



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ - ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθ. ΜΕΛΕΚΟΣ Δ. ΜΙΧΑΗΛ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**“Μελέτη προγνωστικών και προβλεπτικών παραγόντων
καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Διερεύνηση των
συστημάτων ΝΕΡ/Νευροπεπτιδίων και Ουβικουιτίνης/
Πρωτεασώματος/ΝFκΒ”**

ΥΠΟ

**ΛΑΜΠΡΟΥ Π. ΜΗΤΡΑΚΑ, MD, MSc
ΟΥΡΟΛΟΓΟΥ, FEBU**

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του
διδακτορικού διπλώματος

**Λάρισα
2015**

© 2015 Λάμπρος Π. Μητράκας

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (N.5343/32 αρ.202 παρ.2).

Δεν επιτρέπεται η μερική ή ολική ανατύπωση ή χρησιμοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χωρίς την έγγραφη και ενυπόγραφη συγκατάθεση του συγγραφέα.

ΟΠΙΣΘΟΦΥΛΛΟ: The Hallmarks of cancer. Πηγή: Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4; 144(5): 646-674.

*Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής
(8^η / 17-07-2014 ΓΣΕΣ)*

1^{ος} Εξεταστής (Επιβλέπων): Δρ. Μελέκος Μιχαήλ

Καθ. Ουρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής: Δρ. Παπανδρέου Χρήστος

Καθ. Παθολογίας- Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής: Δρ. Κουκούλης Γεώργιος

Καθ. Παθ/κής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής: Δρ. Γκράβας Σταύρος

Αν. Καθ. Ουρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής: Δρ. Καρατζάς Αναστάσιος

Επ. Καθ. Ουρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής: Δρ. Ζάχου Καλλιόπη

Επ. Καθ. Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής: Δρ. Φουντάς Κωνσταντίνος

Αν. Καθ. Νευροχειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητές κ.κ Μελέκο Μιχαήλ, Παπανδρέου Χρήστο και Κουκούλη Γεώργιο, καθώς και τον πρώην Επ. Καθηγητή Ουρολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Μουτζούρη Γεώργιο για την εμπιστοσύνη και την έμπρακτη υποστήριξή τους.

Ευχαριστώ επίσης τον Αν. Καθηγητή Ουρολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γκράβα Σταύρο και τη συνάδελφό μου Επιμ. Α΄ Π.Γ.Ν.Λάρισας, Παθολογοανατόμο κ. Καρασαββίδου Φωτεινή για την άριστη συνεργασία.

Ευχαριστώ την οικογένειά μου και τη σύζυγό μου για την υπομονή και την αγάπη τους.

Λάμπρος Π. Μητράκας
Ουρολόγος, FEBU

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Ο Μητράκας Λάμπρος του Πέτρου γεννήθηκε στις 28/09/1978 στη Λάρισα. Το 1996 αποφοίτησε από το Λύκειο και πέτυχε την εισαγωγή του, ως υποτρόφου, στην Ιατρική Σχολή του Α.Π.Θ. Αποφοίτησε από την Ιατρική το 2002. Ακολούθως, ολοκλήρωσε την υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου (2003-2004) και την εκπαίδευσή του στην Ουρολογία (2004-2009). Είναι ειδικός Ουρολόγος από το 2010. Τον Ιούνιο του 2010 έλαβε τον τίτλο "Fellow of European Board of Urology" (FEBU), κατόπιν πανευρωπαϊκών εξετάσεων. Το 2011 έλαβε τον τίτλο Μεταπτυχιακών Σπουδών "Ευρωπαϊκές Πολιτικές Νεολαίας" από το Τμήμα Διεθνών και Ευρωπαϊκών Σπουδών του Πανεπιστημίου Μακεδονίας (Θεσσαλονίκη) και υπηρέτησε στον Ελληνικό Στρατό. Το 2012 έκανε μετεκπαίδευση στην Ενδοουρολογία στη Γερμανία (Klinik für Urologie und Kinderurologie, Sozialstiftung Bamberg-Klinikum am Bruderwald, Akademisches Lehrkrankenhaus der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg). Έχει διατελέσει Επιστημονικός Υπότροφος της Ουρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Π.Γ.Ν.Λάρισας. Είναι Επιστημονικός Συνεργάτης της Ουρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Π.Γ.Ν.Λάρισας. Από τον Δεκέμβριο 2012 διατηρεί ιδιωτικό ουρολογικό ιατρείο στη Λάρισα. Μιλά Αγγλικά και Γερμανικά και χειρίζεται ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Είναι συγγραφέας 4 ελληνικών και 6 διεθνών δημοσιεύσεων. Έχει 13 ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια και 3 σε διεθνή. Έχει παρουσιάσει 10 εισηγήσεις σε ελληνικά συνέδρια και 1 σε διεθνές συνέδριο. Είναι κριτής σε 2 διεθνή περιοδικά και μέλος της συντακτικής επιτροπής σε 1 διεθνές περιοδικό. Συμμετέχει ενεργά στην κλινική άσκηση και τη θεωρητική κατάρτιση στην Ουρολογία των φοιτητών Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Έχει

συμμετάσχει, και συνεχίζει να συμμετέχει, σε 12 διεθνείς κλινικές μελέτες ως "Subinvestigator" και σε 1 ως "Unblinded pharmacist". Έχει υπάρξει μέλος της οργανωτικής επιτροπής 3 ελληνικών και 2 διεθνών συνεδρίων.

Είναι μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Λάρισας, της Ελληνικής Ουρολογικής Εταιρείας και της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας.

Μένει στη Λάρισα και είναι παντρεμένος από το 2010.

**“Μελέτη προγνωστικών και προβλεπτικών παραγόντων καρκίνου της
ουροδόχου κύστης.**

**Διερεύνηση των συστημάτων ΝΕΡ/Νευροπεπτιδίων και Ουβικουιτίνης/
Πρωτεασώματος/NFκΒ”**

**ΛΑΜΠΡΟΣ Π. ΜΗΤΡΑΚΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
2008**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Δρ. Μιχαήλ Δ. Μελέκος, Καθ. Ουρολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**
- 2. Δρ. Χρήστος Ν. Παπανδρέου, Καθ. Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**
- 3. Δρ. Γεώργιος Κ. Κουκούλης, Καθ. Παθ/κής Ανατομικής, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο άξονας Ουδέτερης Ενδοπεπτιδάσης (NEP/CD10)-Νευροπεπτιδίων (όπως η ενδοθηλίνη 1/ET-1) και το βιολογικό μονοπάτι του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα kappaB (NFκB)-Ουβικουΐτινης-Πρωτεασώματος είναι δύο μηχανισμοί που έχουν συσχετιστεί, ανεξαρτήτως ο ένας από τον άλλον, με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Μελετήσαμε αυτές τις βιολογικές οδούς καθώς και τη μεταξύ τους σχέση, χρησιμοποιώντας αρχειακό βιολογικό υλικό (block παραφίνης από υλικό βιοψίας/εκτομής όγκων ουροδόχου κύστης ή κυστεκτομής), σε δύο ομάδες ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστης. Μελετήσαμε προοπτικά ασθενείς με μυοδιηθητική νόσο και αναδρομικά ασθενείς με μη μυοδιηθητική, υψηλής κακοήθειας νόσο. Τέλος, πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική μελέτη των μοριακών δεικτών NEP/CD10, ET-1 και NF-κB (κυτταροπλασματικό).

Η ερευνητική υπόθεση είναι ότι οι δύο προαναφερθείσες οδοί είναι ευθέως και άμεσα συνδεδεμένες και αλληλεπιδρούν στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Τα νευροπεπτίδια επομένως, μπορούν να δράσουν διεγερτικά και να ενεργοποιήσουν την ανενεργό κυτταροπλασματική μορφή του NF-κB, προκαλώντας μετακίνησή του εντός του κυτταρικού πυρήνα (ανάλογος μηχανισμός δράσης με τους εξωκυττάριους διεγέρτες του NF-κB). Ως αντιπροσωπευτικό νευροπεπτίδιο για την διερεύνηση της υπόθεσης επιλέξαμε την ενδοθηλίνη-1 (ET-1). Αν η υπόθεση είναι ορθή, τότε θα πρέπει να αποδειχθούν τα εξής:

↓ επίπεδα και/ή δραστηριότητα CD10 ► ↑ επίπεδα και δράση ET-1 (► ↑ κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ↓ απόπτωσης και ↑ νεοαγγειογένεσης ► αρνητική κλινική έκβαση στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης) ► ↑ δραστηριότητα πρωτεασώματος ► ↑ πρωτεασωμική αποδόμηση IκB ►

↑ δραστηριότητα IKK ► ↑ μεταγραφική δραστηριότητα NF-κB ► ↑ NF-κB-εξαρτώμενων παραγόντων αγγειογένεσης, διείσδυσης και μεταστατικότητας ► αρνητική κλινική έκβαση στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Στους ασθενείς με μυοδιηθητική νόσο:

Μόνο η υπερέκφραση ET-1 συσχετίστηκε σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για πρόοδο νόσου, σε σύγκριση με ασθενείς με ήπια έκφραση ET-1, καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους. Επιπρόσθετα, συσχετίστηκε σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για θάνατο, σε σύγκριση με ασθενείς με μέτρια έκφραση ET-1, καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους. Τέλος, συσχετίστηκε σημαντικά με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για θάνατο, σε σύγκριση με ασθενείς με ήπια έκφραση ET-1, καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους.

Στους ασθενείς με μη μυοδιηθητική, υψηλής κακοήθειας νόσο:

Η έκφραση της ET-1 συσχετίστηκε σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio) και για υποτροπή και για πρόοδο νόσου και επίσης με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για υποτροπή.

Η έκφραση του NFκB συσχετίστηκε σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio) για πρόοδο νόσου, αλλά όχι και για υποτροπή.

Στους ασθενείς με μυοδιηθητική νόσο και τους ασθενείς με μη μυοδιηθητική, υψηλής κακοήθειας νόσο:

Η έκφραση της NEP/CD10 δε συσχετίστηκε με τις υπο μελέτη προγνωστικές παραμέτρους.

ABSTRACT

The neutral endopeptidase (NEP/CD10)-neuropeptides (such as endothelin 1/ET-1) axis and the molecular pathway of the transcriptional nuclear factor kappaB (NFκB)-ubiquitin-proteasome are two mechanisms which have associated, independently from one another, with urinary bladder cancer. We studied these biological pathways as well as the relationship between them, using archived biological material (paraffin embedded tissue from transurethral resections of bladder tumors and radical cystectomies), in two groups of patients with bladder cancer. We prospectively studied patients with muscle-invasive bladder cancer and we retrospectively studied patients with non-muscle-invasive, high-grade bladder cancer. Finally, we performed immunohistochemical study for the following biological markers: NEP/CD10, ET-1 and NFκB (cytoplasmic).

Our research hypothesis is that these two pathways are directly connected and interact in bladder cancer. Therefore, the neuropeptides could stimulate and activate the inactive cytoplasmic form of NFκB, resulting to its transfer into the nucleus (analogue mechanism of action with the extracellular stimulators of NFκB). As representative neuropeptide for testing our hypothesis we picked ET-1. If our hypothesis is correct, then the following should be proved:

↓ levels and/or activity of CD10 ► ↑ levels and activity of ET-1 (► ↑ cell proliferation, ↓ apoptosis and ↑ neovascularization ► negative clinical outcome in bladder cancer) ► ↑ proteasome activity ► ↑ proteasomal degradation IκB ► ↑ activity IKK ► ↑ transcriptional activity of NF-κB ► ↑ NF-κB-dependent factors of angiogenesis, infiltration and metastasis ► negative clinical outcome in bladder cancer.

Muscle-invasive bladder cancer patients:

Only overexpression of ET-1 was significantly associated with negative clinical outcome, specifically with an increased hazard ratio for disease progression, in comparison with patients with mild expression of ET-1, throughout the duration of the monitoring period. Additionally, it was significantly associated with negative clinical outcome, specifically with an increased hazard ratio for death, in comparison with patients with moderate expression of ET-1, throughout the duration of the monitoring period. Finally, it was significantly associated with negative clinical outcome, specifically with an increased hazard ratio for death, in comparison with patients with mild expression of ET-1, throughout the duration of the monitoring period.

Non-muscle invasive high grade bladder cancer patients:

Expression of ET-1 was significantly associated with negative clinical outcome, specifically with an increased odds ratio for recurrence as well as progression of the disease and additionally with an increased hazard ratio for disease recurrence.

Expression of NF κ B was significantly associated with negative clinical outcome, specifically with an increased odds ratio for disease progression but not for recurrence.

Muscle-invasive and non-muscle invasive high grade bladder cancer patients:

Expression of NEP/CD10 was not associated with the studied prognostic parameters.

Πίνακας Περιεχομένων

Α' Μέρος: Καρκίνος της ουροδόχου κύστης

1. Επιδημιολογία	15
2. Αιτιολογία	21
3. Μοριακή βιολογία	29
4. Κλινική εικόνα – Διάγνωση	37
5. Επέκταση των όγκων του ουροθηλίου	48
6. Ιστολογία - Παθολογική Ανατομική των όγκων της κύστης	61
7. Σταδιοποίηση	74
8. Φυσική ιστορία της νόσου - Προγνωστικοί παράγοντες	78
9. Θεραπεία	93

Β' Μέρος: Μελέτη προγνωστικών και προβλεπτικών παραγόντων καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Διερεύνηση των συστημάτων NEP/Νευροπεπτιδίων και Ουβικουϊτίνης/ Πρωτεασώματος/NFκB

1. Το μοριακό μονοπάτι NFκB–ουβικουϊτίνης–πρωτεασώματος	116
2. Ο άξονας ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης - νευροπεπτιδίων	125
3. Ερευνητική υπόθεση - Κλινικό ενδιαφέρον	130
4. Υλικό – Μέθοδοι	132
5. Αποτελέσματα: Ομάδα Α και Ομάδα Β	147 / 166
6. Συζήτηση	195
Βιβλιογραφία	211

Α΄ Μέρος
Καρκίνος της ουροδόχου κύστης

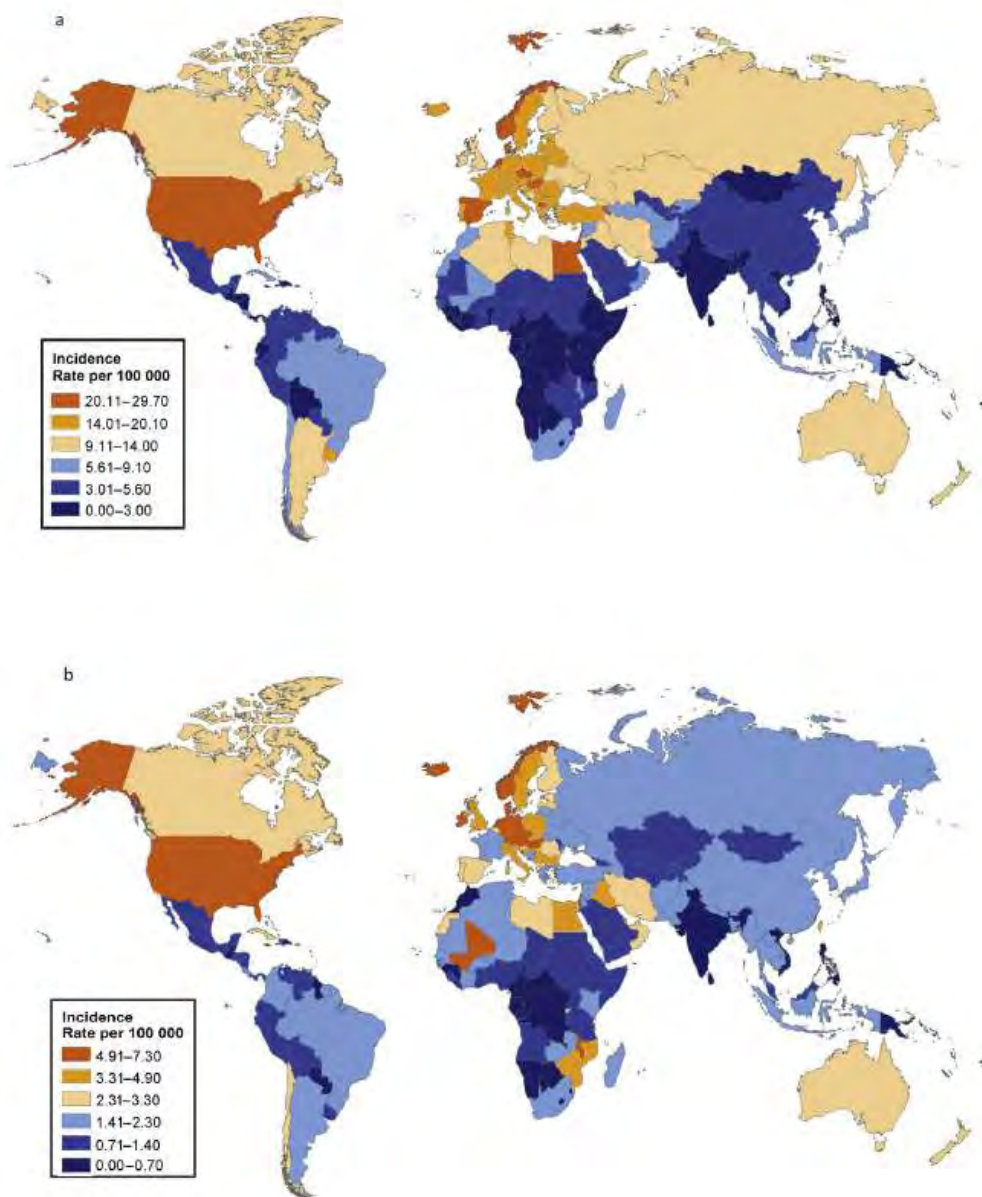
1. Επιδημιολογία

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι η πιο συχνή κακοήθεια του ουροποιητικού συστήματος, ο 7^{ος} πιο κοινός καρκίνος στους άνδρες και ο 17^{ος} στις γυναίκες¹. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, συμπεριλαμβανομένης της παιδικής, και προσβάλλει κυρίως ανθρώπους ηλικίας άνω των 50 ετών. Η μέση ηλικία κατά την διάγνωση, για τους άντρες και τις γυναίκες, είναι 70 ετών². Η επίπτωση και η θνητότητα αυξάνουν με την ηλικία. Η αυξημένη θνητότητα των ηλικιωμένων ασθενών μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη πιο επιθετικών όγκων, το πιο προχωρημένο στάδιο κατά την διάγνωση, λόγω κοινωνικών και βιολογικών αιτιών, και την επιλογή και παροχή λιγότερο επιθετικών, και ίσως λιγότερο αποτελεσματικών, θεραπειών³. Στους εφήβους και τους ενήλικες ηλικίας 30-40 ετών ο καρκίνος της κύστης είναι καλά διαφοροποιημένος και έχει καλή κλινική συμπεριφορά. Παραδόξως μάλιστα, η μοριακή και γενετική παρέκκλιση των όγκων σε αυτές τις ηλικιακές ομάδες δεν παρουσιάζουν τη στενή συσχέτιση βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης-κλινικής συμπεριφοράς, όπως οι όγκοι στους μεσήλικες και τους ηλικιωμένους³. Οι νεαρότεροι ασθενείς έχουν καλύτερη πρόγνωση, διότι έχουν συχνότερα επιφανειακούς και καλά διαφοροποιημένους όγκους. Όμως έχουν τον ίδιο κίνδυνο προόδου της νόσου, για όλους τους βαθμούς διαφοροποίησης, με τους μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς⁴.

Η λευκή φυλή προσβάλλεται συχνότερα από τη μαύρη³. Η παγκόσμια επίπτωση είναι 2,2/100000 (ASR-W)¹ για τις γυναίκες,

¹ ASR-W (Age-standardized rate by world population): Είναι ένα αθροιστικό μέτρο του ποσοστού που θα είχε ένας πληθυσμός, αν αυτός είχε μία τυπική δομή ηλικίας (standard age structure). Η τυποποίηση (standardization) είναι απαραίτητη, κατά την σύγκριση πληθυσμών που διαφέρουν ως προς την ηλικία.

9,1/100000 (ASR-W) για τους άντρες, 5,3/100000 συνολικά και για τα δύο φύλα⁵ και δείχνει αυξητική τάση (Εικόνα 1). Οι υψηλότεροι ρυθμοί



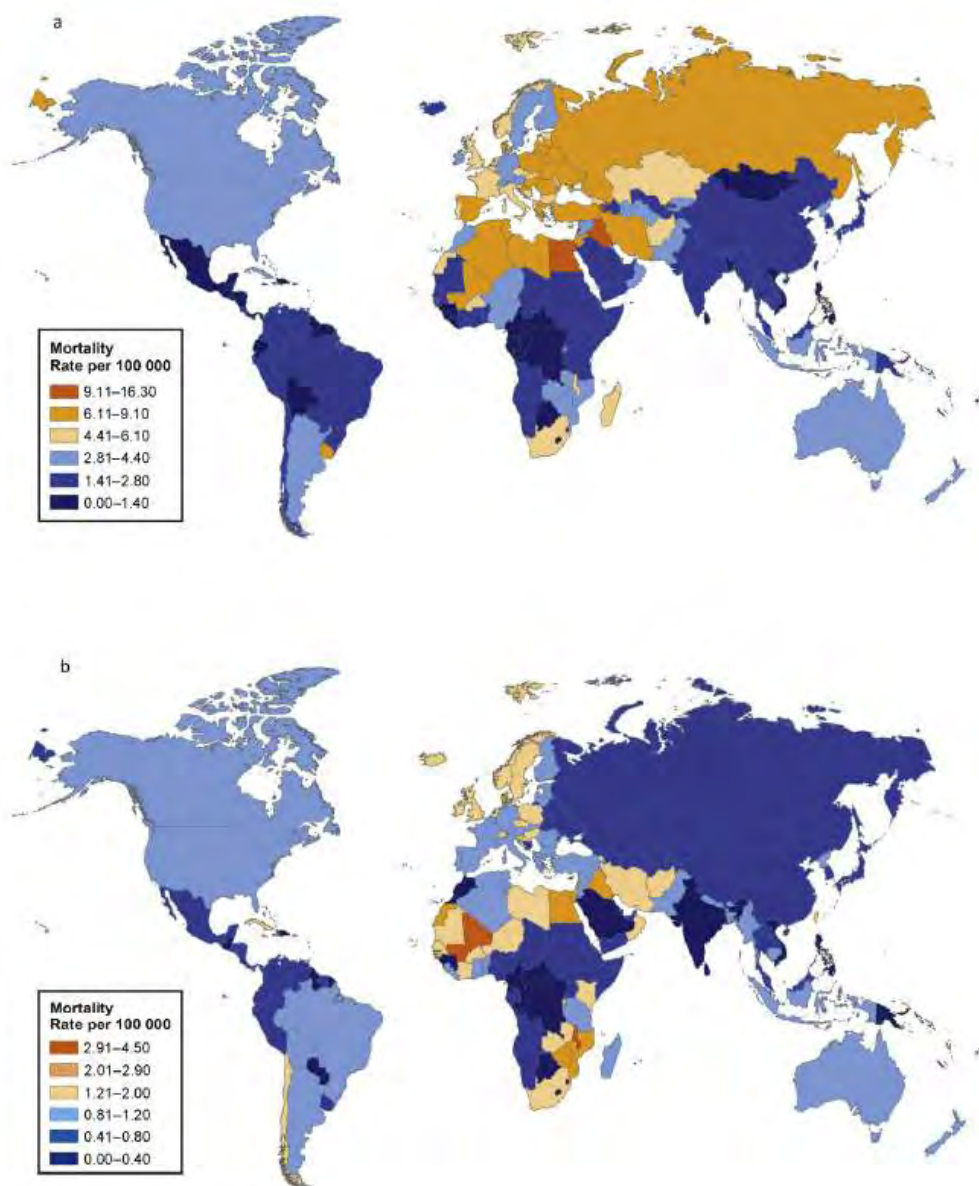
Εικόνα 1: Εκτιμώμενη επίπτωση διεθνώς (age-standarized/ASR-W) του καρκίνου της ουροδόχου κύστης για όλες τις ηλικίες στους (a) άντρες και τις (b) γυναίκες, σύμφωνα με την GLOBOCAN 2008. Πηγή γραφήματος: Chavan S et al. International variations in bladder cancer incidence and mortality. Eur Urol. 2014 Jul; 66(1): 62.

επίπτωσης, και για τα δύο φύλα, παρατηρούνται στην Αυστραλία, την Β. Αμερική και την Δ. Ευρώπη⁶. Ο καρκίνος της κύστης σπανίως είναι τυχαίο εύρημα σε υλικό βιοψίας, κατά συνέπεια λοιπόν ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ του να είναι ορατός, κυστεοσκοπικά ή σε βιοψία, και του να είναι συμπτωματικός (αιματουρία) είναι σχετικά σύντομος.

Δεδομένου ότι τα μέσα διάγνωσής του (κυστεοσκόπηση, λήψη βιοψίας) είναι τα ίδια από το 1930, η παρατηρούμενη αύξηση της επίπτωσης δεν μπορεί να αποδοθεί στην τεχνολογική εξέλιξη ή τις αλλαγές της κλινικής πρακτικής³. Επίσης, ακολουθεί την αύξηση της ηλικίας και είναι παράδοξο ότι είναι μεγαλύτερη στους άνδρες, αφενός γιατί αυτοί έχουν μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης αφετέρου διότι από το 1960 η έκθεση των γυναικών, λόγω επαγγέλματος και έξεων, σε καρκινογόνους παράγοντες έχει αυξηθεί³. Ο καρκίνος της κύστης δεν αυξήθηκε στις γυναίκες όπως ο καρκίνος του πνεύμονα από το 1960 και έπειτα, γεγονός που πιθανώς έχει πολυπαραγοντική αιτιολογία (πχ. γενετική, ορμονική, ανατομική)³.

Κάθε χρόνο περισσότεροι από 130000 άνθρωποι πεθαίνουν παγκοσμίως, λόγω καρκίνου της ουροδόχου κύστης⁷. Η παγκόσμια θνησιμότητα είναι 3,3/100000 (ASR-W) για τους άντρες, 0,9/100000 (ASR-W) για τις γυναίκες και 2,0/100000 στο σύνολο των δύο φύλων⁵ (Εικόνα 2). Στην Ελλάδα η θνησιμότητα ανέρχεται σε 6,4/100000 (ASR-W) για τους άντρες και σε 1,0/100000 (ASR-W) για τις γυναίκες (Εικόνα 3). Επίσης, ο επιπολασμός της νόσου σε περίοδο 5 ετών έφτασε τα 1172461 άτομα και για τα δύο φύλα⁵. Οι γυναίκες ασθενείς έχουν χειρότερη πρόγνωση εξαιτίας αργοπορημένης διάγνωσης⁸. Η μαύρη φυλή έχει επίσης χειρότερη πρόγνωση από τη λευκή, γεγονός που αποδίδεται στο χαμηλότερο ποσοστό περιορισμένης στην κύστη νόσου κατά την διάγνωση. Αυτή η εύρεση πιο προχωρημένου σταδίου ίσως να οφείλεται στη μη αναφορά επιφανειακών όγκων, την αργοπορημένη διάγνωση και/ή τη συχνότερη εύρεση πιο επιθετικών ιστολογικών μορφών³. Πάντως, στις Η.Π.Α από τα τέλη της δεκαετίας του 1950 ως τα τέλη της δεκαετίας του 1990, η θνησιμότητα της νόσου μειώθηκε κατά 33%, παρά την κατά 50% αύξηση της επίπτωσης³. Η μείωση της θνησιμότητας

αφορά κυρίως στους άντρες⁹. Οι γυναίκες που έχουν την νόσο έχουν 50% μεγαλύτερη πιθανότητα να καταλήξουν λόγω αυτής συγκριτικά με τους

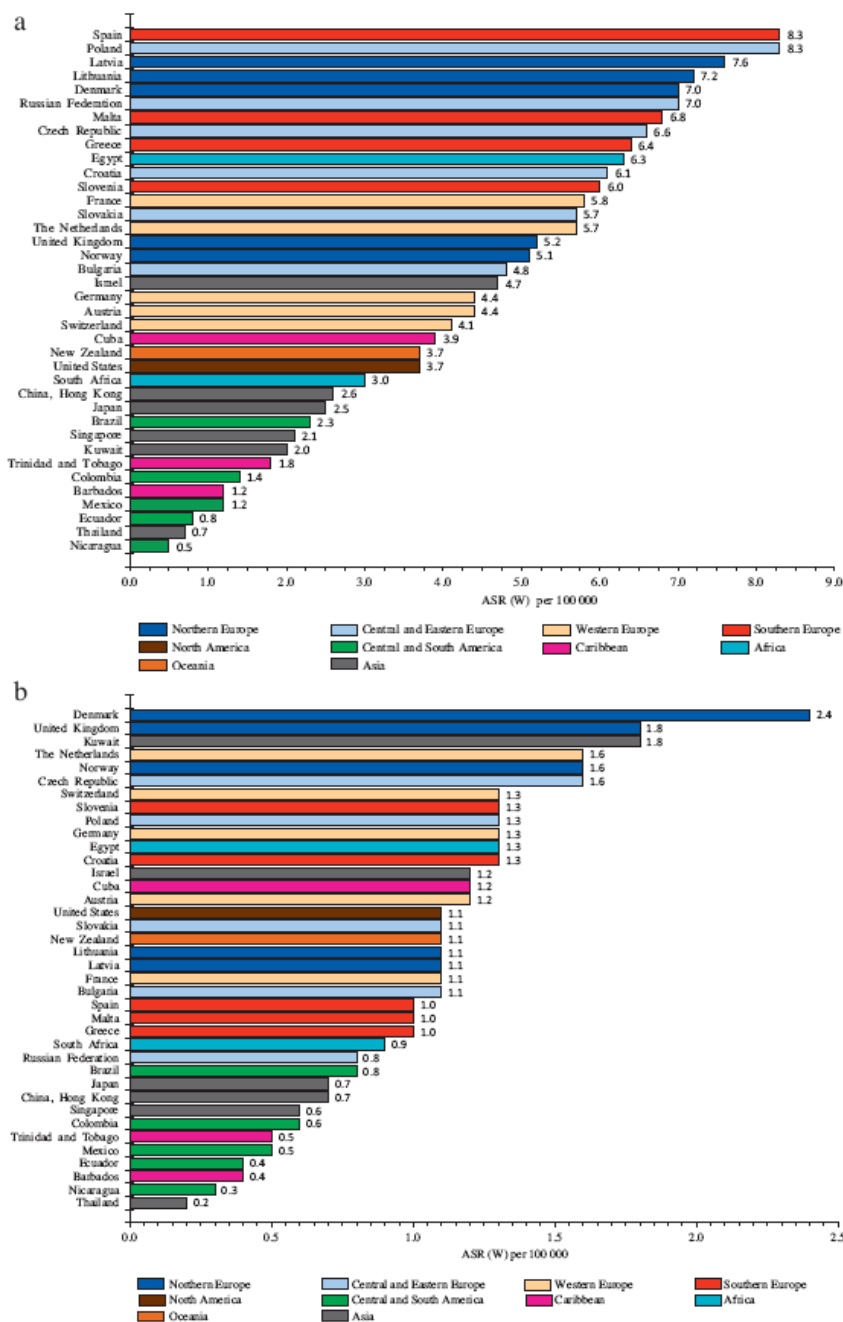


Εικόνα 2: Εκτιμώμενη θνησιμότητα διεθνώς (age-standarized/ASR-W) του καρκίνου της ουροδόχου κύστης για όλες τις ηλικίες στους (a) άντρες και τις (b) γυναίκες, σύμφωνα με την GLOBOCAN 2008. Πηγή γραφήματος: Chavan S et al. International variations in bladder cancer incidence and mortality. Eur Urol. 2014 Jul; 66(1): 63.

άντρες³ (SEER², 1973-1997). Οι διαφορές των φύλων ως προς τα παραπάνω επιβεβαιώνονται και σε άλλες χώρες.

Το καρκίνωμα μεταβατικού επιθηλίου (transitional cell carcinoma/TCC), που εξορμάται από το ουροθήλιο (μεταβατικό επιθήλιο) είναι ο συχνότερος ιστοπαθολογικός τύπος καρκίνου της ουροδόχου κύστης και αντιπροσωπεύει το 84% και 79% όλων των περιπτώσεων σε άντρες και γυναίκες αντίστοιχα⁶.

² SEER: Surveillance Epidemiology and End Results, National Cancer Institute, U.S National Institutes of Health



Εικόνα 3: Θνησιμότητα καρκίνου της ουροδόχου κύστης σε επιλεγμένες περιοχές την περίοδο 2000-2006 (age-standardized/ASR-W, μέσες τιμές των παρατηρούμενων ρυθμών για το διάστημα 2000-2006) για τους (a) άντρες και τις (b) γυναίκες, σύμφωνα με την Βάση Δεδομένων Θνησιμότητας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Mortality Database, World Health Organization) Πηγή γραφήματος: Chavan S et al. International variations in bladder cancer incidence and mortality. Eur Urol. 2014 Jul; 66(1): 64.

2. Αιτιολογία

Η αιτιολογία του καρκίνου της κύστης είναι καλά μελετημένη και αρκετοί καρκινογόνοι για το ουροθήλιο παράγοντες έχουν αναγνωρισθεί, αν και ο μέσος χρόνος από την έκθεση ως την εκδήλωση του καρκίνου (λανθάνουσα περίοδος) είναι 24 χρόνια⁷. Υπάρχει εύρωστη τεκμηρίωση της συσχέτισης μεταξύ καρκίνου της κύστης και αρωματικών αμινών καθώς και καπνίσματος.

Οι **αρωματικές αμίνες** (όπως η 2-ναφθυλαμίνη, η βενζιδίνη, η 4-αμινοδιφαινίλη, η διχλωροβενζιδίνη, η ορθοδιανισιδίνη, η φαινακετίνη, η χλωροναφαζίνη, η κυκλοφωσφαμίδη και η 44-μεθυλεν-2-χλωρανιλίνη) είναι οι πρώτες ουσίες που αναγνωρίστηκαν ως καρκινογόνες. Το 1895 ο Ludwig Rehn διαπίστωσε ότι οι εργάτες στη βιομηχανία χρώματος είχαν υψηλότερο κίνδυνο προσβολής από τη νόσο⁷. Από το 1938 έχει καταδειχθεί ο καρκινογενετικός ρόλος της 2-ναφθυλαμίνης. Η επαγγελματική έκθεση (βιομηχανίες χρώματος, ελαστικών, αλουμινίου, υφασμάτων, εκτυπώσεων, συνθετικών υλικών, εργασία σε εργαστήρια, συνεργεία απεντόμωσης, κομμωτήρια, έκθεση σε ακτινοβολία και αέρια της βιομηχανίας άνθρακα) σε χημικά καρκινογόνα υπολογίζεται ότι ευθύνεται για το 25% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστης⁷. Η μακρά λανθάνουσα περίοδος πάντως υποδηλώνει ότι ο αιτιολογικός παράγοντας πρέπει να δράσει αθροιστικά για να προκληθεί νόσος.

Άλλες ουσίες που κατά καιρούς έχουν ενοχοποιηθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες είναι οι μεταβολίτες της τρυπτοφάνης, τα νιτρικά άλατα των τροφών και διάφορα τεχνητά γλυκαντικά (νατριούχος σακχαρίνη, κυκλαμάτη), χωρίς όμως να υπάρχει αναμφισβήτητη τεκμηρίωση του καρκινογενετικού τους ρόλου¹⁰. Η κατανάλωση καφέ και τσαγιού ενοχοποιήθηκε στο παρελθόν ως αιτιολογικός παράγοντας

του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Μεταγενέστερες πειραματικές μελέτες δεν αποδείξαν ότι η καφεΐνη μπορεί να ξεκινήσει ή να συντηρήσει και να επαυξήσει μία ογκογενετική διαδικασία στην ουροδόχο κύστη. Επομένως, οφείλουμε να δεχθούμε ότι η κατανάλωση καφέ και τσαγιού δεν αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα του καρκίνου του ουροθηλίου¹⁰. Άλλη μελέτη αναγνωρίζει ως πιθανό αιτιολογικό παράγοντα την κατανάλωση μπίρας¹¹. Η περιεκτικότητα του πόσιμου νερού σε χλώριο και νιτρικά επίσης αναφέρεται να συσχετίζεται με τον καρκίνο της κύστης⁷. Η ενδημική στην Ταϊβάν 'μαύρη ασθένεια των κάτω άκρων' (blackfoot disease) οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα του πόσιμου ύδατος σε αρσενικό και προκαλεί, εκτός των καρδιαγγειακών νόσων, διάφορες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένης της ουροδόχου κύστης³. Το φυτό της Κίνας *Aristolochia fangchi*, που χρησιμοποιήθηκε ως συμπλήρωμα διατροφής για απώλεια βάρους, προκαλεί διάμεση νεφροπάθεια και αυτή συσχετίζεται με πολύ υψηλότερο κίνδυνο για την ανάπτυξη ουροθηλιακού καρκινώματος πρωτίστως του ανώτερου ουροποιητικού αλλά και της κύστης¹². Επίσης, η έκθεση σε αριστολοχικό οξύ (aristolochic acid) προκαλεί την ενδημική οικογενή νεφροπάθεια του Δούναβη ή ενδημική νεφροπάθεια των Βαλκανίων¹³. Το οξύ περιέχεται στους σπόρους του φυτού *Aristolochia clematitis* (ενδημεί στις παραδουνάβιες βαλκανικές χώρες), που αναμειγνύονται με τους σπόρους σίτου και έτσι περνά στην διατροφική αλυσίδα. Η μυκοτοξίνη οχρατοξίνη Α (mycotoxin Ochratoxin A), που παράγεται από τους μύκητες *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium verrucosum*, προσβάλλει ευρέως τις τροφές και σχετίζεται επίσης με την βαλκανική νεφροπάθεια. Η νεφροπάθεια αυτή σχετίζεται με την ανάπτυξη όγκων του ουροποιητικού, κυρίως ανώτερου αλλά και κατώτερου¹⁴.

Σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες **ουσίες**, υπάρχουν άλλες, όπως η βιταμίνη Α και η β-καρωτένη, που θεωρούνται **προστατευτικές** έναντι του καρκίνου της κύστης¹⁰. Άτομα που προσλαμβάνουν με τις τροφές μικρές μόνο ποσότητες των ουσιών αυτών έχουν αυξημένο κίνδυνο νόσησης, ενώ έχειδειχθεί πειραματικά ότι η βιταμίνη Α μπορεί να αποτρέψει την ανάπτυξη του καρκίνου που προκαλείται από χημικά καρκινογόνα. Οι παρατηρήσεις αυτές αποτέλεσαν την βάση για τη χρήση των ρητινοειδών ως δυνητικών χημειοπροστατευτικών παραγόντων σε ασθενείς με ιστορικό επιφανειακού όγκου της ουροδόχου κύστης. Προστατευτικά φαίνεται να δρα και η αυξημένη πρόσληψη υγρών. Πιθανώς επειδή αυτή συνεπάγεται αφενός αραίωση των διαλυτών ουσιών, άρα και των καρκινογόνων, και αφετέρου ελάττωση του χρόνου επαφής τους με το ουροθήλιο, μέσω της αύξησης της συχνότητας ούρησης¹⁵. Τέλος, τροφές που έδειξαν προστατευτική δράση είναι το ξινόγαλα και τα προϊόντα γιαουρτιού¹⁶, ενώ τα φρούτα και τα λαχανικά δεν φαίνεται να δρουν ούτε προστατευτικά ούτε προκλητικά¹⁷.

Η ισχυρή σχέση του καπνίσματος με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης είναι πλήρως επιβεβαιωμένη. Οι καπνιστές συγκριτικά με τους μη καπνιστές έχουν 2-6 φορές μεγαλύτερο σχετικό κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο της ουροδόχου κύστης¹⁸. Ο κίνδυνος φαίνεται ότι σχετίζεται με τον αριθμό των τσιγάρων, την διάρκεια του καπνίσματος και τον βαθμό εισπνοής του καπνού. Στους άντρες ασθενείς το 50-60% των όγκων της κύστης οφείλεται στο κάπνισμα, ενώ στις γυναίκες το ίδιο ποσοστό μειώνεται στο 25% περίπου¹⁹. Μεταξύ των καπνιστών δεν έχει αναγνωριστεί η υπεύθυνη για την ανάπτυξη του καρκίνου ουσία. Φαίνεται ότι καρκινογενετική δράση ασκούν οι νιτροζαμίνες, η 4-αμινοδιφαινύλη, η ο-τολουϊδίνη, η 2-ναφθυλαμίνη και οι μεταβολίτες της τρυπτοφάνης¹⁰, που έχουν ανιχνευθεί σε αυξημένες ποσότητες στα ούρα

καπνιστών. Στο μηχανισμό της καρκινογένεσης συμμετέχουν διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στους μεταβολικούς δρόμους των αρωματικών αμινών, όπως η N-ακετυλοτρανσφεράση 2 (NAT2), το κυτόχρωμα P-450 1A2 (CYP 1A2), καθώς και ένζυμα της οικογένειας των τρανσφερασών της γλουταθειόνης, ιδίως η γλουταθειόνη S τρανσφεράση M1 (GSTM1). Το NAT2 είναι το κύριο ένζυμο ακετυλίωσης των αρωματικών αμινών και οι γενετικές ποικιλίες που προκαλούν αργή ακετυλίωση οδηγούν σε μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου¹⁰. Το CYP 1A2 συμμετέχει στην απομεθυλίωση των αρωματικών αμινών, ενεργοποιώντας με τον τρόπο αυτό δυνητικά καρκινογόνα¹⁰. Τέλος, το GSTM1 συμμετέχει στην διαδικασία αποδόμησης δυνητικά καρκινογόνων ουσιών, όπως το βενζοπυρένιο, και η έλλειψή του σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της κύστης¹⁰. Η διακοπή του καπνίσματος φαίνεται ότι έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης του καρκίνου της κύστης, μείωση που πάντως είναι προοδευτική και μακροχρόνια. Υπολογίζεται ότι χρειάζονται τουλάχιστον 20 χρόνια από τη διακοπή του καπνίσματος, ώστε ο σχετικός κίνδυνος να μειωθεί στα επίπεδα του μη καπνιστή. Τέλος, από κλινικής απόψεως πρέπει να γίνει αντιληπτό ότι το κάπνισμα όχι μόνο αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο της ουροδόχου κύστης αλλά και ότι η μη διακοπή του μετά την διάγνωση της νόσου οδηγεί σε χειρότερη πρόγνωση, ακόμη και στις περιπτώσεις πρώιμων μη διηθητικών όγκων.

Η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων (5-15kgr σε 10 έτη) συνδυασμών αναλγητικών, που περιέχουν φαινακετίνη, η οποία έχει παρόμοια χημική δομή με την ανιλίνη, έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος μεταβατικού επιθηλίου στην ουροδόχο κύστη και την νεφρική πύελο³. Η λανθάνουσα περίοδος και στις δύο περιπτώσεις είναι μακρά. Πειραματικές μελέτες σε πειραματόζωα

έδειξαν ότι η φαινακετίνη προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ουροθηλίου και πιθανόν το ίδιο να συμβαίνει και στον άνθρωπο¹⁰. Πάντως, τα πειραματικά δεδομένα είναι ενδεικτικά, αλλά όχι απολύτως αποδεικτικά της αιτιολογικής σχέσης της φαινακετίνης με τον καρκίνο.

