotaktični protein eotaksin te u dva soja transgeničnih miševa koji uopće nemaju eozinofile. Najveća učestalost i najbrži rast tumora zabilježen je u sojevima bez eozinofila, malo manji u sojevima bez eotaksina, a znatno manji u miševa divljeg tipa i IL-5 transgeničnih miševa. Rezultati su također pokazali da su IL-5 transgenični miševi bili otporniji na nastanak tumora od miševa divljeg tipa, a u slučaju nastanka, tumori su bili znatno manji te infiltrirani znatno većim brojem eozinofila (195).

U istraživanju iz 2006., Cormier i sur. (178) pratili su nakupljanje eozinofila u tumoru nakon uštrcavanja melanomskih stanica u miševe. Nakupljanje eozinofila bilo je kontinuirano i izraženo u nekrotičnim područjima i u kapsuli tumora od samog početka pokusa, a degranulacija eozinofila bila je prisutna samo u područjima nekroze. Istraživanje kemotaksije eozinofila u *in vitro* uvjetima ukazalo je na prisutnost nepoznatog kemotaktičnog čimbenika prisutnog isključivo u lizatu nekrotičnog tumora, a

ne i u kulturi održanih tumorskih stanica. Ujedno je *in vivo* učinjena deplecija CD4+ T limfocita uspomoć protutijela koja nije utjecala na nakupljanje eozinofila. Stoga su autori zaključili da je nakupljanje eozinofila u zloćudnim tumorima proces koji je kontinuiran i uključen u rani imunološki odgovor te da nije ovisan o Th2 upalnom odgovoru (178).

Nekoliko novih istraživanja opisuje da određivanje broja eozinofila u stromi karcinoma može pomoći u dijagnozi invazije. Spiegel i sur. (179) usporedili su broj eozinofila koji okružuju intraepitelnu neoplaziju stidnice teškog stupnja i karcinom stidnice s invazijom te utvrdili da je broj eozinofila >20/VVP i 50/10 VVP ograničen na slučajeve vulvarnog karcinoma pločastih stanica s invazijom. U istraživanju cervikalne intraepitelne neoplazije i invazivnog karcinoma pločastih stanica vrata maternice dobiveni su slični rezultati, s nešto drugačijim vrijednostima eozinofila (180). Određivanje broja eozinofila može također biti korisno u procjeni invazije pločastog karcinoma u području glave i vrata kao dijagnostički kriterij vrlo visoke specifičnosti (100%) i nešto niže osjetljivosti (61%) (181).

U mokraćnom mjehuru su zamijećene promjene vezane uz infitraciju eozinofila u sklopu nastanka urotelnog karcinoma. Lose i sur. (183) mjerili su koncentraciju eozinofilnog kationskog proteina (ECP) u urinu 18 pacijenata s karcinomom i 18 kontrolnih ispitanika te ustvrdili da je razina ECP značajno viša u skupini bolesnika s karcinomom.

Jedino u literaturi dostupno istraživanje koje se odnosi na određivanje broja eozinofila u urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura je ono koje su učinili Lowe i sur. (177). Koristili su jednostavnu metodologiju, odredivši broj od 100 eozinofila/10VVP kao izrazito povišen i ustanovili da znatno veći postotak tumora s tim stupnjem eozinofilije pokazuje pločastu metaplaziju i tendenciju invazije u dublje slojeve, osobito mišićni sloj stijenke mokraćnog mjehura. Spomenuto istraživanje ne sadrži procjenu osjetljivosti ili specifičnosti određivanja broja eozinofila u dijagnozi invazije (177).

U vlastitom istraživanju (184) pokazali smo da brojanje eozinofila u lamini propriji može predstavljati dodatni dijagnostički kriterij u dijagnozi invazije papilarnog urotelnog karcinoma u laminu propriju mokraćnog

mjehura te izrazito visoku specifičnost i pozitivnu prediktivnu vrijednost opisane metode.

U ovom istraživanju, medijan vrijednosti E_{max} bio je 21 eozinofil po vidnom polju s velikim povećanjem (VVP) u skupini invazivnih karcinoma, za razliku od 6 eozinofila/VVP u skupini neinvazivnih karcinoma, što predstavlja statistički značajnu razliku (Mann-Whitney U test, $p<0.001$).

Medijan vrijednosti E_{uk} bio je 63.5 (21-106.75) eozinofila/10VVP u skupini invazivnih karcinoma, što je statistički bilo znatno više od 14 eozinofila/10VVP u skupini neinvazivnih karcinoma (Mann-Whitney U test, $p<0.001$).

Ujedno su izračunate osjetljivost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrijednost i negativna prediktivna vrijednost brojanja eozinofila u lamini propriji u razlikovanju invazivnih od neinvazivnih karcinoma. Granične vrijednosti odabrane su obzirom na medijane vrijednosti E_{max} i E_{uk}, a iznose 20 eozinofila/VVP i 60 eozinofila/10VVP.

Osjetljivost, specifičnost, negativna i pozitivna prediktivna vrijednost za E_{max} ≥20 eozinofila/VVP u dijagnozi invazije bile su 54%, 96%, 68% i 93%.

Osjetljivost, specifičnost, negativna i pozitivna prediktivna vrijednost za E_{uk} ≥60 eozinofila/VVP u dijagnozi invazije bile su 52%, 94%, 66% i 90%.

Ovakav profil dobivenih vrijednosti ukazuje da invazija u laminu karcinoma mokraćnog mjehura nije uvijek praćena infiltracijom eozinofila, no izražena infiltracija eozinofila gotovo uvijek ukazuje na invazivni karcinom u pozadini procesa te poziva na dodatne dijagnostičke napore u potvrđivanju iste.

Spearmanovim koeficijentom korelacije utvrđena je očekivana pozitivna korelacija E_{max} i E_{uk} u obje skupine. U skupini invazivnih karcinoma E_{max} i E_{uk} pokazali su negativnu korelaciju s dobi bolesnika, dok u kontrolnoj skupini takve korelacije nije bilo. U skupini neinvazivnih karcinoma pokazana je pozitivna korelacija izraženosti upale s E_{max} i E_{uk}, dok u invazivnim karcinomima ista nije utvrđena.