Η συσχέτιση της **πιογλιταζόνης** (per os θεραπεία σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2) με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά κατά την περίοδο αδειδότησης του φαρμάκου, κατόπιν παρατηρήσεων σε αρσενικά ποντίκια. Τότε δεν υπήρχε τεκμηρίωση για αυξημένο κίνδυνο στους ανθρώπους, αλλά υπήρξε δέσμευση διερεύνησης της υπόθεσης. Το 2011 επιβεβαιώθηκε μικρή αύξηση του κινδύνου για ασθενείς υπό αγωγή με πιογλιταζόνη, αλλά το σχετικό όφελος υπερτερεί του κινδύνου, ιδίως σε ασθενείς που δεν έχουν άλλους συνυπάρχοντες παράγοντες κινδύνου. Πάντως, βάσει των ευρημάτων διατυπώθηκαν οι εξής συστάσεις²⁰: διακοπή της πιογλιταζόνης σε ασθενείς με ιστορικό καρκίνου της κύστης ή ενεργό νόσο και σε όσους παρουσιάζουν αιματουρία, που δεν έχει διερευνηθεί, και προ της έναρξης αγωγής με πιογλιταζόνη να διερευνάται η ύπαρξη γνωστών παραγόντων κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου της κύστης, όπως λόγου χάρη το κάπνισμα.

Είναι παραδεκτό ότι η **χρόνια φλεγμονή της κύστης**, μικροβιακή και μη, επί παρουσίας μόνιμου ουροκαθετήρα ή λιθίασης συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο της ουροδόχου κύστης εκ πλακώδους επιθηλίου (Squamous Cell Carcinoma, SCC). Υπολογίζεται ότι το 2-10% των παραπληγικών με μόνιμο καθετήρα θα αναπτύξουν καρκίνο της κύστης, που στο 80% των περιπτώσεων θα είναι πλακώδους επιθηλίου. Επίσης, περισσότεροι από τους μισούς θα έχουν μυοδιηθητική νόσο κατά την διάγνωση²¹. Παρά τον αυξημένο κίνδυνο ο περιοδικός έλεγχος με

κυστεοσκόπηση και/ή κυτταρολογική εξέταση ούρων σε μη συμπτωματικούς (απουσία αιματουρίας) ασθενείς με χρόνια καθετήρα δεν έχει ισχυρή ένδειξη²². Η σχιστοσωμίαση (βιλαρζίαση), η οποία οφείλεται στο παράσιτο *Schistosoma haematobium* και ενδημεί στις βόρειες ακτές της Αφρικής, θεωρείται αιτιολογικός παράγοντας καρκινώματος της ουροδόχου κύστης εκ πλακώδους επιθηλίου. Η εναπόθεση των ωαρίων του παράσιτου σε υποεπιθηλιακές θέσεις και η επακολουθούσα φλεγμονώδης αντίδραση οδηγεί σε μετατροπή του φυσιολογικού μεταβατικού επιθηλίου σε πλακώδες, το οποίο έχει πολύ μεγαλύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού, με αποτέλεσμα να υπάρχουν περισσότερες ευκαιρίες για αυτόματο γενετικό λάθος και επακόλουθη καρκινογένεση. Στην καρκινογένεση πιθανόν να συμβάλλει και η μακρόχρονη επαφή του φυσιολογικού ουροθηλίου με μεταλλαξιγόνες ουσίες, όπως οι νιτροζαμίνες, οι οποίες είναι προϊόν παρασιτικού ή μικροβιολογικού μεταβολισμού (η αναγωγή των νιτρικών παράγεται από πολλά βακτηρίδια) φυσιολογικών συστατικών (νιτρικά) των ούρων²³. Αυτός ο μηχανισμός πιθανώς να δρα και σε ασθενείς, ιδίως γυναίκες, με υποτροπιάζουσες ουρολοιμώξεις, που επίσης έχουν ενοχοποιηθεί ως αιτιολογικός παράγοντας καρκίνου της κύστης. Εξάλλου, λίθοι οι οποίοι παραμένουν στο ουροποιητικό για μεγάλο χρονικό διάστημα αναφέρεται ότι μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο της κύστης, πιθανόν διότι προκαλούν τραυματισμό του ουροθηλίου και επακόλουθη κινητοποίηση των μηχανισμών επούλωσης (κυτταρικός πολλαπλασιασμός, αγγειογένεση), οπότε υπάρχει δυνατότητα για αυτόματο γενετικό λάθος και καρκινογένεση. Η έκθεση στον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV) και η ανάπτυξη καρκίνου της κύστης έχει εκτιμηθεί με αντιφατικά ευρήματα. Μία πρόσφατη μετα-ανάλυση πάντως των σχετικών μελετών δείχνει την ύπαρξη μέτριας συσχέτισης²⁴. Τέλος, φαίνεται ότι ο HPV ίσως να σχετίζεται περισσότερο με την

ανάπτυξη καρκινώματος μεταβατικού επιθηλίου σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς²⁵.

Πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν συσχετίσει την **κυκλοφωσφαμίδη και τους συναφείς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες** με την ανάπτυξη καρκίνου στην κύστη. Ο κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με τους παράγοντες αυτούς είναι 9 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με το γενικό πληθυσμό και η λανθάνουσα περίοδος είναι σχετικά σύντομη (6-13 έτη)³. Οι περισσότεροι όγκοι είναι χαμηλής διαφοροποίησης και μυοδιηθητικοί στην διάγνωση. Υπεύθυνη για την καρκινογένεση ουσία θεωρείται ο μεταβολίτης της κυκλοφωσφαμίδης ακρολεΐνη²⁶. Έχει προταθεί ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου μειώνεται με την χρήση της ουσίας mesna (2-mercaptoethanesulfonic acid), που θεωρείται προστατευτικός παράγοντας του ουροθηλίου²⁷. Τέλος, προτείνεται από ορισμένους συγγραφείς η πρώιμη κυστεκτομή ως θεραπεία κατά την διάγνωση, ακόμα και για μη διηθητικούς όγκους, λόγω του ασυνήθιστα υψηλού ρυθμού πρόοδου της νόσου σε ασθενείς, που δεν υποβλήθηκαν σε ριζική κυστεκτομή²⁸.

Γυναίκες που υποβάλλονται σε **ακτινοθεραπεία της πυέλου** για καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ή των ωοθηκών έχουν 2-4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της κύστης²⁹. Η επίπτωση αυξάνει περαιτέρω με την χορήγηση χημειοθεραπείας (με ή χωρίς κυκλοφωσφαμίδη) ή και με την χορήγηση χημειοθεραπείας μόνο²⁹. Οι όγκοι είναι χαμηλής διαφοροποίησης και τοπικά προχωρημένοι κατά την διάγνωση.

Ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού έχουν υψηλότερο κίνδυνο νόσησης από καρκίνο της ουροδόχου κύστης³⁰.

Πιθανώς αυτό να συσχετίζεται με την χρόνια λήψη ανοσοκατασταλτικής θεραπείας³.

Δεν υπάρχουν επιδημιολογικές αποδείξεις κληρονομικότητας της νόσου¹⁰. Πάντως στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί περιπτώσεις “οικογενούς” εμφάνισης καρκίνου της κύστης. Κλείνοντας, δεν έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη αυξημένου κινδύνου σε άτομα που ανήκουν σε συγκεκριμένο τύπο αντιγόνων ιστοσυμβατότητας ή συγκεκριμένο φαινότυπο ομάδων αίματος¹⁰.

3. Μοριακή βιολογία

Η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε νεοπλασματικό είναι πολύπλοκη διαδικασία. Η πρόσφατη πρόοδος στην ανάπτυξη των διαγνωστικών τεχνικών της μοριακής βιολογίας οδήγησε στην καλύτερη κατανόηση της γενετικής του καρκίνου και παρείχε την βάση για βελτίωση της πρόγνωσης της κλινικής συμπεριφοράς πολλών νεοπλασμάτων του ανθρώπου. Η καρκινογένεση είναι μια αλληλουχία γενετικών αλλαγών που αφορούν στους κυτταρικούς μηχανισμούς αύξησης, διαφοροποίησης και απόπτωσης και οδηγούν στη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Γενικά, στην καρκινογένεση εμπλέκονται κυρίως δύο γενετικοί μηχανισμοί: η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων και η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ιδιαίτερος μηχανισμός καρκινογένεσης θεωρείται η ενίσχυση ή η υπερέκφραση ορισμένων φυσιολογικών γονιδίων, που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες.

Τα **ογκογονίδια** είναι μεταλλαγμένα φυσιολογικά γονίδια που προάγουν την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παρεμβαίνοντας στους φυσιολογικούς μηχανισμούς ελέγχου της ανάπτυξης. Η ανενεργός μορφή τους είναι τα πρωτοογκογονίδια από τα οποία προκύπτουν με μια σειρά διεργασιών, όπως σημειακή μετάλλαξη ή εξάλειψη. Τα πρωτοογκογονίδια κωδικοποιούν σειρά προϊόντων που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα της κυτταρικής δραστηριότητας. Στα προϊόντα αυτά περιλαμβάνονται λόγω χάρη αυξητικοί παράγοντες και οι υποδοχείς τους, πρωτεΐνες-διαβιβαστές εξωτερικών σημάτων (P21 ή G) και πυρηνικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή του DNA.

Στον καρκίνο της κύστης εμπλέκονται κυρίως τα εξής ογκογονίδια:

α) H-ras

Τα γονίδια της οικογένειας ras (c-H-ras που είναι και το συνηθέστερο, c-K-ras, p21-ras) είναι μέρη μιας πολυγονιδιακής οικογένειας που

κωδικοποιεί μια ομάδα πρωτεϊνών γνωστών με το όνομα P21 ή G. Οι πρωτεΐνες G θεωρούνται μεταβιβαστές σημάτων από υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας στο κυτταρόπλασμα, όπου ειδικά ένζυμα, οι φωσφολιπάσες, παράγουν ένα «δεύτερο μήνυμα» που οδηγεί στην αύξηση του κυττάρου. Σημειακή μετάλλαξη των γονιδίων *ras* οδηγεί σε υπερπαραγωγή ή αλλαγή της δομής των G πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την υπερδιέγερση των φωσφολιπασών και την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση. Η συχνότητα ανεύρεσης μεταλλαγμένου H-*ras* γονιδίου στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης δεν είναι απολύτως γνωστή. Είναι πάντως πιθανό ότι η μετάλλαξη του H-*ras* συμβαίνει μόνο σε υποπληθυσμούς κυττάρων και ότι επέρχεται σχετικά αργά στη διαδικασία της ογκογένεσης. Τα ογκογονίδια της οικογένειας *ras* έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη, υποτροπή και πρόοδο της νόσου^{31,32}.

β) c-myc

Ο ογκογενετικός ρόλος του *c-myc* έχει επιβεβαιωθεί σε πολλές κακοήθειες. Το ογκογονίδιο αυτό προάγει την κυτταρική διαίρεση, ενώ αναστέλλει την κυτταρική διαφοροποίηση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός μεγάλου πληθυσμού αδιαφοροποίητων κυττάρων με ικανό πολλαπλασιαστικό δυναμικό που είναι ταυτόχρονα ιδιαίτερα ευάλωτος στην επίδραση οποιουδήποτε ογκογόνου παράγοντα. Αυξημένη έκφραση του *c-myc* έχει συσχετιστεί με υψηλότερο στάδιο και βαθμό κακοήθειας καθώς και αυξημένη πιθανότητα υποτροπής και διηθητικής εξέλιξης του καρκίνου της κύστης³³.

γ) erbB-1, erbB-2

Ιδιαίτερος καρκινογενετικός μηχανισμός θεωρείται η ενίσχυση ή υπερέκφραση ορισμένων φυσιολογικών γονιδίων, που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες ή τους υποδοχείς τους. Οι αυξητικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους που προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο υποδοχέας του

επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGF-r), που κωδικοποιείται από το πρωτοογκογονίδιο c-erbB-1, εκφράζεται φυσιολογικά μόνο στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του ουροθηλίου. Με τον EGF-r συνδέεται ο EGF που εκκρίνεται στα ούρα και με τον τρόπο αυτό η ανάπτυξη του ουροθηλίου είναι κανονική και ελεγχόμενη. Στον καρκίνο όμως, ο EGF-r υπερεκφράζεται σ' όλες τις στοιβάδες, με τελικό αποτέλεσμα τον γρήγορο και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και την ανάπτυξη καρκίνου. Αυξημένη έκφραση του EGF-r έχει συσχετιστεί με υψηλότερο νεοπλασματικό στάδιο και χειρότερο βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης, με αυξημένη θνητότητα, μικρότερη ελεύθερη υποτροπής επιβίωση και υψηλότερη συχνότητα υποτροπής και διηθητικής εξέλιξης του μη μυοδιηθητικού καρκίνου. Αντιθέτως, στο μυοδιηθητικό καρκίνο τέτοια συσχέτιση δεν έχει τεκμηριωθεί.

Το γονίδιο erbB-2 κωδικοποιεί ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα ομόλογο του EGF-r. Σε ορισμένους όγκους της κύστης παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου erbB-2 και υπερέκφραση του πρωτεϊνικού του παραγώγου, του p-185. Πάντως, υπερέκφραση του p-185 ανιχνεύεται και σε όγκους χωρίς ενίσχυση του erbB-2, χωρίς να έχει διευκρινιστεί ο μοριακός μηχανισμός που προκαλεί αυτό το φαινόμενο. Αντικρουόμενα αποτελέσματα λοιπόν έχουν αναφερθεί για την πρόοδο της νόσου και την πρόγνωση σε σχέση με την έκφραση του erbB-2³⁴.

Υπερεκφράζονται επίσης, **τα ογκογονίδια c-jun και mdm2**. Το c-jun κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα AP-1, που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης. Επομένως, μεταβολές του c-jun προκαλούν ανεπαρκή έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Υπερέκφραση του c-jun σχετίζεται με διηθητικά στάδια της νόσου^{35,36}. Η ενδοκυττάρια πρωτεΐνη mdm2, που δεσμεύει την p53 πρωτεΐνη και τη μεταφέρει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, έχει αυξημένη έκφραση στο 20-30%

των όγκων της κύστεως και φαίνεται να παρουσιάζει προγνωστική αξία³⁷.

Με τα σημερινά δεδομένα, ο καρκίνος της κύστης δεν μπορεί εύκολα να συσχετιστεί με ενίσχυση κάποιου συγκεκριμένου γονιδίου.

Τα **ογκοκατασταλτικά γονίδια** (tumor suppressor genes, TSGs) είναι γονίδια που η απενεργοποίησή τους οδηγεί σε σειρά μοριακών ή κυτταρικών φαινομένων, με τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη καρκίνου. Πολλά TSGs είναι αποδεδειγμένοι αιτιολογικοί παράγοντες διαφόρων μορφών καρκίνου. Για να προκληθεί καρκίνος από την απενεργοποίηση ενός TSG θα πρέπει η πρωτεΐνη, την οποία το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί, να καταστεί μη λειτουργική. Αυτό απαιτεί την αδρανοποίηση και των δύο αλληλίων του γονιδίου. Κυτταρογενετικές μελέτες σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων έχουν δείξει έλλειψη του ενός από τα δύο αλληλία που υπάρχουν σε φυσιολογικά κύτταρα, κατάσταση που ονομάζεται απώλεια της ετεροζυγωτίας (Loss of Heterozygosity, LOH). Η LOH θεωρείται απόδειξη της απενεργοποίησης ενός TSG, διότι στο απωλεσθέν τμήμα του χρωματοσώματος βρίσκεται η θέση εντόπισης αυτού του συγκεκριμένου TSG.

Τα κύρια ογκοκατασταλτικά γονίδια που έχουν μελετηθεί στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης είναι τα ακόλουθα:

α) γονίδιο p53

Το γονίδιο p53 εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωματοσώματος 17 (17p). Είναι το συχνότερα ανευρισκόμενο μεταλλαγμένο γονίδιο στον ανθρώπινο καρκίνο. Κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, που παρεμβαίνει στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η φυσιολογική πρωτεΐνη p53 (wild type) στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και κατά την έναρξη της φάσης αναδιπλασιασμού του DNA (φάση S) εισέρχεται στον πυρήνα, όπου παραμένει για 3 περίπου ώρες, για να συσσωρευτεί στη συνέχεια εκ

νέου στο κυτταρόπλασμα. Με τον τρόπο αυτό προκαλεί καθήλωση των κυττάρων στη φάση G1, πριν δηλαδή το κύτταρο εισέλθει στη φάση S, παρέχοντας έτσι περισσότερο χρόνο για την διόρθωση τυχόν γενετικής βλάβης.

Η wild type p53 πρωτεΐνη υπάρχει στα περισσότερα κύτταρα, αλλά είναι ασταθής και έχει σχετικά μικρό χρόνο ημιζωής (περίπου 20-30 λεπτά), με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Αντίθετα, η μεταλλαγμένη (mutant) p53 έχει παρατεταμένο χρόνο ημιζωής (περίπου 6 ώρες), με αποτέλεσμα τα επίπεδά της στα μεταλλαγμένα κύτταρα να είναι περίπου εκατονταπλάσια και να είναι ευκολότερη η ανίχνευσή της. Η μεταλλαγμένη p53, όχι μόνο δεν έχει τη φυσιολογική δραστηριότητα της wild type p53, αλλά δρα και ως αναστολέας της.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο μυοδιηθητικός καρκίνος της κύστης και το carcinoma in situ παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων του p53 συγκριτικά με τον μη μυοδιηθητικό¹⁰. Το εύρημα αυτό τεκμηριώνει το σημαντικό ρόλο της απενεργοποίησης του p53 στην ογκογενετική διαδικασία του μυοδιηθητικού καρκίνου. Αντίθετα, στους μη μυοδιηθητικούς όγκους η αξία της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του p53 είναι αμφισβητήσιμη. Οι Malatz et al. σε μία ανασκόπηση των δημοσιευμένων εργασιών για την p53 αναφέρουν ότι η μεταλλαγμένη p53 έκφραση βρέθηκε ότι είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας υποτροπής του όγκου σε 9 από τις 34 εργασίες, προόδου σε 12 από τις 24 και επιβίωσης σε 10 από τις 35³⁸.

Μελετάται ακόμη ως σημαντικός προγνωστικός δείκτης στον επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης η πρωτεΐνη p27. Χαμηλή έκφρασή της βρέθηκε ότι σχετίζεται με μικρότερο ελεύθερο νόσου διάστημα, μικρότερη επιβίωση και υψηλότερη συχνότητα μυοδιήθησης σε ασθενείς με επιφανειακό καρκίνο της κύστης^{39,40}.

β) γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb)

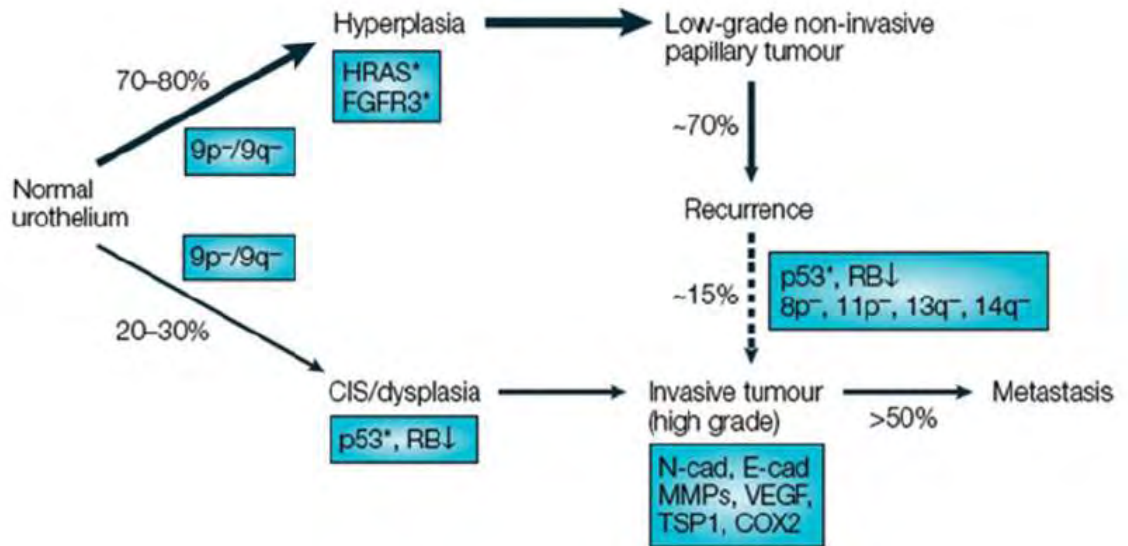
Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb) βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωματοσώματος 13 (13q) και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p110 Rb. Η πρωτεΐνη αυτή είναι τμήμα του συμπλέγματος E₂F, που αναστέλλει τη μεταγραφή του DNA, υφίσταται δε κυκλική αλλαγή στη φωσφορυλίωσή της ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου (υποφωσφορυλίωση στις φάσεις G₀, G₁ και υπερφωσφορυλίωση στις φάσεις S, M). Μετάλλαξη του Rb γονιδίου οδηγεί σε απενεργοποίηση της p110 Rb και επιτρέπει την ευκολότερη είσοδο του κυττάρου στη φάση S, επιτείνοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Απώλεια του Rb γονιδίου παρατηρείται τόσο σε μη μυοδιηθητικούς όσο και σε μυοδιηθητικούς όγκους της κύστης. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι Rb (-) μη μυοδιηθητικοί όγκοι εξελίσσονται συχνότερα σε μυοδιηθητικούς συγκριτικά με τους Rb (+). Εξάλλου, στο μυοδιηθητικό καρκίνο της κύστης η απώλεια του Rb γονιδίου έχει συσχετιστεί με υψηλότερη συχνότητα υποτροπής μετά την κυστεκτομή καθώς και με μικρότερη επιβίωση. Εντούτοις, άλλες έρευνες δε συσχέτισαν την απώλεια έκφρασης του Rb γονιδίου με υψηλής κακοήθειας και κακής πρόγνωσης διηθητική νόσο. Συνεπώς, η χρησιμότητα των μεταβολών της έκφρασης του Rb γονιδίου στη θεραπεία και πρόγνωση παραμένει αμφισβητήσιμη^{41,42}.

Εκτός των αλλαγών στην έκφραση των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, στον καρκίνο της κύστης εμπλέκονται και άλλα γενετικά συμβάματα. Η **απώλεια της ετεροζυγωτίας**, και γενικά η απώλεια γενετικού υλικού, στο χρωματόσωμα 9 είναι από τις πλέον συνηθισμένες γενετικές αλλαγές στον καρκίνο της κύστης, ανεξάρτητα από το στάδιο και τον βαθμό διαφοροποίησης⁴³. Πιθανώς στο χρωματόσωμα 9 βρίσκονται γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες p15 και p16, που αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση της p110 Rb και, κατ'

επέκταση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό¹⁰. Η απώλεια στη θέση 8p23.3 συσχετίζεται με πιο προχωρημένο στάδιο, με χαμηλότερο βαθμό διαφοροποίησης, με μικρότερη ελεύθερη-υποτροπής επιβίωση και με μικρότερη ελεύθερη-προόδου επιβίωση σε μη μυοδιηθητικούς καρκίνους⁴⁴. Η απώλεια του χρωματοσώματος Y είναι επίσης συνηθισμένο εύρημα στον ουροθηλιακό καρκίνο της κύστης, ανεξαρτήτως σταδίου και βαθμού διαφοροποίησης, και δεν συσχετίζεται με την κλινική έκβαση⁴⁵. Η LOH στο χρωματόσωμα 18 έχει δείξει να συσχετίζεται με την απουσία υποτροπής σε ασθενείς με χαμηλού κινδύνου μη μυοδιηθητική νόσο⁴⁶. Μία άλλη γενετική διαταραχή που έχει περιγραφεί στον καρκίνο της κύστης είναι αυτή στο χρωμόσωμα 5, συγκεκριμένα στην περιοχή p13. Στην p13 εδράζεται το DOG-2/DAB2 ογκοκατασταλτικό γονίδιο, που σε πειραματικές μελέτες φάνηκε ότι υπολειπουργεί σε κυτταρικές σειρές στον καρκίνο της κύστης^{47,48}.

Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι υπάρχουν δύο διαφορετικοί μοριακοί/γενετικοί δρόμοι, που οδηγούν είτε στην ανάπτυξη μη μυοδιηθητικού είτε στην ανάπτυξη μυοδιηθητικού καρκίνου της κύστης. Οι καλής διαφοροποίησης, μη μυοδιηθητικοί όγκοι χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις του H-ras γονιδίου και γονιδίου του υποδοχέα 3 του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (Fibroblast Growth Factor Receptor 3/FGFR3)⁴³. Οι ελάχιστα διαφοροποιημένοι, μυοδιηθητικοί όγκοι χαρακτηρίζονται από ελαττώματα στις ογκοκατασταλτικές οδούς των γονιδίων p53 και Rb⁴³. Η επέκταση του όγκου και η πρόοδος στον καρκίνο της κύστης φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική διαδικασία που προάγεται από μικροπεριβαλλοντικές αλλαγές⁴³ (πολλές εκ των οποίων σημειώνονται στο σχήμα 1).



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση των δύο διαφορετικών μηχανισμών του ουροθηλιακού καρκίνου. (Πηγή: Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews/Cancer. Wu, XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. Nat Rev Cancer. 2005; 5: 713-725.)

4. Κλινική εικόνα - Διάγνωση

Το συχνότερο **σύμπτωμα** είναι η ανώδυνη αιματουρία, που παρατηρείται στο 85% των ασθενών. Η αιματουρία μπορεί να είναι μακροσκοπική είτε μικροσκοπική και διαλείπουσα¹⁰, γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία στην διάγνωση, επειδή μία αρνητική για αιμοσφαιρίνη γενική εξέταση ούρων πρακτικά δεν αποκλείει τη νόσο. Συμπτώματα πλήρωσης (ερεθιστικά), όπως συχνουρία, νυκτουρία ή επιτακτική ούρηση είναι συχνότερα σε carcinoma in situ ή μυοδιηθητικό όγκο. Σπανιότερα παρατηρούνται οσφυϊκός πόνος (είτε από οπισθοπεριτοναϊκές λεμφαδενικές μεταστάσεις είτε από ουρητηρική απόφραξη), οίδημα κάτω άκρων και ψηλαφητή μάζα (σε τοπικά προχωρημένη νόσο). Η απώλεια βάρους χαρακτηρίζει τα τελικά στάδια της νόσου.

Ο ρόλος του **υπερηχογραφήματος** στην διάγνωση είναι πολύ σημαντικός. Οι όγκοι της ουροδόχου κύστης αναγνωρίζονται σαν υπερηχογενείς μάζες που προβάλλουν στον αυλό. Το διακοιλιακό υπερηχογράφημα έχει ευαισθησία 90-92% στην διάγνωση του καρκίνου της κύστης¹⁰. Ακόμη μεγαλύτερη ευαισθησία έχουν το διορθικό (91%) και το διουρηθρικό (96-100%) υπερηχογράφημα, που όμως δεν χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημερινή κλινική πράξη.

Η **ενδοφλέβια ουρογραφία (IVU)** αποτελεί σημαντική εξέταση στην εκτίμηση ενός ασθενή με αιματουρία. Η αξία της έγκειται κυρίως στη μελέτη του ανώτερου ουροποιητικού, όπου μπορεί να αποκαλύψει κάποια απόφραξη ή ένα έλλειμμα σκιαγράφησης, που μπορεί να οφείλονται σε όγκο¹⁰. Η ευαισθησία της είναι μικρότερη από του υπερηχογραφήματος στην διάγνωση των όγκων της κύστης. Έλλειμμα σκιαγράφησης ή ασύμμετρη διάταση της κύστης αποτελούν εικόνες ενδεικτικές επιφανειακού ή μυοδιηθητικού όγκου αντίστοιχα. Η εξέταση μπορεί ίσως να παραληφθεί σε ασθενείς με πρωτοεμφανιζόμενο όγκο της κύστης,

επειδή η πιθανότητα ύπαρξης όγκου στο ανώτερο ουροποιητικό είναι πολύ μικρή. Έχει όμως απόλυτη ένδειξη σε περιπτώσεις υποτροπής, γιατί τα νεοπλασμάτα της νεφρικής πυέλου και του ουρητήρα μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη όγκου στη κύστη σε ποσοστό 30-50%.

Στα περισσότερα κέντρα χρησιμοποιείται εναλλακτικά η **αξονική ουρογραφία (CT Urography)**¹. Ειδικά σε μυοδιηθητικούς όγκους της κύστης και όγκους του ανώτερου ουροποιητικού η μέθοδος πλεονεκτεί, έναντι της ενδοφλέβιας πυελογραφίας, διότι δίνει επιπρόσθετες πληροφορίες για την κατάσταση των λεμφαδένων και των γειτονικών οργάνων. Στον αντίποδα υπάρχει το μειονέκτημα, έναντι της IVU, της έκθεσης του ασθενή σε υψηλότερη ακτινοβολία.

Το carcinoma in situ δεν διαγιγνώσκεται με καμία από τις προαναφερθείσες απεικονιστικές μεθόδους¹.

Τα τελευταία χρόνια έχει ενταθεί η **ερευνητική προσπάθεια** ανεύρεσης ουσιών, που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστοι διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, διότι ο μη μυοδιηθητικός καρκίνος παρουσιάζει υψηλά ποσοστά υποτροπής (60-85%) και μόνο 40% των ασθενών τηρούν αυστηρά το προτεινόμενο, από τις κατευθυντήριες οδηγίες, πρόγραμμα κυστεοσκοπήσεων στα 3 χρόνια παρακολούθησης. Η έρευνα λοιπόν έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αρκετών μη επεμβατικών δοκιμασιών, με υλικό-στόχο τα ούρα, για την αναγνώριση ή τη μέτρηση διαφόρων μορίων, προκειμένου να γίνει δυνατή η ανίχνευση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Από τους δυνητικούς αυτούς καρκινικούς δείκτες άλλοι εξαφανίστηκαν μετά τα αρχικά υποσχόμενα αποτελέσματα και άλλοι είναι διαθέσιμοι πλέον στην αγορά. Πάντως, για να χαρακτηριστεί κάποιο βιολογικό προϊόν ως "δείκτης καρκίνου ουροδόχου κύστης" θα πρέπει να έχει όλα τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: i) υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, ii) ικανότητα αναγνώρισης των καλά διαφοροποιημένων νεοπλασμάτων, iii) ανεξαρτησία από υποκειμενικούς

παράγοντες (π.χ. ερευνητής-παρατηρητής), iv) σύντομη και απλή διεκπεραίωση (δοκιμασία "πάγκου"), v) απλή και εύκολη συλλογή του προς εξέταση υλικού, vi) αναπαραγώγιμα αποτελέσματα και vii) χαμηλό κόστος. Οι δείκτες θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν την διαγνωστική κυστεοσκόπηση ή τουλάχιστον να αυξήσουν το διάστημα μεταξύ δύο κυστεοσκοπήσεων, ελαττώνοντας την ταλαιπωρία για τους ασθενείς και το κόστος για τα συστήματα υγείας. Έως σήμερα δεν έχουμε στην διάθεσή μας τον ιδανικό αυτόν δείκτη.

Η κυτταρολογική εξέταση των ούρων αποτελεί χρήσιμη διαγνωστική μέθοδο, κυρίως για την ανίχνευση εκείνων των όγκων που δεν αναγνωρίζονται κυστεοσκοπικά. Βασίζεται στο γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μειωμένη συνοχή και, κατά συνέπεια, αποφολιδώνονται εύκολα, με αποτέλεσμα να αναγνωρίζονται στα ούρα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους (αυξημένο μέγεθος πυρήνα, εμφανές πυρήνιο, αθροίσεις χρωματίνης και άλλα). Η διαγνωστική ικανότητα της εξέτασης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Για νεοπλάσματα βαθμού κακοήθειας 1, 2 και 3 η μέθοδος έχει ευασθησία 17% (6-40%), 51% (35-60%) και 90% (80-98%) αντίστοιχα⁴⁹. Οι όγκοι χαμηλής κακοήθειας (καλά διαφοροποιημένοι), των οποίων τα κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με ισχυρούς δεσμούς και αποφολιδώνονται λιγότερο, ανιχνεύονται σε σαφώς μικρότερο ποσοστό από τους υψηλής κακοήθειας (ελάχιστα διαφοροποιημένοι). Η διαγνωστική αξία της εξέτασης αυξάνεται στους μεγάλους όγκους, επειδή αυτοί έχουν μεγάλο αριθμό αποφολιδούμενων νεοπλασματικών κυττάρων. Σημειώνεται, ότι η παραμονή των κυττάρων στα ούρα για μεγάλο χρονικό διάστημα οδηγεί στην εκφύλιση τους και επομένως τα πρώτα πρωινά ούρα δεν αποτελούν κατάλληλο δείγμα. Η διαγνωστική ακρίβεια της κυτταρολογικής ούρων αυξάνεται από 65% σε 87% όταν εξετασθούν τρία δείγματα ούρων αντί ενός¹⁰. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα αναφέρονται σε ποσοστό 1-12%

και οφείλονται σε λιθίαση, φλεγμονή, τραύμα ή εξέλκωση του βλεννογόνου της κύστης, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ενδοκυστικές εγχύσεις BCG κ.λπ. Η αναζήτηση νεοπλασματικών κυττάρων μεταβατικού επιθηλίου μπορεί να γίνει και σε εκπλύματα της κύστης και μάλιστα πιο αξιόπιστα. Αυτό συμβαίνει, γιατί οι μηχανικοί χειρισμοί που γίνονται για την ανάκτηση των εκπλυμάτων οδηγούν σε αποφολίδωση περισσότερων κυττάρων, διευκολύνοντας την αναγνώριση των νεοπλασματικών. Συμπερασματικά, η χρήση της κυτταρολογικής περιορίζεται στη διάγνωση αλλά και παρακολούθηση υψηλού βαθμού κακοήθειας νεοπλασμάτων από μεταβατικό επιθήλιο και ιδίως των *in situ* που αναπτύσσονται στην ουροδόχο κύστη, την προστατική ουρήθρα και το ανώτερο ουροποιητικό σύστημα.

Η **κυτταρομετρία ροής** μετράει το ποσό του DNA που περιέχεται σ' έναν κυτταρικό πληθυσμό. Έτσι υπολογίζεται η πλοειδικότητα αυτού του πληθυσμού και η πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των κυττάρων του. Τα κύτταρα βάφονται με μία χρωστική, που συνδέεται με το DNA του πυρήνα. Η πρόσπτωση ακτίνας laser έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με την περιεχόμενη ποσότητα DNA των κυττάρων. Τα φυσιολογικά κύτταρα περιέχουν σταθερό ποσό DNA στον πυρήνα τους, επειδή έχουν ορισμένο αριθμό χρωματοσωμάτων, είναι δηλαδή ευπλοειδικά. Αντίθετα, τα κύτταρα ενός όγκου μπορεί να είναι είτε ευπλοειδικά (διπλοειδικά ή πολυπλοειδικά) είτε ανευπλοειδικά (όταν περιέχουν παθολογικό αριθμό χρωματοσωμάτων και άρα και μη κανονικό ποσό DNA). Αντίστοιχα και οι όγκοι χαρακτηρίζονται ως διπλοειδικοί, πολυπλοειδικοί και ανευπλοειδικοί. Η πλοειδικότητα ενός όγκου σχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τόσο με την πιθανότητα υποτροπής και εξέλιξής του όσο και με την επιβίωση¹⁰. Οι διπλοειδικοί όγκοι είναι συνήθως καλά διαφοροποιημένοι και έχουν καλή πρόγνωση, σε αντίθεση με τους ανευπλοειδικούς που έχουν συνήθως

δυσμενή. Οι τετραπλοειδικοί όγκοι έχουν συνήθως ενδιάμεση πρόγνωση. Με την κυτταρομετρία ροής μπορεί επίσης να υπολογιστεί το ποσό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση σύνθεσης DNA (φάση S) του κυτταρικού κύκλου, η οποία αντανακλά την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα του κυττάρου. Σε φυσιολογικό κυτταρικό πληθυσμό τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση S δεν ξεπερνούν το 10%. Η ανεύρεση τέτοιων κυττάρων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10 ή 15% υποδηλώνει την ύπαρξη καρκίνου, αν και πολλές φορές το εύρημα αυτό δεν καταδεικνύεται, ακόμη και σε επιθετικούς όγκους. Η διαγνωστική ακρίβεια της κυτταρομετρίας ροής είναι περίπου 80%. Το ποσοστό αυτό είναι χαμηλότερο σε όγκους χαμηλής κακοήθειας, που συνήθως είναι διπλοειδικοί και συχνά δίνουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Αντίθετα, οι υψηλής κακοήθειας όγκοι, συμπεριλαμβανομένου του carcinoma in situ, ανιχνεύονται σε ποσοστό 80-90%. Επομένως, η χρησιμότητα της μεθόδου έγκειται στην ανίχνευση αυτών των όγκων.

Η **ανάλυση εικόνας** ανιχνεύει την πλοειδικότητα των κυττάρων ενός όγκου. Θεωρείται πιο ευαίσθητη διαγνωστική μέθοδος, κυρίως για την ανίχνευση όγκων που περιέχουν μικρό αριθμό ανευπλοειδικών κυττάρων ανάμεσα σε μεγάλο αριθμό διπλοειδικών. Η κυτταρομετρία ροής ανιχνεύει τέτοιους όγκους ως διπλοειδικούς (χαμηλή ευαισθησία). Πρόκειται ουσιαστικά για ένα σύστημα αυτόματης ανάλυσης εικόνας, που αξιολογεί το σχήμα του πυρήνα και την περιεκτικότητα σε DNA των κυττάρων σε δείγματα μετά από πλύσεις της κύστεως, με σκοπό είτε την αναγνώριση νεοπλασμάτων είτε την διάκριση ατόμων χαμηλού ή υψηλού κινδύνου για καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Το κάθε κύτταρο εξετάζεται χωριστά και υπολογίζεται η πλοειδικότητά του ανεξάρτητα από τα άλλα, με τελικό αποτέλεσμα την ακριβέστερη διάγνωση ενός όγκου. Σε δύο μελέτες η μέθοδος παρουσίασε ευαισθησία 45,4% και 59% και ειδικότητα 70,6% και 93%^{50,51}. Μειονεκτήματα της μεθόδου

είναι η ανάγκη για την ύπαρξη μεγάλου αριθμού κυττάρων στα υπό εξέταση δείγματα, το ακριβό σύστημα ανάλυσης, η ανάγκη εξειδικευμένου τεχνικού προσωπικού και η χαμηλή ευαισθησία στους καλά διαφοροποιημένους όγκους.

Το **BTA test** είναι μία δοκιμασία συγκόλλησης (latex agglutination assay), με την οποία είναι δυνατή η ποιοτική ανίχνευση στα ούρα του λεγόμενου “αντιγόνου του όγκου” (Bladder Tumor Antigen), που αποτελείται από συμπλέγματα της βασικής μεμβράνης του ουροθηλίου. Κατά τη φάση προσκόλλησης ενός όγκου στην βασική μεμβράνη, τα νεοπλασματικά κύτταρα εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα (κολλαγενάσες και λαμινάσες), που διασπούν την βασική μεμβράνη σε πολυπεπτιδικά συμπλέγματα (μοριακού βάρους 16-165 kD), που απεκκρίνονται στα ούρα και μπορούν να ανιχνευθούν με το BTA test . Οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η μέθοδος έχει υψηλή ειδικότητα (96%), αλλά χαμηλή ευαισθησία (40%). Πολυκεντρικές μελέτες έδειξαν ότι η μέθοδος είναι ανώτερη της κυτταρολογικής ούρων. Οι προσπάθειες βελτίωσης του test οδήγησαν στη δημιουργία των **BTA stat** και **BTA TRAK**, που ανιχνεύουν ένα διαφορετικό αντιγόνο, την πρωτεΐνη human complement factor-H-related protein (hCFHrp), που έχει παρόμοια δομή και λειτουργία με τον human complement factor-H, αλλά παράγεται μόνο από τα καρκινικά κύτταρα¹⁰. Το BTA stat είναι ποιοτική, ενώ το BTA TRAK είναι ποσοτική μέθοδος (ELISA) ανίχνευσης αυτής της πρωτεΐνης. Η ευαισθησία του BTA stat κυμαίνεται από 29-83% και η ειδικότητά του από 56-86%¹. Οι αντίστοιχες τιμές για το BTA TRAK είναι 53-91% και 28-83%¹. Οι καλά διαφοροποιημένοι όγκοι ανιχνεύονται πάλι σε σαφώς μικρότερο ποσοστό.

Οι **Nuclear Matrix Proteins (NMPs)** είναι τμήματα του σκελετού του πυρήνα του κυττάρου, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA καθώς και στην ρύθμιση έκφρασης διαφόρων γονιδίων. Η NMP22, ειδικότερα, είναι μία “μιτωτική”

πρωτεΐνη, που εμπλέκεται στην ρύθμιση της σωστής κατανομής των χρωματίδων στα θυγατρικά κύτταρα. Βρίσκεται τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα του ουροθηλίου, αλλά η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή της είναι τουλάχιστον 25πλάσια στα δεύτερα. Με τον κυτταρικό θάνατο, η πρωτεΐνη απελευθερώνεται στα ούρα, όπου μπορεί να ανιχνευθεί ποσοτικά με ELISA. Η χρησιμότητά της ως καρκινικού δείκτη έχει μελετηθεί σε διάφορες ερευνητικές εργασίες. Σε πολυκεντρική μελέτη στις ΗΠΑ βρέθηκε ότι η NMP22 είναι ισχυρός προγνωστικός δείκτης υποτροπής ενός όγκου μετά τη διουρηθρική εκτομή με ευαισθησία 100% για τους μυοδιηθητικούς και 70% για τους επιφανειακούς όγκους. Η NMP22 ως διαγνωστικός δείκτης παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία (47-100%), που είναι ανώτερη της κυτταρολογικής ούρων, και ειδικότητα (55-98%)¹. Συνοπτικά, είναι εύκολη τεχνικά δοκιμασία, ικανή να ανιχνεύσει και όγκους καλής διαφοροποίησης, με καλύτερη, συνολικά, ευαισθησία από την κυτταρολογική και αποδεκτή ειδικότητα και μη επηρεαζόμενη από τη μετεγχειρητική ενδοκυστική BCG θεραπεία⁵².

Τα τελομερή είναι βραχέα άκρα των χρωμοσωμάτων που υφίστανται αποδόμηση με την πρόοδο της ηλικίας των σωματικών κυττάρων. Σε κάθε γύρο αντιγραφής το κύτταρο χάνει τελομερή, με τελικό αποτέλεσμα τη χρωμοσωμική αστάθεια και τον κυτταρικό θάνατο. Η **τελομεράση** είναι ένα ένζυμο που βοηθά στην διατήρηση του μήκους των τελομερών. Η κύρια δράση της είναι να προσθέτει εξαμερή TTAGGG στα τελομερή, αποτρέποντας έτσι την κυτταρική γήρανση. Η δραστηριότητα της τελομεράσης είναι φυσιολογικά παρούσα μόνο στα γεννητικά κύτταρα. Εκφράζεται επίσης σε καρκινικά κύτταρα. Εφόσον η τελομεράση δεν παρουσιάζει καμία σχεδόν δραστηριότητα στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα, συνεπώς η μέτρηση της δραστηριότητάς της σε αποφολιδωμένα κύτταρα των ούρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ευαίσθητος δείκτης ανίχνευσης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Αρχικά, για το σκοπό αυτό

χρησιμοποιήθηκε το TRAP-assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol) που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Οι μελέτες δείχνουν ότι η δραστηριότητα της τελομεράσης έχει υψηλότερη ευαισθησία (70-100%) σε όλες τις κατηγορίες βαθμού κακοήθειας των νεοπλασμάτων, αλλά χαμηλότερη ειδικότητα (60-70%) συγκριτικά με την κυτταρολογική εξέταση⁵³⁻⁵⁹. Επίσης, φάνηκε ότι σε ασθενείς με καλοήθεις παθήσεις του ουροποιητικού δεν ανιχνεύεται δραστηριότητα τελομεράσης. Η ανάγκη χρήσης τεχνικών PCR, το γεγονός ότι η PCR απαιτεί την ύπαρξη ζωντανών κυττάρων, διότι προσδιορίζει την δραστηριότητα⁶⁰⁻⁶³, και όχι την παρουσία, της τελομεράσης και το γεγονός ότι η ηλικία και η φλεγμονή επηρεάζουν το αποτέλεσμα⁴⁹ είναι παράγοντες που περιορίζουν την δυνατότητα ευρείας καθημερινής κλινικής εφαρμογής. Εναλλακτικά έχει χρησιμοποιηθεί η ανίχνευση υποομάδων της ανθρώπινης RNA-τελομεράσης (h-RT) και της ανθρώπινης αντίστροφης τρανσκριπτάσης της τελομεράσης (h-TERT). Η μέθοδος της h-RT παρουσιάζει ευαισθησία 80% και ειδικότητα 95%⁶⁴.