Rezultati korelacija ukazuju da u neinvazivnom karcinomu broj eozinofila ovisi o upali te se vjerojatno povećava ovisno o stanjima koja

potiču upalu u stijenci mokraćnog mjehura. U invazivnom karcinomu broj eozinofila nije ovisan o broju drugih upalnih stanica te vjerojatno predstavlja proces izazvan samim tumorom, što se uklapa u zaključke Cormier i sur. (178). Isto tako, čini se da se sposobnost takve tumor-specifične reakcije smanjuje s dobi bolesnika.

Stromalne promjene u papilarnom urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura koje je moguće histološki, histokemijski i imunohistokemijski dokazati mogle bi se iskoristiti i u dijagnostičke svrhe, posebice kada se radi o dvojbenim slučajevima odnosno tzv. „mikroinvazivnom karcinomu“. Mallory trikrom metoda je podjednako uspješna u otkrivanju reaktivne invazije karcinoma kao i imunohistokemijske metode, a puno je jednostavnija, brža i jeftinija te bi se mogla rutinski koristiti u dijagnozi invazije urotelnog karcinoma. Određivanje broja eozinofila još je jeftinija i brža, a specifična metoda koja može pomoći u dijagnozi invazije karcinoma u laminu propriju. Postupci opisani u ovoj disertaciji mogli bi se koristiti kao dodatne metode u dijagnozi invazije papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura u laminu propriju.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Intenzitet zelenog obojenja lamine proprije Mallory trikrom metodom u pT1 papilarnom urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura bio je statistički značajno slabiji u odnosu na laminu propriju pTa karcinoma (χ^2-test, $p<0.001$). Statističkom analizom histokemijskih i imunohistokemijskih rezultata potvrđena je negativna korelacija između intenziteta zelenog obojenja Mallory trikrom metodom i fascikularne distribucije SMA (Spearmanov test korelacije, $p<0.05$), dok takva povezanost nije nađena za ostale miofibroblastične biljege (Spearmanov test korelacije, $p>0.05$).

Razlika u intenzitetu obojenja upućuje na zaključak da u stromi invazivnog karcinoma dolazi do promjene u količini ili sastavu kolagena. Promjena intenziteta zelenog obojenja Mallory trikrom metodom u stromi invazivnog karcinoma vjerojatno je dijelom rezultat miofibroblastične reakcije.

2. Za točniju fenotipizaciju stanica u lamini propriji tumora upotrijebljeni su imunohistokemijski markeri vimentin, SMA i dezmin. Vimentin je bio statistički značajno više izražen u pT1 karcinomu u usporedbi s pTa karcinomom (χ^2-test, $p<0.001$). SMA je bio statistički značajno više izražen u pT1 karcinomu u usporedbi s pTa karcinomom (χ^2-test, $p<0.001$). Izraženost dezmina nije se statistički značajno razlikovala u istraživanim skupinama.

Kombinacija izraženosti vimentina i SMA karakteristična je za fenotip miofibroblasta pa pojačana izraženost u stromi invazivnog karcinoma upućuje na povećan broj miofibroblasta. Izraženost dezmina u lamini propriji mokraćnog mjehura nije pokazala razliku između ispitivanih skupina jer je karakteristična za sloj muskularis mukoze koji je bio prisutan u približno jednakom postotku invazivnih i neinvazivnih karcinoma.

3. Raspored vimentin pozitivnih stanica unutar lamine proprije pTa karcinoma bio je pretežno retikularan, odnosno organiziran u smislu da su spomenute stanice bile raspoređene pojedinačno i međusobno paralelno u površnom dijelu lamine proprije te oko velikih krvnih žila u dubljem sloju lamine proprije. Raspored SMA pozitivnih stanica u pTa karcinomu bio je također pretežno retikularan. U lamini propriji pT1 karcinoma raspored vimentin pozitivnih i SMA pozitivnih stanica bio je pretežno fascikularan, odnosno neorganiziran u smislu da su spomenute stanice bile raspoređene u deblje snopove (fascikule) te rasprostrte u svim smjerovima diljem lamine proprije, kako u površnom tako i u dubljem sloju. Statističkom analizom utvrdjena je značajna razlika u raspodjeli spomenutih stanica unutar lamine proprije pT1 i pTa karcinoma (χ^2-test, $p<0.001$).

Razlika u raspodjeli vimentin i SMA pozitivnih stanica upućuje da u stromi invazivnog karcinoma ne dolazi samo do povećanja broja miofibroblasta, već i do promjene u načinu njihovog rasporeda.

4. Upalna reakcija bila je statistički značajno izraženija u invazivnom karcinomu (χ^2-test, $p<0.05$).

Iako razlika u upalnoj reakciji ne predstavlja vrlo sigurno dijagnostičko oruđe, rezultat sugerira pomnije traženje invazije u području s izraženom upalnom reakcijom prilikom patohistološke analize.

5. Vrijednosti broja eozinofila u jednom VVP i 10 VVP s najvećim brojem eozinofila u lamini propriji bile su značajno više u invazivnom karcinomu. Medijan vrijednosti E_{max} bio je 21 eozinofil/VVP u skupini invazivnih karcinoma, a tek 6 eozinofila/VVP u skupini neinvazivnih karcinoma (Mann-Whitney U test, $p<0.001$). Medijan vrijednosti E_{uk} bio je 63.5 eozinofila/10VVP u skupini invazivnih karcinoma, a tek 14 eozinofila/10VVP u skupini neinvazivnih karcinoma (Mann-Whitney U test, $p<0.001$). Specifičnost i pozitivna prediktivna vrijednost za E_{max} ≥20 eozinofila/VVP u dijagnozi invazije iznose 96%, odnosno 93%. Specifičnost i pozitivna prediktivna vrijednost za E_{uk} ≥60 eozinofila/VVP u dijagnozi invazije

iznose 94%, odnosno 90%. Statističkom analizom utvrđena je pozitivna korelacija intenziteta upale i broja eozinofila u neinvazivnom karcinomu, dok ista nije bila prisutna u invazivnom karcinomu.

Određivanje broja eozinofila predstavlja dijagnostički kriterij vrlo visoke specifičnosti i pozitivne prediktivne vrijednosti za prisutnost invazije. Nakupljanje eozinofila u invazivnom karcinomu je tumor-specifično, a u neinvazivnom ovisi o intenzitetu upalne reakcije.

Dobiveni rezultati potvrđuju promjene u stromi papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura s invazijom u laminu propriju koje su dijelom posljedica miofibroblastične reakcije, a koje je moguće histokemijski i imunohistokemijski dokazati te promjene u upalnoj reakciji koje su vidljive histološki. Mogućnost korištenja spomenutih promjena je iskoristiva u dijagnozi invazije u laminu propriju, posebice kada se radi o dvojbenim slučajevima odnosno tzv. „mikroinvazivnom karcinomu“. Mallory trikrom metoda bi se mogla gotovo rutinski koristiti u dijagnozi invazije u laminu propriju jer je podjednako uspješna u otkrivanju reaktivne strome tumora kao i imunohistokemijske metode, a puno je jednostavnija, brža i jeftinija.

7. SAŽETAK

Rak mokraćnog mjehura predstavlja jednu od najčešćih malignih bolesti, osobito u muške populacije. Utjecaj rizičnih čimbenika na njegov nastanak dobrim je dijelom rasvijetljen, ali čimbenici koji utječu na brzinu napredovanja bolesti nisu sasvim razjašnjeni. Novije spoznaje govore u prilog teze da je osim epitelnog i stromalni dio tumora jednako važan u rastu, razvoju i širenju tumora.

Hipoteza ovog istraživanja je da u stromi invazivnog (pT1) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura postoji izraženija miofibroblastična i upalna reakcija u odnosu na laminu propriju neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura te da histološka razlika u intenzitetu miofibroblastične i upalne reakcije može pomoći u diferencijalnoj dijagnozi ta dva stadija karcinoma.

Ovim su istraživanjem analizirane promjene strome u 50 uzoraka invazivnog i 50 uzoraka neinvazivnog papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura te su postavljeni slijedeći ciljevi:

1. analizirati i usporediti intenzitet zelenog obojenja lamine proprije Malloryevom trikrom metodom u invazivnom (pT1) i neinvazivnom (pTa) papilarnom urotelnom karcinomu.
2. analizirati i usporediti izraženost vimentina, dezmina i SMA u lamini propriji invazivnog (pT1) i neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura.
3. analzirati raspodjelu miofibroblasta u u lamini propriji invazivnog (pT1) i neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura.
4. analizirati i usporediti izraženost upalne reakcije u lamini propriji invazivnog (pT1) i neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura.

5. analizirati i usporediti izraženost upalne reakcije te broj eozinofila u lamini propriji invazivnog (pT1) i neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura.

Zeleno obojenje Mallory trikrom metodom bilo je znatno slabije u invazivnom karcinomu (χ^2-test, $p<0.001$). Obojenje u skupini invazivnih karcinoma bilo je slabije zeleno u uzorcima s fascikularnim rasporedom SMA pozitivnih stanica (Spearmanov test korelacije, $p<0.05$). Imunohistokemijski biljezi miofibroblasta (vimentin i SMA) bili su značajno izraženiji u stromi invazivnog u usporedbi sa stromom neinvazivnog karcinoma (χ^2-test, $p<0.001$). Distribucija miofibroblasta bila je pretežno fascikularna u invazivnom, a pretežno retikularna u neinvazivnom karcinomu (χ^2-test, $p<0.001$). Upalna reakcija bila je izraženija u invazivnom karcinomu (χ^2-test, $p<0.05$), a medijani vrijednosti broja eozinofila u jednom velikom vidnom polju i deset velikih vidnih polja bili su značajno viši u skupini invazivnih karcinoma (Mann-Whitney U test, $p<0.001$). Broj eozinofila ≥20 eozinofila/VVP i ≥60 eozinofila/10VVP imaju specifičnost i pozitivnu prediktivnu vrijednost u dijagnozi invazije u laminu propriju 96% i 93%, odnosno 94% i 90%. Broj eozinofila korelirao je sa stupnjem upale u neinvazivnih (Spearmanov test korelacije, $p<0.05$), ali ne i u invazivnih karcinoma.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da u stromi invazivnog (pT1) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura postoji izraženija miofibroblastična i upalna reakcija u odnosu na laminu propriju neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokraćnog mjehura koja se može dokazati histološki, histokemijski i imunohistokemijski. Razlika u intenzitetu miofibroblastične i upalne reakcije može pomoći u dijagnozi invazije karcinoma u laminu propriju.

8. SUMMARY

MYOFIBROBLASTIC AND INFLAMMATORY STROMAL REACTION IN NON-INVASIVE (pTa) AND INVASIVE (pT1) PAPILLARY UROTHELIAL CARCINOMA OF THE URINARY BLADDER

The aims of this study were to analyze stromal changes in papillary urothelial carcinoma of the urinary bladder with lamina propria invasion.

For the assessment of myofibroblastic reaction, Mallory trichrome method and immunohistochemical analysis of vimentin, smooth muscle actin (SMA) and desmin were performed. For the assessment of inflammatory reaction, stromal inflammatory cells and eosinophils were counted.

Reactive stroma in invasive carcinoma showed a decreased intensity of green staining by Mallory trichrome method ($p>0.001$). It also showed increased vimentin and SMA expression ($p<0.001$). The distribution pattern of myofibroblasts was fascicular in invasive and reticular in noninvasive carcinoma ($p<0.001$). There was positive correlation between the absence of Mallory green staining and the fascicular pattern of SMA expression in invasive carcinoma ($p<0.05$). Inflammation was more pronounced in invasive carcinoma ($p<0.05$). The maximum number of eosinophils per one and ten high power fields was significantly higher in invasive carcinoma ($p<0.001$)

Our study indicates that a distinct pattern of myofibroblastic and inflammatory stromal reaction in invasive (pT1) papillary urothelial carcinoma of the urinary bladder can be demonstrated by histological, histochemical and immunohistochemical means. This may be used as a helpful additional diagnostic tool in cases suspicious of invasion.

Zlatko Marušić, Zagreb, 2010.