Άλλοι υποσχόμενοι δείκτες είναι οι κυτοκερατίνες, τα microsatellites (Microsatellite Analysis/MSA), το υαλουρονικό οξύ (Hyaluronic Acid/HA) και η υαλουρονιδάση (Hyaluronic Acidase/HA-ase), το BLC4 και ο εντοπισμός χρωμοσωμικών ανωμαλιών ή αντιγόνων των κυττάρων του όγκου.

Οι **κυτοκερατίνες** είναι συνδεδετικά διάμεσα ινίδια, που εντοπίζονται σε όλα τα επιθήλια και υφίστανται διαρκή μετασχηματισμό κατά την επιθηλιακή διαφοροποίηση. Υπάρχουν 20 γνωστές κυτοκερατίνες. Κάθε επιθήλιο έχει γνωστό ειδικό συνδυασμό τέτοιων ινιδίων. Κατά την ανάπτυξη ενός όγκου διαταράσσεται η αρχιτεκτονική του πάσχοντος επιθηλίου, με αποτέλεσμα κυτοκερατίνες να καταστρέφονται και τμήματά τους να διαχέονται στο αίμα ή στα ούρα (στην περίπτωση του καρκίνου

της ουροδόχου κύστεως), οπότε και είναι δυνατή η ανίχνευση τους σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Επομένως, η χρήση των κυτοκερατινών ως καρκινικών δεικτών είναι εφικτή. Ειδικά, **η κυτοκερατίνη 19** ανιχνεύεται με τη μέθοδο CYFRA 21-1 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay/ELISA μέθοδος) και **οι κυτοκερατίνες 8 και 18** με τη μέθοδο Urinary Bladder Cancer/UBC (Immunoradiometric Assay/IRMA μέθοδος). Οι κυτοκερατίνες παρουσιάζουν ευαισθησία 12-88% και ειδικότητα 73-95%¹. Η CYFRA 21-1 μοιάζει να είναι η καλύτερη, έχει όμως απογοητευτική επίδοση σε χαμηλού σταδίου όγκους και το αποτέλεσμά της επηρεάζεται από καλοήθεις καταστάσεις και τυχόν ενδοκυτταρικές εγχύσεις⁵².

Τα **microsatellites** είναι υψηλά, πολυμορφικά και μικροσκοπικά τμήματα DNA, που βρίσκονται συχνά στο ανθρώπινο γονιδίωμα⁵². Διαφοροποιήσεις αυτών σε αποφολιδωμένα κύτταρα ανιχνεύονται με PCR (συνδυασμός 15-20 δεικτών από περιοχή με υψηλό ποσοστό LOH). Η **MSA** έχει δείξει ευαισθησία 58-92% και ειδικότητα 73-100%¹. Το υψηλό κόστος είναι σημαντικό πρόβλημα.

Το **υαλουρονικό οξύ (HA)** είναι μία μη-θειούχα γλυκοζαμινογλυκάνη, που προάγει τη συγκόλληση των κυττάρων του όγκου και τη μετανάστευση τους. Βρίσκεται στους φυσιολογικούς ιστούς και τα σωματικά υγρά. Μπορεί να συνδέεται με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, όπως ο CD44, και ως εκ τούτου μπορεί να ρυθμίζει τη συγκόλληση, πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των κυττάρων. Αυξάνεται στον καρκίνο του παχέως εντέρου, του μαστού, του πνεύμονα και στον όγκο του Wilms⁶⁵. Έχει βρεθεί ακόμα ότι τμήματα του HA προάγουν την αγγειογένεση. Σε καλλιέργειες κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως επάγει την παραγωγή HA από τους ινοβλάστες. Η **υαλουρονιδάση (HA-ase)** είναι μια ενδογλυκοσιδάση που διασπά το HA. Το μεγαλύτερο μέρος της στον

άνθρωπο παράγεται από το ήπαρ. Η έκκριση HA-ase από τα καρκινικά κύτταρα της κύστεως έχει συσχετισθεί με μεγαλύτερη διηθητική δυνατότητα του όγκου⁶⁶. Τα επίπεδα της HAase είναι αυξημένα στα ούρα ασθενών με όγκους G2 και G3⁶⁷. Η δοκιμασία υαλουρονικού οξέως-υαλουρονιδάσης⁶⁸ (**HA-HAase test**) αποτελείται από δύο παρόμοια αντιδραστήρια τύπου ELISA, ένα για το HA και ένα για την HA-ase. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η συνολική ευαισθησία φθάνει το 83-94% και η ειδικότητα το 77-93%. Φαίνεται να είναι πολύ υποσχόμενος δείκτης με καλή ευαισθησία στην ανίχνευση όγκων κάθε σταδίου και κάθε βαθμού διαφοροποίησης⁵². Χρήζει συνεπώς περαιτέρω διερεύνησης.

Το **BLCA-4** είναι πρωτεΐνη της πυρηνικής θεμέλιας ουσίας, που εκφράζεται ειδικά στον καρκίνο της κύστης⁵² και προσδιορίζεται με ELISA. Οι αρχικές μελέτες δείχνουν ευαισθησία 89-96% και ειδικότητα 95-100%.

Ο **εντοπισμός χρωμοσωμικών ανωμαλιών** (πολυσωμία 3, 7, 17 και απώλεια του 9p21 / UroVysion) με μέθοδο φθορίζοντος in situ υβριδισμού (Fluorescence In Situ Hybridisation / FISH) παρουσιάζει ευαισθησία 30-86% και ειδικότητα 63-95%¹. Η ευαισθησία αυξάνει σε όγκους χαμηλής διαφοροποίησης και όγκους υψηλού σταδίου (83-97%) και αγγίζει το 100% για το carcinoma in situ⁵². Η περιορισμένη απόδοση σε όγκους καλά διαφοροποιημένους ή χαμηλού σταδίου δεν είναι σταθερή. Πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα χρήσης και σε ασθενείς που έλαβαν ενδοκυστεκτική ανοσοθεραπεία με BCG, ενώ στα μειονεκτήματα αναφέρονται η απαραίτητη ύπαρξη εργαστηρίου, η καμπύλη εκμάθησης και το κόστος⁵².

Ο **εντοπισμός αντιγόνων των κυττάρων του όγκου** με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (ανοσοκυτταρολογία / Immunocytology) έχει επίσης υποσχόμενες επιδόσεις (ευαισθησία: 52-100%, ειδικότητα: 63-75%)¹. Υστερεί συγκριτικά με την κλασική κυτταρολογική εξέταση ούρων

ως προς την ειδικότητα, εμφανίζει ζήτημα αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, λόγω της μεταβλητότητας του παρατηρητή και απαιτεί σταθερό ποιοτικό έλεγχο⁵².

Τα προσεχή χρόνια, όταν θα έχουν ολοκληρωθεί οι μελέτες αξιολόγησης, είναι πιθανό κάποιοι από τους δείκτες αυτούς να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην διάγνωση και παρακολούθηση του καρκινώματος της ουροδόχου κύστης. Επί του παρόντος, η κυστεοσκόπηση παραμένει ο χρυσός κανόνας στην παρακολούθηση του καρκίνου της κύστης, αφού ιδανικός καρκινικός δείκτης δεν υφίσταται.

Η **κυστεοσκόπηση** (εύκαμπτη, κατά προτίμηση, ή ημιάκαμπτη, με χρήση πηγής λευκού φωτός) είναι επεμβατική πράξη και αποτελεί την τελική εξέταση με την οποία οριστικοποιείται η διάγνωση είτε της πρωτοπαθούς νόσου είτε της υποτροπής. Συνήθως, οι επιφανειακοί όγκοι αναγνωρίζονται ως μισχωτές, θηλωματώδεις προσεκβολές του τοιχώματος της κύστης. Αντιθέτως, οι μυοδιηθητικοί είναι, κατά πλειοψηφία, συμπαγείς όγκοι με ευρεία βάση. Τονίζεται ότι τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά ενός όγκου δεν μπορούν να διαχωρίσουν ακριβώς αυτούς τους δύο τύπους νεοπλασματος. Αν η ύπαρξη όγκου εντός της κύστης έχει τεκμηριωθεί νωρίτερα με κάποια από τις απεικονιστικές μεθόδους που προαναφέρθηκαν, τότε η διαγνωστική κυστεοσκόπηση μπορεί να παραληφθεί, μιας και αποτελεί κομμάτι της επακόλουθης διουρηθρικής εκτομής του όγκου¹. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η Αμερικανική Ουρολογική Εταιρεία (American Urological Association/AUA) προτείνει στις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες της την υποχρεωτική κυστεοσκόπηση όλων όσων παρουσιάζουν ανώδυνη μικροσκοπική αιματουρία και έχουν ηλικία > 35 ετών⁶⁹.

5. Επέκταση των όγκων του ουροθηλίου

Τα κύτταρα του φυσιολογικού ουροθηλίου συνδέονται τόσο μεταξύ τους όσο και με την υποκείμενη βασική μεμβράνη με ισχυρούς δεσμούς. Η σύνδεση αυτή επιτυγχάνεται με τα λεγόμενα **μόρια διακυττάριας προσκόλλησης (Intracellular Adhesion Molecules/ICAM)**, όπως είναι **οι καντχερίνες και οι ιντεγκρίνες**. Οι ουσίες αυτές φαίνεται ότι σχετίζονται με την διακυττάρια επικοινωνία και την έκφραση και λειτουργία των υποδοχέων διαφόρων αυξητικών παραγόντων. Ταυτόχρονα, αποτελούν φραγμό στην επέκταση των όγκων του ουροθηλίου και τη διήθηση των υποκειμένων στρωμάτων. Ίσως κατά την διαδικασία επέκτασης των όγκων να διαταράσσεται η λειτουργία των ICAM, με συνέπεια να διευκολύνεται η διήθηση του στρώματος.

Οι **καντχερίνες** (cadherins/calcium dependent adhesion) είναι μία τάξη τύπου-1 διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών. Διατηρούν την προσκόλληση μεταξύ γειτονικών κυττάρων, διασφαλίζοντας ότι τα κύτταρα στους ιστούς παραμένουν ενωμένα. Η λειτουργία τους εξαρτάται από τα ιόντα ασβεστίου (Ca^{+2}). Γενικώς αλληλεπιδρούν με τον κυτταροσκελετό σχηματίζοντας διακυττάριας συνδέσεις προσκόλλησης και συμμετέχοντας στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Η απώλεια της διακυττάριας προσκόλλησης είναι η βάση της μεταστατικής διασποράς των καρκινικών κυττάρων. Αναφέρεται ότι το 62% των μη μυοδιηθητικών καρκίνων της κύστης παρουσιάζουν θετική χρώση για την επιθηλιακή καντερίνη (E-cadherin), ενώ το 75% των μυοδιηθητικών όγκων δείχνει ασυνήθιστη έκφραση της E-cadherin. Η επιθηλιακή καντερίνη σχετίζεται με το στάδιο της νόσου αλλά όχι με τον βαθμό κακοήθειας⁷⁰.

Οι **ιντεγκρίνες** (integrins) είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που μεσολαβούν την προσκόλληση ενός κυττάρου με το περιβάλλον του,

όπως με ένα άλλο κύτταρο ή με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (extracellular matrix/ECM). Επίσης, έχουν ρόλο στην αγωγή σημάτων (μεταφέρουν ενδοκυτταρικά πληροφορίες για τη χημική σύνθεση και τη μηχανική κατάσταση της ECM) και την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής μορφής και της κυτταρικής κινητικότητας. Εντοπίζονται μόνο στην βασική μεμβράνη επιφανείας της βασικής κυτταρικής στιβάδας του ουροθηλίου. Εν τούτοις τα καρκινώματα της κύστεως συχνά εκφράζουν ιντεγκρίνες διάχυτα στον νεοπλασματικό ιστό. Οι α-2 και β-4 ιντεγκρίνες εκφράζονται έντονα στο υγιές ουροθήλιο και στο 29-35% των επιφανειακών όγκων. Στους μυοδιηθητικούς όγκους παρατηρείται ασυνήθιστη έκφραση των α-2, β-4 ιντεγκρινών στο 81% και 100% των περιπτώσεων αντίστοιχα⁷⁰. Ένα άλλο μέλος της οικογένειας των ιντεγκρινών, η αββ4 υπερεκφράζεται στον καρκίνο της κύστεως και η ένταση της έκφρασής της συνδέεται με την επιβίωση των ασθενών⁷¹.

Η τοπική επέκταση ενός όγκου διευκολύνεται από ποικιλία βιολογικών μηχανισμών, όπως η αγγειογένεση, η λύση του στρώματος από πρωτεολυτικά ένζυμα, η αύξηση του πολλαπλασιασμού και της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων και η διαφυγή τους από τους τοπικούς μηχανισμούς ανοσίας.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η αγγειογένεση παρατηρείται σπάνια και μόνο σε ιδιαίτερες περιπτώσεις (επούλωση τραυμάτων, κυκλικές αλλαγές ενδομητρίου, πλακούντας). Η διαδικασία προάγεται από ειδικούς αγγειογενετικούς παράγοντες που εκκρίνονται είτε από τον ίδιο τον όγκο είτε από διάφορα μαστοκύτταρα ή μακροφάγα που τον διηθούν μετά από χημειοτακτική έλξη είτε ακόμη και από το εξωκυττάριο στρώμα. Τέτοιοι παράγοντες είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Gactor/VEGF), ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (Fibroblast Growth Factor/FGF), τόσο ο βασικός (bFGF) όσο

και ο όξινος (aFGF), ο προερχόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor/PDECGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF) και άλλοι. Υπό την επίδραση των αυξητικών παραγόντων τα γειτονικά αγγεία διατείνονται και τα κύτταρα του ενδοθηλίου τους μεταναστεύουν προς το αγγειογενετικό ερέθισμα. Η μετακίνηση διευκολύνεται τόσο από την καταστροφή της βασικής τους μεμβράνης όσο και από τη λύση του γειτονικού στρώματος από πρωτεολυτικά ένζυμα, που παράγονται από τους ινοβλάστες (όπως η κολλαγενάση τύπου IV). Ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων και η διαμόρφωση νέων τριχοειδών.

Συνοπτικά θα αναφερθούμε στους επαγωγείς της αγγειογένεσης που έχουν μελετηθεί στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης:

• **Παράγοντες επαγόμενοι από την υποξία (Hypoxia-inducible factors) 1 και 2 (HIF-1/HIF-2)**

Ο HIF-1 είναι μία πρωτεΐνη που δεσμεύει DNA προκαλώντας θετική ρύθμιση σε γειτονικά γονίδια. Αποτελείται από δύο υπομονάδες την α και β ⁷². Η αποδόμηση της HIF-1 α συνήθως διεγείρεται από το προϊόν του γονιδίου von Hippel-Lindau (pVHL), η απώλεια του οποίου έχει αποδειχθεί στο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού και παίζει σημαντικότατο ρόλο στην παθογένεση του VHL συνδρόμου. Ο HIF-2 α είναι ομόλογος κατά 48% του HIF-1 α , αλλά η λειτουργία του στη βιολογία του όγκου δεν είναι απολύτως κατανοητή⁷³. Σε μελέτες με κυτταρικές σειρές καρκίνου της ουροδόχου κύστεως έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα της HIF-1 α στην υποξία με αντίστοιχη αύξηση της επαγωγής του VEGF. Η υπερρύθμιση της HIF-1 α χάθηκε σε κάποιες κυτταρικές σειρές επιφανειακού καρκίνου, αλλά διατηρήθηκε στις διηθητικές κυτταρικές σειρές. Κυτταρικές σειρές διηθητικού καρκινώματος παρουσιάζουν επίσης αυξημένα επίπεδα της HIF-2 α ⁷⁴. Η

καρβονική ανυδράση IX (Carbonic Anhydrase IX/CAIX) είναι ένα από τα γονίδια που επάγονται από τον HIF. Η πρωτεΐνη της CAIX χρησιμεύει στην διατήρηση όξινου εξωκυττάρου pH και επάγεται ισχυρότατα από την υποξία⁷⁵. Χρώση με CAIX επιφανειακών και μυοδιηθητικών καρκινωμάτων μεταβατικού επιθηλίου αντιστοιχεί στενά σε περιοχές υποξίας⁷⁶. Σε πρόσφατη μελέτη η υπερέκφραση του HIF-1α στον καρκίνο της κύστεως φαίνεται να συνδέεται με ιδιαίτερα επιθετικό φαινότυπο, υποδεικνύοντας αυξημένο κίνδυνο προόδου της νόσου σε επιφανειακά καρκινώματα⁷⁷.

• Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)

Ο VEGF αναγνωρίστηκε το 1989 ως ένας ιδιαίτερα ειδικός επαγωγέας πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων⁷⁸. Ένα από τα αποτελέσματα της δράσης του στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι να επάγει τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης και ιστικού τύπου, τους υποδοχείς τους και τις κολλαγενάσες τύπου IV. Αυτό οδηγεί σε αποδόμηση της ECM, επιτρέποντας τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την διήθηση. Επίσης, αυξάνει την διαβατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα αύξηση του διάμεσου πλασμινογόνου και πλασμίνης. Δεν εντοπίζεται μόνο σε νεοπλασματικά κύτταρα. Απελευθερώνεται και από διάφορα φυσιολογικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων και των λεμφοκυττάρων. Η έκφραση του VEGF στους επιφανειακούς όγκους είναι 4πλάσια από εκείνη στους μυοδιηθητικούς και 10πλάσια απ' ό τι στη φυσιολογική κύστη⁷⁹. Αντίθετα, η έκφραση του PDECGF στους μυοδιηθητικούς καρκίνους είναι 33 φορές μεγαλύτερη απ' ό τι στους επιφανειακούς όγκους και 260 φορές μεγαλύτερη απ' ό τι στη φυσιολογική κύστη⁸⁰. Αυτό δείχνει, ότι πιθανώς υπάρχουν διαφορετικοί αγγειογενετικοί δρόμοι για τον επιφανειακό και το μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Μία πιθανή εξήγηση της

παρουσίας χαμηλότερων επιπέδων mRNA του VEGF σε μυοδιηθητικούς όγκους είναι η υπερρύθμιση του VEGF που παρατηρείται στην αυλική επιφάνεια των επιφανειακών όγκων, που είναι πιθανότερο να είναι περισσότερο υποξικοί. Φαίνεται επομένως ότι η θηλωματώδης φύση των επιφανειακών όγκων συμβάλλει στην εμφάνιση ικανής αγγείωσης στον πυρήνα τους και υποξίας στην περιφέρεια.

Έχει υποτεθεί η μετά τη μεταγραφή ρύθμιση του VEGF από τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης-4e (eIF-4e). Αυτός είναι μια πρωτεΐνη που οδηγεί σε αυξημένη mRNA μεταγραφή και η παρουσία του σε επιφανειακούς όγκους της ουροδόχου κύστεως έχει συνδεθεί με πτωχή πρόγνωση⁸¹. Επιπλέον, μεταλλάξεις του p53 έχουν συνδεθεί με αυξημένη ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF, αυξημένη πυκνότητα των αγγείων και χειρότερη πρόγνωση⁸².

Σε μία μελέτη μετρήθηκε η συγκέντρωση του VEGF στα ούρα. Στη μελέτη συμμετείχαν ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, ασθενείς με ιστορικό καρκίνου κύστεως, αλλά αρνητική κυστεοσκόπηση, και ασθενείς με άλλες κακοήθειες ή καλοήθειες παθήσεις του ουροποιητικού. Τα υψηλότερα επίπεδα βρέθηκαν στα ούρα των ασθενών με καρκίνο της κύστεως. Η συγκέντρωση του VEGF συσχετιζόταν με τον βαθμό κακοήθειας της νόσου, αλλά όχι και με το στάδιο⁸³. Επίσης, τα επίπεδα του VEGF συνδέονταν με τη συχνότητα των υποτροπών. Τέλος, οι ερευνητές διαπίστωσαν αυξημένη έκφραση του VEGF στα ελεύθερα νόσου δείγματα ουροθηλίου ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστεως σε σχέση με το ουροθήλιο 7 πτωματικών ελεύθερων νόσου δοτών και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο VEGF ενέχεται στην παθογένεση των υποτροπών του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως⁸³.

• **Οξειδωτικό (Oxidative) stress και Φωσφορυλάση της Θυμιδίνης (Thymidine Phosphorylase/TP) ή προερχόμενος από τα αιμοπετάλια**

αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor/PDECGF)

Η φωσφορυλάση της θυμιδίνης (TP) ή προερχόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor/PDECGF) είναι ένα ενδοκυττάριο ένζυμο υπεύθυνο για την διάσπαση της θυμιδίνης σε θυμίνη και 2-δεοξυ-D-ριβόζη-φωσφορικό άλας. Είναι επαγωγέας αγγειογένεσης, που διεγείρει ισχυρά την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και επάγει τη χημειοταξία. Δρα αποκλειστικά σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυξημένα επίπεδα του PDECGF έχουν αναφερθεί στον καρκίνο του μαστού, του εντέρου και των ωοθηκών⁷⁶. Σε κυτταρική σειρά επιφανειακού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως διαπιστώθηκε ότι ο PDECGF επάγει την παραγωγή ιντερλευκίνης-8 (IL-8), VEGF και μεταλλοπρωτεϊνάσης της θεμέλιας ουσίας-1 (Matrix Metalloproteinase-1/MMP-1). Ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα mRNA του PDECGF έχουν βρεθεί στο μυοδιηθητικό καρκίνωμα της κύστεως συγκριτικά με το επιφανειακό (33 φορές) και το φυσιολογικό ουροθήλιο (260 φορές)⁸⁰. Οι Arima et al. βρήκαν ότι αυξημένη έκφραση του PDECGF σε ασθενείς με επιφανειακό καρκίνο συνοδεύεται από πτωχή πρόγνωση, επειδή συνδέεται με ελαττωμένο χρονικό διάστημα ως την πρώτη υποτροπή και ελαττωμένη επιβίωση⁸⁴. Σε in vitro πειράματα φάνηκε ότι ο PDECGF μετατρέπει το φαινότυπο των καρκινικών κυτταρικών σειρών από επιφανειακό σε διηθητικό. Η αποδόμηση του νεκρωτικού κυτταρικού DNA μέσα σε υποξικούς συμπαγείς όγκους προκαλεί αύξηση των επιπέδων της θυμιδίνης. Επομένως, μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα των συμπαγών όγκων να ανθίστανται στην υποξία, να διηθούν και τελικά να μεθίστανται⁷⁶.

- **Ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες**

Στους ινοβλαστικούς αυξητικούς παράγοντες που ενέχονται στην αγγειογενετική διαδικασία στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως περιλαμβάνονται ο **όξινος ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (aFGF)** και ο **βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF)**.

Ο bFGF, που είναι ο ισχυρότερος αγγειογενετικός παράγοντας που έχει αναγνωριστεί μέχρι σήμερα, βρίσκεται συνδεδεμένος με τις θειϊκές ηπαράνες του εξωκυτταρίου στρώματος και απελευθερώνεται υπό την επίδραση διαφόρων ηπαρινασών ή πρωτεασών¹⁰.

Τα κύτταρα του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως παρουσία υψηλών επιπέδων aFGF δείχνουν μια αύξηση της κινητικότητας *in vitro*, υψηλότερο μεταστατικό δυναμικό και αλλαγές στη μορφολογία⁸⁵. Οι Chopin et al. έδειξαν 10πλάσια αύξηση του aFGF σε ιστό από καρκίνωμα μεταβατικού επιθηλίου σε σχέση με ιστό από φυσιολογικό ενδοθήλιο⁸⁶. Σε μία πειραματική μελέτη με καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, που επιμολύνθηκαν με aFGFcDNA, τα επιμολυσμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε έναν καλά αγγειούμενο και ταχύτατα αναπτυσσόμενο όγκο σε αντίθεση με όμοια μη επιμολυσμένα κύτταρα⁸⁷. Τέλος, άλλες μελέτες βρήκαν σημαντικά αυξημένη τιμή των aFGF και bFGF στα ούρα ασθενών με νεόπλασμα της κύστης¹⁰.

- **Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF)**

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ παρουσίας του υποδοχέα του EGF (EGF-receptor/EGF-r) και αυξημένου βαθμού κακοήθειας και αυξημένου σταδίου της νόσου⁸³. Η συγκέντρωση του EGF στα ούρα των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως δεν είναι αυξημένη, πιθανά λόγω της αυξημένης δέσμευσης με τον EGR-r⁸⁸ και δε φαίνεται να έχει προγνωστική σημασία.

- **Παράγοντας Scatter (Scatter Factor/SF)**

Ο παράγοντας Scatter, γνωστός και ως ηπατοξυτταρικός αυξητικός παράγοντας, είναι μία κυτοκίνη του στρώματος. Είναι δυνητικά αγγειογενετική. Ο SF βρέθηκε αυξημένος στο στρώμα και τα ούρα ασθενών με υψηλού βαθμού κακοήθειας νεοπλάσμα της ουροδόχου κύστεως⁸⁹.

- **Προϊόντα αποδόμησης υαλουρονικού οξέως**

Τα προϊόντα αποδόμησης του υαλουρονικού οξέως (Hyaluronic Acid/HA) μέσω της δράσης του ενζύμου της υαλουρονιδάσης (Hyaluronic Acidase/HA-ase) είναι αγγειογενετικοί παράγοντες. Έχουν ανιχνευθεί σε υψηλότερη συγκέντρωση στα ούρα ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως σε σχέση με τη συγκέντρωση στα ούρα υγιών μαρτύρων⁹⁰. Το HA-HAase test φαίνεται να είναι ιδιαίτερα υποσχόμενη δοκιμασία για την ανίχνευση του καρκίνου της κύστεως, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 4.

- **Μιντκίνη (Midkine/MDK) ή αυξητικός των νευριτών παράγοντας-2 (Neurite Growth-Promoting Factor 2/NEGF2)**

Η μιντκίνη είναι ένας αυξητικός παράγοντας που δεσμεύει την ηπαρίνη. Η αγγειογενετική του ικανότητα έχει αποδειχθεί σε μελέτες με πειραματόζωα. Έχει βρεθεί ότι εκφράζεται 4 φορές περισσότερο στα νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστης συγκριτικά με το υγιές ουροθήλιο και ότι η υπερέκφραση της συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση⁹¹. Έχει αναφερθεί επίσης ότι η υπερέκφραση του γονιδίου της προκαλεί αύξηση της αγγειογενετικής δραστηριότητας των κυττάρων, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του κακόηθους δυναμικού των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστεως, τα οποία όμως δείχνουν και μεγαλύτερη αντίκριση στη θεραπευτική χορήγηση του αντιαγγειογενετικού παράγοντα TNP-470⁹².

- **Αγγειογενίνη (Angiogenin)**

Η αγγειογενίνη είναι αγγειογενετικός παράγοντας και σχετίζεται με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Εκφράζεται 5 φορές περισσότερο στον καρκινικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό μεταβατικό επιθήλιο και παρατηρείται μέτρια αύξηση των επιπέδων της στον ορό των ασθενών σε σύγκριση με εκείνα των υγιών μαρτύρων⁹³.

- **Μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας (Matrix Metalloproteinases/MMPs)**

Βασική προϋπόθεση ανάπτυξης μετάστασης των νεοπλασμάτων είναι η ικανότητά τους να καταστρέφουν την ECM και να διηθούν τους γειτονικούς ιστούς. Σημαντικότερη θέση στην διαδικασία αυτή κατέχουν οι MMPs. Οι MMPs είναι ένζυμα προκαλούν πρωτεολυτική διάσπαση πολλών στοιχείων της ECM. Δρουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα περισσότερο έμμεσα, επάγοντας άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, παρά άμεσα. Περισσότερο έχουν μελετηθεί οι MMP-2 και MMP-9. Η παρουσία τους στο νεοπλασματικό ιστό έχει συσχετιστεί με αυξημένο βαθμό κακοήθειας, αυξημένο στάδιο νόσου^{94,95} και χειρότερη πρόγνωση⁹⁶. Τα επίπεδα της MMP-9 στα ούρα ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έχουν βρεθεί αυξημένα⁹⁴. Τα επίπεδα της MMP-1 στα ούρα σχετίζονται με το στάδιο και το βαθμό κακοήθειας⁸⁸. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι ο EGF διεγείρει την απελευθέρωση των MMPs⁸⁸, δείχνοντας έτσι την αλληλεπίδραση μεταξύ των αγγειογενετικών παραγόντων.

Έχουν αναγνωρισθεί ενδογενείς αναστολείς των MMPs, οι λεγόμενοι ιστικοί αναστολείς των MMPs (Tissue Inhibitors of MMP, TIMP). Οι TIMP έχουν πιθανώς συμπληρωματική λειτουργία και ενέχονται στην παραγωγή ενός ελεγχόμενου μικροπεριβάλλοντος πρωτεόλυσης, διότι η υπερβολική πρωτεόλυση μπορεί να προκαλέσει

εκτεταμένη ιστική καταστροφή και να εμποδίσει την ανάπτυξη. Αυξημένα επίπεδα του TIMP-1 έχουν βρεθεί στον ορό ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως και σχετίζονται με νόσο υψηλού σταδίου⁹⁷. Δεδομένα για τον ρόλο του TIMP-2 στον καρκίνο της κύστεως δείχνουν ότι η ανοσοϊστοχημική έκφρασή του στο στρώμα ή τα καρκινικά κύτταρα σχετίζεται με την έκφραση του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 και της πρωτεΐνης p53 και η έκφρασή του μόνο στο στρώμα συνδέεται με δυσμενέστερη πρόγνωση⁹⁸.

• Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου

Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου είναι ένζυμα που συμμετέχουν στην αποδόμηση της ECM και της βασικής μεμβράνης. Ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (tissue Plasminogen Activator/tPA) και ο τύπου ουροκινάσης ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (urokinase-type Plasminogen Activator/u-PA) είναι οι δύο πιο κοινοί τύποι αυτών των ενζύμων. Ο tPA συνδέεται με διπλάσιο κίνδυνο υποτροπής του καρκίνου της κύστεως μετά διουρηθρική εκτομή⁹⁹. Η υψηλή έκφραση του u-PA σε επιφανειακούς όγκους έχει συσχετιστεί με πτωχότερη επιβίωση¹⁰⁰.

Η καλύτερη κατανόηση της αγγειογένεσης θέτει τις βάσεις για την εφαρμογή της αντι-αγγειογένεσης ως θεραπείας στον καρκίνο της κύστης. Πράγματι, παρεμβαίνοντας σε διάφορα επίπεδα της αγγειογενετικής διαδικασίας, είναι δυνατόν να αναστείλουμε την επέκταση ενός όγκου. Το ίδιο μπορεί να επιτευχθεί και με τη χορήγηση ουσιών που είναι γνωστοί αναστολείς της αγγειογένεσης, όπως η αγγειοστατίνη και η θρομβοσπονδίνη.

Από τους καλύτερα μελετημένους αναστολείς της αγγειογένεσης στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως είναι η θρομβοσπονδίνη-1 (Thrombospondin-1/TSP-1), που είναι γλυκοπρωτεΐνη με MW 430 kDa. Σε πειραματικές μελέτες οι Campbell et al. έδειξαν ότι το φυσιολογικό

ουροθήλιο δεν προκαλεί αγγειογενετική απάντηση, λόγω της ανασταλτικής δράσης της TSP-1. Συμπέραναν λοιπόν ότι η TSP-1 αποτελεί τον κυρίαρχο αντιαγγειογενετικό παράγοντα της νεοαγγείωσης¹⁰¹. Ελαττωμένα επίπεδα της TSP-1 έχουν συνδεθεί με αυξημένη πυκνότητα αγγείων, αυξημένες μεταλλάξεις του p53, αυξημένη συχνότητα υποτροπής και ελαττωμένη επιβίωση¹⁰². Οι Goddard et al. έδειξαν με ανοσοϊστοχημεία ότι η ελαττωμένη έκφραση της TSP-1 στον επιφανειακό καρκίνο της κύστεως, κατά την εμφάνιση της νόσου, αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την ανάπτυξη μυοδιηθητικής ή μεταστατικής νόσου¹⁰³.

Η συστηματική χορήγηση του αναστολέα αγγειογένεσης TNP-470 προκαλεί μείωση της ανάπτυξης του όγκου και καταστολή της νεοπλασματικής αγγειογένεσης¹⁰⁴. Στην πιο πρόσφατη μελέτη με χρήση πειραματόζων διαπιστώθηκε ότι ο θεραπευτικός συνδυασμός TNP-470 και σισπλατίνης στον καρκίνο της κύστεως προκαλεί σημαντική μείωση της αγγειακής πυκνότητας του όγκου, όμως η χορήγηση του TNP-470 δε φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στην δράση της σισπλατίνης με βάση την απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό¹⁰⁵.

Άλλοι παράγοντες, όπως η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη, έχουν αποδείξει τις αντιαγγειογενετικές τους ιδιότητες, με αποτέλεσμα υποστροφή των όγκων σε πειραματικές μελέτες. Η επίδρασή τους στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως δεν έχει δοκιμαστεί. Εν τούτοις, είναι λογικό να αναμένεται ανάλογη συμπεριφορά. Σε πρόσφατη πειραματική μελέτη βρέθηκε ότι η ανθρώπινη ενδοστατίνη μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως μέσω ρύθμισης του VEGF, των MMPs και των TIMP αυτών και επάγοντας επίσης την απόπτωση¹⁰⁶. Ο πραγματικός ρόλος των ουσιών αυτών στην νεοαγγειογένεση στην ουροδόχο κύστη είναι χρήσιμο να αποκαλυφθεί.

Η τοπική επέκταση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης στο 60% των περιπτώσεων γίνεται προς τον υποκείμενο μυ. Σημειώνεται ότι όγκος που αναπτύσσεται σε εκκόλπωμα μπορεί να διηθήσει απευθείας γειτονικά όργανα, επειδή το επίκτητο εκκόλπωμα στερείται μυϊκού τοιχώματος.

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης μεθίσταται λεμφογενώς στους επιχώριους λεμφαδένες της πυέλου (έσω και έξω λαγόνιους, κοινούς λαγόνιους, θυροειδείς, προϊερούς). Η λεμφογενής διασπορά είναι ανεξάρτητη της αιματογενούς.

Θεωρητικά ο καρκίνος της κύστης μπορεί να επεκταθεί αιματογενώς σε οποιοδήποτε όργανο. Στην πράξη μεθίσταται κυρίως στο ήπαρ, τους πνεύμονες, τα οστά και τα επινεφρίδια. Σπανιότερα μεθίσταται στον εγκέφαλο. Η ύπαρξη αιματογενών ή λεμφογενών μεταστάσεων κατά την διάγνωση είναι δυσμενής προγνωστικός παράγοντας.

Το καρκίνωμα της κύστης θεωρείται ότι έχει την τάση να εμφυτεύεται σε τραχείες επιφάνειες, όπως κοιλιακά τραύματα ή θέσεις του ουροθηλίου που έχουν υποστεί λύση της συνεχείας (όπως για παράδειγμα, λόγω διεγχειρητικής χρήσης του ηλεκτροτόμου). Σήμερα ενδείκνυται η λήψη προφυλακτικών μέτρων, ώστε να αποφεύγεται η διασπορά. Έχει αποδειχτεί ότι η πρόωμη, μετεγχειρητική, ενδοκυστική έγχυση χημειοθεραπευτικού καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα που κυκλοφορούν μέσα στην κύστη μετά την διουρηθρική εκτομή και επιπρόσθετα προκαλεί χημειοεκτομή υπολειπόμενων καρκινικών κυττάρων στην περιοχή εκτομής του αρχικού όγκου και χημειοεκτομή μικρών όγκων που διέφυγαν της εκτομής¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Μελέτη της Ευρωπαϊκής Οργάνωσης για την Διάγνωση και Θεραπεία του Καρκίνου (EORTC) έδειξε ότι η εφάπαξ ενδοκυστική έγχυση επιρουμπικίνης ή μιτομυκίνης C (Mitomycin C/MMC), κατά την άμεση μετεγχειρητική περίοδο (το πρώτο βωρο μετά την διουρηθρική εκτομή του όγκου), μπορεί να μειώσει τον ρυθμό υποτροπής της νόσου κατά 11.7% συγκριτικά με την διουρηθρική εκτομή χωρίς συνοδό

μετεγχειρητική έγχυση¹¹¹. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην αδρανοποίηση από το φάρμακο των υπολειμματικών καρκινικών κυττάρων, που θα μπορούσαν να εμφυτευθούν στις θέσεις του τραυματισμένου ουροθηλίου. Παρόμοια αποτελεσματικότητα καταγράφηκε και σε δύο μεταγενέστερες μελέτες^{112,113}. Ο χρησιμοποιούμενος χημειοθεραπευτικός παράγοντας μπορεί να είναι είτε επιρουμπικίνη είτε MMC είτε δοξορουβικίνη, μιας και όλες αυτές οι ουσίες έχουν δείξει ευεργετική επίδραση, χωρίς όμως να έχουν συγκριθεί μεταξύ τους ως προς την αποτελεσματικότητα¹¹¹.

6. Ιστολογία - Παθολογική ανατομική των όγκων της κύστης

Ο φυσιολογικός βλεννογόνος της ουροδόχου κύστης αποτελείται από μεταβατικό επιθήλιο (ουροθήλιο) και χόριο. Το ουροθήλιο απαρτίζεται από 3-7 σειρές κυττάρων, αναλόγως του βαθμού διάτασης της κύστης. Το κατώτερο στρώμα αποτελείται από τα βασικά κύτταρα, που άπτονται της βασικής μεμβράνης και έχουν μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Το κορυφαίο τμήμα αποτελείται από μεγάλα εξαγωνικά κύτταρα (umbrella-like), που είναι ενωμένα μεταξύ τους με ισχυρούς δεσμούς, σχηματίζοντας ένα φραγμό μεταξύ των ούρων και του υγρού των ιστών. Στην δημιουργία του φραγμού συμβάλλει και ένα στρώμα από γλυκοζαμινογλυκάνες (GAG), που καλύπτει το στρώμα των κορυφαίων κυττάρων. Τα κύτταρα του ουροθηλίου εμφανίζουν πολικότητα, υπό την έννοια του κάθετου προσανατολισμού των πυρήνων τους προς τη βασική μεμβράνη. Η απώλεια της πολικότητας των κυττάρων σχετίζεται με δυσπλασία ή καρκίνωμα *in situ* (carcinoma *in situ* / CIS). Ο υποβλεννογόνιος χιτώνας περιέχει μία στιβάδα μυϊκών ινών, την υποβλεννογόνια μυϊκή στιβάδα, η διάκριση της οποίας από τον αληθή μυϊκό χιτώνα είναι ιδιαίτερα σημαντική στην ορθή παθολογοανατομική σταδιοποίηση του καρκίνου της κύστης.

Με τον όρο **υπερπλασία** υποδηλώνεται η αύξηση των κυτταρικών στρωμάτων του ουροθηλίου χωρίς αλλαγή στην αρχιτεκτονική του ή απώλεια προσανατολισμού των κυττάρων. Σύμφωνα με την ταξινόμηση του 1998, η υπερπλασία διακρίνεται σε επίπεδη και θηλώδη. Η θηλώδης υπερπλασία έχει συσχετιστεί με προηγούμενη ή ταυτόχρονη ανάπτυξη θηλώδους όγκου στην ουροδόχο κύστη. Η ακριβής σχέση μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων παραμένει αδιευκρίνιστη.

Ατυπία είναι η επιθηλιακή υπερπλασία που συνοδεύεται από ανωμαλίες του πυρήνα ή και διαταραχή στην διάταξη των κορυφαίων κυττάρων.

Ατυπία του ουροθηλίου σε θέσεις παρακείμενες ενός επιφανειακού όγκου αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης μυοδιηθητικού όγκου στο μέλλον κατά 35-40%.

Η **δυσπλασία** χαρακτηρίζεται από ιστολογική εικόνα που είναι ενδιάμεση μεταξύ του φυσιολογικού και του carcinoma in situ, δηλαδή οι πυρήνες είναι μεγάλοι και στρογγυλοί και τα κύτταρα εμφανίζουν απώλεια προσανατολισμού. Δεν υπάρχουν όμως, πολλές μιτώσεις και ο αριθμός των κυτταρικών στρωμάτων του ουροθηλίου είναι φυσιολογικός. Στο παρελθόν, είχε προταθεί η διάκριση της δυσπλασίας σε ήπια, μέτρια και σοβαρή. Το 1998 όμως, στην ταξινόμηση της WHO/ISUP τέτοια διάκριση δεν προβλέπεται. Στην ταξινόμηση αυτή ως δυσπλασία και CIS ορίζονται αντίστοιχα η χαμηλής και υψηλής κακοήθειας ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία. Η συνύπαρξη δυσπλασίας σε παρακείμενες θέσεις ενός όγκου συσχετίζεται με αυξημένο ρυθμό υποτροπής της νόσου. Εξάλλου συνοδός δυσπλασία ή και CIS αυξάνει την πιθανότητα μετατροπής ενός επιφανειακού όγκου σε μυοδιηθητικό.

Ως **μετάπλαση** ορίζεται η κατάσταση, όπου παρατηρείται κατά τόπους αλλαγή του ουροθηλίου από μεταβατικό σε πλακώδες (πλακώδης μετάπλαση) ή αδενικό (αδενική μετάπλαση). Πλακώδης μετάπλαση παρατηρείται φυσιολογικά στην περιοχή του κυστικού τριγώνου αρκετών γυναικών και στο 10% των υγιών ανδρών. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η πλακώδης μετάπλαση μπορεί να είναι προκαρκινωματώδης βλάβη, αλλά φαίνεται ότι όταν δεν συνοδεύεται από ατυπία ή εκσεσημασμένη κερατινοποίηση αποτελεί καλοήγη κατάσταση και στα δύο φύλα.

Οι **φωλέες von Brunn** είναι νησίδια επιθηλιακών κυττάρων στο χόριο, πιθανώς λόγω πολλαπλασιασμού και διεύδυσης των βασικών κυττάρων προς τα κάτω. Τα νησίδια μπορεί να συνδέονται με το ουροθήλιο (καταδύσεις) ή να είναι αποσπασμένα απ' αυτό. Απαντώνται φυσιολογικά στο 89% των ουροδόχων κύστεων υγιών ατόμων, ενώ

υπάρχουν ως φυσιολογική παραλλαγή του επιθηλίου και στην προστατική ουρήθρα. Η κλινική τους σημασία είναι άγνωστη.

Η **κυστική κυστίτιδα** μοιάζει με τις φωλεές του von Brunn με τη διαφορά ότι το επιθήλιο στο κέντρο της φωλεάς έχει υποστεί ηωσινοφιλική νέκρωση. Παρατηρείται στο 60% των φυσιολογικών ουροδόχων κύστεων. Είναι τελείως διαφορετική από τη **λεμφοξιδιακή κυστίτιδα**, η οποία χαρακτηρίζεται από την υποβλεννογόνια ανάπτυξη λεμφοξιδίων, λόγω χρόνιας μικροβιακής φλεγμονής.

Η **αδενική κυστίτιδα** είναι ίδια με την κυστική, με την διαφορά ότι εδώ συνυπάρχει και αδενική μετάπλαση του μεταβατικού επιθηλίου. Θεωρείται πρόδρομη μορφή του αδενοκαρκινώματος της κύστης (προκαρκινική κατάσταση).

Το **νεφρογενές αδένωμα** είναι μία σπάνια ιστολογική αλλοίωση, που απαντάται συχνότερα σε άνδρες, που αποτελείται από στοιχεία που προσομοιάζουν με νεφρικά αθροιστικά σωληνάρια. Απουσιάζει η πυρηνική ατυπία ή η έντονη μιτωτική δραστηριότητα. Θεωρείται είδος μετάπλασης του ουροθηλίου ως απάντηση στην επίδραση διαφόρων παραγόντων.

Με τον όρο **λευκοπλακία** ορίζεται η υπερπαραγωγή κερατίνης ουσίας σε μία εντοπισμένη περιοχή ενός βλεννογόνου. Στην περιοχή αυτή παρατηρείται όλη η εξέλιξη των πλακωδών κυττάρων έως του σχηματισμού κερατίνης, όπως ακριβώς συμβαίνει στην επιδερμίδα. Θεωρείται προκαρκινωματώδης κατάσταση, διότι είναι πιθανό να εξελιχθεί σε καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου στο 20% των ασθενών. Είναι αρκετά συχνή σε περιπτώσεις λιθίασης, σχιστοσωμιάσης, μόνιμων καθετήρων ή χρόνιας φλεγμονής της κύστης.

Το **μετεγχειρητικό ατρακτοκυτταρικό οζίδιο ή ψευδοσάρκωμα** είναι βλάβη, που μπορεί να αναπτυχθεί αρκετούς μήνες μετά από κάποιο χειρισμό στο κατώτερο ουροποιητικό ή και μετά από μία φλεγμονή,

εξαιτίας αντιδραστικού πολλαπλασιασμού μεσεγχυματογενών κυττάρων του υποστρώματος. Πολύ συχνά συγχέεται με κακοήθη νεοπλάσματα του συνδετικού ιστού (π.χ. λειομυοσαρκώματα).

Το **ανάστροφο θήλωμα** είναι καλοήθης βλάβη, η οποία συχνά αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα χρόνιας φλεγμονής ή υποκυστικού κωλύματος. Εντοπίζεται συνήθως στο τρίγωνο ή τον αυχένα της κύστης. Δημιουργείται όταν η ανάπτυξη ενός θηλώματος γίνεται προς το ινομώδες στρώμα της κύστης. Το υπερκείμενο ουροθήλιο είναι φυσιολογικό κι έτσι το ανάστροφο θήλωμα φαίνεται, μακροσκοπικά, σα μικρό επηρμένο οζίδιο. Η κακοήθης εξαλλαγή είναι σπάνια.

Η συντριπτική πλειοψηφία των όγκων της ουροδόχου κύστης είναι επιθηλιακής προέλευσης και η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ, World Health Organisation/WHO) συνιστά την κατάταξή τους στους εξής 4 βασικούς ιστολογικούς τύπους:

- i) καρκίνωμα μεταβατικού επιθηλίου (Transitional Cell Carcinoma / TCC),
- ii) καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου (Squamous Cell Carcinoma / SCC),
- iii) αδenoκαρκίνωμα (Adenocarcinoma) και
- iv) αδιαφοροποίητο καρκίνωμα.

Σ' αυτούς πρέπει να προστεθούν οι μικτές μορφές καθώς επίσης και μία σειρά σπάνιων όγκων επιθηλιακής και μη προέλευσης.

Το **καρκίνωμα μεταβατικού επιθηλίου (Transitional Cell Carcinoma/TCC)**, συνιστά περισσότερο από το 90% των καρκινωμάτων της κύστης. Διαφέρει από το φυσιολογικό ουροθήλιο στα ακόλουθα σημεία: i) έχει αυξημένο αριθμό στιβάδων με θηλώδη πτύχωση του βλεννογόνου, ii) υπάρχει απώλεια προσανατολισμού των κυττάρων, iii) παρατηρείται διαταραχή της φυσιολογικής κυτταρικής ωρίμανσης από τα βασικά προς τα κορυφαία στρώματα, iv) υπάρχουν γιγαντοκύτταρα, v) αναγνωρίζεται στα κύτταρα διαταραχή της σχέσης

πυρήνα/πρωτοπλάσματος και εμφανές πυρήνιο και, τέλος, vi) παρατηρούνται συσσωματώματα (clumping) χρωματίνης και αυξημένος αριθμός μιτώσεων. Έχει πολλά πρότυπα ανάπτυξης (θηλώδες, μη θηλώδες, μικτό και ενδοεπιθηλιακό/in situ). Συνήθως οι μη θηλώδεις όγκοι είναι και μυοδιηθητικοί. Η συνύπαρξη εστιών μετάπλασης δεν είναι σπάνια καθώς στο 20% και το 7% των περιπτώσεων ανευρίσκονται εστίες πλακώδους και αδενικής μετάπλασης αντίστοιχα.

Για την **εκτίμηση του ιστολογικού βαθμού κακοήθειας (Grade)** των όγκων του ουροθηλίου προτάθηκαν στο παρελθόν πολλά συστήματα. Μέχρι και την δεκαετία του 1960 τα χρησιμοποιούμενα συστήματα ταξινομούσαν τους όγκους σε 4 βαθμούς κακοήθειας.

Το **1973 η WHO** πρότεινε ένα σύστημα ταξινόμησης σύμφωνα με το οποίο οι όγκοι της ουροδόχου κύστης διακρίνονται, ανάλογα με το βαθμό της αναπλαστικότητας των κυττάρων τους, σε θηλώματα και σε καρκινώματα (Grades I, II και III).

Ως **ουροθηλιακό θήλωμα (urothelial papilloma)** ορίζεται ένας μονήρης θηλωματώδης όγκος που περιέχει όχι περισσότερα από 7 στρώματα κυττάρων φυσιολογικού μεταβατικού επιθηλίου, που καλύπτουν έναν ινοαγγειακό μίσχο. Σύμφωνα μ' αυτόν τον ορισμό τα θηλώματα είναι καλοήθεις βλάβες. Υπάρχει όμως μεγάλη αμφισβήτηση κατά πόσον υφίστανται στην πραγματικότητα ή είναι (τουλάχιστον μερικά εξ αυτών) TCC Grade I. Από κλινικής άποψης αυτό δεν φαίνεται να έχει ιδιαίτερη σημασία, γιατί και τα καρκινώματα Grade I, ιδίως τα μονήρη, έχουν συνήθως καλοήθη συμπεριφορά.

Grade I (καλώς διαφοροποιημένα) TCC είναι αυτά των οποίων η ιστολογική εικόνα δεν διαφέρει πολύ από του φυσιολογικού ουροθηλίου. Υπάρχει αύξηση του αριθμού των κυτταρικών στιβάδων (>7), μικρή διαταραχή της σχέσης πυρήνα/ πρωτοπλάσματος, σπάνιες μιτώσεις και

μικρή διαταραχή της ωρίμανσης των κυττάρων από τα βασικά προς τα κορυφαία στρώματα.

Στα **Grade II (μετρίως διαφοροποιημένα) TCC** ο ινοαγγειακός μίσχος είναι παχύτερος και η διαταραχή της ωρίμανσης από τη βάση προς την κορυφή είναι εντονότερη. Σημειώνεται απώλεια προσανατολισμού των κυττάρων, μεγαλύτερη αύξηση της σχέσης πυρήνα/πρωτοπλάσματος, εμφανές πυρήνιο και περισσότερες μιτώσεις.

Στα **Grade III (κακώς διαφοροποιημένα) TCC** δεν υπάρχει διαφοροποίηση των κυττάρων από τη βασική μεμβράνη προς το κορυφαίο στρώμα, υπάρχουν πολλές μιτώσεις και η διαταραχή της σχέσης πυρήνα/πρωτοπλάσματος είναι μέγιστη.

Ταξινόμηση WHO 1973	
Ουροθηλιακό θήλωμα	
Grade I	Καλή διαφοροποίηση
Grade II	Μέτρια διαφοροποίηση
Grade III	Πτωχή διαφοροποίηση

Η παραπάνω κατάταξη βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά και περιέχει έντονο το στοιχείο της υποκειμενικότητας (παρατηρητής/εξεταστής). Ο χαρακτηρισμός του grade είναι ευκολότερος στις περιπτώσεις Grade I και Grade III, επειδή τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων βρίσκονται στις "ακραίες" μορφές τους, είτε προς την καλοήθη είτε προς την κακοήθη πλευρά. Αυτό δεν ισχύει για τα καρκινώματα ενδιάμεσης κακοήθειας (Grade II), που αποτελούν

ετερογενή ομάδα. Επειδή παρατηρήθηκε ότι χρησιμοποιώντας το σύστημα ταξινόμησης τριών βαθμών κακοήθειας οι περισσότεροι όγκοι ταξινομούνταν ως Grade II, η WHO/ISUP³ πρότεινε το 1998 μία νέα ταξινόμηση των όγκων της κύστης, που δημοσιεύτηκε το **2004 από την WHO**. Η κύρια συμβολή της είναι μία αναλυτική ιστολογική περιγραφή των βαθμών κακοήθειας, που χρησιμοποιεί ειδικά κυτταρολογικά και αρχιτεκτονικά κριτήρια. Η ταξινόμηση του 2004 διακρίνει τις βλάβες σε: **i) επίπεδες βλάβες (flat lesions)**, που περιλαμβάνουν την ουροθηλιακή υπερπλασία, την αντιδραστική ουροθηλιακή ατυπία, την ατυπία αγνώστου σημαντικότητας, την δυσπλασία και το carcinoma in situ και **ii) θηλώδεις βλάβες (papillary lesions)**, που διακρίνονται σε ουροθηλιακό θήλωμα, θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού (Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential/PUNLMP), χαμηλού βαθμού ουροθηλιακό καρκίνωμα και υψηλού βαθμού ουροθηλιακό καρκίνωμα. Τα PUNLMP ορίζονται ως βλάβες που δεν έχουν κυτταρολογικά χαρακτηριστικά κακοήθειας, αλλά αποτελούνται από φυσιολογικά ουροθηλιακά κύτταρα σε θηλώδη σχηματισμό. Έχουν αμελητέο κίνδυνο προόδου, όμως δεν είναι τελείως καλοήθη και έχουν την τάση να υποτροπιάζουν. Ο ενδιάμεσος βαθμός κακοήθειας (Grade II) της ταξινόμησης του 1973, που αποτέλεσε αντικείμενο αμφισβήτησης, έχει εξαληφθεί.

³ ISUP: International Society of Urological Pathology

Ταξινόμηση WHO 2004	
Επίπεδες βλάβες	Θηλώδεις βλάβες
Υπερπλασία	Ουροθηλιακό θήλωμα
Αντιδραστική ατυπία	Θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού
Ατυπία άγνωστης σημαντικότητας	Χαμηλού βαθμού θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα
Ουροθηλιακή δυσπλασία	Υψηλού βαθμού θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα
Ουροθηλιακό carcinoma in situ	

Οι δημοσιευμένες συγκρίσεις δεν έχουν επιβεβαιώσει ότι η ταξινόμηση του 2004 έχει καλύτερη επαναληψιμότητα^{114,115} από την αντίστοιχη του 1973. Επίσης, η προγνωστική αξία και των δύο είναι επιβεβαιωμένη. Οι προσπάθειες απόδειξης της υπεροχής της μίας ή της άλλης έχουν οδηγήσει πάντως σε αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Η πλειοψηφία των κλινικών δοκιμών σε μη μυοδιηθητικούς όγκους έχει χρησιμοποιήσει την ταξινόμηση του 1973. Έως ότου η ταξινόμηση του 2004 εκτιμηθεί με περισσότερες προοπτικές μελέτες υπάρχει σύσταση χρησιμοποίησης και των δύο ταξινομήσεων.

Ανεξάρτητα ταξινόμησης, η πλειοψηφία των συγγραφέων δέχεται ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση του Grade τόσο με το στάδιο του όγκου όσο και με τη συχνότητα εξέλιξής του σε μυοδιηθητικό. Πρόοδος (εξέλιξη) της νόσου εμφανίζεται στο 10-20% των ασθενών με όγκο Grade I, στο 19-37% των ασθενών με όγκο Grade II και στο 33-64% των ασθενών με όγκο Grade III. Ισχυρή συσχέτιση φαίνεται ότι υπάρχει και μεταξύ Grade και επιβίωσης. Σε όγκους χαμηλής κακοήθειας (low Grade) η 10ετής επιβίωση

φθάνει μέχρι και 98%, σε αντίθεση με το 35% που παρατηρείται σε όγκους υψηλής κακοήθειας (high Grade).

Το **καρκίνωμα in situ (carcinoma in situ/CIS) ματαβατικού επιθηλίου** είναι ένα επίπεδο, χαμηλής διαφοροποίησης (high Grade) και μη μυοδιηθητικό καρκίνωμα, που εντοπίζεται στο επιθήλιο (flat carcinoma). Έχει απρόβλεπτη συμπεριφορά, αλλά με μεγάλο διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό. Θεωρείται η αρχική φάση στην εξέλιξη του μυοδιηθητικού καρκίνου. Μπορεί να εμφανίζεται μόνο του ή να συνοδεύει πρωτοπαθείς ή υποτροπιάζοντες όγκους της ουροδόχου κύστης οποιουδήποτε βαθμού κακοήθειας. Εντοπίζεται κυρίως στο τρίγωνο και τη βάση της κύστης, γύρω από τα ουρητηρικά στόμια και στον αυχένα και σπανιότερα στο θόλο. Πολλές φορές CIS ανευρίσκεται και στις φωλεές του von Brunn κι αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, διότι οι ενδοκυστικά χορηγούμενοι αντινεοπλασματικοί παράγοντες αδυνατούν να εισέλθουν στις θέσεις αυτές και να επηρεάσουν αποτελεσματικά τη βλάβη. Ουροθηλιακό CIS αναφέρεται και σε θέσεις έξω από την ουροδόχο κύστη, όπως για παράδειγμα στην ουρήθρα. Το CIS σπανίως συνοδεύει καλώς διαφοροποιημένους (low Grade) όγκους. Αντίθετα, είναι συχνό σε όγκους χαμηλής διαφοροποίησης (high Grade). Οι μυοδιηθητικοί όγκοι συνοδεύονται από CIS σε ποσοστό μέχρι και 75%. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι ένα μεγάλο ποσοστό των CIS παρουσιάζει, όπως και οι μυοδιηθητικοί όγκοι, εξάλειψη ή μετάλλαξη του p53, γεγονός που συνιστά ένδειξη ότι το CIS αποτελεί πρόδρομη μορφή μυοδιηθητικού καρκίνου. Η πιθανότητα μετατροπής ενός CIS σε μυοδιηθητικό καρκίνο υπολογίζεται κατά μέσο όρο στο 54%. Η ίδια πιθανότητα είναι σημαντικά μεγαλύτερη στο διάχυτο CIS (78%) συγκριτικά με το εστιακό (8%).

Το CIS εκδηλώνεται κλινικά κυρίως με ερεθιστικά φαινόμενα (συχνουρία, νυκτουρία, επιτακτική ούρηση), που μπορεί να οδηγήσουν την διαγνωστική σκέψη προς άλλες παθήσεις. Το 25% των ασθενών περίπου

είναι τελείως ασυμπτωματικοί. Όταν υπάρχουν έντονα ερεθιστικά φαινόμενα, το διάστημα μέχρι την εξέλιξη σε μυοδιηθητική νόσο είναι μικρότερο. Η κυστεοσκόπηση μπορεί να αποκαλύψει ερυθρότητα ή αυξημένη αγγείωση του βλεννογόνου, οίδηματώδεις περιοχές σαν βελούδο, πολλές φορές όμως είναι αρνητική για ευρήματα. Η κυτταρολογική εξέταση των ούρων αποβαίνει θετική στις πλείστες των περιπτώσεων (90% σε πολυεστιακό CIS). Αυτό οφείλεται στη μειωμένη συνοχή μεταξύ των κυττάρων που οδηγεί σε ευκολότερη αποφολίδωσή τους. Η κυτταρομετρία ροής εκπλυμάτων της ουροδόχου κύστης είναι ακόμη πιο ευαίσθητη ως δοκιμασία και αποβαίνει θετική μέχρι και στο 97% των περιπτώσεων.

Το **καρκίνωμα πλακώδους επιθηλίου (Squamous Cell Carcinoma/SCC)** είναι μια επιθετική μορφή καρκίνου της κύστης με κακή πρόγνωση. Συνήθως, κατά την διάγνωση η νόσος είναι προχωρημένη. Η συχνότητά του είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε χώρες όπου ενδημεί η σχιστοσωμίαση, όπως η Αίγυπτος. Ενώ στις χώρες της Δυτικής Ευρώπης και τις ΗΠΑ οι περιπτώσεις SCC αποτελούν το 1-10% όλων των όγκων της κύστης, στην Αίγυπτο το ποσοστό αυτό ανέρχεται σε 75%. Ο χρόνιος ερεθισμός της κύστης (από μόνιμο ουροκαθετήρα, λιθίαση, υποτροπιάζουσες ουρολοιμώξεις) έχει επίσης ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη SCC. Η μορφή αυτή του καρκίνου έχει γενικά συσχετιστεί περισσότερο με την πλακώδη μετάπλαση του ουροθηλίου παρά με το CIS. Η θεραπεία πρέπει να είναι εξαρχής επιθετική. Συνιστάται ριζική κυστεκτομή, με ή χωρίς προεγχειρητική (neoadjuvant) ακτινοθεραπεία, που θα πρέπει να συνοδεύεται πάντα από ουρηθρεκτομή, λόγω του μεγάλου κινδύνου υποτροπής στην ουρήθρα. Η χημειοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική.

Το **αδενοκαρκίνωμα** αποτελεί το 0,5-2% όλων των πρωτοπαθών όγκων της κύστης. Μπορεί να είναι είτε πρωτοπαθές είτε μεταστατικό. Στα

πρωτοπαθή συμπεριλαμβάνονται και τα αδενοκαρκινώματα του ουραχού, που αποτελούν το 1/3 όλων των αδενοκαρκινωμάτων της κύστης. Ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος μπορεί να συμβεί και σε εντερικά τμήματα που χρησιμοποιούνται στις εντεροκυστεοπλαστικές ή για τη δημιουργία νεοκύστεων. Τα πρωτοπαθή αδενοκαρκινώματα έχουν συσχετιστεί τόσο με χρόνια φλεγμονή και ερεθισμό της κύστης όσο και με τη σχιστοσωμίαση (αν και σε μικρότερο βαθμό από το SCC). Ισχυρή συσχέτιση φαίνεται ότι υπάρχει και με την αδενική κυστίτιδα. Πρωτοπαθές αδενοκαρκίνωμα αναπτύσσεται στην εκτροφή της κύστης και μάλιστα οι όγκοι αυτού του τύπου αποτελούν το 85% όλων των όγκων που αναπτύσσονται στη συγγενή αυτή βλάβη. Η αποβολή βλέννης με τα ούρα αποτελεί συχνό σύμπτωμα του αδενοκαρκινώματος, επειδή ο όγκος είναι βλεννοπαραγωγός. Γενικά, τα αδενοκαρκινώματα έχουν κακή πρόγνωση. Η ριζική κυστεκτομή αποτελεί την αποτελεσματικότερη θεραπεία. Η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία δεν βοηθούν. Τα αδενοκαρκινώματα του ουραχού είναι εξαιρετικά σπάνιοι όγκοι, που εξορμούνται από υπολείμματα του ουραχού στο τοίχωμα της κύστης. Για το λόγο αυτό κυστεοσκοπικά δίνουν την εικόνα υποβλεννογόνιας μάζας στο θόλο. Αν η διήθηση αφορά και το ουροθήλιο, τίθεται θέμα διαφοροδιάγνωσης από το μη προερχόμενο από τον ουραχό πρωτοπαθές αδενοκαρκίνωμα. Η πρόγνωση είναι επίσης κακή. Η μερική κυστεκτομή με ταυτόχρονη αφαίρεση του ουραχού, του περιτοναίου, της εγκαρσίας περιτονίας και του προσθίου κοιλιακού τοιχώματος έχει δώσει καλά αποτελέσματα. Σπάνια αναπτύσσονται στην ουροδόχο κύστη μεταστατικά αδενοκαρκινώματα, των οποίων η πρωτοπαθής εστία εντοπίζεται κυρίως σε ορθό, στόμαχο, προστάτη και μαστό.

Το **μικροκυτταρικό καρκίνωμα** εμφανίζεται με συχνότητα μικρότερη του 1% όλων των όγκων της κύστης. Θεωρείται ότι προέρχεται είτε από κακοήγη εξαλλαγή νευροενδοκρινικών κυττάρων, που υπάρχουν

φυσιολογικά και στην ουροδόχο κύστη, είτε από κάποιο κοινό αρχέγονο μητρικό κύτταρο, που έχει την δυνατότητα διαφοροποίησης σε διάφορους ιστολογικούς τύπους. Είναι επιθετικός όγκος και διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο (οι περισσότερες περιπτώσεις που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα ήταν σταδίου T3). Εντοπίζεται συχνότερα στα πλάγια τοιχώματα. Είναι μεγάλος, συμπαγής, άμισχος ή πολυποειδής, με περιοχές νέκρωσης. Η θεραπεία περιλαμβάνει ριζική κυστεκτομή με χορήγηση νεοεπικουρικής και επικουρικής συστηματικής χημειοθεραπείας, λόγω του υψηλού μεταστατικού δυναμικού του όγκου. Η πρόγνωση είναι δυσμενής (πενταετής επιβίωση 8%).

Στην ουροδόχο κύστη έχουν περιγραφεί **διάφοροι όγκοι επιθηλιακής προέλευσης**, όπως το λαχνωτό αδένωμα, οι καρκινοειδείς όγκοι, το μελάνωμα και το καρκινοσάρκωμα. Το τελευταίο είναι πολύ επιθετικός όγκος, που περιέχει τόσο επιθηλιακά όσο και μεσεγχυματικά στοιχεία, και η πρόγνωση είναι κακή (πενταετής επιβίωση <20%). Στους **μη επιθηλιακούς όγκους** περιλαμβάνονται το φαιοχρωμοκύτωμα, το πρωτοπαθές λέμφωμα και διάφοροι μεσεγχυματικοί όγκοι (όπως σάρκωμα, λειομυοσάρκωμα και ραβδομυοσάρκωμα).

Συνοπτικά όλοι οι όγκοι της ουροδόχου κύστης και η ταξινόμησή τους φαίνονται στον ακόλουθο Πίνακα (Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology/ICD-O and the Systematized Nomenclature of Medicine, <http://snomed.org>. Η συμπεριφορά κωδικοποιείται ως εξής: 0=Καλοήθης όγκος, 1=οριακή ή αβέβαιη συμπεριφορά, 2=in situ καρκίνωμα και grade III ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και 3=κακοήθης όγκος)⁶.

Urothelial tumors		Melanocytic tumors	
Infiltrating urothelial carcinoma³ with squamous differentiation with glandular differentiation with trophoblastic differentiation Nested Microcystic Micropapillary ³ Lymphoepithelioma-like ³ Lymphoma-like Plasmacytoid Sarcomatoid ³ Giant cell ³ Undifferentiated ³	8120 8131 8082 8122 8031 8020	Malignant melanoma ³ Nevus	8720
Non-invasive urothelial neoplasias Urothelial carcinoma in situ ² Non-invasive papillary urothelial carcinoma, high grade ²³ Non-invasive papillary urothelial carcinoma, low grade ²¹ Non-invasive papillary urothelial neoplasm of low malignant potential ¹ Urothelial papilloma ⁰ Inverted urothelial papilloma ⁰	8120 8130 8130 8130 8120 8121		
Squamous neoplasms		Mesenchymal tumors	
Squamous cell carcinoma ³ Verrucous carcinoma ³ Squamous cell papilloma ⁰	8070 8051 8052	Rhabdomyosarcoma ³ Leiomyosarcoma ³ Angiosarcoma ³ Osteosarcoma ³ Malignant fibrous histiocytoma ³ Leiomyoma ⁰ Haemangioma ⁰ Other	8900 8890 9120 9180 8830 8890 9120
Glandular neoplasms		Haematopoietic and lymphoid tumors	
Adenocarcinoma³ Enteric Mucinous ³ Signet-ring cell ³ Clear cell ³ Villous adenoma⁰	8140 8480 8490 8310 8261	Lymphoma Plasmacytoma ³	9731
Neuroendocrine tumors		Miscellaneous tumors	
Small cell carcinoma ³ Carcinoid ³ Paraganglioma ¹	8041 8240 8680	Carcinoma of Skene, Cowper and Littre glands Metastatic tumors and tumors extending from other organs	

7. Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση περιλαμβάνει το σύνολο των διαγνωστικών τεχνικών με τις οποίες εκτιμάται τόσο η τοπική επέκταση ενός νεοπλασματος όσο και η συστηματική διασπορά του. Διακρίνεται σε κλινική και παθολογοανατομική.

Στον καρκίνο της κύστης η **κλινική σταδιοποίηση** προκύπτει από το συνδυασμό της φυσικής εξέτασης, του απεικονιστικού ελέγχου, της αμφίχειρης υπό νάρκωση εξέτασης και της ιστολογικής εξέτασης του όγκου μετά την διουρηθρική εκτομή του. Η κλινική σταδιοποίηση, αν και συχνά είναι ανακριβής, είναι εκείνη που καθορίζει την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας σε κάθε περίπτωση (συντηρητική ή χειρουργική). Συνήθως ολοκληρωμένη κλινική σταδιοποίηση γίνεται μετά την αρχική διουρηθρική εκτομή του όγκου. Στον καθορισμό του κλινικού σταδίου χρησιμοποιούνται οι αξονικές τομογραφίες (CT) άνω, κάτω κοιλίας και οπισθοπεριτοναϊκού χώρου και θώρακος για την εκτίμηση της τοπικής επέκτασης της νόσου και της ύπαρξης τυχόν μεταστάσεων. Οι CT είναι πιθανό να αποκαλύψουν πάχυνση του τοιχώματος της κύστης ή ασάφεια του περικυστικού λίπους, ενδείξεις εξωκυστικής επέκτασης της νόσου, και απομακρυσμένες δευτεροπαθείς εντοπίσεις. Η διαγνωστική τους ακρίβεια είναι περιορισμένη, επειδή αδυνατούν να ανιχνεύσουν τυχόν μικροσκοπική εξωκυστική διήθηση και να διαφοροδιαγνώσουν με ακρίβεια τους μη μυοδιηθητικούς από τους διηθητικούς όγκους. Διηθημένοι λεμφαδένες ανιχνεύονται με CT μόνο όταν το μεγέθός τους είναι μεγαλύτερο από 1 cm. Οι ηπατικές μεταστάσεις ανιχνεύονται μόνο όταν έχουν μέγεθος 2 cm. Εξαιρώντας τις οστικές μεταστάσεις, η μαγνητική τομογραφία (MRI) δεν φαίνεται να πλεονεκτεί της CT στην διάγνωση και σταδιοποίηση του καρκίνου της κύστης, έχει δε επιπλέον και το μειονέκτημα του κόστους. Τέλος, το σπινθηρογράφημα οστών συνήθως

χρησιμοποιείται για την διερεύνηση μεταστάσεων του καρκίνου της κύστης μόνο όταν ο ασθενής είναι συμπτωματικός ή η αλκαλική φωσφατάση (ALP) του ορού είναι αυξημένη.

Το **παθολογοανατομικό στάδιο** προκύπτει από τον ακριβή καθορισμό των ανατομικών ορίων του όγκου μετά τη χειρουργική αφαίρεση της κύστης. Σημειώνεται ότι στην παθολογοανατομική σταδιοποίηση δεν συμπεριλαμβάνεται αναγκαστικά και η ιστολογική εξέταση των λεμφαδενικών ή σπλαγγχνικών μεταστάσεων.

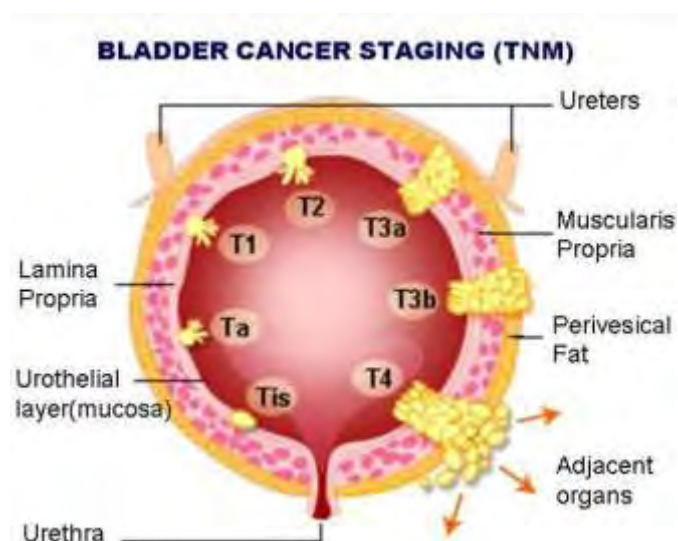
Ιδανική θα ήταν η σταδιοποίηση ενός όγκου αν το κλινικό στάδιο ταυτιζόταν με το παθολογοανατομικό. Αυτό είναι εξαιρετικά δύσκολο με τις υπάρχουσες τεχνικές. Δεν είναι λοιπόν σπάνια η υποσταδιοποίηση, που σε όγκους χαμηλής ή μέσης διαφοροποίησης φθάνει μέχρι και σε ποσοστό 33%.

Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορα **συστήματα σταδιοποίησης** του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Εκείνο που χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως είναι το **TNM (Tumor, Nodes, Metastases)**. Η TNM σταδιοποίηση του 2009 έχει ως εξής¹:

T (Tumor) – Πρωτοπαθής όγκος

- Tx: Ο όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
- T0: Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
- Ta: Μη διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα
- Tis: Καρκίνωμα in situ (επίπεδος όγκος)
- T1: Ο όγκος διηθεί το χόριο
- T2: Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα της κύστης

- T2a: Ο όγκος διηθεί τον επιπολής μυϊκό χιτώνα (έσω ήμισυ)
- T2b: Ο όγκος διηθεί τον εν τω βάθει μυϊκό χιτώνα (έξω ήμισυ)
- T3: Ο όγκος επεκτείνεται στο περικυστικό λίπος
- T3a: Μικροσκοπική διήθηση
- T3b: Μακροσκοπική διήθηση (εξωκυστική μάζα)
- T4: Ο όγκος διηθεί ένα από τα ακόλουθα: προστάτη, μήτρα, κόλπο, πυελικό ή κοιλιακό τοίχωμα
- T4a: Ο όγκος διηθεί προστάτη, σπέρματοδόχους κύστεις, μήτρα ή κόλπο
- T4b: Ο όγκος διηθεί πυελικό ή κοιλιακό τοίχωμα



N (Lymph Nodes) - Λεμφαδένες

- Nx: Επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
- N0: Δεν υπάρχει μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες
- N1: Μετάσταση σ' ένα λεμφαδένα στην αληθή πύελο (υπογάστριος, θυροειδής, έξω λαγόνιος ή προϊερός)
- N2: Μετάσταση σε πολλούς λεμφαδένες στην αληθή πύελο (υπογάστριος, θυροειδής, έξω λαγόνιος ή προϊερός)
- N3: Μετάσταση σε κοινό λαγόνιο λεμφαδένα / κοινούς λαγόνιους λεμφαδένες

M (Distant Metastasis) – Απομακρυσμένες μεταστάσεις

- Mx: Η ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων δε μπορεί να εκτιμηθεί
- M0: Δεν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις
- M1: Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις

8. Φυσική ιστορία της νόσου - Προγνωστικοί παράγοντες

Σύμφωνα με την 6^η Ταξινόμηση των κακοήθων όγκων κατά TNM (6th TNM Classification of Malignant Tumors) ο επιφανειακός καρκίνος της κύστης περιλαμβάνει τα στάδια T_a, T₁ και in situ (T_{is}). Χρησιμοποιώντας λοιπόν τον όρο “επιφανειακός καρκίνος της κύστης” εννοούμε μία ετερογενή ομάδα ασθενών¹¹⁶. Κατά την διάγνωση 75-85% των ασθενών έχουν νόσο περιορισμένη στον βλεννογόνο ή υποβλεννογόνια (δηλαδή T_a, T₁ και T_{is}). Για την αξιολόγηση του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου χρησιμοποιούνται οι δύο ταξινομήσεις της WHO (1973, 2004).

Η φυσική ιστορία του επιφανειακού καρκίνου της κύστης, και δη του ελάχιστα διαφοροποιημένου (high grade), χαρακτηρίζεται από την τάση της ασθένειας να υποτροπιάζει και να προοδεύει σε μυοδιήθηση (T₂). Είναι δύσκολο να γίνει ακριβής πρόγνωση, λόγω της ετερογένειας των όγκων. Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την προγνωστική αξία κλινικών και παθολογοανατομικών παραγόντων (ηλικία, φύλο, ρυθμός υποτροπής, αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου, θέση όγκου, στάδιο, βαθμός διαφοροποίησης, θηλώδης ή μη θηλώδης όγκος, παρουσία carcinoma in situ και υποτροπή στους 3 μήνες μετά την αρχική διουρηθρική εκτομή). Όταν εκτιμούμε τη φυσική ιστορία ή την πρόοδο της νόσου για τους ασθενείς πρέπει να λαμβάνουμε υπόψιν όχι μόνο κλινικούς και παθολογοανατομικούς παράγοντες, αλλά και την δυνητική επίδραση της επικουρικά χορηγούμενης ενδοκυστεϊκής θεραπείας (χημειοθεραπεία ή ανοσοθεραπεία).

Προτείνεται κυρίως ότι ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου (grade) είναι καλύτερος προγνωστικός παράγοντας για πρόοδο και θνησιμότητα και όχι για υποτροπή¹¹⁷. Πολυπαραγοντικές αναλύσεις έχουν αποδείξει ότι οι πιο συχνά αναφερόμενοι προγνωστικοί

παράγοντες για το "χρόνο ως την πρώτη υποτροπή" είναι¹¹⁶: i) ο αριθμός των όγκων (είτε ο ασθενής έχει πρωτοπαθή νόσο είτε όχι), ii) ο προηγούμενος ρυθμός υποτροπής (εφόσον ο ασθενής δεν είναι πρωτοπαθής) και iii) το μέγεθος του όγκου (εφόσον ο ασθενής δεν είναι πρωτοπαθής). Επίσης, έχουν αποδείξει ότι οι πιο σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες για το "χρόνο ως την πρόοδο σε T2" είναι¹¹⁶: i) ο βαθμός διαφοροποίησης, ii) το στάδιο και iii) η παρουσία carcinoma in situ.

Γενικώς οι βλάβες Ta-χαμηλής διαφοροποίησης (Ta-high grade, Ta HG) έχουν χαμηλή επίπτωση που κυμαίνεται μεταξύ 2-9%⁴⁰. Περίπου 50% αυτών των βλαβών υποτροπιάζουν και 25% κάνουν πρόοδο σε T2, ακόμα και υπό επικουρική ενδοκυστική θεραπεία¹¹⁸. Το 2005 οι Sylvester RJ et al. ανέφεραν ότι έως και 20% των Ta HG ασθενών ίσως πεθάνει λόγω της νόσου¹¹⁹.

Οι όγκοι T1-χαμηλής διαφοροποίησης (T1-high grade, T1 HG) έχουν δυνατότητα υποτροπής, προόδου και πρόκλησης θανάτου. Εξαιτίας συχνής υποσταδιοποίησής τους ή εσφαλμένης ταξινόμησής τους, μία επαναληπτική διουρηθρική εκτομή (transurethral resection/TUR) πρέπει να γίνεται σε 1-4 εβδομάδες μετά την αρχική. Περίπου 35-48% των T1 ασθενών παρουσιάζουν πρόοδο σε T2 νόσο εντός 3 ετών, εφόσον λάβουν ως αγωγή μόνο την διουρηθρική εκτομή¹¹⁷. Το συνυπάρχον carcinoma in situ (Tis) επιδεινώνει βαρύτερα την πρόγνωση, οδηγώντας σε ποσοστό 80% σε πρόοδο σε T2. Ως σήμερα δεν έχουμε διαθέσιμους αξιόπιστους προγνωστικούς παράγοντες της κλινικής πορείας του Tis. Χρησιμοποιώντας επικουρική (adjuvant) ενδοκυστική ανοσοθεραπεία με Bacillus Calmette-Guérin (BCG) επιτυγχάνουμε πλήρη ανταπόκριση στο 70-80% των ασθενών¹²⁰. Τελικά, παρά την επίδοση αυτή το 20% των ασθενών θα καταλήξει λόγω μεταστατικής νόσου και ένα σημαντικό ποσοστό θα υποφέρει λόγω ενδοκυστικών και εξωκυστικών

υποτροπών¹²¹. Για τους λόγους αυτούς οι συγκεκριμένοι ασθενείς χρειάζονται εντατική παρακολούθηση και θεραπεία.

Ο αριθμός των όγκων θεωρείται σημαντικός παράγοντας κινδύνου για υποτροπή, αλλά όχι για πρόοδο. Ασθενείς με μονήρεις όγκους υποτροπιάζουν σε ποσοστό 18-60%, ενώ στους ασθενείς με πολλαπλούς όγκους το αντίστοιχο ποσοστό είναι 40-90%¹¹⁷. Οι Heney NM et al. αναφέρει ότι οι επιφανειακοί όγκοι μεγέθους > 5cm συσχετίζονται με πρόοδο σε μυοδιηθητική νόσο (T2)¹²². Επίσης, έχει αναφερθεί ότι ο προηγούμενος ρυθμός υποτροπής, για ασθενείς που έχουν ήδη ιστορικό όγκου κύστης, είναι προγνωστικός παράγοντας υποτροπής. Τέλος, η ηλικία του ασθενή κατά την διάγνωση έχει συσχετιστεί με την πρόγνωση. Οι Cheng L et al. αναφέρουν ότι ηλικία διάγνωσης \leq 65 ετών είναι σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για βελτιωμένη ελεύθερη-προόδου καθώς και ολική επιβίωση¹²³.

Η διήθηση αγγείων και λεμφαγγείων έχει επίσης προταθεί ως προγνωστικός δείκτης. Οι επιφανειακοί όγκοι διηθούν τα αγγεία σε ποσοστό 2,5-7%. Η είσοδος καρκινικών κυττάρων σε αγγειακούς ή λεμφαγγειακούς χώρους επηρεάζει αρνητικά τη βιολογική συμπεριφορά ενός επιφανειακού όγκου. Η 5-ετής επιβίωση ασθενών με λεμφαγγειακή διήθηση είναι σαφώς μικρότερη εκείνης των ασθενών με νεοπλάσματα χωρίς το χαρακτηριστικό αυτό (44% έναντι 81% αντίστοιχα).

Είναι φανερό η ανάγκη δημιουργίας και χρήσης ενός συστήματος ταξινόμησης των ασθενών σε ομάδες κινδύνου, τόσο για υποτροπή όσο και για πρόοδο, το οποίο θα συνδυάζει τους προαναφερθέντες προγνωστικούς παράγοντες.

Οι Millán-Rodriguez F et al. έχουν προτείνει ένα τέτοιο σύστημα, που χρησιμοποιεί το στάδιο, τον βαθμό διαφοροποίησης, τον αριθμό των όγκων (μονήρης ή πολλαπλοί) και τη συσχέτιση με carcinoma in situ¹²⁴. Οι ασθενείς ταξινομούνται ως χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού

κινδύνου. Στους 40 μήνες μετά την αρχική διουρηθρική εκτομή οι πιθανότητες υποτροπής και προόδου καθώς και ο ρυθμός θνησιμότητας διαμορφώνονται όπως στον πίνακα¹²⁴:

	Πιθανότητα υποτροπής (recurrence probability)	Πιθανότητα προόδου (progression probability)	Ρυθμός θνησιμότητας (mortality rate)
Χαμηλού κινδύνου ασθενείς	37%	0%	0%
Ενδιαμέσου κινδύνου ασθενείς	45%	1.8%	0.7%
Υψηλού κινδύνου ασθενείς	54%	15%	9.5%
Σύνολο Ασθενών	48%	7.5%	4.6%

Οι Sylvester RJ et al. δημιούργησαν ένα διαφορετικό σύστημα αξιολόγησης (με βαθμούς) καθώς και πίνακες κινδύνου¹²⁵, χρησιμοποιώντας ως πυλώνα την βάση δεδομένων της EORTC⁴. Η συγκεκριμένη βάση περιείχε δεδομένα για 2596 ασθενείς με όγκους T_a και T₁ (μη μυοδιηθητικούς), που τυχαιοποιήθηκαν σε επτά (7) κλινικές μελέτες, οι οποίες δεν περιείχαν ούτε θεραπεία συντήρησης με BCG ούτε δεύτερη διουρηθρική εκτομή. Οι έξι (6) σημαντικότεροι κλινικοί και παθολογοανατομικοί παράγοντες (αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου, προηγούμενος ρυθμός υποτροπής, στάδιο, ταυτόχρονη παρουσία carcinoma in situ και βαθμός διαφοροποίησης) χρησιμοποιούνται για τη βαθμολόγηση των ασθενών, βάσει του προτεινόμενου συστήματος. Σύμφωνα με τη συνολική βαθμολογία οι ασθενείς κατηγοριοποιούνται ως χαμηλού, ενδιαμέσου και υψηλού κινδύνου τόσο για την υποτροπή (σύνολο βαθμών: 0, 1 ως 9 και 10 ως 17 αντίστοιχα) όσο και για την

⁴ EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer

πρόοδο (σύνολο βαθμών: 0, 2 ως 6 και 7 ως 23 αντίστοιχα). Το σύστημα αξιολόγησης με βαθμούς και οι πίνακες κινδύνου των Sylvester RJ et al. χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως. Οι πιθανότητες υποτροπής και προόδου για όλες τις ομάδες ασθενών στον 1 χρόνο και στα 5 χρόνια, μετά την διουρηθρική εκτομή, παρουσιάζονται στους πίνακες¹:

Σκορ υποτροπής	Πιθανότητα υποτροπής στον 1 χρόνο (μετά την διουρηθρική εκτομή)	Πιθανότητα υποτροπής στα 5 χρόνια (μετά την διουρηθρική εκτομή)
0	15 %	31 %
1-9	24-38 %	46-62 %
10-17	61 %	78 %

Σκορ προόδου	Πιθανότητα προόδου στον 1 χρόνο (μετά την διουρηθρική εκτομή)	Πιθανότητα προόδου στα 5 χρόνια (μετά την διουρηθρική εκτομή)
0	0.2 %	0.8 %
2-6	1 %	6 %
7-23	5-17 %	17-45 %

Γνωρίζοντας ότι πλήθος ασθενών με μη μυοδιηθητικούς και χαμηλής διαφοροποίησης όγκους λαμβάνουν επικουρική ενδοκυστεκτική ανοσοθεραπεία με BCG (σχήμα εφόδου και σχήμα συντήρησης), γίνεται αντιληπτό ότι το προταθέν σύστημα εκτίμησης των πιθανοτήτων υποτροπής και προόδου των Sylvester RJ et al. δεν μπορεί να εφαρμοστεί στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών. Οι Fernandez-Gomez J et al. διαμόρφωσαν λοιπόν ένα προγνωστικό μοντέλο υποτροπής και προόδου¹²⁶, που καλύπτει αυτούς τους ασθενείς, γνωστό ως CUETO⁵. Οι

⁵ CUETO: Club Urológico Español De Tratamiento Oncológico

ασθενείς που συμμετείχαν στην ανάπτυξη του CUETO δεν έλαβαν άμεσα μετεγχειρητικά εφάπαξ ενδοκυστική έγχυση χημειοθεραπευτικού ούτε υποβλήθηκαν σε δεύτερη διουρηθρική εκτομή. Όλοι έλαβαν 12 εγχύσεις BCG σε μία περίοδο 5-6 μηνών. Στο CUETO για την υποτροπή λαμβάνονται υπόψιν ως προγνωστικοί παράγοντες το φύλο, η ηλικία, ο βαθμός διαφοροποίησης, το status του όγκου (πρωτοπαθής ή όχι), η ύπαρξη πολλαπλών όγκων και το συνυπάρχον καρκίνωμα in situ. Στην πρόοδο ως προγνωστικοί παράγοντες υπολογίζονται η ηλικία, ο βαθμός διαφοροποίησης, το status του όγκου (πρωτοπαθής ή όχι), το στάδιο, η ύπαρξη πολλαπλών όγκων και το συνυπάρχον καρκίνωμα in situ. Τα σκορ για υποτροπή και πρόοδο κυμαίνονται από 0 ως 16 και από 0 ως 14 αντίστοιχα. Βάσει του σκορ οι ασθενείς κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις (4) ομάδες. Ο κίνδυνος υποτροπής προσδιορίζεται μικρότερος με το μοντέλο CUETO, συγκριτικά με αυτό της EORTC. Οι πιθανότητες πρόοδου υπολογίζονται επίσης μικρότερες με το CUETO αλλά μόνο στους ασθενείς με όγκους υψηλού κινδύνου. Οι μικρότερες πιθανότητες υποτροπής και πρόοδου ίσως να οφείλονται στην αποτελεσματικότητα του BCG, που χρησιμοποιείται για τις ενδοκυστικές εγχύσεις.