9. LITERATURA

1. Krmpotić-Nemanić J. Anatomija čovjeka. 3. izdanje. Zagreb: JUMENA, 1982.
2. Mills S. Histology for Pathologists. 2. izdanje. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
3. Rubin R, Strayer DS. Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. 5. izdanje. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
4. Wein JA. Campbell-Walsh Urology. 9. izdanje. Philadelphia: Saunders, 2007.
5. Gosling JA, Dixon JS, Lendon RG. The autonomic innervation of the human male and female bladder neck and proximal urethra. J Urol 1977;118:302-5.
6. Sobin LH, Wittekind C. UICC: TNM Classification of Malignant Tumors. 6. izdanje. New York: Wiley, 2002.
7. Rizk DE, Raaschou T, Mason N, Berg B. Evidence of progesterone receptors in the mucosa of the urinary bladder. Scand J Urol Nephrol 2001;35:305-9.
8. Mikuz G. Clinical Pathology of Urological Tumors. London: Informa Healthcare, 2007.
9. Alroy J, Gould VE. Epithelial-stromal interface in normal and neoplastic human bladder epithelium. Ultrastruct Pathol 1980;1:201-10.
10. Ro JY, Ayala AG, el-Naggar A. Muscularis mucosa of urinary bladder. Importance for staging and treatment. Am J Surg Pathol 1987;11:668-73.
11. Paner GP, Shen SS, Lapetino S, i sur. Diagnostic utility of antibody to smoothelin in the distinction of muscularis propria from muscularis mucosae of the urinary bladder: a potential ancillary tool in the

pathologic staging of invasive urothelial carcinoma. Am J Surg Pathol 2009;33:91-8.

12. Epstein JI. Pathologists and the judicial process: how to avoid it. Am J Surg Pathol 2001;25:527-37.
13. Jequier S, Rousseau O. Sonographic measurements of the normal bladder wall in children. AJR Am J Roentgenol 1987;149:563-6.
14. Krause WJ. Essentials of human histology. 2. izdanje. New York: Little, Brown and Company, 1996.
15. Philip AT, Amin MB, Tamboli P, Lee TJ, Hill CE, Ro JY. Intravesical adipose tissue: a quantitative study of its presence and location with implications for therapy and prognosis. Am J Surg Pathol 2000;24:1286-90.
16. Moore KL. The urogenital system in the developing human. Clinically oriented embryology. 3. izdanje. Philadelphia: WB Saunders, 1982.
17. Petersen RO, Sesterhenn I, Davis C. Urologic Pathology. 3. izdanje. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
18. Goldstein AM, Fauer RB, Chinn M, Kaempf MJ. New concepts on formation of Brunn's nests and cysts in urinary tract mucosa. Urology 1978;11:513-7.
19. Wiener DP, Koss LG, Sablay B, Freed SZ. The prevalence and significance of Brunn's nests, cystitis cystica and squamous metaplasia in normal bladders. J Urol 1979;122:317-21.
20. Smith AK, Hansel DE, Jones JS. Role of cystitis cystica et glandularis and intestinal metaplasia in development of bladder carcinoma. Urology 2008;71:915-8.
21. Tannenbaum M. Inflammatory proliferative lesion of urinary bladder: squamous metaplasia. Urology 1976;7:428-9.
22. Bell TE, Wendel RG. Cystitis glandularis: benign or malignant? J Urol 1968;100:462-5.
23. Corica FA, Husmann DA, Churchill BM, i sur. Intestinal metaplasia is not a strong risk factor for bladder cancer: study of 53 cases with long-term follow-up. Urology 1997;50:427-31.

24. Edwards PD, Hurm RA, Jaeschke WH. Conversion of cystitis glandularis to adenocarcinoma. J Urol 1972;108:568-70.
25. Oliva E, Young RH. Nephrogenic adenoma of the urinary tract: a review of the microscopic appearance of 80 cases with emphasis on unusual features. Mod Pathol 1995;8:722-30.
26. Young RH. Tumor-like lesions of the urinary bladder. Mod Pathol 2009;22 Suppl 2:S37-52.
27. 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;22:1435-48.
28. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I. WHO Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 6. izdanje. Lyon: IARC Press, 2004.
29. Obermann EC, Junker K, Stoehr R, i sur. Frequent genetic alterations in flat urothelial hyperplasias and concomitant papillary bladder cancer as detected by CGH, LOH, and FISH analyses. J Pathol 2003;199:50-7.
30. Baker PM, Young RH. Radiation-induced pseudocarcinomatous proliferations of the urinary bladder: a report of 4 cases. Hum Pathol 2000;31:678-83.
31. Chan TY, Epstein JI. Radiation or chemotherapy cystitis with "pseudocarcinomatous" features. Am J Surg Pathol 2004;28:909-13.
32. Lane Z, Epstein JI. Pseudocarcinomatous epithelial hyperplasia in the bladder unassociated with prior irradiation or chemotherapy. Am J Surg Pathol 2008;32:92-7.
33. Cina SJ, Lancaster-Weiss KJ, Lecksell K, Epstein JI. Correlation of Ki-67 and p53 with the new World Health Organization/International Society of Urological Pathology Classification System for Urothelial Neoplasia. Arch Pathol Lab Med 2001;125:646-51.

34. Harnden P, Mahmood N, Southgate J. Expression of cytokeratin 20 redefines urothelial papillomas of the bladder. Lancet 1999;353:974-7.
35. van Rhijn BW, Montironi R, Zwarthoff EC, Jobsis AC, van der Kwast TH. Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma. J Pathol 2002;198:245-51.
36. Oyasu R, Yang XJ, Yoshida O. Questions in Daily Urologic Practice. Updates for Urologists and Diagnostic Pathologists. Berlin: Springer, 2008.
37. Kimura G, Tsuboi N, Nakajima H, Yoshida K, Masugi Y, Akimoto M. Inverted papilloma of the ureter with malignant transformation: a case report and review of the literature. The importance of the recognition of the inverted papillary tumor of the ureter. Urol Int 1987;42:30-6.
38. Stower MJ, MacIver AG, Gingell JC, Clarke E. Inverted papilloma of the ureter with malignant change. Br J Urol 1990;65:13-6.
39. Uyama T, Moriwaki S. Inverted papilloma with malignant change of renal pelvis. Urology 1981;17:200-1.
40. Broussard JN, Tan PH, Epstein JI. Atypia in inverted urothelial papillomas: pathology and prognostic significance. Hum Pathol 2004;35:1499-504.
41. Lin O, Cardillo M, Dalbagni G, Linkov I, Hutchinson B, Reuter VE. Nested variant of urothelial carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 12 cases. Mod Pathol 2003;16:1289-98.
42. Amin MB, Gomez JA, Young RH. Urothelial transitional cell carcinoma with endophytic growth patterns: a discussion of patterns of invasion and problems associated with assessment of invasion in 18 cases. Am J Surg Pathol 1997;21:1057-68.
43. Eiber M, van Oers JM, Zwarthoff EC, i sur. Low frequency of molecular changes and tumor recurrence in inverted papillomas of the urinary tract. Am J Surg Pathol 2007;31:938-46.