Βάσει των διαθέσιμων δεδομένων για τους διάφορους προγνωστικούς παράγοντες και ειδικά αυτών που πηγάζουν από τους πίνακες κινδύνου της EORTC (EORTC risk tables), όπως αυτοί έχουν ήδη αναφερθεί, η ομάδα εργασίας για τον μη μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας προτείνει την ταξινόμηση των ασθενών σε 3 ομάδες κινδύνου, με σκοπό την διευκόλυνση των συστάσεων θεραπείας¹. Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει τις 3 ομάδες, λαμβάνοντας υπόψιν τις πιθανότητες υποτροπής και, κυρίως, πρόοδου της νόσου, όπως αυτές προκύπτουν από τους πίνακες κινδύνου της EORTC.

Ομάδα Κινδύνου	Χαρακτηριστικά
Χαμηλός κίνδυνος	Πρωτοπαθής, μονήρης, Ta, Grade 1 (Low Grade), <3cm, no carcinoma in situ
Ενδιάμεσος κίνδυνος	Όλοι οι όγκοι που δεν εντάσσονται στις άλλες 2 κατηγορίες
Υψηλός κίνδυνος	Όταν ισχύει οτιδήποτε εκ των ακολούθων: T1 ή Grade 3 (High Grade) ή carcinoma in situ ή πολλαπλοί ΚΑΙ υποτροπιάζοντες ΚΑΙ μεγάλοι (>3cm) Ta Grade 1,2 όγκοι (στην τελευταία περίπτωση πρέπει να ικανοποιούνται όλες οι συνθήκες)

Η Διεθνής Ομάδα για τον Καρκίνο της Κύστης (International Bladder Cancer Group) προτείνει παρόμοια, αλλά όχι ταυτόσημη, ταξινόμηση¹. Έως σήμερα πάντως δεν υπάρχει ένα κοινά αποδεκτό προγνωστικό σύστημα για την υποτροπή και/ή την πρόοδο με εφαρμογή σε όλους ανεξαιρέτως τους ασθενείς και με αναμφισβήτητα διαπιστωμένη εγκυρότητα.

Περίπου 30% των ασθενών παρουσιάζουν μυοδιήθηση (στάδιο T2) κατά την διάγνωση και έως περίπου 50% των ασθενών υποτροπιάζουν μετά την ριζική κυστεκτομή, αναλόγως του παθολογοανατομικού σταδίου του πρωτοπαθούς όγκου και την διήθηση ή όχι των λεμφαδένων. Οι απομακρυσμένες μεταστάσεις αντιπροσωπεύουν το 70% των υποτροπών μετά κυστεκτομή. Ήδη κατά την διάγνωση 10-15% των ασθενών έχουν μεταστάσεις. Πριν αναπτυχθούν οι σύγχρονες χημειοθεραπείες, οι μεταστατικοί ασθενείς είχαν προσδόκιμο επιβίωσης 3-6 μήνες, ενώ σήμερα η 5-ετής επιβίωση των ασθενών, που σχετίζεται άμεσα με το

στάδιο, είναι 25% σε ασθενείς με όγκους T4, 39% σε ασθενείς με όγκους T3 και 53% σε ασθενείς με όγκους T2.

Οι περισσότεροι από τους προαναφερθέντες προγνωστικούς παράγοντες βασίζονται κυρίως σε μορφολογικά κριτήρια. Αν και τα νεοπλάσματα της κύστης έχουν κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά, η βιολογική τους συμπεριφορά είναι συχνά απρόβλεπτη. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει την έρευνα τα τελευταία χρόνια προς την κατεύθυνση της ανάπτυξης μη μορφολογικών δεικτών για τον ακριβέστερο καθορισμό της κλινικής πορείας και πρόγνωσης των όγκων της κύστης. Μερικοί από τους δείκτες αυτούς παρουσιάζονται ακολούθως.

Η πλοειδικότητα του DNA των καρκινικών κυττάρων αποτελεί αξιόπιστο προγνωστικό παράγοντα. Οι ανευπλοειδικοί όγκοι έχουν επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά από τους ευπλοειδικούς. Η ανεύρεση με κυτταρομετρία ροής αυξημένου ποσοστού κυττάρων στη φάση σύνθεσης DNA (S-phase fraction, S-PF) σχετίζεται με το στάδιο και το βαθμό κακοήθειας, πιθανώς και με μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής και εξέλιξης ενός επιφανειακού όγκου σε μυοδιηθητικό και συνεπώς με μειωμένη επιβίωση.

Η ομάδα των αντιγόνων ABH περιλαμβάνει αντιγόνα που βρίσκονται συνδεδεμένα με γλυκοπρωτεΐνες ή γλυκολιπίδια στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων και διαφόρων επιθηλιακών κυττάρων, μεταξύ των οποίων κι αυτά του ουροθηλίου. Έχει βρεθεί ότι η απώλεια της έκφρασης των αντιγόνων ABH από τους όγκους του ουροθηλίου είναι προγνωστικός παράγοντας επιθετικής συμπεριφοράς και διήθησης. Επιφανειακοί όγκοι που διατηρούν τα αντιγόνα αυτά έχουν μικρότερη πιθανότητα μετατροπής σε διηθητικούς. Αντίθετα, η μείωση των επιπέδων των αντιγόνων σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα οδηγεί σε ανάπτυξη μυοδιηθητικού καρκίνου σε ποσοστό 62-66%.

Από τα **αντιγόνα Lewis** η ανίχνευση του Lewis X σε αποπίπτοντα στα ούρα ουροθηλιακά κύτταρα μπορεί να είναι ένας χρήσιμος κλινικός δείκτης για την πρόγνωση υποτροπής ή διηθητικής εξέλιξης ενός όγκου. Το Lewis X ανιχνεύεται στο 90% των καρκινικών κυττάρων του ουροθηλίου, αλλά όχι στα φυσιολογικά.

Υψηλά επίπεδα του **πολυπεπτιδικού αντιγόνου των ιστών (tissue polypeptide antigen, TPA)** στον ορό ασθενών με επιφανειακό καρκίνο φαίνεται ότι σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής της νόσου.

Η αυξημένη έκφραση του **T (Thomsen-Friedenreich) αντιγόνου** έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με διηθητική εξέλιξη και πτωχή πρόγνωση.

Τα **αντιγόνα M344 και 19A211** ανιχνεύονται μόνο σε καρκινικά ουροθηλιακά κύτταρα. Εκφράζονται στο 70-90% των επιφανειακών όγκων και σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό διηθητικών. Συσχετίζονται επίσης με αυξημένη συχνότητα υποτροπής των μη μυοδιηθητικών όγκων.

Το **αντιγόνο T138** ανιχνεύεται επίσης μόνο σε καρκινικά ουροθηλιακά κύτταρα. Εκφράζεται κυρίως σε μυοδιηθητικούς όγκους και έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη μεταστατικής νόσου.

Τέλος, το **επιθηλιακό αντιγόνο της μεμβράνης (epithelial membrane antigen, EMA)** σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση όταν εκφράζεται ομοιογενώς στα επιφανειακά νεοπλάσματα της κύστης, αλλά με καλύτερη επιβίωση όταν εκφράζεται με περισσότερη ετερογένεια.

Η έκφραση ορισμένων αντιγόνων του κυτταρικού πυρήνα, όπως το **PCNA (proliferating cell nuclear antigen)** και το **Ki-67**, αντανακλά την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα ενός κυττάρου. Αυξημένη έκφραση των αντιγόνων αυτών υποδηλώνει έντονη πολλαπλασιαστική δραστηριότητα, γεγονός που χαρακτηρίζει κυρίως τα κακοήθη κύτταρα. Όγκοι στους οποίους τα πυρηνικά αντιγόνα υπερεκφράζονται συμπεριφέρονται επιθετικότερα. Τέτοιοι όγκοι στην ουροδόχο κύστη έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα μετατροπής σε μυοδιηθητικούς. Το **Ki-67**

είναι μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον ενός πυρηνικού αντιγόνου, που εκφράζεται στα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται. Υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης υποτροπής της νόσου^{127,128}. Το **PCNA** διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον κυτταρικό κύκλο και φαίνεται να συσχετίζεται με τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και το στάδιο του. Η προγνωστική αξία όμως των αντιγόνων αυτών δεν έχει τεκμηριωθεί απόλυτα.

Απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Είναι μία διαδικασία που προκύπτει από την αλληλεπίδραση σημάτων, ενδογενών και εξωγενών, τα οποία συγκλείνουν σε ένα κοινό μονοπάτι¹²⁹. Μεταβολές στο μονοπάτι της απόπτωσης προκαλούν ογκογένεση και διήθηση, επειδή επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να επιβιώνουν για περισσότερο χρόνο και να αντέχουν σε βλαβερά ερεθίσματα¹³⁰. Ο καρκίνος της κύστης έχει βρεθεί ότι ανθίσταται στην απόπτωση προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο με την εκφράζοντας μεταλλαγμένες προαποπτωτικές και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες^{130,131}. Το **γονίδιο απόπτωσης-1 (Apoptosis Antigen-1/APO-1) ή υποδοχέα Fas** είναι ένας υποδοχέας θανάτου στην επιφάνεια των κυττάρων, που οδηγεί σε απόπτωση, αποτελώντας το ένα μονοπάτι αυτής. Κωδικοποιείται από το γονίδιο TNFRSF6 του χρωμοσώματος 10 (10q24.1)^{132,133}. Όταν ενεργοποιηθεί από το συνδέτη (ligand) του APO-1 προκαλεί ερεθίσματα, που προάγουν την απόπτωση¹³⁴. Οι Svatec et al. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η διαλυτή μορφή (soluble) του APO-1 μπορεί να παράγεται και να απελευθερώνεται από τα καρκινικά κύτταρα καρκίνου της ουροδόχου κύστης¹³⁵. Άλλοι μελετητές βρήκαν ότι ο APO-1 εκφράζεται στο 90% των φυσιολογικών δειγμάτων συγκριτικά με το 50% των καρκινικών δειγμάτων. Επιπρόσθετα, η μειωμένη έκφραση του APO-1 συσχετίζεται με προχωρημένο στάδιο, χαμηλότερο βαθμό διαφοροποίησης και ειδική της νόσου θνητότητα¹³⁶. Η **κασπάση 3 (Caspase-3/C-3)** είναι το τελικό μόριο της απόπτωσης και

προκαλεί αποδιοργάνωση και καταστροφή του κυττάρου¹³⁷. Οι Burton et al. μελέτησαν την έκφραση της C-3 σε ασθενείς με εντοπισμένο καρκίνο της κύστης και ανέφεραν ότι η υπερέκφραση της ενεργοποιημένης C-3 συνδυάζεται με υψηλότερα ποσοστά διήθησης¹³⁸. Ωστόσο, οι Karann et al. σε πρόσφατη μελέτη, με δείγματα από 226 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ριζική κυστεκτομή, αναφέρουν ότι το 49% των ασθενών είχαν έλλειψη της έκφρασης της C-3, υψηλότερο στάδιο, χαμηλότερο βαθμό διαφοροποίησης (υψηλότερο grade) και λεμφαδενικές μεταστάσεις¹³⁹. Το **Bcl-2** (B-cell lymphoma 2) είναι ένα γονίδιο που προωθεί την ογκογένεση, καταστέλλοντας τα κυτταρικά σήματα που ευοδώνουν την απόπτωση. Παράγει μια αντιαποπτωτική πρωτεΐνη που υπάρχει στις ενδοκυττάριας μεμβράνες και ρυθμίζει τη θέση του κυττοχρώματος c και των ιοντικών καναλιών που προάγουν την απόπτωση¹⁴⁰. Υπερέκφραση της Bcl-2 πρωτεΐνης έχει βρεθεί σε 32% των δειγμάτων ριζικής κυστεκτομής και συσχετίζεται με υψηλό στάδιο, χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης και υψηλά ποσοστά ειδικής για τη νόσο θνητότητας⁴⁸. Το γονίδιο **bax** αναστέλλει την δραστηριότητα του bcl-2. Έχει διατυπωθεί η άποψη, ότι ο λόγος των εκφράσεων των δύο αυτών μορίων (bcl-2/bax ratio) πιθανόν αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη υποτροπής και εξέλιξης για όγκους χαμηλής κακοήθειας¹⁰. Η **σερβαϊβίνη (Survivin/S)** είναι ένας νέος αναστολέας της απόπτωσης. Αναστέλλει την απόπτωση, τουλάχιστον εν μέρει, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση της κασπάσης^{141,142}. Έχει βρεθεί ότι υψηλά επίπεδα σερβαϊβίνης στα ούρα, είτε της πρωτεΐνης είτε του mRNA αυτής, σχετίζονται με την παρουσία όγκου στην κύστη υψηλού σταδίου και χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης^{143,144}.

Τα **μόρια διακυττάριας προσκόλλησης** αποτελούν φραγμό στην επέκταση των όγκων του ουροθηλίου και την διήθηση των υποκειμένων στρωμάτων. Σε επιθετικότερους μη μυοδιηθητικούς όγκους της κύστης

έχει παρατηρηθεί μείωση της έκφρασης της E-cadherin και της ιντεγκρίνης αβ4. Οι όγκοι αυτοί κατά κανόνα σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση.

Προγνωστική σημασία φαίνεται ότι πιθανόν έχει και η έκφραση **παραγόντων που εμπλέκονται στην αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας** (extracellular matrix, ECM), όπως η καθεψίνη-D, το u-PA και, κυρίως, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) της θεμέλιας ουσίας και οι αναστολείς τους.

Ο **υποδοχέας του αυτοκρινούς κινητικού παράγοντα** είναι μία κυτοκίνη του όγκου, που προάγει την άμεση και τυχαία μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Μη μυοδιηθητικοί όγκοι που παρουσιάζουν αυξημένη έκφρασή του παρουσιάζουν συχνότερα εξέλιξη σε μυοδιήθηση.

Η **διακοπή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της λαμινίνης** στα βασικά στρώματα, ως ένδειξη αρχόμενης διήθησης του χορίου, συσχετίζεται και αυτή με συχνότερη εξέλιξη των μη μυοδιηθητικών όγκων σε μυοδιηθητικούς.

Η **προγνωστική αξία των ογκογονιδίων** της οικογένειας ras, του c-myc και του c-erbB-2 δεν έχει τεκμηριωθεί απόλυτα στο καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Αντίθετα, αυξημένη έκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF-r), που είναι το πρωτεϊνικό παράγωγο του πρωτοογκογονιδίου c-erbB-1, έχει συσχετιστεί με υψηλότερο νεοπλασματικό στάδιο και βαθμό διαφοροποίησης (grade), αυξημένη θνητότητα, μικρότερο διάστημα μέχρι την υποτροπή και υψηλότερη συχνότητα υποτροπής και προόδου της μη μυοδιηθητικής νόσου.

Μεταξύ των **αυξητικών παραγόντων** η προγνωστική σημασία του **ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (Fibroblast Growth Factor/FGF)** δεν έχει τεκμηριωθεί. Ο **επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor/EGF)** επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στο υγιές μεταβατικό επιθήλιο ο **υποδοχέας του EGF (Epidermal Growth Factor receptor/EGF-r)** εντοπίζεται στην βασική κυτταρική στιβάδα, ενώ στους

κακοήθεις ιστούς ο EGF-r βρίσκεται σε όλες τις στιβάδες. Η προγνωστική σημασία του EGF είναι άγνωστη. Μελέτες δεν έδειξαν διαφορά στις συγκεντρώσεις του EGF στα ούρα μεταξύ ασθενών με καρκίνο της κύστεως και υγιών ατόμων¹⁴⁵, ενώ άλλες βρήκαν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε ασθενείς με όγκο⁸⁸. Καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ συγκεντρώσεων EGF και σταδίου, βαθμού κακοήθειας και επιβίωσης^{88,146}. Ερευνητές έχουν δείξει ότι υπερέκφραση του EGF-r στον καρκίνο της κύστεως σχετίζεται με υψηλότερο στάδιο και βαθμό κακοήθειας της νόσου, αποτελώντας ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα προόδου και μειωμένης επιβίωσης στον επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως¹⁴⁷. Οι Neal et al. έδειξαν σε μία προοπτική μελέτη ότι ο EGF-r συνδέεται ανεξάρτητα με υψηλότερο στάδιο του όγκου και θάνατο από τη νόσο¹⁴⁸. Επιπρόσθετα, ασθενείς με μη μυοδιηθητική νόσο (pTa και pT1) με θετική χρώση για EGFr υποτροπίασαν συντομότερα και σε μεγαλύτερο ποσοστό και εμφάνισαν μεγαλύτερη πιθανότητα εξέλιξης σε μυοδιήθηση. Η φτωχή προγνωστική επίδραση της θετικής χρώσης για τον EGFr ήταν στατιστικά ανεξάρτητη από το στάδιο έκτασης της νόσου T ή τον βαθμό κακοήθειας¹⁴⁸. Η εντονότερη έκφραση του EGFr στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός προγνωστικός δείκτης. Επιπλέον, θεραπευτικές στρατηγικές θα μπορούσαν να έχουν ως στόχο απευθείας τον EGFr. Ο **μετατρεπτικός αυξητικός παράγων-β (Transforming Growth Factor-β/TGF-β)**, μεταξύ άλλων ιδιοτήτων, επάγει αλλά και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Τα νεοπλάσματα με αυξημένη έκφραση του TGF-β δείχνουν αργό ρυθμό πολλαπλασιασμού, ενώ τα προχωρημένα στάδια καρκινώματος από μεταβατικό επιθήλιο σχετίζονται με ελαττωμένη έκφραση του TGF-β1¹⁴⁹.

Το **ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53** παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στους μυοδιηθητικούς όγκους. Στα μη μυοδιηθητικά

νεοπλάσματα η ανοσοϊστοχημική έκφραση του p53 σχετίζεται με υψηλότερο στάδιο και βαθμό διαφοροποίησης (grade), αυξημένη συχνότητα μυοδιηθητικής εξέλιξης και μειωμένη επιβίωση. Αντίθετα, ο ρυθμός των υποτροπών δεν φαίνεται να έχει σχέση με την έκφραση του p53.

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (**Rb**) είναι ογκοκατασταλτικό. Τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών για την προγνωστική αξία του είναι αντικρουόμενα. Πάντως, η απώλειά του έχει συσχετιστεί με δυσμενή εξέλιξη της νόσου.

Συχνό γενετικό σύμβαμα στο μη μυοδιηθητικό καρκίνο της κύστης είναι η **απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH)** του χρωματοσώματος 9, που σχετίζεται και με αυξημένη συχνότητα υποτροπής. Στο carcinoma in situ παρατηρείται συχνά LOH στα χρωματοσώματα 17 και 14q. Γονίδια που δεν ανιχνεύονται φυσιολογικά, αλλά υπερεκφράζονται σε μυοδιηθητικούς όγκους είναι τα MAGE και H19 (το δεύτερο όταν συνυπάρχει carcinoma in situ).

Μελέτες για την προγνωστική σημασία της **αγγειογένεσης** στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης έχουν δείξει ότι σε επιθετικότερους όγκους (T1G3) παρατηρείται μεγαλύτερη αγγειογενετική δραστηριότητα και υψηλότερη συχνότητα υποτροπής και μυοδιήθησης. Εξάλλου, η παρατήρηση ότι ο VEGF εκφράζεται κυρίως σε επιφανειακά, ενώ ο PDECGF κυρίως σε μυοδιηθητικά νεοπλάσματα, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι αγγειογενετικοί δρόμοι αυτών των δύο μορφών καρκίνου είναι διαφορετικοί. Ο **VEGF** είναι ικανός και ειδικός επαγωγέας της αγγειογένεσης. Υψηλότερες συγκεντρώσεις του VEGF στα ούρα βρέθηκαν σε πάσχοντες από καρκίνο της κύστεως συγκριτικά με πάσχοντες από καλοήγη νοσήματα^{83,150}. Οι T1 και T2 όγκοι δεν είχαν σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση του VEGF των ούρων. Αντίθετα, οι Τα όγκοι παρουσίαζαν χαμηλότερη συγκέντρωση.

Αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ όγκων βαθμού κακοήθειας G2 και G3. Όμως, η έκφραση του VEGF στους G1 όγκους ήταν χαμηλότερη⁸³. Τέλος, υψηλότερες συγκεντρώσεις VEGF σχετίζονται με υψηλότερο ποσοστό υποτροπής^{83,150}. Η **μέτρηση των μικροαγγείων** ενός όγκου (microvessel count) αποτελεί επίσης χρήσιμο προγνωστικό δείκτη. Στο μυοδιηθητικό καρκίνο η αυξημένη πυκνότητα μικροαγγείων έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης λεμφαδενικών μεταστάσεων και μειωμένη επιβίωση. Τέλος, χαμηλή έκφραση του αντιαγγειογενετικού παράγοντα **θρομβοσπονδίνη-1** αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα, που επιφέρει μειωμένη επιβίωση.

9. Θεραπεία

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου της κύστης καθορίζεται από το στάδιο της νόσου. Ασθενείς με μη μυοδιηθητικό νεόπλασμα αρχικά υποβάλλονται σε διουρηθρική εξαίρεση του όγκου. Στη συνέχεια, ανάλογα με το στάδιο και το βαθμό κακοήθειας, είτε εντάσσονται σε πρόγραμμα συστηματικής παρακολούθησης είτε υποβάλλονται σε επικουρική ενδοκυστεκτική θεραπεία (χημειοθεραπεία ή ανοσοθεραπεία).

Παρακολούθηση ενδείκνυται σε μικρούς, πρωτοπαθείς, μη μυοδιηθητικούς όγκους χαμηλής κακοήθειας (Ta Grade I), διότι ο κίνδυνος υποτροπής και διηθητικής εξέλιξης θεωρείται μικρός. Αντίθετα, σε ασθενείς με πολλαπλούς, μεγάλους και υποτροπιάζοντες όγκους καθώς και σε εκείνους με όγκους T1 ή συνοδό carcinoma in situ (Cis) χορηγείται επικουρική ενδοκυστεκτική θεραπεία, επειδή θεωρούνται υψηλού κινδύνου για υποτροπή και εξέλιξη σε μυοδιήθηση.

Ασθενείς με διηθητικούς όγκους T2 ή T3 είναι υποψήφιοι για ριζική κυστεκτομή, που μπορεί να συνδυαστεί με συστηματική νεοεπικουρική (neoadjuvant, προεγχειρητικά) ή επικουρική (adjuvant, μετεγχειρητικά) χημειοθεραπεία.

Τοπικά εκτεταμένοι ή ανεγχείρητοι όγκοι (T4) μπορούν να αντιμετωπιστούν αρχικά με συστηματική χημειοθεραπεία, ώστε να μειωθεί η νεοπλασματική μάζα, και στη συνέχεια με ακτινοθεραπεία ή χειρουργική επέμβαση αναλόγως της ανταπόκρισης. Τέλος, ασθενείς με μεταστατική νόσο (M1) αντιμετωπίζονται με χημειοθεραπεία.

- **Θεραπεία μη μυοδιηθητικού καρκίνου**

Η διουρηθρική εκτομή (TURBT) αποτελεί την αρχική αντιμετώπιση οποιουδήποτε όγκου. Στο υλικό της διουρηθρικής εκτομής θα πρέπει να περιλαμβάνεται και μυϊκός ιστός, ώστε να καθορίζεται ακριβώς το στάδιο. Όταν υπάρχει υπόνοια Cis ή θετική κυτταρολογική εξέταση ούρων, τότε η TURBT πρέπει να συνδυάζεται με τη λήψη τυχαίων βιοψιών της κύστης. Η χρήση διαφόρων τύπων laser για την εκτομή του όγκου φαίνεται ότι έχει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με την κλασική εκτομή με ηλεκτροτόμο (π.χ μικρότερη αιμορραγία και σπάνιος ερεθισμός του θυροειδούς νεύρου). Μειονέκτημα των laser είναι η αδυναμία λήψης ιστού για σταδιοποίηση.

Η μετεγχειρητική (adjuvant) ενδοκυστική χορήγηση χημειοθεραπευτικών ή ανοσοθεραπευτικών παραγόντων έγινε δημοφιλής στην δεκαετία του 1980 και έλαβε μεγάλες διαστάσεις στην δεκαετία του 1990. Χορηγείται για τους εξής λόγους:

- i) προφυλακτικά: μετά από μία φαινομενικά πλήρη TURBT, με σκοπό την πρόληψη των υποτροπών,
- ii) θεραπευτικά: μετά από μία ατελή TURBT, με σκοπό την αντιμετώπιση του υπολειπόμενου όγκου ή τυχόν συνυπάρχοντος Cis και
- iii) συμπληρωματικά: μετά μία φαινομενικά πλήρη TURBT, με σκοπό την πρόληψη υποτροπών, λόγω εμφύτευσης εναπομεινάντων νεοπλασματικών κυττάρων.

Προϋπόθεση για την αποτελεσματική δράση των χορηγούμενων παραγόντων είναι η ικανοποιητική συγκέντρωσή τους μέσα στην ουροδόχο κύστη και η επαφή τους με το μη φυσιολογικό επιθήλιο.

Προοπτικές μελέτες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα της ενδοκυστικής θεραπείας στην πρόληψη των υποτροπών των μη

μυοδιηθητικών όγκων της κύστης. Τονίζεται πάντως ότι κανείς από τους, έως σήμερα, χρησιμοποιούμενους παράγοντες για ενδοκυστικές εγχύσεις δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ιδανικός. Ιδανικό για ενδοκυστικές εγχύσεις θα ήταν εκείνο το φάρμακο, που με μία εφάπαξ χορήγηση θα παρείχε απόλυτη προστασία από τις υποτροπές και την εξέλιξη του όγκου σε μυοδιηθητικό και ταυτόχρονα θα είχε ελάχιστη τοξικότητα και χαμηλό κόστος.

Για ασθενείς χαμηλού κινδύνου με όγκους Ta η άμεση μετεγχειρητική, εφόσον δεν υπάρχει αντένδειξη, εφάπαξ, ενδοκυστική έγχυση ενός χημειοθεραπευτικού παράγοντα αρκεί. Στους υπόλοιπους ασθενείς η αρχική φάση εφόδου (διάρκειας 6 εβδομάδων) ακολουθείται από περίοδο θεραπείας συντήρησης, που η διάρκειά της και το χρονοδιάγραμμα χορήγησής της διαφέρει ανάλογα του σταδίου της νόσου και του εκτιμώμενου κίνδυνου υποτροπής ή/και εξέλιξης για τον ασθενή. Για ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου με όγκους Ta, T1 η άμεση μετεγχειρητική, εφάπαξ, ενδοκυστική έγχυση χημειοθεραπευτικού¹¹¹ ακολουθείται από τη χορήγηση ενδοκυστικής θεραπείας συντήρησης με τον ίδιο χημειοθεραπευτικό παράγοντα ή BCG για 1 έτος¹. Για ασθενείς με όγκους υψηλού κινδύνου η άμεση μετεγχειρητική, εφάπαξ, ενδοκυστική έγχυση χημειοθεραπευτικού ακολουθείται από τη χορήγηση ενδοκυστικής θεραπείας συντήρησης με BCG για 1-3 έτη¹. Ριζική κυστεκτομή γενικά δεν ενδείκνυται στο μη μυοδιηθητικό καρκίνο της κύστης, με εξαίρεση τους πολλαπλούς, συμπτωματικούς όγκους, που είναι αδύνατον να εξαιρεθούν πλήρως με TURBT, την αποτυχία της επικουρικής, ενδοκυστικής ανοσοθεραπείας με BCG και, υπό προϋποθέσεις, τους ασθενείς υψηλού κινδύνου για εξέλιξη σε μυοδιήθηση.

Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι **χημειοθεραπευτικοί παράγοντες** που χορηγούνται ενδοκυστικά στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης είναι η επιρουμπικίνη και η μιτομυκίνη C.

Η επιρουμπικίνη (Epirubicin) είναι μικρότερης τοξικότητας παράγωγο της αδριαμυκίνης (αντιβιοτικού ιδιαίτερα τοξικού στη φάση S του κυτταρικού κύκλου). Ως συχνότερη παρενέργεια εμφανίζεται η χημική κυστίτιδα (6,8-14%). Μελέτη της EORTC έδειξε ότι η εφάπαξ ενδοκυστική χορήγηση επιρουμπικίνης (80mg) κατά την άμεση μετεγχειρητική περίοδο μειώνει το ρυθμό υποτροπής της νόσου κατά 50% περίπου¹¹. Πιθανώς το φάρμακο να δρα και έναντι μη εμφανούς υπολειπόμενου όγκου και αποτρέποντας την εμφύτευση καρκινικών κυττάρων. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι η επιρουμπικίνη δεν επηρεάζει τη μυοδιηθητική εξέλιξη του όγκου ούτε αυξάνει την επιβίωση.

Η μιτομυκίνη C (Mitomycin C/MMC) είναι αντιβιοτικό και δρα αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA. Λόγω υψηλού μοριακού βάρους (334 Da), η απορρόφησή της στις συνήθως χρησιμοποιούμενες δόσεις (20-60 mg) είναι ασήμαντη. Επομένως, η συστηματική τοξικότητα είναι ελάχιστη. Πλήρης ανταπόκριση μετά τη χορήγηση MMC παρατηρείται στο 40% των όγκων και μερική στο 35% περίπου. Το φάρμακο έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό και στην πρόληψη των υποτροπών των μη μυοδιηθητικών όγκων. Η εφάπαξ έγχυση μιας δόσης MMC κατά την περιεγχειρητική περίοδο υπερέχει της απλής παρακολούθησης. Ο συνδυασμός με άλλα χημειοθεραπευτικά ή ανοσοθεραπευτικά φάρμακα έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην πρόληψη των υποτροπών των επιφανειακών όγκων και του Cis. Ανεπιθύμητες ενέργειες αναφέρονται σε ποσοστό 10-43% και είναι κυρίως τοπικές. Συνηθέστερη είναι η χημική κυστίτιδα (6-41%). Σπανίως, έχουν αναφερθεί ίνωση και αποτιτανώσεις του τοιχώματος της κύστης και ηωσινοφιλική κυστίτιδα. Δερματικές αντιδράσεις, όπως εξάνθημα στην περιοχή των γεννητικών οργάνων, απολέπιση των παλαμών και γενικευμένο εξάνθημα, δεν είναι σπάνιες και αποδίδονται είτε σε δερματίτιδα εξ επαφής είτε σε επιβραδυνόμενη αντίδραση υπερευαισθησίας.

Η αποτελεσματικότητα της επιρουμπικίνης είναι παραπλήσια με εκείνη της μιτομυκίνης.

Η **ενδοκυστική ανοσοθεραπεία** περιλαμβάνει την ενδοκυστική χορήγηση παραγόντων-τροποποιητών της βιολογικής απάντησης (biological response modifiers), που έχουν την δυνατότητα να προκαλούν αλλαγές (π.χ διαφοροποίηση των κυτταρικών πληθυσμών που διηθούν έναν όγκο και αύξηση της έκφρασης διαφόρων κυτοκινών ή άλλων παραγόντων) στην τοπική ανοσολογική απάντηση του οργανισμού έναντι του νεοπλασματος. Μεταξύ αυτών των παραγόντων έχει κυριαρχήσει η χρήση του *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG).

Το **αντιφυματικό εμβόλιο BCG** αποτελείται από εξασθενημένα στελέχη *Mycobacterium bovis*. Η ενδοκυστική χορήγησή του αποτελεί μορφή ενεργητικής μη ειδικής ανοσοθεραπείας. Η ανοσοτροποποιητική δράση των μυκοβακτηριδίων είχε πιθανολογηθεί από το 1929. Η χορήγησή τους για το σκοπό αυτό έγινε για πρώτη φορά το 1969 σε οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Οι ενδοκυστικές εγχύσεις με BCG πρωτοχρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία το 1976 από τον Morales. Αρχικά, η ενδοκυστική χορήγηση του BCG συνδυαζόταν με δερματικούς σκαριφισμούς, πρακτική που σήμερα έχει εγκαταλειφθεί επειδή δεν αυξάνει την αντινεοπλασματική δράση. Από το αρχικό στέλεχος των Calmette και Guérin (στέλεχος Pasteur) έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται και αρκετά άλλα στελέχη, όπως λόγω χάρη τα Connaught (Καναδάς), Tice (ΗΠΑ), Glaxo (Μ. Βρετανία), RIVM (Ολλανδία), Moreau (Βραζιλία), Berna (Ιταλία) και Tokyo 172 (Ιαπωνία). Τα στελέχη αυτά δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές από το αρχικό στις γενετικές και ανοσολογικές ιδιότητες και έχουν παραπλήσια αποτελεσματικότητα και τοξικότητα.

Σύμφωνα με 4 μετά-αναλύσεις (meta-analyses) οι ενδοκυστικές εγχύσεις BCG μετά TURBT είναι ανώτερες του TURBT μόνου του ή του

TURBT σε συνδυασμό με ενδοκυστική χημειοθεραπεία στην πρόληψη των υποτροπών για T_a και T₁ όγκους¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Επιπρόσθετα, άλλες 2 μετά-αναλύσεις έδειξαν ότι το BCG αποτρέπει ή καθυστερεί, τουλάχιστον, τον κίνδυνο εξέλιξης σε μυοδιήθηση^{155,156}. Απαιτείται η συμπληρωματική χορήγηση ενδοκυστικής θεραπείας συντήρησης με BCG για τουλάχιστον 1 έτος, ώστε να καταδειχθεί η ανωτερότητα του BCG έναντι της MMC στην πρόληψη της υποτροπής (recurrence) ή της εξέλιξης (progression)^{154,156}.

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του BCG στους μη μυοδιηθητικούς όγκους της κύστης δεν έχει αποσαφηνιστεί. Οι υπάρχουσες ενδείξεις (πειραματικές και κλινικές) προσανατολίζουν προς το σημαντικό ρόλο που παίζει το ανοσολογικό σύστημα. Αρχικά, το BCG προσκολλάται στο τοίχωμα της κύστης και μάλιστα σε θέσεις με λύση της συνεχείας του ουροθηλίου (από χημικό ή ηλεκτρικό ερεθισμό). Η σύνδεση του μορίου του BCG γίνεται με τη φιμπρονεκτίνη/fibronectin (μία γλυκοπρωτεϊνική ουσία μοριακού βάρους 440 Kda), που εκφράζεται κυρίως στη βασική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Η φιμπρονεκτίνη αποτελεί συστατικό του πήγματος που καλύπτει τις περιοχές του ουροθηλίου μετά τη διουρηθρική εκτομή. Για το λόγο αυτό η θεραπευτική χρήση ουσίων με αντιπηκτική δράση, όπως η ασπιρίνη ή τα κουμαρινικά παράγωγα, αναστέλλουν την προσκόλληση του BCG, μειώνοντας πιθανόν την αποτελεσματικότητά του. Η σύνδεση με τη φιμπρονεκτίνη επάγει μία ανοσολογική απάντηση εκ μέρους του οργανισμού, τόσο τοπική όσο και συστηματική. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της τοπικής ανοσολογικής διέγερσης είναι η διήθηση του τοιχώματος της κύστης από ανοσοϊκανά κύτταρα (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα), που συναθροίζονται σε κοκκιώματα (BCG-induced granulomas) και παραμένουν σε ενεργή κατάσταση για μακρό χρονικό διάστημα. Η αύξηση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC class II), τόσο στα φυσιολογικά όσο και

τα νεοπλασματικά κύτταρα, καθώς και η ανίχνευση κυτοκινών (IL-1, IL-2, TNF) στο τοίχωμα της κύστης θεωρούνται επιπρόσθετα χαρακτηριστικά της τοπικής ανοσολογικής απάντησης. Εξάλλου, η ενδοκυστική χορήγηση BCG προκαλεί σημαντική αύξηση διαφόρων κυτοκινών που εκκρίνονται στα ούρα, όπως οι IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α και β , και IFN- γ . Οι κυτοκίνες είναι ιδιαίτερα τοξικές έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων και πολλές από αυτές έχουν και αντιαγγειογενετική δράση. Το BCG προκαλεί επίσης και συστηματική ανοσοδιέγερση, που μάλιστα έχει τα χαρακτηριστικά της αντίδρασης υπερευαισθησίας επιβραδυνόμενου τύπου (DTH). Κλινική απόδειξη της συστηματικής απάντησης είναι η θετικοποίηση της δερμοαντίδρασης Mantoux. Κυρίως υπεύθυνα για την ανάπτυξη της DTH είναι τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα. Για την εκδήλωση όμως της αντινεοπλασματικής δράσης του BCG έχειδειχθεί ότι είναι απαραίτητη η ύπαρξη τόσο CD4⁺ όσο και CD8⁺ λεμφοκυττάρων και ότι η εξαφάνιση είτε της μίας είτε της άλλης σειράς καταργεί αυτήν την δράση. Εξάλλου και ο ρόλος των μονοπύρηνων του περιφερικού αίματος, αν και όχι πλήρως διευκρινισμένος, φαίνεται ότι είναι σημαντικός στο μηχανισμό δράσης του BCG. Μελέτες επίσης έδειξαν το σημαντικό ρόλο του μονοξειδίου του αζώτου (NO), που έχει κυτταροστατικές-κυτταροτοξικές ιδιότητες έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων, και του ενζύμου που καταλύει την αντίδραση σχηματισμού του, της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Η ενδοκυστική χορήγηση BCG επάγει τη δραστηριότητα της NOS και προκαλεί αύξηση (έως και 30 φορές) της παραγωγής NO στην ουροδόχο κύστη.

Δεν υπάρχει ομοφωνία ως προς το ιδανικό σχήμα ενδοκυστικών εγχύσεων BCG. Αρχικά, εφόσον δεν υπάρχει υποτροπή του όγκου, το σχήμα εφόδου περιλαμβάνει 6 εβδομαδιαίες εγχύσεις και στη συνέχεια απαιτείται η χορήγηση αναμνηστικών δόσεων (συνήθως 3 εβδομαδιαίες)¹⁵⁷, ως θεραπείας συντήρησης (maintenance therapy). Οι

αναμνηστικές δόσεις συνήθως επαναλαμβάνονται ανά 3-6 μήνες, ώστε να ανανεώνεται η ανοσολογική διέγερση του οργανισμού έναντι του όγκου, και για συνολικό διάστημα από 1 έως 3 έτη. Η χορήγηση σχήματος συντήρησης οδηγεί σε σημαντική μείωση του ρυθμού υποτροπής και σημαντική παράταση του ελεύθερου υποτροπής διαστήματος. Σε πρόσφατη, προοπτική, τυχαιοποιημένη μελέτη η χορήγηση πλήρους δόσης BCG για 3 έτη ως θεραπείας συντήρησης, συγκριτικά με την ετήσια θεραπεία συντήρησης, μειώνει τον ρυθμό υποτροπής σε ασθενείς υψηλού, αλλά όχι ενδιάμεσου, κινδύνου¹⁵⁸. Δεν υπήρξαν διαφορές στην πρόοδο ή την γενική επιβίωση¹⁵⁸. Αυτό το όφελος πρέπει να σταθμιστεί έναντι της αύξησης του κόστους και των πιθανών παρενεργειών¹. Εννοείται ότι η θεραπεία συντήρησης διακόπτεται επί διαγνωσθείσας, με κυστεοσκόπηση παρακολούθησης, υποτροπής, που χρήζει χειρουργικής αντιμετώπισης. Έχει αποδειχτεί ακόμη ότι η μείωση της δόσης του BCG στο 1/2 ή το 1/3 καταλήγει σε σημαντικά μικρότερη τοξικότητα χωρίς να επηρεάζεται η αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Η ενδοκυστική χορήγηση BCG ενδείκνυται κυρίως σε νεοπλάσματα υψηλής επικινδυνότητας (όπως οι ελάχιστα διαφοροποιημένοι T1 όγκοι/T1G3 και το Cis). Η αποτελεσματικότητα του BCG στην πρόληψη των υποτροπών κυμαίνεται από 58 έως και 90%. Η θεραπευτική του χορήγηση για την εκρίζωση υπολειμματικού όγκου έχει ποσοστό επιτυχίας 60-70%. Η χορήγηση ενός δεύτερου κύκλου 6 εβδομαδιαίων εγχύσεων BCG σε ασθενείς που υποτροπίασαν μετά τον πρώτο φαίνεται ότι μπορεί να επιλεγεί ακόμα και σε ασθενείς με υποτροπιάζοντες όγκους χαμηλής διαφοροποίησης (high grade)^{159,160}. Στην περίπτωση αυτή υπάρχει όμως αυξημένος κίνδυνος προόδου-εξέλιξης της νόσου, οπότε η πρόιμη ριζική κυστεκτομή είναι προτιμητέα¹. Εξάλλου, η ενδοκυστική ανοσοθεραπεία με BCG μπορεί να μειώσει το ποσοστό εξέλιξης των επιφανειακών όγκων της

κύστης σε μυοδιηθητικούς και, κατ' επέκταση, να βελτιώσει την επιβίωση των ασθενών. Η παρατήρηση αυτή δεν φαίνεται να ισχύει στο Cis.

Παρενέργειες από τη χρήση του BCG αναφέρονται σχετικά συχνά, πιθανόν επειδή ο βάκιλος Calmette-Guérin είναι ζωντανός μικροοργανισμός, που μπορεί να προκαλέσει τοπική, περιοχική ή ακόμη και συστηματική φλεγμονή, ανάλογα με τις ιδιαίτερες συνθήκες και την ανοσολογική επάρκεια του ξενιστή. Οι προκαλούμενες από το BCG ανεπιθύμητες ενέργειες μπορούν να διακριθούν σε τοπικές, συστηματικές και αλλεργικές.

Συμπτωματολογία κυστίτιδας, που τυπικά αρχίζει 2 ώρες μετά την έγχυση και διαρκεί 24-48 ώρες, παρουσιάζει η συντριπτική πλειοψηφία (90%) των αρρώστων. Μακροσκοπική αιματουρία παρατηρείται στο 43% των περιπτώσεων, αλλά σπάνια είναι σοβαρή. Συνηθέστερες συστηματικές παρενέργειες είναι ο χαμηλός πυρετός (30%), η κακουχία (24%) και η ναυτία (8%). Η αντιμετώπιση των παρενεργειών είναι ανάλογη της βαρύτητάς τους. Για τα ερεθιστικά συμπτώματα και το χαμηλό πυρετό συνήθως αρκεί η χορήγηση αναλγητικών ή και αντιχολινεργικών φαρμάκων. Σε ασθενείς με σοβαρά ή παρατεινόμενα, πέραν του 48ώρου, ερεθιστικά συμπτώματα η χορήγηση BCG πρέπει να αναβάλλεται μέχρι να βελτιωθεί η κλινική εικόνα. Στο διάστημα αυτό ενδείκνυται η χορήγηση ισονιαζίδης 300 mg/ημέρα και η επανάληψη των εγχύσεων μπορεί να γίνει με μειωμένη δόση BCG.

Σοβαρές παρενέργειες από την ενδοκυστική χορήγηση BCG θεωρούνται οι αλλεργικές αντιδράσεις και η γενικευμένη λοίμωξη ("generalised BCGitis" ή "BCG sepsis"). Οι αλλεργικές αντιδράσεις (1%) μπορούν να εκδηλωθούν με δερματικά εξανθήματα ή με αρθρίτιδα και μεταναστεύουσα αρθραλγία. Αιματογενής διασπορά του βακίλου και γενικευμένη λοίμωξη παρατηρείται πολύ σπάνια (0,4%). Η επιπλοκή αυτή συνήθως ακολουθεί τραυματικό καθετηριασμό της κύστης αμέσως πριν

την έγχυση. Έχει όμως παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις όπου το BCG χορηγήθηκε αμέσως μετά τη λήψη βιοψιών από την κύστη ή αμέσως μετά την TURBT ή ακόμη και μετά διουρηθρική προστατεκτομή (TURP). Στις περιπτώσεις αυτές δημιουργείται μία πύλη για την είσοδο των μικροοργανισμών στο αίμα και τη γενικευμένη διασπορά τους. Γενικευμένη λοίμωξη με επακόλουθη σοβαρή ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων έχει περιγραφεί και αρκετά χρόνια μετά τη λήξη της θεραπείας με BCG, ως αποτέλεσμα ανοσοκαταστολής. Η κλινική εικόνα είναι βαρειά (υψηλός πυρετός με ρίγος, διανοητική σύγχυση, αναπνευστική ανεπάρκεια, ίκτερος, επιβαρυνμένες αιμοδυναμικές παράμετροι, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, λευκοπενία και παθολογικές ηπατικές δοκιμασίες) και η πρόγνωση επιφυλακτική. Για την αποφυγή του σοβαρού αυτού συνδρόμου συνιστάται η παρεμβολή χρονικού διαστήματος τουλάχιστον μιας εβδομάδας από την TURBT μέχρι την έναρξη των ενδοκυστικών εγχύσεων BCG.

Σπανιότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από την ενδοκυστική χορήγηση BCG είναι η επιδιδυμίτιδα, η ουρητηρίτιδα και ουρητηρική απόφραξη, η πνευμονίτιδα, η ηπατίτιδα και η ρικνή κύστη. Κοκκιωματώδης προστατίτιδα αναφέρεται στο 1% των περιπτώσεων, στην πραγματικότητα όμως είναι πολύ συχνότερη, διότι οι περισσότερες περιπτώσεις είναι ασυμπτωματικές.

- **Θεραπεία του CIS**

Μέχρι και την δεκαετία του 1970 η κυστεκτομή αποτελούσε την αρχική, και ίσως τη μοναδική, θεραπεία του Cis. Η χρήση του BCG, υπό τη μορφή ενδοκυστικών εγχύσεων, άλλαξε την θεραπευτική προσέγγιση στην ιδιαίτερη αυτή μορφή καρκίνου της κύστης. Η αποτελεσματικότητα του BCG στο Cis είναι περίπου 70%. Ασθενείς στους οποίους ο πρώτος κύκλος BCG δεν είναι αποτελεσματικός, πιθανώς να ανταποκριθούν σ' έναν δεύτερο κύκλο. Η πιθανότητα υποτροπής της νόσου μειώνεται αν χορηγηθεί και θεραπεία συντήρησης.

Η πρόωμη υποτροπή μετά τον πρώτο κύκλο BCG πρέπει να ακολουθείται από επανεκτίμηση του ασθενούς για τον αποκλεισμό μυοδιηθητικής νόσου ή εξωκυστικού Cis (προστατικής ουρήθρας ή αποχετευτικής μοίρας). Το Cis της προστατικής ουρήθρας μπορεί επίσης να αντιμετωπιστεί με BCG (ανταπόκριση 48-77%). Μερικοί προτείνουν την πραγματοποίηση και διουρηθρικής προστατεκτομής πριν τις εγχύσεις. Πάντως, οι ασθενείς με Cis που δεν ανταποκρίθηκαν στο BCG θα πρέπει γενικά να θεωρούνται υποψήφιοι για κυστεκτομή. Σημειώνεται ότι το 10% των ασθενών με Cis έχει ήδη κατά την διάγνωση μεταστάσεις, λεμφαδενικές ή συστηματικές.

Η αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση του Cis αποτελεί πρόκληση και προς το σκοπό αυτό βρίσκονται σε εξέλιξη διάφορες μελέτες.

- **Θεραπεία διηθητικού καρκίνου**

Η θεραπευτική αντιμετώπιση των διηθητικών όγκων (T2-T4) περιλαμβάνει την κυστεκτομή (ριζική ή μερική), την εξωτερική ακτινοβολία, τη χημειοθεραπεία ή συνδυασμό τους. Η πραγματοποίηση μόνο διουρηθρικής εκτομής είναι ανεπαρκής μέθοδος ριζικής αντιμετώπισης των όγκων αυτών. Εξαιρέση στον κανόνα αποτελούν οι μικροί, καλώς διαφοροποιημένοι όγκοι (low Grade) που διηθούν μόνο επιφανειακά τη μυϊκή στιβάδα (T2), καθώς και εκείνοι σε ασθενείς ακατάλληλους για χειρουργική επέμβαση. Στις λίγες αυτές περιπτώσεις, η αρχική διουρηθρική εκτομή πρέπει να ακολουθείται, σε σύντομο χρονικό διάστημα, από μία δεύτερη, ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες "ριζικής" εξαίρεσης του όγκου.

Η **ριζική κυστεκτομή** είναι ο χρυσός κανόνας στην αντιμετώπιση της μη μεταστατικής διηθητικής νόσου. Η πραγματοποίησή της ενδείκνυται σε τοπικά εντοπισμένους όγκους (T2-T4a N0-Nx M0). Μπορεί να εφαρμοστεί και ως θεραπεία διάσωσης (salvage cystectomy) σε ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν σε συντηρητικές μεθόδους ή υποτροπίασαν μετά από αυτές. Εξάλλου, η ριζική κυστεκτομή αποτελεί την αποτελεσματικότερη μέθοδο αντιμετώπισης και των καρκινωμάτων που δεν εξορμώνται από το μεταβατικό επιθήλιο (αδενοκαρκίνωμα, καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου). Αντένδειξη για την εκτέλεση κυστεκτομής αποτελεί η συνύπαρξη σοβαρών παθήσεων, που μειώνουν το προσδόκιμο επιβίωσης. Η ριζική κυστεκτομή στον άνδρα περιλαμβάνει την (en bloc) αφαίρεση της κύστης, του προστάτη και των σπερματοδόχων κύστεων (ριζική κυστεοπροστατεκτομή). Στη γυναίκα η κύστη αφαιρείται μαζί με τη μήτρα, τα εξαρτήματα, την ουρήθρα και το πρόσθιο τοίχωμα του κόλπου (πρόσθια εξεντέρωση). Κατά την διάρκεια της επέμβασης, τα τελικά άκρα των ουρητήρων αποστέλλονται για ταχεία βιοψία, ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα διήθησής τους από τον όγκο ή από συνυπάρχον

Cis. Αναπόσπαστο τμήμα της κυστεκτομής παραμένει η πυελική λεμφαδενεκτομή, ο ρόλος της οποίας έχει αποτελέσει αντικείμενο αντιπαράθεσης. Αναμφισβήτητα η αφαίρεση των πυελικών λεμφαδένων έχει προγνωστική σημασία, επειδή οι λεμφαδενικές μεταστάσεις (οι οποίες παρατηρούνται στο 10-30% των T2 και το 30-65% των T3-T4 όγκων) συνεπάγονται κακή πρόγνωση. Επίσης, αναδρομικές και προοπτικές μελέτες έχουν δείξει ότι δεν ανευρίσκονται λεμφαδενικές μεταστάσεις εκτός πύελου, εφόσον οι πυελικοί λεμφαδένες είναι ελεύθεροι όγκου¹⁶¹⁻¹⁶⁶. Η θεραπευτική αξία της λεμφαδενεκτομής δεν είναι απόλυτα τεκμηριωμένη. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν αυξημένη επιβίωση μετά από εκτεταμένη (μέχρι και το διχασμό της αορτής) λεμφαδενική εξαίρεση σε μη μεταστατικούς (NOM0) ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο¹. Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η ελεύθερη εξέλιξης επιβίωση (progression-free survival) και η γενική επιβίωση (overall survival) συσχετίζονται με τον αριθμό των αφαιρούμενων λεμφαδένων κατά την κυστεκτομή, αν και δεν υπάρχουν αξιόπιστα δεδομένα για τον ελάχιστο αριθμό λεμφαδένων που πρέπει να αφαιρεθούν. Παρόλ' αυτά οι πιθανότητες επιβίωσης αυξάνουν με τον αριθμό των αφαιρούμενων λεμφαδένων¹⁶⁷. Αναδρομικές μελέτες δείχνουν ότι η αφαίρεση 10-15 λεμφαδένων αρκεί τόσο για την ακριβή σταδιοποίηση όσο και για την βελτίωση της γενικής επιβίωσης^{166,168-169}. Η σύγχρονη άποψη είναι ότι ουρηθρεκτομή θα πρέπει να γίνεται μόνον όταν ο όγκος επεκτείνεται στην προστατική ουρήθρα (στον άνδρα) ή στο τρίγωνο (στη γυναίκα), περιπτώσεις όπου ο κίνδυνος υποτροπής της νόσου μετά την κυστεκτομή είναι πολύ μεγάλος.

Η ριζική κυστεκτομή είναι μείζονος βαρύτητας χειρουργική επέμβαση και συνδέεται με επιπλοκές στο 25% των ασθενών. Αυτές σχετίζονται τόσο με την επέμβαση όσο και με συμπαρομαρτούσες παθολογικές καταστάσεις. Η θνητότητα της επέμβασης υπολογίζεται σε 1-2%. Η πνευμονική εμβολή είναι σπάνια (2%), όπως και η τρώση του ορθού

(<1%). Μεγάλη διεγχειρητική αιμορραγία είναι πολύ σπάνια. Άλλες δυνητικές επιπλοκές είναι ο ειλεός (4-10%), το στένωμα της ουρητηρο-εντερικής αναστόμωσης (3%) καθώς και οι διαταραχές που παρατηρούνται συνεπεία της χρήσης λεπτού εντέρου για την εκτροπή των ούρων (π.χ. μεταβολικές διαταραχές, ουρολοιμώξεις, λιθίαση).

Μετά την κυστεκτομή απαιτείται συστηματική περιοδική παρακολούθηση των ασθενών, ώστε να διαγνωστούν έγκαιρα η πιθανή υποτροπή ή πρόοδος της νόσου και οι ενδεχόμενες μεταβολικές διαταραχές. Η παρακολούθηση περιλαμβάνει κλινική εξέταση, αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο, ακτινογραφία θώρακα και αξονική τομογραφία άνω, κάτω κοιλίας και οπισθοπεριτοναϊκού χώρου.

Η πενταετής επιβίωση των ασθενών που υποβάλλονται σε ριζική κυστεκτομή κυμαίνεται στο 40-60%, αναλόγως του σταδίου, και κρίνεται μη ικανοποιητική. Στην προσπάθεια βελτιστοποίησης του αποτελέσματος, ως προς την επιβίωση, έχει δοκιμαστεί η χορήγηση προεγχειρητικής (neoadjuvant) χημειοθεραπείας. Κύριος σκοπός είναι η εκρίζωση τυχόν μικρομεταστάσεων ή η συρρίκνωση ενός τοπικά εκτεταμένου όγκου, ώστε να καταστεί εξαιρέσιμος (tumour downstaging). Η χορήγηση προεγχειρητικής χημειοθεραπείας καταδεικνύει και τη "χημειοευαισθησία" του όγκου, γεγονός που έχει προγνωστική αξία, επειδή η απουσία ανταπόκρισης μειώνει τις πιθανότητες αποτελεσματικής αντιμετώπισης τυχόν μεταστατικών εστιών. Μειονέκτημα θεωρείται πάντως η καθυστέρηση στη χορήγηση οριστικής θεραπείας σε περίπτωση που ο όγκος είναι χημειοανθεκτικός.

Σε τρεις μετα-αναλύσεις έχειδειχτεί ότι η χορήγηση νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας (θεραπεία συνδυασμού σισπλατίνης με τουλάχιστον ένα επιπρόσθετο χημειοθεραπευτικό) βελτιώνει την ολική επιβίωση κατά 5% στα 5 έτη¹⁷⁰⁻¹⁷². Ωφελούνται περισσότερο οι ασθενείς που ανταποκρίνονται (responders), δηλαδή αυτοί που στο παρασκεύασμα της κυστεκτομής δεν

αναγνωρίζεται όγκος (pT0N0)¹⁷³. Αντιθέτως, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα υπέρ της χορήγησης προεγχειρητικής εξωτερικής ακτινοθεραπείας¹.

- **Μερική κυστεκτομή**

Ο ρόλος της μερικής κυστεκτομής στην αντιμετώπιση του μυοδιηθητικού καρκίνου είναι περιορισμένος. Μπορεί να εφαρμοστεί σε περιπτώσεις μονήρους όγκου, που εντοπίζεται σε περιοχή της κύστης που επιτρέπει την επί υγιούς εξαίρεσή του, όπως είναι ο θόλος, και σε περιπτώσεις όγκου που εντοπίζεται σε εκκόλπωμα. Ασφαλής θεωρείται η αφαίρεση 2 cm φυσιολογικού, μακροσκοπικά, τοιχώματος κύστης περίξ του όγκου. Επιπρόσθετες προϋποθέσεις είναι η καλή λειτουργικότητα της κύστης προεγχειρητικά και η επαρκής χωρητικότητα του τμήματος της κύστης που θα απομείνει μετεγχειρητικά. Η συνύπαρξη *in situ* καρκινώματος είναι απόλυτη αντένδειξη για την πραγματοποίηση της επέμβασης. Είναι θεραπευτική πρακτική που προσφέρεται σε περιορισμένο αριθμό ασθενών και στα πλαίσια κλινικών μελετών.

- **Ακτινοθεραπεία**

Η ακτινοθεραπεία αποτελεί εναλλακτική της χειρουργικής θεραπείας μέθοδο σε όγκους T2-3N0M0 ασθενών που είναι ακατάλληλοι για χειρουργική θεραπεία ή συνδυαστική θεραπεία διατήρησης της κύστης. Επίσης, έχει ένδειξη στον έλεγχο της αιμορραγίας, που δεν αντιμετωπίζεται με συντηρητικά μέσα και διουρηθρική εκτομή-αιμόσταση, λόγω της εκτεταμένης τοπικής επέκτασης του όγκου. Εφαρμόζεται συνήθως ως εξωτερική ακτινοβολία (30-40 συνεδρίες εντός 6-7 εβδομάδων μέχρι συνολικής δόσης 60-66 Gy). Είναι αποτελεσματικότερη σε μονήρεις, μικρού μεγέθους και χαμηλού σταδίου όγκους. Η συνύπαρξη καρκινώματος *in situ* φαίνεται ότι αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα. Η πενταετής επιβίωση των ασθενών που

υποβάλλονται σε εξωτερική ακτινοβολία είναι 30-60%. Τα ποσοστά αυτά θεωρούνται ικανοποιητικά. Μία ανάλυση Cochrane των διαθέσιμων μελετών έδειξε ότι η ριζική κυστεκτομή πλεονεκτεί στην γενική επιβίωση έναντι της ακτινοθεραπείας¹⁷⁴. Στο 50% των περιπτώσεων η νόσος υποτροπιάζει τοπικά, άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα μετά τη θεραπεία.

Μετακτινική κυστίτιδα με ερεθιστικά κυστικά συμπτώματα, πρωκτίτιδα και εντερίτιδα παρατηρούνται συχνά μετά την εφαρμογή της ακτινοβολίας. Οι παρενέργειες αυτές είναι παροδικές και ελεγχόμενες. Μετακτινική στυτική δυσλειτουργία εμφανίζουν τα 2/3 των ανδρών ασθενών. Επιμονή των επιπλοκών παρατηρείται στο 5% των ασθενών.

• Χημειοθεραπεία

Απόλυτη ένδειξη χορήγησης χημειοθεραπείας είναι ο μεταστατικός καρκίνος της ουροδόχου κύστης. Το 30-40% των ασθενών με διηθητικό καρκίνο θα αναπτύξουν τελικά μεταστάσεις, ανεξαρτήτως αν υποβληθούν σε κυστεκτομή ή ριζική ακτινοθεραπεία. Η πολυδύναμη χημειοθεραπεία, δηλαδή η ταυτόχρονη χορήγηση πολλών φαρμάκων, έχει αποδειχθεί περισσότερο δραστική από τη μονοθεραπεία. Εκτός της περίπτωσης του μεταστατικού νεοπλάσματος, χημειοθεραπεία μπορεί να χορηγηθεί προεγχειρητικά (νεοεπικουρική χημειοθεραπεία/neoadjuvant chemotherapy), όπως ήδη αναφέρθηκε, και μετεγχειρητικά (επικουρική χημειοθεραπεία/adjuvant chemotherapy). Η χημειοθεραπεία έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία λόγω της ανάπτυξης και εφαρμογής πρωτοκόλλων διατήρησης της κύστης (bladder preservation protocols), που στοχεύουν μεταξύ άλλων και στην βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών.

Βάσει των δεδομένων από πέντε τυχαιοποιημένες μελέτες και μία μετα-ανάλυση, που έχουν όμως ποιοτικά προβλήματα, η επικουρική (adjuvant, μετά την κυστεκτομή) χημειοθεραπεία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με

στόχο την βελτίωση της γενικής επιβίωσης¹⁷⁵⁻¹⁸⁰. Δεν είναι επίσης ξεκαθαρισμένο αν υπάρχει διαφορά ως προς την επίδραση στην ολική επιβίωση μεταξύ άμεσα μετεγχειρητικής χορήγησής της ή χορήγησής της επί υποτροπής¹. Υπάρχουν ενδείξεις ότι από τη χορήγηση μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας πιθανόν ωφελούνται περισσότερο οι ασθενείς με pT3 νόσο και ίσως εκείνοι με pT4 ή με μικροσκοπικές λεμφαδενικές μεταστάσεις. Οι δημοσιευμένες τυχαιοποιημένες μελέτες adjuvant χημειοθεραπείας έχουν χρησιμοποιήσει 3-4 κύκλους CMV (σισπλατίνη, μεθοτρεξάτη, βινβλαστίνη) ή Cisca (σισπλατίνη, κυκλοφωσφαμίδη, αδριαμυκίνη) ή MVA(E)C (μεθοτρεξάτη, βινβλαστίνη, αδριαμυκίνη ή επιρουμικίνη, σισπλατίνη) ή CM (σισπλατίνη, μεθοτρεξάτη)¹⁸¹. Δεν υπάρχουν δεδομένα ότι πιο σύγχρονα σχήματα ή συνδυασμοί χημειοθεραπείας, που περιλαμβάνουν καρβοπλατίνη, είναι ομοίως αποτελεσματικά¹. Οι ασθενείς που δεν μπορούν να λάβουν σισπλατίνη πρέπει να αποκλείονται από την χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας¹. Εν κατακλείδι, η επικουρική χημειοθεραπεία δεν είναι ενταγμένη στην καθημερινή κλινική πρακτική, λόγω έλλειψης επαρκών αποδεικτικών δεδομένων, και προσφέρεται συχνά στα πλαίσια κλινικών μελετών. Η απόφαση λοιπόν για χορήγηση ή όχι adjuvant χημειοθεραπείας θα πρέπει πάντα να εξατομικεύεται.

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι συνδυασμοί χημειοθεραπευτικών ως πρώτης γραμμής χημειοθεραπεία έναντι του μεταστατικού καρκίνου της κύστης, όπως τα σχήματα Cisca και CMV. Βασικές επιλογές είναι τα σχήματα MVAC (μεθοτρεξάτη, βινβλαστίνη, αδριαμυκίνη, σισπλατίνη) και GC (γεμισιταμπίνη, σισπλατίνη).

Η χορήγηση MVAC είναι ανώτερη της μονοθεραπείας με σισπλατίνη και της θεραπείας με Cisca¹⁸²⁻¹⁸³. Είναι επίσης ανώτερη και του συνδυασμού CD (σισπλατίνη, δοσεταξέλη)¹⁸⁴. Τα σχήματα MVAC και GC παρατείνουν την επιβίωση κατά 14.8 και 13.8 μήνες αντίστοιχα,

συγκριτικά με τη μονοθεραπεία σισπλατίνης και το CISCA¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Κανείς συνδυασμός εκ των MVAC και GC δεν είναι ανώτερος του άλλου, αλλά η ισοδυναμία τους δεν έχει δοκιμαστεί¹. Ανταπόκριση επιτυγχάνεται στο 46% και 49% των ασθενών που έλαβαν MVAC και GC αντίστοιχα. Τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα επιβίωσης επιβεβαιώνουν την ισοδυναμία των MVAC και GC¹⁸⁸. Η σημαντικότερη μεταξύ τους διαφορά είναι η τοξικότητα. Το 3-4% των ασθενών που λαμβάνουν MVAC καταλήγει από σήψη, λόγω της προκαλούμενης μυελοκαταστολής και της επακόλουθης ουδετεροπενίας. Η χαμηλότερη τοξικότητα του GC¹⁸⁷ το έχει καθιερώσει ως θεραπεία επιλογής¹⁸⁹. Το MVAC είναι καλύτερα ανεκτό σε συνδυασμό με παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (Granulocyte Colony Stimulating Factor / G-CSF)^{184,189}. Η υψηλής έντασης δόση MVAC (HD-MVAC) σε συνδυασμό με G-CSF είναι, παραδόξως, λιγότερη τοξική και πιο αποτελεσματική, έναντι του τυποποιημένου σχήματος MVAC, σε όρους πυκνότητας δόσης, πλήρους ανταπόκρισης και διетуός επιβίωσης, χωρίς όμως σαφές πλεονέκτημα στη μέση επιβίωση¹⁹⁰⁻¹⁹¹.

Όλες οι μεταστατικές εστίες ανταποκρίνονται στη συνδυαστική χημειοθεραπεία με βάση τη σισπλατίνη, αλλά κυρίως ανταποκρίνονται οι λεμφαδενικές εστίες. Στη χορήγηση MVAC και HD-MVAC οι λεμφαδενικές μεταστάσεις ανταποκρίνονται στο 66% και 77% αντίστοιχα, ενώ οι εξωλεμφαδενικές σε ποσοστά 29% και 33% αντίστοιχα¹⁹⁰. Επίσης, η εντόπιση των μεταστάσεων επηρεάζει καθοριστικά την επιβίωση. Η 5-ετής επιβίωση για ασθενείς με μόνο λεμφαδενικές μεταστάσεις είναι 20.9% και μόλις 6.8% για ασθενείς με σπλαγχνικές μεταστάσεις¹⁸⁸.

Περαιτέρω εντατικοποίηση του σχήματος GC έχει δοκιμαστεί με την προσθήκη πακλιταξέλης. Το νέο τριπλό σχήμα PCG (πακλιταξέλη, σισπλατίνη, γεμισιταμπίνη) έχει επιτύχει καλύτερα ποσοστά ανταπόκρισης και αυξητική τάση της ολικής επιβίωσης¹⁹². Οι παρενέργειες δεν είναι

περισσότερες και έτσι το PCG συνιστά επίσης αξιόπιστη επιλογή ως πρώτης γραμμής χημειοθεραπεία.

Παράγοντες που θεωρούνται προγνωστικοί φτωχής επιβίωσης είναι η κακή φυσική κατάσταση (Karnofsky performance status $\leq 80\%$) και η παρουσία σπλαγχνικών μεταστάσεων (γνωστοί και ως προγνωστικοί παράγοντες Bajorin)¹. Έχουν επίσης αρνητική προγνωστική σημασία η αυξημένη αλκαλική φωσφατάση (ALP) αίματος και ο αριθμός των μεταστατικών εστιών (>3)¹⁸⁸. Στους ηλικιωμένους ασθενείς (>60 ετών) η χαμηλή τιμή αιμοσφαιρίνης ($<10\text{mg/dl}$) αίματος και η κακή φυσική κατάσταση (Eastern Cooperative Oncology Group / ECOG performance status 2-3) είναι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες φτωχής επιβίωσης¹⁸⁸. Η ηλικία μόνη της δεν έχει επίδραση ούτε στην ανταπόκριση ούτε στην τοξικότητα¹⁹³. Για ασθενείς ανθεκτικούς στη χημειοθεραπεία ή για ασθενείς που έχουν πρόοδο της νόσου σύντομα μετά τη χορήγηση συνδυαστικής, με βάση τη σισπλατίνη, χημειοθεραπείας αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες είναι η χαμηλή αιμοσφαιρίνη ($<10\text{mg/dl}$) αίματος, η παρουσία ηπατικών μεταστάσεων και η κακή φυσική κατάσταση (ECOG performance status ≥ 1)¹⁹⁴. Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ως ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες τη μικρού βαθμού λεμφαδενική νόσο και τη μη απώλεια βάρους πριν την έναρξη της θεραπείας¹⁰. Οι προγνωστικοί αυτοί παράγοντες θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν όταν αποφασίζεται η χορήγηση χημειοθεραπείας σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Σε ασθενείς που θα χρειαστούν δεύτερης γραμμής χημειοθεραπεία έχουν δοκιμαστεί αρκετοί παράγοντες (εβδομαδιαία πακλιταξέλη, δοσεταξέλη, οξαλιπλατίνη, ιφοσφαμίδη, τοποτεκάνη, πεμετρεξίδη, λαπατινίμπη, γκεφτινίμπη και μπορτεζομίβη)¹⁹⁵⁻²⁰³ σε μικρές κλινικές μελέτες φάσης II. Καταγράφηκε ανταπόκριση κυμαινόμενη μεταξύ 0% και 28%. Ακόμα και η γεμισιταμπίνη μπορεί να ξαναχορηγηθεί, ασχέτως

της χρήσης της ως πρώτης γραμμής φάρμακο¹. Επίσης, είναι λογική στρατηγική να ξαναχορηγηθεί σισπλατίνη σε ασθενείς που παρουσίασαν πρόοδο νόσου τουλάχιστον 6-12 μήνες μετά την αρχική συνδυαστική χημειοθεραπεία. Ο συνδυασμός PG (πακλιταξέλη, γεμισιταμπίνη) παρουσιάζει ανταπόκριση 38-60%, χωρίς πάντως να έχουμε στη διάθεσή μας επαρκή δεδομένα από τυχαιοποιημένες μελέτες φάσης III²⁰⁴⁻²⁰⁶. Η βινφλουνίνη, ένα τρίτης γενιάς αλκαλοειδές της βίνκα, έχει δείξει καλή ανταπόκριση (18%) και έλεγχο της νόσου (67%)²⁰⁷. Σε πρόσφατη μελέτη φάσης III έδειξε και στατιστικώς σημαντικό όφελος στην επιβίωση²⁰⁸. Για το λόγο αυτό είναι το μοναδικό εγκεκριμένο φάρμακο ως δεύτερης γραμμής χημειοθεραπεία στο μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνο¹. Οποιαδήποτε άλλη επιλογή γίνεται αποκλειστικά στα πλαίσια κλινικών μελετών.

Ο επιπολασμός των οστικών μεταστάσεων στον προχωρημένο και τον μεταστατικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης είναι 30-40%²⁰⁹. Τα οφειλόμενα στις μεταστάσεις σκελετικά συμβάματα προκαλούν άλγος, επιδείνωση της ποιότητας ζωής και αύξηση της θνησιμότητας²¹⁰. Τα διφωσφονικά καθυστερούν την εμφάνιση του πρώτου σκελετικού συμβάματος και γενικά ελαττώνουν τη συχνότητα αυτών, διότι αναστέλλουν με την δράση τους την οστική απορρόφηση. Η δενοσουμάμπη (Denosumab) είναι πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα. Συνδέεται μ' ένα μόριο-συνδέτη, το RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor-κB Ligand), και το εξουδετερώνει. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλεται η οστεοκλαστική δραστηριότητα και προλαμβάνονται η γενικευμένη οστική απορρόφηση και η τοπική οστική καταστροφή. Είναι ισάξια με το ζολεδρονικό οξύ (διφωσφονικό) στην πρόληψη ή καθυστέρηση των σκελετικών συμβαμάτων σε ασθενείς με προχωρημένη μεταστατική οστική νόσο, συμπεριλαμβανομένων των ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνωμα²¹¹. Η δενοσουμάμπη και το

ζολεδρονικό οξύ έχουν λάβει έγκριση για χορήγηση σε ασθενείς με οστικές μεταστάσεις οφειλόμενες σε συμπαγείς όγκους. Πιθανές κοινές επιπλοκές των δύο ουσιών είναι η οστεονέκρωση της κάτω γνάθου και η υπασβεστιαμία. Το ζολεδρονικό οξύ συσχετίζεται συχνότερα με πρόκληση νεφρικής ανεπάρκειας και απαιτείται μείωση της δόσης του σε ασθενείς με ήδη υπάρχουσα νεφρική υπολειτουργία. Γενικά και οι δύο ουσίες κρίνονται ασφαλείς και σπάνια χρειάζεται η διακοπή της χρήσης τους, λόγω παρενεργειών. Το ζολεδρονικό οξύ χορηγείται σε δόση 4mg ενδοφλέβια ανά 3-4 εβδομάδες και η δενοσουμάμπη χορηγείται υποδόρια σε δόση 120mg κάθε μήνα. Πάντα χορηγούνται συμπληρωματικά στους ασθενείς συμπληρώματα ασβεστίου και βιταμίνης D.

• Συνδυασμένη θεραπεία διατήρησης της κύστης (Multimodality bladder-preserving treatment)

Η ελκυστική προοπτική διατήρησης της κύστης σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνο οδήγησε στην ανάπτυξη θεραπευτικών συνδυασμών διουρηθρικής εκτομής του όγκου (TUR-BT), χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας (Multimodality bladder-preserving treatment/MBPT)²¹²⁻²¹³. Η TUR-BT και η εξωτερική ακτινοθεραπεία στοχεύουν στην επίτευξη τοπικού ελέγχου του όγκου και η χημειοθεραπεία αποσκοπεί στην εκρίζωση των μικρομεταστάσεων. Συνηθέστερα χορηγούμενο χημειοθεραπευτικό σχήμα είναι το MCV (μεθοτρεξάτη, σισπλατίνη, βινβλαστίνη)¹.

Ερευνητές αναφέρουν ότι το καλό αποτέλεσμα της MBPT εξαρτάται από το στάδιο της νόσου (T), την παρουσία λεμφαγγειακής διήθησης, την κατάσταση του υπολειπόμενου όγκου και την αρχική ανταπόκριση, όπως αυτή αποτυπώνεται στην επανασταδιοποιητική TUR-BT²¹⁴. Η ριζικότητα της αρχικής TUR-BT είναι σημαντική. Θεωρούνται επίσης ευνοϊκοί προγνωστικοί παράγοντες το μικρό μέγεθος του όγκου, η παρουσία

μονήρους όγκου και η απουσία υδρονέφρωσης¹⁰. Έχουν γίνει αρκετές μικρές μελέτες, που διαφέρουν όμως στο σχεδιασμό και την επιλογή ασθενών²¹⁵⁻²¹⁸. Αυτές αναφέρουν ποσοστά 5-ετούς γενικής επιβίωσης στο 70% περίπου. Η πρώιμη κυστεκτομή ενδείκνυται στους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται πλήρως. Περίπου 40-45% των ασθενών που υποβάλλονται σε MBPT επιβιώνει 4-5 έτη με άθικτη την κύστη²¹³.

Η ριζική κυστεκτομή και η MBPT δεν έχουν συγκριθεί άμεσα. Η MBPT απαιτεί διατμηματική συνεργασία ιατρικών ειδικοτήτων και απόλυτη συμμόρφωση του ασθενή. Η εύρεση pT0 στην επαναληπτική TUR-BT, μετά την αρχική TUR-BT που ακολουθήθηκε από το συνδυασμό χημειοθεραπείας-ακτινοθεραπείας, είναι σημαντικός προγνωστικός παράγοντας. Ακόμα και στην περίπτωση αυτή όμως ο ασθενής συνεχίζει να είναι σε κίνδυνο ενδοκυστικής υποτροπής και θα χρειαστεί εντατική παρακολούθηση και πολλαπλές επανεπεμβάσεις. Διατυπώνεται η άποψη ότι η καθυστερημένη κυστεκτομή, λόγω αρχικής εφαρμογής MBPT, αυξάνει τον κίνδυνο ύπαρξης λεμφαδενικών μεταστάσεων. Συμπερασματικά, η θεραπευτική στρατηγική της MBPT θεωρείται, επί του παρόντος, ερευνητική. Η χρησιμότητά της πρέπει να κριθεί σε προοπτικές, τυχαιοποιημένες μελέτες.

Β' Μέρος

**Μελέτη προγνωστικών και προβλεπτικών
παραγόντων καρκίνου της ουροδόχου κύστης.**

**Διερεύνηση των συστημάτων
NEP/Νευροπεπτιδίων και Ουβικουιτίνης/
Πρωτεασώματος/NFκΒ**

1. Το μοριακό μονοπάτι NFκB – ουβικουΐτινης - πρωτεασώματος

Η οικογένεια πρωτεϊνών NF-kappaB (NF-κB) ή Rel είναι μία οικογένεια δομικά ομόλογων ευκαρυωτικών μεταγραφικών παραγόντων, που εμπλέκεται στον έλεγχο πολλών φυσιολογικών κυτταρικών διαδικασιών, όπως ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις, αναπτυξιακές διαδικασίες, κυτταρική αύξηση και απόπτωση. Επίσης, είναι ενεργή σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, η αρθρίτιδα, η χρόνια φλεγμονή, το άσθμα, τα καρδιαγγειακά και τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα.

Οι πρωτεΐνες NF-κB έχουν μία εξελικτικά διατηρημένη δομική περιοχή πρόσδεσης στο DNA/διμερισμού, την περιοχή ομολογίας Rel (Rel Homology Domain/RHD)²¹⁹. Ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες με βάση την άμεσως ακόλουθη αλληλουχία, προς την κατεύθυνση του καρβοξυλικού άκρου, μετά την RHD. Η πρώτη κατηγορία, η κατηγορία των NF-κB πρωτεϊνών (p105, p100), έχει εκτεταμένα καρβοξυλικά άκρα, που περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα αλληλουχιών αγκυρίνης, τα οποία αναστέλλουν τα ίδια τα πρωτεϊνικά μόρια. Τα μέλη αυτής της κατηγορίας μετατρέπονται σε μικρότερες ενεργείς πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (το p105 σε p50 και το p100 σε p52), μέσω είτε εν μέρει πρωτεόλυσης είτε διακοπής μετάφρασης^{220,221}. Επομένως, τα μέλη της πρώτης κατηγορίας δε λειτουργούν συνήθως ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές, εκτός αν σχηματίσουν ετεροδιμερή με κάποιο μέλος της δεύτερης κατηγορίας. Η δεύτερη κατηγορία, οι πρωτεΐνες Rel, περιλαμβάνει το RelA (p65), το RelB και το c-Rel. Οι Rel πρωτεΐνες έχουν στο καρβοξυλικό τους άκρο αυστηρά διατηρημένες εξελικτικά περιοχές ενεργοποίησης μεταγραφής²²¹.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες Rel/NF-κB προσδένονται ως διμερή σε ένα μοτίβο αλληλουχίας DNA 9-10bp, που λέγονται μοτίβα κB. Όλες οι Rel πρωτεΐνες σχηματίζουν ετεροδιμερή ή ομοδιμερή, πλην της RelB που σχηματίζει μόνο ομοδιμερή. Το συχνότερο ετεροδιμερές είναι το p50/RelA, που είναι ο κυριότερος μεταγραφικός παράγοντας για την πλειοψηφία των ευκαρυωτικών κυττάρων²²².

Η δραστηριότητα του NF-κB ελέγχεται κυρίως μέσω των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB. Οι πρωτεΐνες IκB (π.χ IκBa, IκBβ, IκBε) δείχνουν διαφορετική συγγένεια για τα διάφορα συμπλέγματα Rel/NF-κB, έχουν διαφορετικό έλεγχο λειτουργίας και εξειδικευμένη ιστική έκφραση^{221,223}.

Η καλύτερα μελετημένη αλληλεπίδραση είναι αυτή του IκBa με το διμερές p50/RelA. Αυτή η αλληλεπίδραση αποτρέπει την πρόσδεση του NF-κB στο DNA, με συνέπεια το σύμπλεγμα NF-κB να βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, λόγω ενός ισχυρού σήματος εξόδου από τον πυρήνα στο IκBa. Πρακτικά το σύμπλεγμα NF-κB/ IκB βρίσκεται σε συνεχή μετακίνηση μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, αλλά το σήμα εξόδου υπερτερεί του σήματος εισόδου στον πυρήνα, διατηρώντας έτσι την δυναμική της σηματοδότησης^{221,224}. Αντίθετα, όταν το NF-κB δεν συνδέεται με το IκB, τότε μετακινείται, ως ελεύθερο NF-κB, προς τον κυτταρικό πυρήνα.

Όταν ένα κύτταρο διεγερθεί από ποικιλία εξωκυττάρων σημάτων, τότε το NF-κB μετακινείται ταχέως στον πυρήνα, όπου ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων-στόχων. Σχεδόν όλα τα σήματα που ενεργοποιούν τον NF-κB ενέχουν ενεργοποίηση ενός συμπλόκου κινασών σερίνης-θρεονίνης ειδικών για το IκB, του συμπλόκου αναστολέων του IκB (IκB kinase, IKK). Η IKK στα περισσότερα κύτταρα έχει τουλάχιστον 3

υπομονάδες: IKKα, IKKβ και IKKγ (NEMO). Οι υπομονάδες IKKα και IKKβ είναι καταλυτικές υπομονάδες κινάσης. Το IKKγ είναι ρυθμιστική υπομονάδα, που λειτουργεί διαγνωστικά και ρυθμιστικά ως προς τη σηματοδότηση για την ενεργοποίηση των καταλυτικών υπομονάδων. Στην "κλασική" ή "κανονική" οδό ενεργοποίησης του NF-κB η ενεργοποίηση του συμπλέγματος IKK οδηγεί σε φωσφορυλίωση από το IKKβ δύο σερινικών θέσεων στο αμινοτελικό άκρο του IκBα, γεγονός το οποίο αποτελεί σήμα για ουβικουϊτίνωση και πρωτεασωμική αποδόμηση. Στη "μη κανονική" ή "εναλλακτική" οδό, το σύμπλεγμα p100/RelB ενεργοποιείται από φωσφορυλίωση του p100 από ένα ομοδιμερές IKKα (χωρίς την υπομονάδα NEMO), οδηγώντας σε ουβικουϊτίνωση και μερική πρωτεόλυση του p100, μετατρέποντάς το έτσι στο ενεργό p52/RelB. Η εναλλακτική οδός είναι ενεργή σε B λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα^{221,223-225}. Και στις δύο οδούς, το ελεύθερο σύμπλεγμα NF-κB εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί μεταγραφικά γονίδια-στόχους. Στην "κλασική" οδό ένα εκ των γονιδίων-στόχων είναι αυτό που κωδικοποιεί το IκBα²²⁶. Το νεοσυντιθέμενο IκBα εισέρχεται στον πυρήνα, συνδέεται με το NF-κB, αποσυνδέοντάς το έτσι από το DNA, και το σύμπλεγμα NF-κB/ IκBα εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα, επαναφέροντας με τον τρόπο αυτό την κατάσταση ισορροπίας. Ως εκ τούτου, η ενεργοποίηση του NF-κB είναι βραχείας διάρκειας κατάσταση (30-60' στα περισσότερα κύτταρα)^{221,223-225}.

Εκτός των προαναφερθέντων, υπάρχει πλήθος ενδείξεων ότι ο έλεγχος της οδού του NF-κB είναι περισσότερο σύνθετη διαδικασία. Για παράδειγμα, το RelA και το p50 ρυθμίζονται από ουβικουϊτίνωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, σουμουλίωση, οξειδωση/αναγωγή και προπυλ-ισομερίωση. Επιπρόσθετα, ως αποτέλεσμα της διέγερσης του NF-κB (τουλάχιστον μέσω TNF) επάγεται ενεργοποίηση και του IKKα.

Αυτό εισέρχεται στον πυρήνα, συνδέεται με θέσεις κB γονιδιακών προαγωγών/ενισχυτών και φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3, η οποία επάγει τη μεταγραφή των κB γονιδίων-στόχων. Στην πράξη, σε αντιστοιχία με τους εξωκυττάριους διεγέρτες του NF-κB, υπάρχει ένας αριθμός ενδοκυττάριων συν-ενεργοποιητών, όπως PKA, CPB ακετυλάσες, p300, p/CAF και p160 πρωτεΐνες. Αντίστοιχα, υπάρχουν ενδοκυττάριοι αναστολείς του NF-κB, όπως είναι η οικογένεια αποακετυλιασών ιστονών (Histone Deacetylase/HDAC), π.χ HDAC1 και HDAC3^{223-224,227-228}.

Το σύστημα ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος (ubiquitin-proteasome/UPS) είναι μία απαραίτητη κυτταρική ρυθμιστική μηχανή, που παίζει βασικό ρόλο σε πρωτεολυτικές και μη πρωτεολυτικές λειτουργίες, που επηρεάζουν πολλές σχετιζόμενες με τον καρκίνο διεργασίες, όπως την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τον έλεγχο της γήρανσης και της οξειδωσης, την απόπτωση, την κυτταρική σηματοδότηση, την επιδιόρθωση του DNA, το χρωματινικό ανασχηματισμό και τη μεταγραφή^{224,229-231}. Το πρωτεασωματικό σύμπλεγμα 26S είναι ένα μεγάλο (2.4Mda) ετερογενές σύμπλεγμα πρωτεϊνών με διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Υπάρχει στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα όλων των κυττάρων. Αποτελείται από δύο πολυπρωτεϊνικά υποσυμπλέγματα, ένα κεντρικό σύμπλοκο πρωτεάσης, το 20S πρωτεάσωμα, και μία ρυθμιστική υπομονάδα, το 19S πρωτεάσωμα ή PA700²³². Το καταλυτικό κέντρο του συμπλέγματος, το 20S πρωτεάσωμα (700kDa), είναι αυστηρά διατηρημένο εξελικτικά, με απλές μορφές παρούσες ακόμα και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Το 20S πρωτεάσωμα αποτελείται από δύο όμοια δομικά τμήματα, 14 πρωτεϊνικών υπομονάδων το καθένα. Οι 14 πρωτεϊνικές υπομονάδες είναι διαταγμένες σε δύο δακτυλιούς, που ο καθένας έχει 7 από αυτές

(α1-α7 και β1-β7). Συνολικά λοιπόν σχηματίζεται ένας κυλινδρικός σχηματισμός με τέσσερις επταμερείς δακτυλίους. Το σύμπλεγμα 20S διαθέτει σε κάθε μία από τις δύο β-υπομονάδες τρία ξεχωριστά καταλυτικά κέντρα (συγκεκριμένα στα αμινοτελικά άκρα των β1, β2, β7). Αυτά τα καταλυτικά κέντρα μαζί (συνολικά 6), υδρολύουν σχεδόν όλους τους πεπτιδικούς δεσμούς. Τα υποστρώματα εισέρχονται στον κεντρικό καταλυτικό πυρήνα από εγκάρσιες εισόδους των α-υπομονάδων, αλλά μόνο παρουσία ενεργοποιητών (όπως το PA700). Σε απουσία ενεργοποιητών, οι είσοδοι κλείνουν και η δραστηριότητα του πρωτεασώματος αναστέλλεται^{229,232-234}.