44. Lopez-Beltran A, Cheng L. Stage pT1 bladder carcinoma: diagnostic criteria, pitfalls and prognostic significance. Pathology 2003;35:484-91.
45. Lopez-Beltran A, Cheng L, Andersson L, i sur. Preneoplastic non-papillary lesions and conditions of the urinary bladder: an update based on the Ancona International Consultation. Virchows Arch 2002;440:3-11.
46. Amin MB, McKenney JK. An approach to the diagnosis of flat intraepithelial lesions of the urinary bladder using the World Health Organization/ International Society of Urological Pathology consensus classification system. Adv Anat Pathol 2002;9:222-32.
47. Amin MB, Young RH. Intraepithelial lesions of the urinary bladder with a discussion of the histogenesis of urothelial neoplasia. Semin Diagn Pathol 1997;14:84-97.
48. Mallofre C, Castillo M, Morente V, Sole M. Immunohistochemical expression of CK20, p53, and Ki-67 as objective markers of urothelial dysplasia. Mod Pathol 2003;16:187-91.
49. Mostofi FK, Sesterhenn IA. Pathology of epithelial tumors & carcinoma in situ of bladder. Prog Clin Biol Res 1984;162A:55-74.
50. Cheng L, Cheville JC, Neumann RM, Bostwick DG. Natural history of urothelial dysplasia of the bladder. Am J Surg Pathol 1999;23:443-7.
51. Cheng L, Cheville JC, Neumann RM, Bostwick DG. Flat intraepithelial lesions of the urinary bladder. Cancer 2000;88:625-31.
52. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 2007;57:43-66.
53. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. Int J Cancer 2002;97:72-81.
54. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005;55:74-108.
55. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance,

Epidemiology, and End Results (SEER) Program. Oncologist 2007;12:20-37.

56. Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. Eur Urol 2004;46:170-6.
57. Riley GF, Potosky AL, Lubitz JD, Kessler LG. Medicare payments from diagnosis to death for elderly cancer patients by stage at diagnosis. Med Care 1995;33:828-41.
58. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. Nat Clin Pract Urol 2006;3:327-40.
59. Okada Y, Hanada M, Sugiura Y. Bladder Cancer and Smoking. Br Med J 1964;1:649-50.
60. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks in Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon: IARC Press, 2004.
61. Castelao JE, Yuan JM, Skipper PL, i sur. Gender- and smoking-related bladder cancer risk. J Natl Cancer Inst 2001;93:538-45.
62. Dietrich H, Dietrich B. Ludwig Rehn (1849-1930)--pioneering findings on the aetiology of bladder tumours. World J Urol 2001;19:151-3.
63. Mc DD, Lund RR. The role of the urine in vesical neoplasm. I. Experimental confirmation of the urogenous theory of pathogenesis. J Urol 1954;71:560-70.
64. Beland FA, Beranek DT, Dooley KL, Heflich RH, Kadlubar FF. Arylamine-DNA adducts in vitro and in vivo: their role in bacterial mutagenesis and urinary bladder carcinogenesis. Environ Health Perspect 1983;49:125-34.
65. Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF, Jr. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. Am J Epidemiol 1984;119:510-5.

66. Khafagy MM, el-Bolkainy MN, Mansour MA. Carcinoma of the bilharzial urinary bladder. A study of the associated mucosal lesions in 86 cases. Cancer 1972;30:150-9.
67. Chiou HY, Chiou ST, Hsu YH, i sur. Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8,102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan. Am J Epidemiol 2001;153:411-8.
68. Blohme I, Johansson S. Renal pelvic neoplasms and atypical urothelium in patients with end-stage analgesic nephropathy. Kidney Int 1981;20:671-5.
69. Volkmer BG, Seidl-Schlick EM, Bach D, Romics I, Kleinschmidt K. Cyclophosphamide is contraindicated in patients with a history of transitional cell carcinoma. Clin Rheumatol 2005;24:319-23.
70. Villanueva CM, Silverman DT, Murta-Nascimento C, i sur. Coffee consumption, genetic susceptibility and bladder cancer risk. Cancer Causes Control 2009;20:121-7.
71. Garland EM, Cohen SM. Saccharin-induced bladder cancer in rats. Prog Clin Biol Res 1995;391:237-43.
72. Negri E, La Vecchia C. Epidemiology and prevention of bladder cancer. Eur J Cancer Prev 2001;10:7-14.
73. Kiemeney LA, Moret NC, Witjes JA, Schoenberg MP, Tulinius H. Familial transitional cell carcinoma among the population of Iceland. J Urol 1997;157:1649-51.
74. Messing EM, Vaillancourt A. Hematuria screening for bladder cancer. J Occup Med 1990;32:838-45.
75. Messing EM, Young TB, Hunt VB, i sur. Hematuria home screening: repeat testing results. J Urol 1995;154:57-61.
76. Messing EM. Editorial comment. Urology 2000;56:791-2.
77. Khadra MH, Pickard RS, Charlton M, Powell PH, Neal DE. A prospective analysis of 1,930 patients with hematuria to evaluate current diagnostic practice. J Urol 2000;163:524-7.