Η φωσφορυλίωση της αλληλουχίας προλίνη-γλουταμικό-σερίνη-θρεονίνη (proline-glutamate-serine-threonine/PEST) ή αλληλουχιών τύπου PEST ως απάντησης σε σήματα κυτταρικής στόχευσης προκαλεί την έναρξη ουβικουϊτίωσης και στοχοποιεί τις πρωτεΐνες για πρωτεασωματική επεξεργασία και/ή αποδόμηση. Η φωσφορυλιωμένη PEST αναγνωρίζεται από λιγκάσες ουβικουϊτίνης, οι οποίες καταλύουν την προσθήκη ενός μορίου ουβικουϊτίνης. Έπειτα, προστίθεται μία αλυσίδα πολυουβικουϊτίνης χαρακτηριστικού σχηματισμού, μέσω της οποίας το πρωτεάσωμα αναγνωρίζει πρωτεΐνες προς αποδόμηση^{224,229,232,235}.

Αναλυτικά, η σύνδεση μίας πρωτεΐνης με την ουβικουϊτίνη γίνεται σε τρία στάδια, που καταλύονται από τρεις κατηγορίες ενζύμων. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα ένζυμα E1 που ενεργοποιούν την ουβικουϊτίνη. Τα E1 χρησιμοποιώντας ενέργεια από την αποδόμηση του ATP συνδέονται, μέσω ενός μορίου κυστεΐνης, με την ουβικουϊτίνη και την ενεργοποιούν. Ακολούθως, η ουβικουϊτίνη μεταφέρεται σ' ένα μόριο κυστεΐνης ενός ενζύμου της κατηγορίας E2 (ubiquitin conjugating enzyme). Στο τρίτο στάδιο η συνδεδεμένη ουβικουϊτίνη μεταφέρεται, με

την βοήθεια του ενζύμου E3 που έχει δράση λιγκάσης της ουβικουΐτινης, στην πρωτεΐνη-στόχο. Η ε-αμίνη μίας λυσίνης του μορίου της πρωτεΐνης-στόχος συνδέεται με την καρβοξυτελική γλυκίνη της ουβικουΐτινης. Επιπρόσθετα μόρια ουβικουΐτινης μπορούν να συνδεθούν, μέσω αμινοξέων λυσίνης, συνήθως του K48, στο παραπάνω σύμπλεγμα του μορίου της ουβικουΐτινης. Η σύνδεση της ουβικουΐτινης με πρωτεΐνες-στόχους, μέσω άλλων λυσινών του μορίου της, όπως K29 και K63, δεν αποτελεί μήνυμα αναγνώρισης για αποδόμηση από το πρωτεάσωμα, αλλά εμπλέκεται σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η επιδιόρθωση του DNA και η ενδοκυττάρωση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Χρειάζεται τουλάχιστον μία αλυσίδα 4 μορίων ουβικουΐτινης, ώστε η πρωτεΐνη-στόχος να αναγνωριστεί και να αποδομηθεί από το πρωτεάσωμα. Η επιμήκυνση της αλυσίδας των ουβικουΐτινών υποβοηθείται σε μερικές περιπτώσεις από τα ένζυμα E4. Πλήθος ενζύμων λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία σύνδεσης με ουβικουΐτινη. Υπάρχουν τουλάχιστον 50 διαφορετικά ένζυμα τύπου E2 και πολλά τύπου E3, που ανήκουν σε τρεις οικογένειες: i) αυτά που φέρουν τομείς HECT (Homologous to E6-associated protein C-terminus), ii) αυτά με τομείς RING (Really Interesting New Gene) και iii) αυτά που περιέχουν τομείς τύπου U-box²³⁶⁻²⁴¹.

Μετά την αναγνώριση μίας πολυ-ουβικουΐτινωμένης πρωτεΐνης, η ρυθμιστική υπομονάδα 19S απο-ουβικουΐτινώνει το υπόστρωμα ως προετοιμασία για την πρωτεόλυση. Η αντίδραση καταλύεται από ειδικά ένζυμα, τις απο-ουβικουΐτινάσες. Στα ανθρώπινα κύτταρα έχουν περιγραφεί περισσότερα από 70 τέτοια ένζυμα^{224,229,232,238}.

Το πρωτεάσωμα στοχεύει σε πρωτεΐνες που είναι κατεστραμμένες, οξειδωμένες ή εσφαλμένα περιελιγμένες. Επίσης, ενορχηστρώνει την διατεταγμένη διάσπαση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών που ορίζουν τον

κυτταρικό κύκλο, την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα, την απόπτωση και την διακίνηση κυττάρων^{229,242-244}. Πρόσφατα έχει αναγνωριστεί ότι έχει και πολύ σημαντικούς μη πρωτεολυτικούς ρόλους που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, την εξέλιξη του καρκίνου και την αντίσταση στη χημειο- και ακτινοθεραπεία. Αυτοί οι ρόλοι διενεργούνται μέσω από-ουβικουϊτίνωσης, σουμουλίωσης ή NEDDυλίωσης πρωτεϊνών^{230,231}.

Το πρωτεάσωμα είναι ένας ευαίσθητος μηχανισμός που μπορεί να προσαρμόζεται ανάλογα, ώστε να ελέγχει την ομοιόσταση της ουβικουϊτίνης, ακόμα και αν είναι σε αναστολή^{229,245}. Επιπλέον, τα κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν τη λειτουργία του πρωτεασώματος ως απάντηση στην αλλαγή των φυσικών απαιτήσεων (για παράδειγμα, ως ανταπόκριση στην βλάβη DNA που προκαλούν χημειοθεραπευτικοί παράγοντες). Η ρύθμιση γίνεται είτε μεταβάλλοντας το συνολικό αριθμό των πρωτεασωμάτων είτε διαφοροποιώντας τη σύνθεση υπομονάδων των πρωτεασωμάτων είτε διαφοροποιώντας την υποκυτταρική εντόπιση του συμπλόκου^{229,246}.

Το σύστημα UPS ρυθμίζει πολλά βήματα στην οδό NFκB: i) την ουβικουϊτίνωση και πρωτεολυτική αποδόμηση της IκB, ii) την επεξεργασία των πρόδρομων μορφών NFκB (p100 και p105) και iii) την ενεργοποίηση της κίνησης IκB (IKK), το τελευταίο τόσο σε εξάρτηση όσο και ανεξάρτητα της διάσπασης^{224,235}.

Η μπορτεζομίμη (bortezomib ή PS-341/ Velcade της Millenium Pharmaceuticals και Bortecad της Cadila Healthcare) είναι ο πρώτος αναστολέας πρωτεασώματος που χρησιμοποιήθηκε κλινικά. Τον Μάιο του 2003 έλαβε έγκριση από τον FDA (Food and Drug Administration) στις Η.Π.Α για χρησιμοποίηση στην θεραπεία του πολλαπλού

μυελώματος, βάσει των αποτελεσμάτων της φάσεως II κλινικής μελέτης SUMMIT. Χρησιμοποιείται επίσης στην θεραπεία ενός σπάνιου non-Hodgkin λεμφώματος, του MCL (Mantle cell lymphoma). Είναι πεπτίδιο που ανήκει στις πεπτιδύλ-αλδεΐδες και είναι παράγωγο του βορονικού οξέος (N-πυραζιν-καρβονυλ-L-φαινυλαλανίνη-L-λευκίνη βορονικό οξύ). Αυτά τα παράγωγα σε αντίθεση με άλλες πεπτιδύλ-αλδεΐδες, όπως η λιουπεπτίνη και η παπαΐνη, είναι ειδικοί αναστολείς του πρωτεασώματος. Η μπορτεζομίμη αναστέλλει ειδικά την ενζυμική δραστηριότητα χυμοτρυψίνης του πρωτεασώματος, ενώ δεν επηρεάζει άλλα σημαντικά ένζυμα του κυττάρου, όπως η τρυψίνη, η θρομβίνη, η χυμοτρυψίνη, η καθεψίνη B και η ελαστάση^{242,247-249}.

Φαρμακοκινητικές μελέτες έδειξαν ότι η συγκέντρωση της μπορτεζομίμης ακολουθεί μία κλασική διφασική μείωση μετά από χορήγηση μίας δόσης. Δεν διέρχεται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Ο καταβολισμός της γίνεται με οξειδωτική αφαίρεση του βορονικού οξέος, υδροξυλίωση των αποβορονιομένων παραγώγων και ηπατική και νεφρική απέκκριση. Δόσεις 1.04 έως 1.38 mg/m² επιφάνειας σώματος οδηγούν σε πρωτεασωμική αναστολή της τάξεως του 70-80%. Το Velcade έχει αποδεδειγμένη κυτταροτοξικότητα στην κυτταρική σειρά προστάτη PC-3 in vitro με GI₅₀:7nM και ακόμη σταματάει την αύξηση του όγκου από τα ίδια κύτταρα σε ζωικά μοντέλα^{235,242,248}. Η μπορτεζομίμη έχει χρησιμοποιηθεί σε μία φάσεως I κλινική μελέτη σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, όπου αποδείχθηκε ότι η μέγιστη ανεκτή και αποτελεσματική δόση ήταν τα 1.6 mg/m² επιφάνειας σώματος χορηγούμενα ενδοφλεβίως εβδομαδιαία για 4 εβδομάδες με κύκλο 5 εβδομάδων. Η μέση αναστολή πρωτεασωμικής δραστηριότητας 1 ώρα μετά την χορήγηση της δόσης ήταν $\geq 75\%$. Στις δόσεις αυτές υπήρξαν

ενδείξεις βιολογικής δραστηριότητας (μείωση δεικτών σχετικών με το NFκΒ) και αντινεοπλασματικής δράσης^{235,243}.

2. Ο άξονας Ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης - νευροπεπτιδίων

Η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (Neutral endopeptidase/NEP) είναι ένα ένζυμο γνωστό επίσης ως CD10, εγκεφαλινάση (enkephalinase) και κοινό αντιγόνο της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen/CALLA). Εντοπίζεται στο χρωματόσωμα 3 (3q21-27). Ανήκει στις πεπτιδάσες και είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II (90-110kDa, με 750 αμινοξέα μήκος πρωτεϊνικής αλληλουχίας). Είναι μέταλλο-ενδοπεπτιδάση ψευδαργύρου τύπου θερμολυσίνης της οικογένειας M13 πεπτιδασών, που εκφράζεται από διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του προστάτη.

Τροποποιεί την κυτταρική απάντηση σε πεπτιδικές ορμόνες ρυθμίζοντας την συγκέντρωση τοπικών πεπτιδίων. Γενικά, ελαττώνει την κυτταρική απάντηση στις πεπτιδικές ορμόνες υδρολύοντάς τις. Συγκεκριμένα, διασπά πεπτιδικούς δεσμούς σε πεπτίδια μήκους έως και 30 αμινοξέων στο αμινικό άκρο των υδρόφοβων αμινοξέων τους, ιδίως σε θέσεις φαινυλαλανίνης ή τυροσίνης. Τέτοια ενεργά ενδογενή πεπτίδια, όπως τα οπιούχα πενταπεπτίδια Met-εγκεφαλίνη και Leu-εγκεφαλίνη, η ουσία P, η βραδυκινίνη, η αγγειοενσίνη I και II, η ενδοθηλίνη 1 και πεπτίδια τύπου βομβεσίνης, ονομάζονται συνολικά νευροπεπτίδια (Neuropeptides/NPs). Με τον τρόπο αυτό μειώνονται οι συγκεντρώσεις πεπτιδίων που είναι διαθέσιμες για σύνδεση σε υποδοχείς και επαγωγή σημάτων²⁵⁰⁻²⁵³. Επιπρόσθετα της ενζυματικής λειτουργίας η NEP έχει πολλές βιολογικές δράσεις. Έχει άμεσο ρόλο στην παραγωγή και μετάδοση σημάτων σε μονοπάτια ρύθμισης της κυτταρικής ανάπτυξης και απόπτωσης²⁵⁴. Επίσης, στους μη αιμοποιητικούς ιστούς ρυθμίζει την μεσολαβούμενη από πεπτίδια κυτταρική υπερπλασία²⁵⁵.

Οι ενδοθηλίνες (endothelins/ETs) είναι μία οικογένεια τριών πεπτιδίων, των ενδοθηλίνη-1 (endothelin-1/ET-1), ενδοθηλίνη-2

(endothelin-2/ET-2) και ενδοθηλίνη-3 (endothelin-3/ET-3), που είναι ισχυρά αγγειοσυσπαστικά και μιτογόνα πεπτίδια εμπλεκόμενα στην παθοφυσιολογία πολλών ανθρώπινων νεοπλασμάτων (π.χ του προστάτη, των ωοθηκών, του νεφρού, του πνεύμονος, του ορθού, του κόλου, του μαστού, του τραχήλου, του ενδομητρίου, της κύστης, του εγκεφάλου, του μελανώματος και του σαρκώματος Kaposi)²⁵⁶⁻²⁵⁹. Το σημαντικότερο εξ αυτών, με ισχυρή δράση στα επιθηλιακά κύτταρα, είναι η ET-1. Η βιολογική δράση των ETs διενεργείται μέσω της ενεργοποίησης δύο υποδοχέων τύπου σύνδεσης με G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors/GPCR), των υποδοχέων A (endothelin-A receptor/ETAR) και B (endothelin-B receptor/ETBR). Ο ETBR έχει ίδιο βαθμό συγγένειας και με τις τρεις ETs, ενώ ο ETAR έχει 2 φορές χαμηλότερο βαθμό συγγένειας με την ET-3 συγκριτικά με τις άλλες δύο. Η ενεργοποίηση του ETBR οδηγεί κυρίως στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μηχανισμών που ανταγωνίζονται το σηματοδοτικό μονοπάτι του ETAR. Η ενεργοποίηση του ETAR οδηγεί σε ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C, η οποία προκαλεί διάσπαση της διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης, και η ενεργοποίηση της οδού της μιτογόνο-ενεργοποιούμενης κινάσης πρωτεΐνης (Mitogen-activated protein kinase/MAPK), τα οποία μονοπάτια οδηγούν σε μεταγραφική ενεργοποίηση διαφόρων άμεσων γονιδίων-στόχων²⁵⁸.

Η ET-1 είναι ένα πολυλειτουργικό πεπτίδιο. Παράγεται από ένα πρόδρομο μόριο, την προενδοθηλίνη-1 μέσω της δράσης του μετατρεπτικού της ενδοθηλίνης ενζύμου-1 (Endothelin-converting enzyme-1/ECE-1). Συνδέεται με τους ETAR και ETBR. Η διέγερση των λειών μυϊκών ινών των αγγείων, η μιτογένεση και η παραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor/VEGF) μεσολαβούνται κυρίως από τον ETAR. Η δράση

του ETBR φαίνεται να διαφέρει σε διάφορους ιστούς και καρκινικούς τύπους. Στις λείες μυϊκές ίνες η δράση του ETBR είναι ίδια με του ETAR (αγγειοσύσπαση και ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου Ca^{++})²⁶⁰ και σε καρκίνους όπως του μαστού και των ωοθηκών μεσολαβεί την ενεργοποίηση της κυτταρικής υπερπλασίας και της μετανάστευσης²⁶¹⁻²⁶⁴. Αντίθετα, στον καρκίνο του προστάτη, όπου η έκφραση του ETBR είναι κυρίως στο επιθηλιακό στοιχείο²⁶⁵, η ενεργοποίηση του ETBR έχει ανταγωνιστική δράση με αυτή του ETAR^{260,265}. Ο άξονας ενδοθηλίνης φαίνεται ότι υπερεκφράζεται στον διηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης²⁶⁶. Η ET-1 και οι υποδοχείς της αναφέρονται συχνά ως ‘‘άξονας ενδοθηλίνης’’.

Η σύνδεση της ET-1 στον υποδοχέα της πυροδοτεί την ενεργοποίηση ενός δικτύου μονοπατιών πολλαπλής σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων της δραστηριότητας της φωσφολιπάσης C, της αύξησης του ενδοκυττάριου Ca^{+2} , της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C και της ενεργοποίησης της MAPK²⁵⁸. Τα μονοπάτια αυτά δρουν συνεργικά και συνδυαστικά, ώστε να οδηγήσουν το μιτογενετικό σήμα στον πυρήνα και να ευοδώσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η δραστηριότητα αυτή ενισχύεται περαιτέρω από την αλληλεπίδραση με υποδοχείς κινάσων τυροσίνης, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)²⁵⁸. Επιπλέον, η ET-1 διεγείρει την ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3 (phosphatidylinositol 3-kinase/PI3K), η οποία ενεργοποιείται μεσολαβείται από την πρωτεϊνική κινάση B (protein kinase B/PKB or Akt), γεγονός που δείχνει ότι ο άξονας της ενδοθηλίνης ενεργοποιεί ένα πολύπλοκο δίκτυο σηματοδότησης, που είναι εξαιρετικά συντονισμένο κατά την κυτταρική αύξηση (cell growth)²⁵⁸.

Πέραν της διέγερσης της υπερπλασίας, η ET-1 έχει σημαντικό ρόλο στην νεοαγγειογένεση των όγκων. Ο ETBR μεσολαβεί στη μιτογένεση των ενδοθηλιακών κυττάρων και ο ETAR τη μιτογένεση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων και των περικυττάρων²⁵⁸. Η ET-1 ρυθμίζει διάφορα στάδια της νεοαγγειογένεσης, όπως πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων, μετανάστευση, διήθηση, παραγωγή πρωτεασών, σωληνοποίηση²⁵⁸. Επίσης, διεγείρει την νεοαγγειογένεση *in vivo*²⁵⁸. Η αυξημένη έκφραση του άξονα της ενδοθηλίνης σχετίζεται σημαντικά με την πυκνότητα των μικροαγγείων (microvessel density/MVD) και την έκφραση του VEGF στα ογκοκύτταρα²⁵⁸.

Η ET-1 είναι αντιαποπτωτικός παράγοντας σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και πιθανώς ρυθμίζει μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης, όπως η μεσολαβούμενη από την PKB (or Akt) ενεργοποίηση της PI3K²⁵⁸.

Τέλος, ο άξονας της ενδοθηλίνης επάγει την δραστηριότητα δύο οικογενειών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μετάσταση, των μεταλλοπρωτεϊνών και του συστήματος του ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (urokinase type plasminogen activator/uPA system), με αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση του διηθητικού δυναμικού των ογκοκυττάρων²⁵⁸. Επιπρόσθετα, η διασταυρούμενη ενεργοποίηση του EGFR από τον ETAR είναι εν μέρει υπεύθυνη για έκκριση προσταγλανδίνης E₂ και VEGF, δραστηριότητα μεταλλοπρωτεΐνωσης και διήθηση από ογκοκύτταρα²⁵⁸.

Συνοπτικά η ET-1 προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την νεοαγγειογένεση, την αντιαποπτωτική ικανότητα και το μεταστατικό δυναμικό των ογκοκυττάρων (Εικόνα 1).

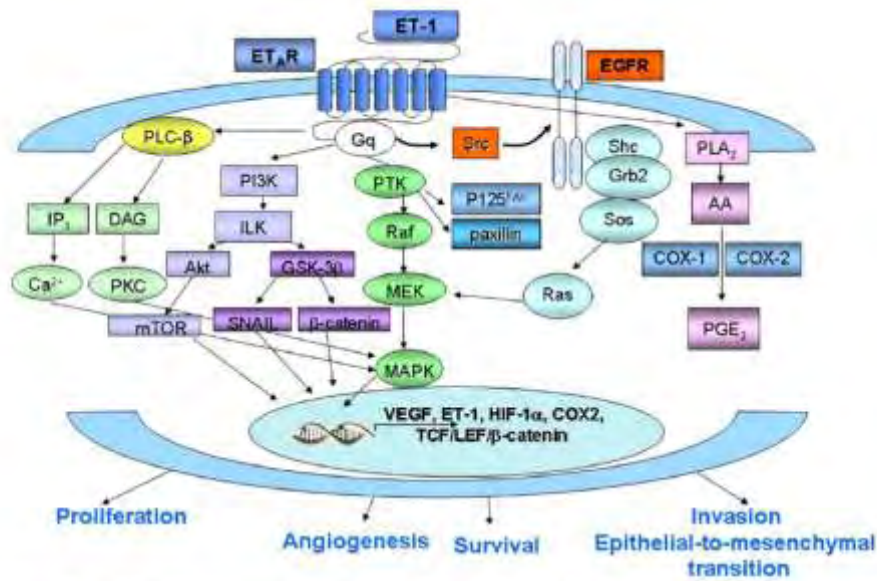


Fig. 2. ET_AR-induced signal transduction pathways in cancer cells. Binding of ET-1 to ET_AR triggers signaling pathways through a pertussis-insensitive G_q subunit that is coupled to the ET_AR intracellular domain. This led to the activation of a signaling network that includes PLC with subsequent parallel mobilization of intracellular Ca²⁺ and PKC activation, and PTKs (such as FAK and paxillin) that ultimately results in the activation of the RAF/MEK/MAPK pathway. ET-1 also activates PI3-K, which results in the stimulation of the Akt survival pathway and increased protein translation by the activation of mTOR signaling pathway, and parallel ILK-dependent GSK-3β phosphorylation stabilizing snail and β-catenin that translocate to the nucleus to engage transcriptional programs leading to EMT. ET-1 also causes c-Src-mediated EGFR transactivation that is in part responsible for MAPK activation. Moreover, ET-1 promotes COX-1 and -2 expression, PGE₂ and VEGF production. The activation of multiple and coordinated signaling pathways, regulates pleiotropic functions, including tumor growth, survival, angiogenesis and, as recently emerged, EMT and invasion.

Εικόνα 1: Ο άξονας της ενδοθηλίνης στα καρκινικά κύτταρα. (Πηγή: Bagnato A, Rosanò L. The endothelin axis in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(8): 1448).

3. Ερευνητική υπόθεση - Κλινικό ενδιαφέρον

Ο άξονας Ουδέτερης Ενδοπεπτιδάσης-Νευροπεπτιδίων και το βιολογικό μονοπάτι NFκB-Ουβικουϊτίνης-Πρωτεασώματος είναι δύο μηχανισμοί που έχουν συσχετιστεί, ανεξαρτήτως ο ένας από τον άλλον, με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Μελετήσαμε τη σχέση των δύο βιολογικών οδών χρησιμοποιώντας αρχειακό βιολογικό υλικό (block παραφίνης από υλικό βιοψίας/εκτομής όγκων ουροδόχου κύστης ή κυστεκτομής) από δύο ομάδες ασθενών, με μυοδιηθητική νόσο και με μη μυοδιηθητική, υψηλής κακοήθειας νόσο, και πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική μελέτη των μοριακών δεικτών NEP/CD10, ET-1 και NF-κB (κυτταροπλασματικό).

Η ερευνητική υπόθεση είναι ότι οι δύο προαναφερθείσες οδοί είναι ευθέως και άμεσα συνδεδεμένες και αλληλεπιδρούν στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Τα νευροπεπτίδια επομένως, μπορούν να δράσουν διεγερτικά και να ενεργοποιήσουν την ανενεργό κυτταροπλασματική μορφή του NF-κB, προκαλώντας μετακίνησή του εντός του κυτταρικού πυρήνα (ανάλογος μηχανισμός δράσης με τους εξωκυττάριους διεγέρτες του NF-κB). Ως αντιπροσωπευτικό νευροπεπτίδιο για την διερεύνηση της υπόθεσης επιλέξαμε την ενδοθηλίνη-1 (ET-1). Αν η υπόθεση είναι ορθή, τότε θα πρέπει να αποδειχθούν τα εξής:

↓ επίπεδα και/ή δραστικότητα CD10 ► ↑ επίπεδα και δράση ET-1 (► ↑ κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ↓ απόπτωσης και ↑ νεοαγγειογένεσης ► αρνητική κλινική έκβαση στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης) ► ↑ δραστηριότητα πρωτεασώματος ► ↑ πρωτεασωμική αποδόμηση IκB ► ↑ δραστηριότητα IKK ► ↑ μεταγραφική δραστηριότητα NF-κB ► ↑ NF-κB-εξαρτώμενων παραγόντων αγγειογένεσης, διείσδυσης και

μεταστατικότητας ► αρνητική κλινική έκβαση στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Η επιβεβαίωση της υπόθεσης παρουσιάζει ιδιαίτερα σημαντικό κλινικό ενδιαφέρον, διότι μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενισχυμένης αντικαρκινικής δράσης στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης με συνδυαστική χρήση i) αναστολέων πρωτεασώματος, ii) αναστολέων NFκB, iii) αύξησης ενδογενούς έκφρασης CD10, iv) αναστολέων ET-1 ή αναστολέων των υποδοχέων της ET-1, v) αναστολέων IKK και vi) αύξησης έκφρασης IκB.

4. Υλικό – Μέθοδοι

Στη μελέτη εντάξαμε συνολικά 100 ασθενείς με διάγνωση πρωτοπαθούς καρκίνου ουροδόχου κύστης, που χωρίστηκαν στις ομάδες Α και Β.

Στην **ομάδα Α (Group A)** εντάξαμε προοπτικά 40 συνεχόμενους, πρωτοπαθείς, τουλάχιστον μυοδιηθητικούς (στάδιο $\geq pT2$), υψηλού βαθμού κακοήθειας (high grade σύμφωνα με την ταξινόμηση WHO 2004) ασθενείς. Αυτοί υποβλήθηκαν αρχικά σε διουρηθρική εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου και ακολούθως (εντός 2 μηνών) σε ριζική κυστεκτομή-εκτροπή ούρων (ουρητηροστομία, ουρητηροειλεοδορμωστομία, εγκρατής ορθότοπη νεοκύστη).

Προ της κυστεκτομής, έγινε κλινική σταδιοποίηση όλων των ασθενών με αξονικές τομογραφίες άνω, κάτω κοιλίας, οπισθοπεριτοναϊκού χώρου και θώρακος. Επί κλινικοεργαστηριακών ενδείξεων, όπως οστικό άλγος, αυξημένη ALP, η σταδιοποίηση συμπληρώθηκε με ολόσωμο σπινθηρογράφημα οστών με γ-κάμερα. Η δυνατότητα χορήγησης νεοεπικουρικής (neoadjuvant) χημειοθεραπείας σε επιλεγμένους ασθενείς ήταν διαθέσιμη. Μετά την κυστεκτομή-εκτροπή ούρων οι ασθενείς βρίσκονταν σε τακτική παρακολούθηση ανά 6μηνο με εργαστηριακό (γενική αίματος, βιοχημικά, αέρια αίματος) και απεικονιστικό (υπερηχογράφημα νεφρών, αξονικές τομογραφίες άνω, κάτω κοιλίας και οπισθοπεριτοναϊκού χώρου και θώρακος) έλεγχο. Ως πρόοδος της νόσου ορίστηκαν η εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων, σπλαγχνικών ή οστικών, και η εμφάνιση πνευλικών ή εξωπνευλικών λεμφαδένων, ανεξαρτήτως διαστάσεων, στον απεικονιστικό έλεγχο. Επί πρόοδου της νόσου οι ασθενείς παραπέμπονταν σε Ογκολόγο για χορήγηση επικουρικής (adjuvant) χημειοθεραπείας.

Στην **ομάδα Β (Group B)** εντάξαμε αναδρομικά 60 ασθενείς με

πρωτοπαθείς, μη μυοδιηθητικούς (pTa, pT1, pTis), μονήρεις ή πολλαπλούς, υψηλού βαθμού κακοήθειας (high grade σύμφωνα με την ταξινόμηση WHO 2004) όγκους, που υποβλήθηκαν αρχικά σε διουρηθρική εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου. Ασθενείς που έχουν νόσο με αυτά τα χαρακτηριστικά ταξινομούνται ως ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk). Το σύνολο των ασθενών αποτελείται από 40 συνεχόμενους ασθενείς που παρουσίασαν υποτροπή με ή χωρίς πρόοδο νόσου (Ομάδα B1/Group B1) και 20 ασθενείς, που δεν παρουσίασαν ούτε υποτροπή ούτε πρόοδο νόσου, ταιριασμένους (matched), ως προς τα βασικά (προ έναρξης οποιασδήποτε θεραπείας) επιδημιολογικά, κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά (baseline characteristics), με τους πρώτους 40 (Ομάδα B2/Group B2). Η ομάδα B2 θα λειτουργήσει ως ομάδα σύγκρισης (μάρτυρες) με την ομάδα B1 κατά τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

Στους ασθενείς της ομάδας B κατά την διουρηθρική εκτομή έγινε λήψη τυχαίων πολλαπλών βιοψιών από το κυστικό τοίχωμα, όταν υπήρχε διεγχειρητική ή προεγχειρητική (λόγω θετικής κυτταρολογικής εξέτασης ούρων) υποψία για παρουσία carcinoma *in situ*. Εντός 6 ωρών από την διουρηθρική εκτομή χορηγήθηκε στους ασθενείς εφάπαξ ενδοκυστική έγχυση χημειοθεραπευτικού παράγοντα (Epirubicin 50mg). Η έγχυση δεν χορηγήθηκε σε κάθε περίπτωση κλινικά σημαντικής μετεγχειρητικής αιμορραγίας ή μετεγχειρητικού πυρετού και επί διεγχειρητικής ένδειξης διάτρησης της ουροδόχου κύστης. Η διουρηθρική εκτομή επαναλήφθηκε εντός 4-6 εβδομάδων σε κάθε περίπτωση που το βιοπτικό υλικό δεν περιείχε μυϊκές ίνες του κυστικού τοιχώματος ή ο όγκος ήταν σταδίου pT1 και υψηλού βαθμού κακοήθειας.

Μετά παρέλευση 3 εβδομάδων από την διουρηθρική εκτομή (είτε πρώτη είτε επαναληπτική) όλοι οι ασθενείς έλαβαν σχήμα εφόδου ενδοκυστικής ανοσοθεραπείας με BCG (6 εβδομαδιαίες εγχύσεις). Τους

χορηγήθηκε επίσης θεραπεία συντήρησης με BCG. Ως θεραπεία συντήρησης χρησιμοποιήσαμε μία τροποποίηση της διαδικασίας που πρότειναν οι Lamm DL et al⁶. Οι ασθενείς λάμβαναν κύκλους των 3 εβδομαδιαίων εγχύσεων BCG στους 3, 6, 12, 18, 24, 30 και 36 μήνες μετά την τελευταία έγχυση του σχήματος εφόδου.

Το πρόγραμμα παρακολούθησης των ασθενών περιλάμβανε κυστεοσκόπηση ανά 3 μήνες για τα πρώτα 2 έτη, ανά 6 μήνες για τα επόμενα 3 έτη και ανά έτος μετά τη συμπλήρωση πενταετίας. Κατά την κυστεοσκόπηση γινόταν επίσης λήψη δείγματος για κυτταρολογική εξέταση ούρων. Απεικόνιση του ανώτερου ουροποιητικού (ενδοφλέβια ουρογραφία) επαναλαμβάνονταν ανά 2ετία.

Η υποτροπή και η πρόοδος της νόσου επιβεβαιώνονταν αποκλειστικά με βιοψία. Θεωρήσαμε ως πρόοδο κάθε μεταβολή από pTa σε τουλάχιστον pT1 και από pT1 σε τουλάχιστον pT2, καθώς επίσης και την παρουσία carcinoma in situ (pTis) σε οποιαδήποτε βιοψία που προερχόταν από ασθενείς χωρίς προηγούμενη διάγνωση pTis.

Εφόσον ο ασθενής υποτροπιάζε μία φορά, τότε επαναλαμβάνονταν τα προαναφερθέντα πρόγραμματα επικουρικής ενδοκυτικής ανοσοθεραπείας με BCG και παρακολούθησης. Η δεύτερη υποτροπή μπορεί να οδηγούσε είτε σε επανάληψη του πρωτοκόλλου θεραπείας με BCG και παρακολούθησης είτε σε τερματισμό αυτού και εφαρμογή ριζικής θεραπείας (κυστεκτομή-εκτροπή ούρων), βάσει της κλινικής κρίσης του θεράποντος Ουρολόγου και της επιθυμίας του ασθενή. Οριστικός τερματισμός της αγωγής με BCG και της παρακολούθησης και εφαρμογή ριζικής χειρουργικής θεραπείας γινόταν σε κάθε περίπτωση προόδου της νόσου σε μυοδιήθηση ή εμφάνιση απομακρυσμένων

⁶ Δεν χορηγήθηκε BCG υποδορίως όπως αναφέρεται στο Lamm DL et al., Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent Ta, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. J Urol. 2000 Apr; 163(4): 1124-9.

μεταστάσεων ή διάγνωσης καρκίνου είτε του ανώτερου ουροποιητικού είτε της προστατικής ουρήθρας.

Για τους ασθενείς που παρουσιάσανε πρόοδο σε μυοδιηθητική νόσο και υποβλήθηκαν σε ριζική κυστεκτομή, έγινε κλινική σταδιοποίηση, προ της ριζικής θεραπείας, των ασθενών με αξονικές τομογραφίες άνω, κάτω κοιλίας, οπισθοπεριτοναϊκού χώρου και θώρακος. Επί κλινικοεργαστηριακών ενδείξεων, όπως οστικό άλγος, αυξημένη ALP, η σταδιοποίηση συμπληρώθηκε με ολόσωμο σπινθηρογράφημα οστών με γ-κάμερα. Η δυνατότητα χορήγησης νεοεπικουρικής (neoadjuvant) χημειοθεραπείας σε επιλεγμένους ασθενείς ήταν διαθέσιμη. Μετά την κυστεκτομή-εκτροπή ούρων οι ασθενείς βρίσκονταν σε τακτική παρακολούθηση ανά 6μηνο με εργαστηριακό (γενική αίματος, βιοχημικά, αέρια αίματος) και απεικονιστικό (υπερηχογράφημα νεφρών, αξονικές τομογραφίες άνω, κάτω κοιλίας και οπισθοπεριτοναϊκού χώρου και θώρακος) έλεγχο. Επί υποτροπής ή προόδου της νόσου οι ασθενείς παραπέμπονταν σε Ογκολόγο για χορήγηση επικουρικής (adjuvant) χημειοθεραπείας.

Όλα τα παρασκευάσματα των χειρουργικών εκτομών (διουρηθρικές εκτομές, ριζικές κυστεκτομές) όλων των ασθενών, όλων των ομάδων και υποομάδων, επεξεργάστηκαν από το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Π.Γ.Ν.Λάρισας.

Για την εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας και την αξιολόγησή της επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά δείγματα όλων των ασθενών. Η επιλογή έγινε με βάση την παρουσία καλής μορφολογίας και αντιγονικότητας, επομένως υλικό έντονα καυτηριασμένο ή ποσοτικά ανεπαρκές δε χρησιμοποιήθηκε. Οι χρώσεις πραγματοποιήθηκαν στην ίδια περίοδο εκτέλεσης, ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ύπαρξης διαφορών στην ένταση των χρώσεων, συνεπεία εκτέλεσής τους σε διαφορετικές περιόδους. Για τους **ασθενείς της ομάδας Α** χρησιμοποιήθηκε υλικό

μυοδιηθητικού, τουλάχιστον, ουροθηλιακού καρκινώματος μεταβατικού επιθηλίου (στάδιο \geq pT2) υψηλού βαθμού κακοηθείας (high grade) προερχόμενο από την αρχική διουρηθρική εκτομή. Για τους **ασθενείς της ομάδας Β** χρησιμοποιήθηκε υλικό μη μυοδιηθητικού ουροθηλιακού καρκινώματος μεταβατικού επιθηλίου (στάδια pTa, pT1, pTis) υψηλού βαθμού κακοηθείας (high grade) προερχόμενο από την αρχική διουρηθρική εκτομή καθώς και από τις επακόλουθες διουρηθρικές εκτομές των ασθενών που παρουσίασαν υποτροπή ή πρόοδο.

Τα ιστοπαθολογικά παρασκευάσματα αξιολογήθηκαν ως προς το στάδιο (stage) βάσει της ταξινόμησης TNM για κακοήθεις όγκους (UICC, International Union Against Cancer, 7^η έκδοση, 2010) και ως προς τον βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης (grade) βάσει της ταξινόμησης του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) του 2004.

♦ Προετοιμασία των ιστών και ανοσοϊστοχημική μέθοδος

Όλα τα παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) φορμαλίνης 10% και εμπεδώθηκαν σε κύβους παραφίνης. Έγιναν τομές 4 μ m από επιλεγμένους κύβους παραφίνης του παρασκευάσματος κάθε ασθενή.

Ακολούθησαν τα κάτωθι στάδια:

1. Μερική αποπαραφίνωση των τομών κύβων παραφίνης 4 μ m, μετά από επώαση στον κλίβανο (60° C) όλη τη νύχτα,
2. ολική αποπαραφίνωση σε ξυλόλη και ενυδάτωση σε κατιόντα διαλύματα αλκοόλης (100%, 96%, 80%, 70%),
3. έκπλυση με αποσταγμένο H₂O,
4. επώαση των τομών σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) 3% για 10 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης,
5. η αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων για τον NF κ B και την

CD10 επιτεύχθηκε σε υδατόλουτρο, μετά από εμβάπτιση των τομών σε Tris-Edta με pH=9 για 25 λεπτά στους 100° C και η αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων για την ET-1 επιτεύχθηκε με βρασμό των τομών σε φούρνο μικροκυμάτων σε διάλυμα κιτρικού οξέος με pH=6 για 20 λεπτά,

6. ακολούθησε επώαση του πρωτογενούς αντισώματος για 30 λεπτά,

7. ξέπλυμα των τομών με TBST,

8. επώαση του δευτερογενούς αντισώματος (Super sensitive polymer – HRP IHC detection system, BIOGENEX, Fremont, CA, USA) για 20 λεπτά,

9. επώαση του πολυμερικού αντισώματος (HRP) για 15 λεπτά,

10. εφαρμογή του χρωμογόνου DAB για 10 λεπτά,

11. χρώση με αιματοξυλίνη Harris για 1 λεπτό,

12. αφυδάτωση σε ανιούσα σειρά αλκοόλης (70%, 80%, 96%, 100%) και

13. κάλυψη με βάλσαμο του Καναδά.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- i) NFκB: μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της υπομονάδας p65 του NFκB (κλώνος F-6, αραιώση 1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA),
- ii) CD10: μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού anti-CD10 (κλώνος 56C6, αραιώση 1:30, Dako, Glostrup, Denmark) και
- iii) ET-1: μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (κλώνος TR.ET.48.5, αραιώση 1:250, NOVUS Biologicals, Littleton, CO, USA).

♦ Αξιολόγηση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

i) Ομάδα Α

Η ανοσοϊστοχημική χρώση του NFκB ήταν κυτταροπλασματική.

Αξιολογήθηκαν χωριστά η ένταση της χρώσης και η έκταση, εκφρασμένη ως ποσοστό που καταλαμβάνουν τα θετικά χρωσμένα νεοπλασματικά κύτταρα.

Η έκφραση της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης αξιολογήθηκε, σε συμφωνία με τη μεθοδολογία έρευνας για τον NFκB και άλλων ερευνητών, ως εξής: αρνητική (=0), ήπια (=1), μέτρια (=2) και έντονη (=3).

Όσον αφορά στην αξιολόγηση της έκτασης της θετικής ανοσοχρώσης, λόγω της μη ύπαρξης ομοφωνίας στην ήδη υπάρχουσα μεθοδολογία έρευνας για τον NFκB, αποφασίσαμε να την αξιολογήσουμε ως εξής: τιμή NFκB έκταση χρώσης $\geq 40\%$ αξιολογείται με 1 και τιμή NFκB έκταση χρώσης $< 40\%$ αξιολογείται με 0.

Με σκοπό να υπερκεράσουμε αφενός το πρόβλημα της αξιολόγησης της έκτασης στην ερευνητική μεθοδολογία και αφετέρου το πρόβλημα της σχετικής υποκειμενικότητας στην αξιολόγηση της έντασης, υιοθετήσαμε την πρακτική ερευνητών οι οποίοι, κατά την διερεύνηση άλλων δεικτών, δημιούργησαν ένα νέο μέγεθος, το "γινόμενο", που συμπεριλαμβάνει τις εκφράσεις της έντασης και της έκτασης. Έτσι λοιπόν ονομάσαμε "Γινόμενο NFκB" το εξής: Γινόμενο NFκB = (Ένταση χρώσης) x (Έκταση χρώσης). Βάσει όσων ήδη αναφέρθηκαν για τις αξιολογήσεις της έντασης και της έκτασης, προκύπτει ότι οι πιθανές τιμές για το "Γινόμενο NFκB" είναι 0, 1, 2 και 3. Για την τελική αξιολόγηση της έκφρασης του NFκB ως γινομένου ορίστηκαν τα εξής: αρνητική έκφραση αντιστοιχεί σε τιμή γινομένου=0, ήπια έκφραση αντιστοιχεί σε τιμή γινομένου=1, μέτρια έκφραση αντιστοιχεί σε τιμή γινομένου=2 και έντονη έκφραση αντιστοιχεί σε τιμή γινομένου=3.

Η **ανοσοχρώση της CD10** ήταν μεμβρανώδης και κορυφαία κυτταροπλασματική. Αξιολογήθηκαν η ένταση της χρώσης και η έκταση,

εκφρασμένη ως ποσοστό, που καταλαμβάνουν τα θετικά στην χρώση νεοπλασματικά κύτταρα. Η έκφραση της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης αξιολογήθηκε, σε συμφωνία με τη μεθοδολογία έρευνας για την CD10 και άλλων ερευνητών, ως εξής: αρνητική (=0), ήπια (=1), μέτρια (=2) και έντονη (=3).

Όσον αφορά στην αξιολόγηση της έκτασης της θετικής ανοσοχρώσης, λόγω της μη ύπαρξης ομοφωνίας στην ήδη υπάρχουσα μεθοδολογία έρευνας για την CD10, αποφασίσαμε να την αξιολογήσουμε ως εξής: τιμή CD10 έκταση χρώσης $\geq 40\%$ αξιολογείται με 1 και τιμή CD10 έκταση χρώσης $< 40\%$ αξιολογείται με 0.

Με σκοπό να υπερκεράσουμε αφενός το πρόβλημα της αξιολόγησης της έκτασης στην ερευνητική μεθοδολογία και αφετέρου το πρόβλημα της σχετικής υποκειμενικότητας στην αξιολόγηση της έντασης, υιοθετήσαμε την πρακτική ερευνητών οι οποίοι, κατά την διερεύνηση άλλων δεικτών, δημιούργησανε ένα νέο μέγεθος, το "γινόμενο", που συμπεριλαμβάνει τις εκφράσεις της έντασης και της έκτασης. Έτσι λοιπόν ονομάσαμε "Γινόμενο CD10" το εξής: $\text{Γινόμενο CD10} = (\text{Ένταση χρώσης}) \times (\text{Έκταση χρώσης})$. Βάσει όσων ήδη αναφέρθηκαν για τις αξιολογήσεις της έντασης και της έκτασης, προκύπτει ότι οι πιθανές τιμές για το "Γινόμενο CD10" είναι 0, 1, 2 και 3. Για την τελική αξιολόγηση της έκφρασης της CD10 ως γινομένου ορίστηκαν τα εξής: αρνητική έκφραση αντιστοιχεί σε τιμή γινομένου=0, ήπια έκφραση αντιστοιχεί σε τιμή γινομένου=1, μέτρια έκφραση αντιστοιχεί σε τιμή γινομένου=2 και έντονη έκφραση αντιστοιχεί σε τιμή γινομένου=3.