78. Schwalb DM, Herr HW, Fair WR. The management of clinically unconfirmed positive urinary cytology. J Urol 1993;150:1751-6.
79. Koshikawa T, Leyh H, Schenck U. Difficulties in evaluating urinary specimens after local mitomycin therapy of bladder cancer. Diagn Cytopathol 1989;5:117-21.
80. Gamarra MC, Zein T. Cytologic spectrum of bladder cancer. Urology 1984;23:23-6.
81. Hijazi A, Devonec M, Bouvier R, Revillard JP. Flow cytometry study of cytokeratin 18 expression according to tumor grade and deoxyribonucleic acid content in human bladder tumors. J Urol 1989;141:522-6.
82. Badalament RA, Hermansen DK, Kimmel M, i sur. The sensitivity of bladder wash flow cytometry, bladder wash cytology, and voided cytology in the detection of bladder carcinoma. Cancer 1987;60:1423-7.
83. Parry WL, Hemstreet GP, 3rd. Cancer detection by quantitative fluorescence image analysis. J Urol 1988;139:270-4.
84. Kriegmair M, Stepp H, Steinbach P, i sur. Fluorescence cystoscopy following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid: a new procedure with high sensitivity for detection of hardly visible urothelial neoplasias. Urol Int 1995;55:190-6.
85. Koenig F, McGovern FJ, Larne R, Enquist H, Schomacker KT, Deutsch TF. Diagnosis of bladder carcinoma using protoporphyrin IX fluorescence induced by 5-aminolaevulinic acid. BJU Int 1999;83:129-35.
86. Denzinger S, Burger M, Walter B, i sur. Clinically relevant reduction in risk of recurrence of superficial bladder cancer using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis: 8-year results of prospective randomized study. Urology 2007;69:675-9.
87. Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, Donat R, Susani M, Marberger M. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy. J Urol 2004;171:135-8.

88. Jones TD, Cheng L. Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential: evolving terminology and concepts. J Urol 2006;175:1995-2003.
89. Holmang S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C, Johansson SL. Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. J Urol 2001;165:1124-8; discussion 1128-30.
90. Barbisan F, Santinelli A, Mazzucchelli R, i sur. 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;112:636-44.
91. Malmstrom PU, Busch C, Norlen BJ. Recurrence, progression and survival in bladder cancer. A retrospective analysis of 232 patients with greater than or equal to 5-year follow-up. Scand J Urol Nephrol 1987;21:185-95.
92. Holmang S, Johansson SL. Stage Ta-T1 bladder cancer: the relationship between findings at first followup cystoscopy and subsequent recurrence and progression. J Urol 2002;167:1634-7.
93. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, i sur. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. Urology 2005;66:4-34.
94. Lum BL, Torti FM. Therapeutic approaches including interferon to carcinoma in situ of the bladder. Cancer Treat Rev 1985;12 Suppl B:45-59.
95. Smith G, Elton RA, Beynon LL, Newsam JE, Chisholm GD, Hargreave TB. Prognostic significance of biopsy results of normal-looking mucosa in cases of superficial bladder cancer. Br J Urol 1983;55:665-9.
96. 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;25:356-62.

97. Rosin MP, Cairns P, Epstein JI, Schoenberg MP, Sidransky D. Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder. Cancer Res 1995;55:5213-6.

98. Murphy WM, Busch C, Algaba F. Intraepithelial lesions of urinary bladder: morphologic considerations. Scand J Urol Nephrol Suppl 2000;67-81.

99. Norming U, Tribukait B, Gustafson H, Nyman CR, Wang NN, Wijkstrom H. Deoxyribonucleic acid profile and tumor progression in primary carcinoma in situ of the bladder: a study of 63 patients with grade 3 lesions. J Urol 1992;147:11-5.

100. Desai S, Lim SD, Jimenez RE, i sur. Relationship of cytokeratin 20 and CD44 protein expression with WHO/ISUP grade in pTa and pT1 papillary urothelial neoplasia. Mod Pathol 2000;13:1315-23.

101. Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML, i sur. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. Am J Pathol 2002;161:1199-206.

102. Pich A, Chiusa L, Formiconi A, Galliano D, Bortolin P, Navone R. Biologic differences between noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and low-grade (grade 1) papillary carcinomas of the bladder. Am J Surg Pathol 2001;25:1528-33.

103. Richter J, Jiang F, Gorog JP, i sur. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. Cancer Res 1997;57:2860-4.

104. van Rhijn BW, Lurkin I, Radvanyi F, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. Cancer Res 2001;61:1265-8.

105. Alroy J, Pauli BU, Weinstein RS. Correlation between numbers of desmosomes and the aggressiveness of transitional cell carcinoma in human urinary bladder. Cancer 1981;47:104-12.
106. Marušić Z, Zhang D, Krušlin B. Bladder cancer therapy related histopathologic changes. Open Path J 2009;3:74-80.
107. Asamoto M, Fukushima S, Tatemoto Y, Yamada K, Fukui S, Mori M. Immunohistochemical expression of keratin proteins in urinary bladder carcinoma. Pathol Res Pract 1989;184:194-201.
108. Anderstrom C, Johansson S, Nilsson S. The significance of lamina propria invasion on the prognosis of patients with bladder tumors. J Urol 1980;124:23-6.
109. Domanowska E, Jozwicki W, Domaniewski J, i sur. Muscle-invasive urothelial cell carcinoma of the human bladder: multidirectional differentiation and ability to metastasize. Hum Pathol 2007;38:741-6.
110. Lopez-Beltran A, Martin J, Garcia J, Toro M. Squamous and glandular differentiation in urothelial bladder carcinomas. Histopathology, histochemistry and immunohistochemical expression of carcinoembryonic antigen. Histol Histopathol 1988;3:63-8.
111. Martin JE, Jenkins BJ, Zuk RJ, Blandy JP, Baithun SI. Clinical importance of squamous metaplasia in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. J Clin Pathol 1989;42:250-3.
112. Johansson SL, Borghede G, Holmang S. Micropapillary bladder carcinoma: a clinicopathological study of 20 cases. J Urol 1999;161:1798-802.
113. Radulovic P, Pavic I, Marusic Z, i sur. [Clinicopathological characteristics of micropapillary variant of urinary bladder carcinoma]. Lijec Vjesn 2008;130:1-3.
114. Amin MB, Ro JY, Lee KM, i sur. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary bladder. Am J Surg Pathol 1994;18:466-73.
115. Gronau S, Menz CK, Melzner I, Hautmann R, Moller P, Barth TF. Immunohistomorphologic and molecular cytogenetic analysis of a

carcinosarcoma of the urinary bladder. Virchows Arch 2002;440:436-40.

116. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. J Clin Oncol 2006;24:5552-64.
117. Spiess PE, Czerniak B. Dual-track pathway of bladder carcinogenesis: practical implications. Arch Pathol Lab Med 2006;130:844-52.
118. Yeager T, Stadler W, Belair C, Puthenveettil J, Olopade O, Reznikoff C. Increased p16 levels correlate with pRb alterations in human urothelial cells. Cancer Res 1995;55:493-7.
119. Balazs M, Carroll P, Kerschmann R, Sauter G, Waldman FM. Frequent homozygous deletion of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (MTS1, p16) in superficial bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. Genes Chromosomes Cancer 1997;19:84-9.
120. Grossman HB, Liebert M, Antelo M, i sur. p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. Clin Cancer Res 1998;4:829-34.
121. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, i sur. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. Cancer Res 1998;58:1090-4.
122. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, i sur. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. J Clin Oncol 1995;13:1384-90.
123. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, i sur. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. J Natl Cancer Inst 1993;85:53-9.
124. Lipponen PK. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. Int J Cancer 1993;53:365-70.
125. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, i sur. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. J Natl Cancer Inst 1992;84:1251-6.

126. Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, i sur. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. J Clin Oncol 2004;22:1007-13.
127. Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J, i sur. p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. J Clin Oncol 2004;22:1014-24.
128. Weidner N, Cote R, Suster S, Weiss LM. Modern Surgical Pathology. 2. izdanje. Philadelphia: Saunders, 2009.
129. Mitra AP, Almal AA, George B, i sur. The use of genetic programming in the analysis of quantitative gene expression profiles for identification of nodal status in bladder cancer. BMC Cancer 2006;6:159.
130. Cote RJ, Esrig D, Groshen S, Jones PA, Skinner DG. p53 and treatment of bladder cancer. Nature 1997;385:123-5.
131. Rodriguez-Alonso A, Pita-Fernandez S, Gonzalez-Carrero J, Nogueira-March JL. Multivariate analysis of survival, recurrence, progression and development of mestastasis in T1 and T2a transitional cell bladder carcinoma. Cancer 2002;94:1677-84.
132. Hasui Y, Osada Y, Kitada S, Nishi S. Significance of invasion to the muscularis mucosae on the progression of superficial bladder cancer. Urology 1994;43:782-6.
133. 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;66:543-8.
134. 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;86:1035-43.
135. Jimenez RE, Gheiler E, Oskanian P, i sur. Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progression-free survival. Am J Surg Pathol 2000;24:980-7.
136. Abel PD, Hall RR, Williams G. Should pT1 transitional cell cancers of the bladder still be classified as superficial? Br J Urol 1988;62:235-9.

137. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, i sur. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. J Clin Oncol 2001;19:666-75.
138. Pagano F, Bassi P, Galetti TP, i sur. Results of contemporary radical cystectomy for invasive bladder cancer: a clinicopathological study with an emphasis on the inadequacy of the tumor, nodes and metastases classification. J Urol 1991;145:45-50.
139. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. Experientia 1971;27:549-50.
140. Seemayer TA, Lagace R, Schurch W, Thelmo WL. The myofibroblast: biologic, pathologic, and theoretical considerations. Pathol Annu 1980;15:443-70.
141. Majno G. The story of the myofibroblasts. Am J Surg Pathol 1979;3:535-42.
142. Doljanski F. The sculpturing role of fibroblast-like cells in morphogenesis. Perspect Biol Med 2004;47:339-56.
143. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. Lab Invest 1990;63:21-9.
144. Rudolph R, McClure WJ, Woodward M. Contractile fibroblasts in chronic alcoholic cirrhosis. Gastroenterology 1979;76:704-9.
145. Madden JW. On "the contractile fibroblast". Plast Reconstr Surg 1973;52:291-2.
146. Gabbrielli S, Di Lollo S, Stanflin N, Romagnoli P. Myofibroblast and elastic and collagen fiber hyperplasia in the bronchial mucosa: a possible basis for the progressive irreversibility of airway obstruction in chronic asthma. Pathologica 1994;86:157-60.
147. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. WHO Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC Press, 2002.
148. Noel A, Foidart JM. The role of stroma in breast carcinoma growth in vivo. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1998;3:215-25.

149. Tremblay G. Stromal aspects of breast carcinoma. Exp Mol Pathol 1979;31:248-60.
150. Seemayer TA, Lagace R, Schurch W, Tremblay G. Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma: a possible host response to neoplasia. Am J Surg Pathol 1979;3:525-33.
151. Tomas D, Kruslin B. The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. Prostate 2004;61:324-31.
152. Tomas D, Ulamec M, Hudolin T, Bulimbasic S, Belicza M, Kruslin B. Myofibroblastic stromal reaction and expression of tenascin-C and laminin in prostate adenocarcinoma. Prostate Cancer Prostatic Dis 2006;9:414-9.
153. Cintorino M, Bellizzi de Marco E, Leoncini P, i sur. Expression of alpha-smooth-muscle actin in stromal cells of the uterine cervix during epithelial neoplastic changes. Int J Cancer 1991;47:843-6.
154. Martin M, Pujuguet P, Martin F. Role of stromal myofibroblasts infiltrating colon cancer in tumor invasion. Pathol Res Pract 1996;192:712-7.
155. Schurch W, Lagace R, Seemayer TA. Myofibroblastic stromal reaction in retracted scirrhous carcinoma of the breast. Surg Gynecol Obstet 1982;154:351-8.
156. Nimphius W, Moll R, Olbert P, Ramaswamy A, Barth PJ. CD34+ fibrocytes in chronic cystitis and noninvasive and invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. Virchows Arch 2007;450:179-85.
157. Shimasaki N, Kuroda N, Miyazaki E, i sur. The distribution pattern of myofibroblasts in the stroma of human bladder carcinoma depends on their invasiveness. Histol Histopathol 2006;21:349-53.
158. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3:349-63.
159. Ronnov-Jessen L, Petersen OW. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast

gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. Lab Invest 1993;68:696-707.

160. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. J Urol 2001;166:2472-83.
161. Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? Lung Cancer 2004;45 Suppl 2:S163-75.
162. De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, i sur. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. FASEB J 2004;18:1016-8.
163. Booth C, Harnden P, Selby PJ, Southgate J. Towards defining roles and relationships for tenascin-C and TGFbeta-1 in the normal and neoplastic urinary bladder. J Pathol 2002;198:359-68.
164. Ioachim E, Michael M, Stavropoulos NE, i sur. Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21(Waf1/Cip1) and p27(Kip1) in urothelial carcinoma: correlation with other cell-cycle-related proteins (Rb, p53, Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. Urol Int 2004;73:65-73.
165. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. J Pathol 2003;200:500-3.
166. Chandrasoma P, Taylor CR. Concise Pathology. 3. izdanje. Stamford: Appleton & Lange, 1998.
167. Majno G, Jorris I. Cells, Tissues and Disease: Principles of General Pathology. 2. izdanje. Oxford: Oxford University Press, 2004.
168. Zhang L, Khayat A, Cheng H, Graves DT. The pattern of monocyte recruitment in tumors is modulated by MCP-1 expression and influences the rate of tumor growth. Lab Invest 1997;76:579-90.
169. Russell SW, Gillespie GY, Pace JL. Evidence for mononuclear phagocytes in solid neoplasms and appraisal of their nonspecific cytotoxic capabilities. Contemp Top Immunobiol 1980;10:143-66.
170. Perussia B. Tumor infiltrating cells. Lab Invest 1992;67:155-7.

171. Finke J, Ferrone S, Frey A, Mufson A, Ochoa A. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. Immunol Today 1999;20:158-60.
172. Banner BF, Sonmez-Alpan E, Yousem SA. An immunophenotypic study of the inflammatory cell populations in colon adenomas and carcinomas. Mod Pathol 1993;6:295-301.
173. Samaratunga H, Fairweather P, Purdie D. Significance of stromal reaction patterns in invasive urothelial carcinoma. Am J Clin Pathol 2005;123:851-7.
174. An T, Sood U, Pietruk T, Cummings G, Hashimoto K, Crissman JD. In situ quantitation of inflammatory mononuclear cells in ductal infiltrating breast carcinoma. Relation to prognostic parameters. Am J Pathol 1987;128:52-60.
175. Cai T, Nesi G, Boddi V, Mazzoli S, Dal Canto M, Bartoletti R. Prognostic role of the tumor-associated tissue inflammatory reaction in transitional bladder cell carcinoma. Oncol Rep 2006;16:329-34.
176. Lowe D, Jorizzo J, Hutt MS. Tumour-associated eosinophilia: a review. J Clin Pathol 1981;34:1343-8.
177. Lowe D, Fletcher CD, Gower RL. Tumour-associated eosinophilia in the bladder. J Clin Pathol 1984;37:500-2.
178. Cormier SA, Taranova AG, Bedient C, i sur. Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. J Leukoc Biol 2006;79:1131-9.
179. Spiegel GW. Eosinophils as a marker for invasion in vulvar squamous neoplastic lesions. Int J Gynecol Pathol 2002;21:108-16.
180. Spiegel GW, Ashraf M, Brooks JJ. Eosinophils as a marker for invasion in cervical squamous neoplastic lesions. Int J Gynecol Pathol 2002;21:117-24.
181. Alrawi SJ, Tan D, Stoler DL, i sur. Tissue eosinophilic infiltration: a useful marker for assessing stromal invasion, survival and locoregional recurrence in head and neck squamous neoplasia. Cancer J 2005;11:217-25.

182. Tostes Oliveira D, Tjioe KC, Assao A, i sur. Tissue eosinophilia and its association with tumoral invasion of oral cancer. Int J Surg Pathol 2009;17:244-9.
183. Lose G, Frandsen B. Eosinophil cationic protein in urine in patients with urinary bladder tumors. Urol Res 1989;17:295-7.
184. Marusic Z, Cupic H, Kruslin B, Tomas D, Milosevic M, Mikuz G. Tumor-associated tissue eosinophilia and inflammation in pTa and pT1 papillary urothelial carcinoma of the bladder. Anal Quant Cytol Histol 2009;31:239-41.
185. Bostwick DG, Mikuz G. Urothelial papillary (exophytic) neoplasms. Virchows Arch 2002;441:109-16.
186. Wullf S. Guide to Special Stains. Carpinteria: Dako, 2004.
187. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, i sur. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell 2005;121:335-48.
188. Council L, Hameed O. Differential expression of immunohistochemical markers in bladder smooth muscle and myofibroblasts, and the potential utility of desmin, smoothelin, and vimentin in staging of bladder carcinoma. Mod Pathol 2009;22:639-50.
189. de Jong BW, Schut TC, Maquelin K, i sur. Discrimination between nontumor bladder tissue and tumor by Raman spectroscopy. Anal Chem 2006;78:7761-9.
190. Brunner A, Tzankov A. The role of structural extracellular matrix proteins in urothelial bladder cancer (review). Biomark Insights 2007;2:418-27.
191. Wilson CB, Leopard J, Cheresh DA, Nakamura RM. Extracellular matrix and integrin composition of the normal bladder wall. World J Urol 1996;14 Suppl 1:S30-7.
192. Pavelic K, Bulbul MA, Slocum HK, i sur. Growth of human urological tumors on extracellular matrix as a model for the in vitro cultivation of primary human tumor explants. Cancer Res 1986;46:3653-62.

193. Wallard MJ, Pennington CJ, Veerakumarasivam A, i sur. Comprehensive profiling and localisation of the matrix metalloproteinases in urothelial carcinoma. Br J Cancer 2006;94:569-77.
194. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. Clin Cancer Res 2002;8:2912-23.
195. Simson L, Ellyard JI, Dent LA, i sur. Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. J Immunol 2007;178:4222-9.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 25.07.1980. godine u Zagrebu. Osnovnu školu i klasičnu gimnaziju završio sam u Zagrebu, a na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao sam 2004. godine s prosječnom ocjenom 4.11.

U veljači 2007. godine dobio sam specijalizaciju iz patološke anatomije u Kliničkom zavodu za patologiju «Ljudevit Jurak» Kliničke bolnice «Sestre milosrdnice», Zagreb.

U ožujku 2006. godine upisao sam Znanstveni poslijediplomski studij u području biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji sam završio u rujnu 2009. godine s prosječnom ocjenom 4.92.

Od 2009. godine tajnik sam organizacijskog odbora «Ljudevit Jurak» International Symposium on Comparative Pathology. Član sam Europskog društva patologa (ESP).

Autor sam više članaka i kongresnih priopćenja koji su objavljeni ili prihvaćeni za objavljivanje u indeksiranim časopisima od kojih je osam u Current Contensu.

Oženjen sam i otac dvoje djece.