Η ανοσοχρώση της ET-1 ήταν κυτταροπλασματική. Η εκτίμηση της ανοσοθετικότητας έγινε με την αξιολόγηση της έντασης της χρώσης, σε

συμφωνία με τη μεθοδολογία έρευνας για την έκφραση της ET-1 σε όγκους ουροδόχου κύστης και άλλων ερευνητών⁷. Η θετικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας. Η ένταση της ανοσοχρώσης των νεοπλασματικών κυττάρων αξιολογήθηκε ως εξής: αρνητική (=0), ήπια (=1), μέτρια (=2) και έντονη (=3). Ως «ήπια» (=1) θεωρήθηκε η ένταση της χρώσης των νεοπλασματικών κυττάρων όταν ήταν ηπιότερη της έντασης της χρώσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ως «μέτρια» (=2) θεωρήθηκε η ένταση της χρώσης των νεοπλασματικών κυττάρων όταν ήταν ισότιμη της έντασης της χρώσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ως «έντονη» (=3) θεωρήθηκε η ένταση της χρώσης των νεοπλασματικών κυττάρων όταν ήταν εντονότερη της έντασης της χρώσης των ενδοθηλιακών κυττάρων.

ii) Ομάδα Β

Η **ανοσοϊστοχημική χρώση του NFκB** ήταν κυτταροπλασματική. Αξιολογήθηκαν χωριστά η ένταση της χρώσης και η έκταση, εκφρασμένη ως ποσοστό που καταλαμβάνουν τα θετικά χρωσμένα νεοπλασματικά κύτταρα.

Η έκφραση της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης αξιολογήθηκε, σε συμφωνία με τη μεθοδολογία έρευνας για τον NFκB και άλλων ερευνητών, ως εξής: αρνητική (=0), ήπια (=1), μέτρια (=2) και έντονη (=3).

Όσον αφορά στην αξιολόγηση της έκτασης της θετικής ανοσοχρώσης, λόγω της μη ύπαρξης ομοφωνίας στην ήδη υπάρχουσα μεθοδολογία έρευνας για τον NFκB, αποφασίσαμε να την αξιολογήσουμε ως εξής: τιμή NFκB έκταση χρώσης $\geq 70\%$ αξιολογείται με 1 και τιμή

⁷ Wülfing C et al. Expression of the endothelin axis in bladder cancer: Relationship to clinicopathologic parameters and long-term survival. Eur Urol. 2005; 47: 593-600 και Wülfing C et al. Expression of endothelin-1 and endothelin-A and -B receptors in invasive bladder cancer. Oncol Rep. Feb 2005; 13(2): 223-228.

NFκB έκταση χρώσης <70% αξιολογείται με 0.

Με σκοπό να υπερκεράσουμε αφενός το πρόβλημα της αξιολόγησης της έκτασης στην ερευνητική μεθοδολογία και αφετέρου το πρόβλημα της σχετικής υποκειμενικότητας στην αξιολόγηση της έντασης, υιοθετήσαμε την πρακτική ερευνητών οι οποίοι, κατά την διερεύνηση άλλων δεικτών, δημιούργησανε ένα νέο μέγεθος, το "γινόμενο", που συμπεριλαμβάνει τις εκφράσεις της έντασης και της έκτασης. Έτσι λοιπόν ονομάσαμε "Γινόμενο NFκB" το εξής: Γινόμενο NFκB = (Ένταση χρώσης) x (Έκταση χρώσης). Βάσει όσων ήδη αναφέρθηκαν για τις αξιολογήσεις της έντασης και της έκτασης, προκύπτει ότι οι πιθανές τιμές για το "Γινόμενο NFκB" είναι 0, 1, 2 και 3. Για την τελική αξιολόγηση της έκφρασης του NFκB ως γινομένου ορίστηκαν τα εξής: αρνητική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 0 και 1, αναμένεται να συσχετίζεται με καλή κλινική έκβαση (μη υποτροπή, μη πρόοδος) και θετική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 2 και 3, αναμένεται να συσχετίζεται με κακή κλινική έκβαση (υποτροπή, πρόοδος).

Η **ανοσοχρώση της CD10** ήταν μεμβρανώδης και κορυφαία κυτταροπλασματική. Αξιολογήθηκαν η ένταση της χρώσης και η έκταση, εκφρασμένη ως ποσοστό, που καταλαμβάνουν τα θετικά στην χρώση νεοπλασματικά κύτταρα. Η έκφραση της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης αξιολογήθηκε, σε συμφωνία με τη μεθοδολογία έρευνας για την CD10 και άλλων ερευνητών, ως εξής: αρνητική (=0), ήπια (=1), μέτρια (=2) και έντονη (=3).

Όσον αφορά στην αξιολόγηση της έκτασης της θετικής ανοσοχρώσης, λόγω της μη ύπαρξης ομοφωνίας στην ήδη υπάρχουσα μεθοδολογία έρευνας για την CD10, αποφασίσαμε να την αξιολογήσουμε ως εξής: τιμή CD10 έκταση χρώσης $\geq 70\%$ αξιολογείται με 1 και τιμή CD10 έκταση χρώσης <70% αξιολογείται με 0.

Με σκοπό να υπερκεράσουμε αφενός το πρόβλημα της

αξιολόγησης της έκτασης στην ερευνητική μεθοδολογία και αφετέρου το πρόβλημα της σχετικής υποκειμενικότητας στην αξιολόγηση της έντασης, υιοθετήσαμε την πρακτική ερευνητών οι οποίοι, κατά την διερεύνηση άλλων δεικτών, δημιούργησαν ένα νέο μέγεθος, το "γινόμενο", που συμπεριλαμβάνει τις εκφράσεις της έντασης και της έκτασης. Έτσι λοιπόν ονομάσαμε "Γινόμενο CD10" το εξής: Γινόμενο CD10 = (Ένταση χρώσης) x (Έκταση χρώσης). Βάσει όσων ήδη αναφέρθηκαν για τις αξιολογήσεις της έντασης και της έκτασης, προκύπτει ότι οι πιθανές τιμές για το "Γινόμενο CD10" είναι 0, 1, 2 και 3. Για την τελική αξιολόγηση της έκφρασης της CD10 ως γινομένου ορίστηκαν τα εξής: αρνητική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 0 και 1, αναμένεται να συσχετίζεται με κακή κλινική έκβαση (υποτροπή, πρόοδος) και θετική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 2 και 3, αναμένεται να συσχετίζεται με καλή κλινική έκβαση (μη υποτροπή, μη πρόοδος).

Η ανοσοχρώση της ET-1 ήταν κυτταροπλασματική. Η εκτίμηση της ανοσοθετικότητας έγινε με την αξιολόγηση της έντασης της χρώσης, σε συμφωνία με τη μεθοδολογία έρευνας για την έκφραση της ET-1 σε όγκους ουροδόχου κύστης και άλλων ερευνητών⁸. Η θετικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας. Η ένταση της ανοσοχρώσης των νεοπλασματικών κυττάρων διαβαθμίσθηκε ως εξής: αρνητική (=0), ήπια (=1), μέτρια (=2) και έντονη (=3). Ως «ήπια» (=1) θεωρήθηκε η ένταση της χρώσης των νεοπλασματικών κυττάρων όταν ήταν ηπιότερη της έντασης της χρώσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ως «μέτρια» (=2) θεωρήθηκε η ένταση της χρώσης των νεοπλασματικών κυττάρων όταν ήταν ισότιμη της έντασης

⁸ Wülfing C et al. Expression of the endothelin axis in bladder cancer: Relationship to clinicopathologic parameters and long-term survival. *Eur Urol.* 2005; 47: 593-600 και Wülfing C et al. Expression of endothelin-1 and endothelin-A and -B receptors in invasive bladder cancer. *Oncol Rep.* Feb 2005; 13(2): 223-228.

της χρώσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ως «έντονη» (=3) θεωρήθηκε η ένταση της χρώσης των νεοπλασματικών κυττάρων όταν ήταν εντονότερη της έντασης της χρώσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Για την τελική αξιολόγηση της έκφρασης της ET-1 ορίστηκαν τα εξής: αρνητική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 0 και 1, αναμένεται να συσχετίζεται με καλή κλινική έκβαση (μη υποτροπή, μη πρόοδος) και θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, αναμένεται να συσχετίζεται με κακή κλινική έκβαση (υποτροπή, πρόοδος).

Η περίοδος παρακολούθησης για τους ασθενείς όλων των ομάδων και υποομάδων υπολογίστηκε ξεκινώντας από την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα της πρώτης διουρηθρικής εκτομής του πρωτοπαθούς όγκου μέχρι την τελευταία συνάντηση, στα πλαίσια της παρακολούθησης, με έναν ασθενή ή μέχρι το θάνατό του.

Ασθενείς με ταυτόχρονη ύπαρξη ή ιστορικό καρκίνου του ανώτερου ουροποιητικού αποκλείστηκαν από τη μελέτη, όπως και ασθενείς με άλλου τύπου καρκίνωμα πλην του καρκινώματος μεταβατικού επιθηλίου.

Η μελέτη συμμορφώνεται με τις διατάξεις της Διακήρυξης του Ελσίνκι (όπως αναθεωρήθηκε στο Τόκιο το 2008).

Δημιουργήθηκε ηλεκτρονική βάση δεδομένων για τους ασθενείς των 2 ομάδων με καταγραφή: i) δημογραφικών στοιχείων, ii) χαρακτηριστικών όγκου (πρωτοπαθής, αριθμός, μέγεθος), iii) παθολογοανατομικής σταδιοποίησης (βάσει διουρηθρικών εκτομών και ριζικών κυστεκτομών), iv) χορήγησης άμεσα μετεγχειρητικής ενδοκυστικής χημειοθεραπείας (Epirubicin), v) χορήγησης μετεγχειρητικής ενδοκυστικής ανοσοθεραπείας (BCG), εφόδου και συντήρησης, vi) χορήγησης neoadjuvant και/ή adjuvant χημειοθεραπείας, vii) υποτροπής νόσου, viii) ελεύθερης υποτροπής επιβίωσης, ix) προόδου νόσου, x) ελεύθερης προόδου επιβίωσης, xi) συνολικής επιβίωσης, xii)

διάρκειας παρακολούθησης και xiii) αποτελεσμάτων αξιολόγησης ανοσοϊστοχημικών χρώσεων.

Χρησιμοποιήθηκε αρχειακό βιολογικό υλικό κύβων (block) παραφίνης από ιστολογικές βιοψίες διουρηθρικών εκτομών όγκων των ασθενών των 2 ομάδων. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη των μοριακών δεικτών NFκB (κυτταροπλασματικό), NEP/CD10 και ET-1. Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις πραγματοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν στο σύνολό τους από το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Π.Θ, Π.Γ.Ν. Λάρισας. Τα αποτελέσματα καταχωρήθηκαν στην προαναφερθείσα ηλεκτρονική βάση δεδομένων.

Ως πρωτεύοντα καταληκτικά σημεία (primary end points) για την ομάδα A ορίστηκαν η πρόοδος της νόσου (progression), η ελεύθερη πρόοδος επιβίωση (progression-free survival/PFS) και η συνολική επιβίωση (overall survival/OS). Έγινε μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση, ώστε να ελεγχθεί η ενδεχόμενη συσχέτιση των υπο μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T, στάδιο N κατά την ριζική κυστεκτομή) παραγόντων με τα πρωτεύοντα καταληκτικά σημεία της μελέτης. Στη μελέτη της συσχέτισης των μοριακών δεικτών αυτοί μελετήθηκαν τόσο μεμονωμένα όσο και συνδυαστικά (διερεύνηση αλληλεπίδρασης NFκB με NEP/CD10, διερεύνηση αλληλεπίδρασης NEP/CD10 με ET-1 και διερεύνηση αλληλεπίδρασης NFκB με NEP/CD10 και ET-1) βάσει όσων αναφέρονται στο κεφάλαιο ‘Έρευνητική υπόθεση – Κλινικό ενδιαφέρον’. Για την διερεύνηση της συσχέτισης με την πρόοδο νόσου χρησιμοποιήθηκαν η δοκιμασία Chi-Square ή η δοκιμασία Fisher’s Exact στη μονοπαραγοντική ανάλυση και η δοκιμασία πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης (Multiple Logistic Regression) στην πολυπαραγοντική.

Για την διερεύνηση της συσχέτισης με την PFS και την OS χρησιμοποιήθηκαν η δοκιμασία Log-Rank για τις κατηγορικές (categorical) μεταβλητές και η παλινδρόμηση Cox (Cox Regression) για τις μεταβλητές κλίμακας (scale) στη μονοπαραγοντική ανάλυση και η παλινδρόμηση Cox (Cox Regression Analysis), κατόπιν ελέγχου της υπόθεσης των ανάλογων κινδύνων (proportional hazards assumption), στην πολυπαραγοντική. Το όριο των στατιστικώς σημαντικών συσχετίσεων ορίστηκε στην τιμή $p \geq 0.05$.

Ως **πρωτεύοντα καταληκτικά σημεία (primary end points) για την ομάδα B** ορίστηκαν η υποτροπή της νόσου (recurrence), η ελεύθερη υποτροπής επιβίωση (recurrence-free survival/RFS), η πρόοδος της νόσου (progression), η ελεύθερη πρόοδου επιβίωση (progression-free survival/PFS) και η συνολική επιβίωση (overall survival/OS). Έγινε μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση, ώστε να ελεγχθεί η ενδεχόμενη συσχέτιση των υπο μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα), κλινικών (αριθμός όγκων και μέγεθος όγκου κατά την διάγνωση) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ* και στάδιο T κατά την διάγνωση) παραγόντων με τα πρωτεύοντα καταληκτικά σημεία της μελέτης. Στη μελέτη της συσχέτισης των μοριακών δεικτών αυτοί μελετήθηκαν τόσο μεμονωμένα όσο και συνδυαστικά (διερεύνηση αλληλεπίδρασης NFκB με NEP/CD10, διερεύνηση αλληλεπίδρασης NEP/CD10 με ET-1 και διερεύνηση αλληλεπίδρασης NFκB με NEP/CD10 και ET-1) βάσει όσων αναφέρονται στο κεφάλαιο "Έρευνητική υπόθεση – Κλινικό ενδιαφέρον". Για την διερεύνηση της συσχέτισης με την υποτροπή και την πρόοδο νόσου χρησιμοποιήθηκαν η δοκιμασία Chi-Square ή η δοκιμασία Fisher's Exact στη μονοπαραγοντική ανάλυση και η δοκιμασία πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης (Multiple Logistic

Regression) στην πολυπαραγοντική. Για την διερεύνηση της συσχέτισης με την RFS, την PFS και την OS χρησιμοποιήθηκαν η δοκιμασία Log-Rank για τις κατηγορικές (categorical) μεταβλητές και η παλινδρόμηση Cox (Cox Regression) για τις μεταβλητές κλίμακας (scale) στη μονοπαραγοντική ανάλυση και η παλινδρόμηση Cox (Cox Regression Analysis), κατόπιν ελέγχου της υπόθεσης των ανάλογων κινδύνων (proportional hazards assumption), στην πολυπαραγοντική. Το όριο των στατιστικώς σημαντικών συσχετίσεων ορίστηκε στην τιμή $p \geq 0.05$.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε από έναν βιοστατιστικό με χρησιμοποίηση της 21^{ης} έκδοσης του λογισμικού IBM SPSS Statistics.

5. Αποτελέσματα

Ομάδα Α

Στην ομάδα Α εντάχθηκαν 40 συνεχόμενοι ασθενείς, εκ των οποίων 33 άνδρες (82.5%) και 7 (17.5%) γυναίκες, μέσης ηλικίας (mean) 69.6 (\pm 6.78) ετών. Από τους υπό μελέτη ασθενείς, 17 (42.5%) είχαν θετικούς λεμφαδένες κατά την ριζική κυστεκτομή και έλαβαν adjuvant χημειοθεραπεία. Οι 19 ασθενείς (47.5%) παρουσίασαν πρόοδο νόσου και η διάμεση ελεύθερη πρόοδου επιβίωση (median progression-free survival) ήταν 42.7 μήνες. Οι 26 ασθενείς (65%) απεβίωσαν και η διάμεση ολική επιβίωση (median overall survival) ήταν 51.4 μήνες. Η διάμεση διάρκεια παρακολούθησης (median follow-up) ήταν 51.4 μήνες. Τα βασικά χαρακτηριστικά (baseline characteristics) των ασθενών κατά την ριζική κυστεκτομή παρουσιάζονται στον Πίνακα Α1.

Πίνακας Α1: Βασικά χαρακτηριστικά Ομάδας Α (n=40) κατά την ριζική κυστεκτομή	
Μέση ηλικία (mean)	69.6 \pm 6.78 (49-79)
Φύλο (♂/♀)	33/7 (82.5%/17.5%)
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	25/5/10 (62.5%/12.5%/25%)
Συνόπαρξη Cis (Ναι/Όχι)	13/27 (32.5%/67.5%)
Στάδιο T (T2/T3/T4)	13/16/11 (32.5%/40%/27.5%)
Στάδιο N (N0/N1/N2/N3)	23/8/9/0 (57.5%/20%/22.5%/0%)

Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για τους ασθενείς της ομάδας Α παρουσιάζονται στον Πίνακα Α2.

Πίνακας Α2: Αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για τους ασθενείς της ομάδας Α (n=40)	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΡΩΣΗΣ			
	Σκορ	Σκορ	Σκορ	Σκορ
	0	1	2	3
NFκB (γινόμενο)	5 (12.5%)	2 (5%)	8 (20%)	25 (62.5%)
CD10 (γινόμενο)	22 (55%)	2 (5%)	8 (20%)	8 (20%)
ET-1	0 (0%)	12 (30%)	23 (57.5%)	5 (12.5%)

◆ Πρόοδος νόσου (Progression)

A) Μονοπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T και στάδιο N κατά την ριζική κυστεκτομή) παραγόντων με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της προόδου νόσου (progression) εφαρμόστηκε η δοκιμασία Chi-Square ή η δοκιμασία Fisher's Exact για τις κατηγορικές μεταβλητές (categorical, Πίνακας A3) και η δοκιμασία T-test για τις μεταβλητές κλίμακας (scale, Πίνακας A4). Κανένας από τους υπό μελέτη παράγοντες δε συσχετίστηκε σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό.

Πίνακας A3: Μονοπαραγοντική ανάλυση - Κατηγορικές μεταβλητές (Chi-Square Test ή Fisher's Exact Test)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Φύλο (♂/♀)	0.689
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	0.418
Συνύπαρξη Cis (Ριζική κυστεκτομή)	0.816
Στάδιο T (Ριζική κυστεκτομή)	0.435
Στάδιο N (Ριζική κυστεκτομή)	0.152
NFκB (γινόμενο)	0.153
CD10 (γινόμενο)	0.460
ET-1	0.093

Πίνακας Α4: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Μεταβλητές κλίμακας (T-test)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Ηλικία	0.487

B) Πολυπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T και στάδιο N κατά την ριζική κυστεκτομή) παραγόντων με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της προόδου νόσου (progression) εφαρμόστηκε η δοκιμασία της πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης (Multiple logistic regression, Πίνακας A5). Κανένας από τους υπό μελέτη παράγοντες δε συσχετίστηκε σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό.

Πίνακας A5: Πολυπαραγοντική ανάλυση – Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση (Multiple logistic regression)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Φύλο (♂/♀)	0.722
Ηλικία	0.254
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	0.804
Συνύπαρξη Cis (Ριζική κυστεκτομή)	0.817
Στάδιο T (Ριζική κυστεκτομή)	0.837
Στάδιο N (Ριζική κυστεκτομή)	0.507
NFκB (γινόμενο)	0.153
CD10 (γινόμενο)	0.460
ET-1	0.171

Η διερεύνηση της συσχέτισης των αλληλεπιδράσεων NFκB με NEP/CD10, NEP/CD10 με ET-1 και NFκB με NEP/CD10 και ET-1,

βάσει όσων αναφέρονται στο κεφάλαιο ‘‘Ερευνητική υπόθεση–Κλινικό ενδιαφέρον’’, με την πρόοδο της νόσου δεν κατέστη δυνατή, λόγω του μικρού αριθμού παρατηρήσεων, γεγονός που έκανε αδύνατη ή ουσιαστικά ασήμαντη την οποιαδήποτε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

◆ Ελεύθερη προόδου επιβίωση (Progression-free survival / PFS)

A) Μονοπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T και στάδιο N κατά την ριζική κυστεκτομή) παραγόντων με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της ελεύθερης προόδου επιβίωσης (progression-free survival/PFS) εφαρμόστηκαν η δοκιμασία Log-rank Test για τις κατηγορικές μεταβλητές (categorical, Πίνακας A6) και η δοκιμασία πανινδρόμησης Cox (Cox regression) για τις μεταβλητές κλίμακας (scale, Πίνακας A7). Μόνο η ET-1 συσχετίστηκε σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό ($p=0.033$).

Πίνακας A6: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Κατηγορικές μεταβλητές (Log-rank test)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Φύλο (♂/♀)	0.269
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	0.307
Συνύπαρξη Cis (Ριζική κυστεκτομή)	0.624
Στάδιο T (Ριζική κυστεκτομή)	0.229
Στάδιο N (Ριζική κυστεκτομή)	0.104
NFκB (γινόμενο)	0.178
CD10 (γινόμενο)	0.742
ET-1	0.033

Πίνακας Α7: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Μεταβλητές κλίμακας (Cox regression)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Ηλικία	0.381

B) Πολυπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T και στάδιο N κατά την ριζική κυστεκτομή) παραγόντων με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της ελεύθερης προόδου επιβίωσης (progression-free survival/PFS) εφαρμόστηκε η δοκιμασία της παλινδρόμησης Cox (Cox regression analysis, Πίνακας A8). Κανένας από τους υπό μελέτη παράγοντες δε συσχετίστηκε σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό.

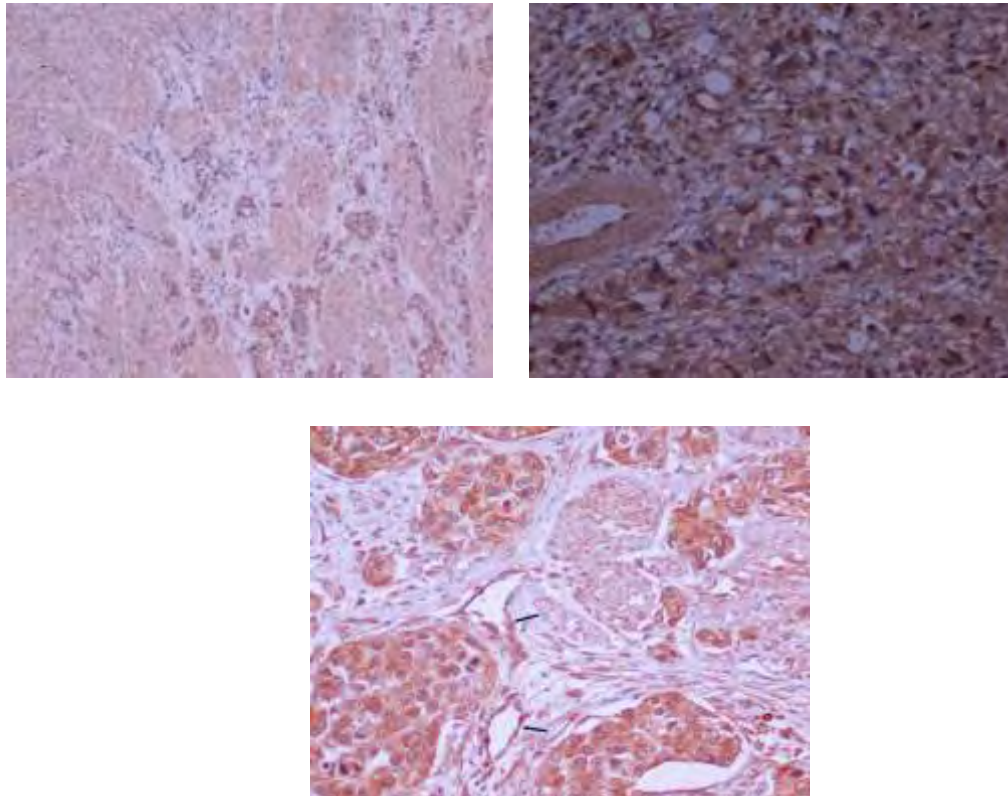
Πίνακας A8: Πολυπαραγοντική ανάλυση (Cox regression analysis)				
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value	Hazard Ratio (HR)	95% Confidence Interval (CI)	
			Lower	Upper
Φύλο (♂/♀)	0.481	NS	NS	NS
Ηλικία	0.144	NS	NS	NS
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	0.441	NS	NS	NS
Συνύπαρξη Cis (Ριζική κυστεκτομή)	0.869	NS	NS	NS
Στάδιο T (Ριζική κυστεκτομή)	0.489	NS	NS	NS
Στάδιο N (Ριζική κυστεκτομή)	0.261	NS	NS	NS
NFκB (γινόμενο)	0.197	NS	NS	NS
CD10 (γινόμενο)	0.840	NS	NS	NS
ET-1	0.128	**	**	**

ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ: Η συντομογραφία NS ανταποκρίνεται στον όρο "Not Significant" και το σύμβολο ** παραπέμπει στον Πίνακα A9.

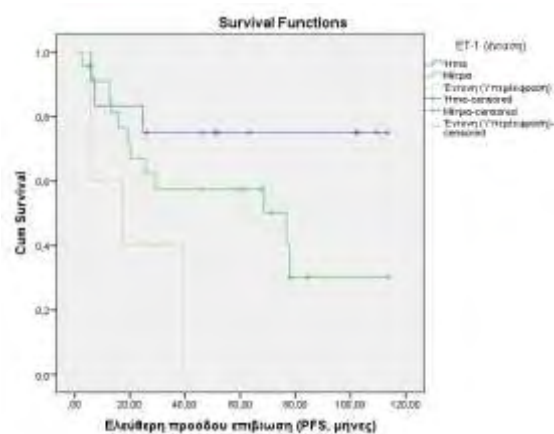
Με περαιτέρω στατιστική επεξεργασία (Cox regression analysis) και διαστρωμάτωση των ασθενών, ως προς την έκφραση (ένταση, γινόμενο) των υπό μελέτη μοριακών δεικτών, βρέθηκε ότι μόνο ασθενείς με υπερέκφραση ET-1 (ένταση=3, Εικόνα 1) παρουσιάζουν αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για πρόοδο νόσου σε σύγκριση με ασθενείς με ήπια (ένταση=1, Εικόνα 1) έκφραση ET-1 (p=0.045, Πίνακας A9) καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους. Οι αντίστοιχες καμπύλες Kaplan-Meier φαίνονται στην Εικόνα 2.

Πίνακας A9 (): Σύγκριση των υποομάδων, ως προς την ένταση της έκφρασης της ET-1, των ασθενών της ομάδας A**

Ένταση έκφρασης ET-1	p-value	Hazard Ratio (HR)	95% Confidence Interval (CI)	
			Lower	Upper
Μέτρια (=2) Vs Ήπια (=1)	0.253	2.099	0.589	7.484
Έντονη (=3) Vs Ήπια (=1)	0.045	4.849	1.039	22.624
Έντονη (=3) Vs Μέτρια (=2)	0.158	0.433	0.135	1.385



Εικόνα 2: Μυοδιηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα (stage pT2), υψηλού βαθμού κακοήθειας (high grade). Ήπια έκφραση (άνω αριστερά, ένταση κυτταροπλασματικής χρώσης=1), μέτρια έκφραση (άνω δεξιά, ένταση κυτταροπλασματικής χρώσης=2) και δυνατή έκφραση ή “υπερέκφραση” ET-1 (ένταση κυτταροπλασματικής χρώσης=3). Θετικός δείκτης το τριχοειδικό ενδοθήλιο (βέλη, ET-1 x200).



Εικόνα 2: Καμπύλες Kaplan-Meier της ελεύθερης προόδου επιβίωσης (progression-free survival/PFS) αναλόγως της έκφρασης της έντασης της ET-1 (ήπια, μέτρια και έντονη). Έντονη (=3) Vs Ήπια (=1) διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p=0.045$).

Η διερεύνηση της συσχέτισης των αλληλεπιδράσεων NFκB με NEP/CD10, NEP/CD10 με ET-1 και NFκB με NEP/CD10 και ET-1, βάσει όσων αναφέρονται στο κεφάλαιο "Έρευνητική υπόθεση–Κλινικό ενδιαφέρον", με την PFS δεν κατέστη δυνατή, λόγω του μικρού αριθμού παρατηρήσεων, γεγονός που έκανε αδύνατη ή ουσιαστικά ασήμαντη την οποιαδήποτε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

◆ Ολική επιβίωση (Overall survival / OS)

A) Μονοπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T και στάδιο N κατά την ριζική κυστεκτομή) παραγόντων με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της ολικής επιβίωσης (overall survival/OS) εφαρμόστηκαν η δοκιμασία Log-rank Test για τις κατηγορικές μεταβλητές (categorical, Πίνακας A10) και η δοκιμασία πανινδρόμησης Cox (Cox regression) για τις μεταβλητές κλίμακας (scale, Πίνακας A11). Μόνο η ET-1 συσχετίστηκε σε οριακά στατιστικώς σημαντικό βαθμό ($p=0.056$).

Πίνακας A10: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Κατηγορικές μεταβλητές (Log-rank test)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Φύλο (♂/♀)	0.360
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	0.096
Συνύπαρξη Carcinoma <i>in situ</i> (Ριζική κυστεκτομή)	0.751
Στάδιο T (Ριζική κυστεκτομή)	0.123
Στάδιο N (Ριζική κυστεκτομή)	0.120
NFκB (γινόμενο)	0.101
CD10 (γινόμενο)	0.717
ET-1	0.056

Πίνακας Α11: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Μεταβλητές κλίμακας (Cox regression)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Ηλικία	0.899

B) Πολυπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T και στάδιο N κατά την ριζική κυστεκτομή) παραγόντων με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της ολικής επιβίωσης (overall survival/OS) εφαρμόστηκε η δοκιμασία της παλινδρόμησης Cox (Cox regression analysis, Πίνακας A12). Μόνο η ET-1 συσχετίστηκε σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό $p=0.019$.

Πίνακας A12: Πολυπαραγοντική ανάλυση (Cox regression analysis)				
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value	Hazard Ratio (HR)	95% Confidence Interval (CI)	
			Lower	Upper
Φύλο (♂/♀)	0.442	NS	NS	NS
Ηλικία	0.642	NS	NS	NS
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	0.125	NS	NS	NS
Συνύπαρξη Cis (Ριζική κυστεκτομή)	0.650	NS	NS	NS
Στάδιο T (Ριζική κυστεκτομή)	0.283	NS	NS	NS
Στάδιο N (Ριζική κυστεκτομή)	0.351	NS	NS	NS
NFκB (γινόμενο)	0.651	NS	NS	NS
CD10 (γινόμενο)	0.418	NS	NS	NS
ET-1	0.019	**	**	**

ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ: Η συντομογραφία NS ανταποκρίνεται στον όρο "Not Significant" και το σύμβολο ** παραπέμπει στον Πίνακα A13.

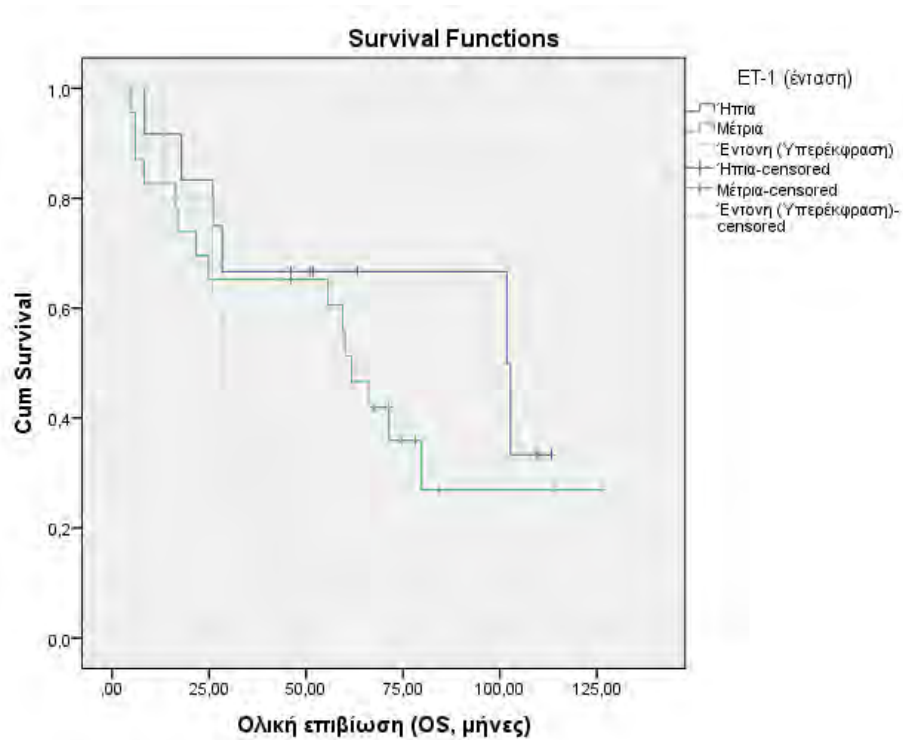
Με περαιτέρω στατιστική επεξεργασία των υποομάδων (Cox regression analysis) και διαστρωμάτωση των ασθενών, ως προς την έκφραση (ένταση, γινόμενο) των υπό μελέτη μοριακών δεικτών, βρέθηκε ότι μόνο ασθενείς με υπερέκφραση ET-1 (ένταση=3, Εικόνα 1) παρουσιάζουν αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για θάνατο σε σύγκριση με ασθενείς με μέτρια (ένταση=2, Εικόνα 1) έκφραση ET-1 ($p=0.026$) καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους. Αυτό φαίνεται και στην Εικόνα 3 με τις αντίστοιχες καμπύλες Kaplan-Meier. Επίσης, μόνο ασθενείς με υπερέκφραση ET-1 (ένταση=3, Εικόνα 1) παρουσιάζουν αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για θάνατο σε σύγκριση με ασθενείς με ήπια (ένταση=1, Εικόνα 1) έκφραση ET-1 ($p=0.005$) καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους. Αυτό φαίνεται και στην Εικόνα 3 με τις αντίστοιχες καμπύλες Kaplan-Meier. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα A13.

Πίνακας A13 (): Σύγκριση των υποομάδων, ως προς την ένταση της έκφρασης της ET-1, των ασθενών της ομάδας A**

Ένταση έκφρασης ET-1	p-value	Hazard Ratio (HR)	95% Confidence Interval (CI)	
			Lower	Upper
Μέτρια (=2) Vs Ήπια (=1)	0.193	1.952	0.713	5.340
Έντονη (=3) Vs Ήπια (=1)	0.005	7.001	1.782	27.501
Μέτρια (=2) Vs Έντονη (=3)	0.026	0.279	0.091	0.856

Η διερεύνηση της συσχέτισης των αλληλεπιδράσεων NFκB με NEP/CD10, NEP/CD10 με ET-1 και NFκB με NEP/CD10 και ET-1, βάσει όσων αναφέρονται στο κεφάλαιο Έρευνητική υπόθεση–Κλινικό

ενδιαφέρον'', με την OS δεν κατέστη δυνατή, λόγω του μικρού αριθμού παρατηρήσεων, γεγονός που έκανε αδύνατη ή ουσιαστικά ασήμαντη την οποιαδήποτε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.



Εικόνα 3: Καμπύλες Kaplan-Meier της ολικής επιβίωσης (overall survival/OS) αναλόγως της έκφρασης της έντασης της ET-1 (ήπια, μέτρια και έντονη). Έντονη (=3) Vs Ήπια (=1) διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p=0.005$). Μέτρια (=2) Vs Έντονη (=3) διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p=0.026$).

♦ Σύνοψη αποτελεσμάτων ομάδας Α

i) Κανένας από τους υπό μελέτη μοριακούς δείκτες (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικούς (ηλικία, φύλο, κάπνισμα) και παθολογοανατομικούς (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T και στάδιο N κατά την ριζική κυστεκτομή) παράγοντες δε συσχετίστηκε, μονοπαραγοντικά ή πολυπαραγοντικά, σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την πρόοδο νόσου.

ii) Μόνο η ET-1 συσχετίστηκε μονοπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την ελεύθερη προόδου επιβίωση.

iii) Μόνο η υπερέκφραση ET-1 (ένταση=3) συσχετίστηκε πολυπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για πρόοδο νόσου, σε σύγκριση με ασθενείς με ήπια έκφραση ET-1 (ένταση=1), καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους.

iv) Μόνο η ET-1 συσχετίστηκε μονοπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την ολική επιβίωση.

v) Μόνο η ET-1 συσχετίστηκε πολυπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την ολική επιβίωση.

vi) Μόνο η υπερέκφραση ET-1 (ένταση=3) συσχετίστηκε πολυπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για θάνατο, σε σύγκριση με ασθενείς με μέτρια έκφραση ET-1 (ένταση=2), καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους.

vii) Μόνο η υπερέκφραση ET-1 (ένταση=3) συσχετίστηκε πολυπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για

θάνατο, σε σύγκριση με ασθενείς με ήπια έκφραση ET-1 (ένταση=1), καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους.

♦ Κλινική σημασία

Η υπερέκφραση ET-1 συσχετίστηκε, πολυπαραγοντικά, σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για πρόοδο νόσου. Επιπλέον, συσχετίστηκε, πολυπαραγοντικά, σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για θάνατο. Τα ευρήματα κρίνονται αξιόλογα, διότι η αυξημένη έκφραση της ET-1 θα μπορούσε να λειτουργήσει ως μοριακός δείκτης κακής πρόγνωσης για τους ασθενείς με μη μεταστατικό μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης, οι οποίοι θα μπορούσαν να ωφεληθούν με την έγκαιρη εφαρμογή επικουρικής θεραπείας. Λαμβάνοντας ακόμη υπόψιν ότι για τον άξονα της ενδοθηλίνης υπάρχει ήδη διαθέσιμη μοριακά στοχευμένη θεραπεία (Atrasentan, ανταγωνιστής υποδοχέα τύπου A της ET-1) ίσως η προοπτική καθιέρωσης της χρήσης της ET-1 ως μοριακού δείκτη πρόγνωσης να γίνεται ελκυστικότερη.

5. Αποτελέσματα

Ομάδα Β

Η ομάδα Β αποτελείται από 50 άνδρες (83.3%) και 10 (16.7%) γυναίκες, μέσης ηλικίας (mean) 67.8 (± 8.7) ετών. Εξ αυτών 40 (66.7%) ασθενείς παρουσίασαν υποτροπή νόσου (recurrence) και 24 (40%) ασθενείς πρόοδο νόσου (progression). Η διάμεση ελεύθερη υποτροπής επιβίωση (median recurrence-free survival) ήταν 22.8 (± 39.4) μήνες και η διάμεση ελεύθερη πρόοδου επιβίωση (median progression-free survival) ήταν 70 (± 39.7) μήνες. Οι 26 ασθενείς (43.3%) απεβίωσαν και η διάμεση ολική επιβίωση (median overall survival) ήταν 78.9 (± 30.6) μήνες. Η διάμεση διάρκεια παρακολούθησης (median follow-up) ήταν 78.9 (± 30.6) μήνες. Τα βασικά χαρακτηριστικά (baseline characteristics) των ασθενών κατά την διάγνωση παρουσιάζονται στον Πίνακα Β1.

Η ομάδα Β1 αποτελείται από 34 άνδρες (85%) και 6 (15%) γυναίκες, μέσης ηλικίας (mean) 68.1 (± 7.2) ετών. Όλοι οι ασθενείς παρουσίασαν υποτροπή νόσου (recurrence) και η διάμεση ελεύθερη υποτροπής επιβίωση (median recurrence-free survival) ήταν 10.7 (± 15.1) μήνες. Οι 24 (60%) ασθενείς παρουσίασαν πρόοδο νόσου (progression) και η διάμεση ελεύθερη πρόοδου επιβίωση (median progression-free survival) ήταν 39.2 (± 40.7) μήνες. Οι 24 (60%) ασθενείς απεβίωσαν και η διάμεση ολική επιβίωση (median overall survival) ήταν 62.7 (± 32.5) μήνες. Η διάμεση διάρκεια παρακολούθησης (median follow-up) ήταν 62.7 (± 32.5) μήνες. Τα βασικά χαρακτηριστικά (baseline characteristics) των ασθενών κατά την διάγνωση παρουσιάζονται στον Πίνακα Β1.

Η ομάδα Β2 αποτελείται από 16 άνδρες (80%) και 4 (20%) γυναίκες, μέσης ηλικίας (mean) 65.6 (± 9.3) ετών. Οι ασθενείς δεν παρουσίασαν ούτε υποτροπή (recurrence) ούτε πρόοδο (progression) νόσου. Η διάμεση ελεύθερη υποτροπής επιβίωση (median recurrence-free

survival), η διάμεση ελεύθερη πρόοδο επιβίωση (median progression-free survival) ήταν 87.4 (± 21.2) μήνες. Οι 2 ασθενείς (10%) απεβίωσαν και η διάμεση ολική επιβίωση (median overall survival) ήταν 87.4 (± 21.2) μήνες. Η διάμεση διάρκεια παρακολούθησης (median follow-up) ήταν 87.4 (± 21.2) μήνες. Τα βασικά χαρακτηριστικά (baseline characteristics) των ασθενών κατά την διάγνωση παρουσιάζονται στον Πίνακα Β1.

Ομάδα	B (n=60)	B1 (n=40)	B2 (n=20)
Μέση ηλικία (mean)	67.8 \pm 8.7 (38-87)	68.1 \pm 7.2 (58-87)	65.6 \pm 9.3 (38-77)
Φύλο (♂/♀)	50/10 (83.3%/16.7%)	34/6 (85%/15%)	16/4 (80%/20%)
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	30/9/21 (50%/15%/35%)	20/5/15 (50%/12.5%/37.5%)	10/4/6 (50%/20%/30%)
Αριθμός όγκων (Μονήρης/Πολλαπλός)	31/29 (51.7%/48.3%)	20/20 (50%/50%)	11/9 (55%/45%)
Μέγεθος όγκου (>3cm/<3cm)	30/30 (50%/50%)	21/19 (52.5%/47.5%)	9/11 (45%/55%)
Συνύπαρξη Cis (Ναι/Όχι)	12/48 (20%/80%)	8/32 (20%/80%)	4/16 (20%/80%)
Στάδιο T (T_a/T₁)	11/49 (18.3%/81.7%)	7/33 (17.5%/82.5%)	4/16 (20%/80%)

Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για τους ασθενείς των ομάδων Β, Β1 και Β2 παρουσιάζονται στους Πίνακες Β2, Β3, Β4.

Πίνακας Β2: Αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για τους ασθενείς της ομάδας Β (n=60)	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΡΩΣΗΣ			
	Σκορ	Σκορ	Σκορ	Σκορ
	0	1	2	3
NFκB (γινόμενο)	40 (66.7%)	1 (1.7%)	6 (10%)	13 (21.6%)
CD10 (γινόμενο)	58 (96.6%)	0 (0%)	1 (1.7%)	1 (1.7%)
ET-1	1 (1.7%)	27 (45%)	23 (38.3%)	9 (15%)

Πίνακας Β3: Αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για τους ασθενείς της ομάδας Β1 (n=40)	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΡΩΣΗΣ			
	Σκορ	Σκορ	Σκορ	Σκορ
	0	1	2	3
NFκB (γινόμενο)	24 (60%)	1 (2.5%)	5 (12.5%)	10 (25%)
CD10 (γινόμενο)	38 (95%)	0 (0%)	1 (2.5%)	1 (2.5%)
ET-1	0 (0%)	10 (25%)	21 (52.5%)	9 (22.5%)

Πίνακας Β4: Αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για τους ασθενείς της ομάδας Β2 (n=20)	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΡΩΣΗΣ			
	Σκορ	Σκορ	Σκορ	Σκορ
	0	1	2	3
NFκB (γινόμενο)	16 (80%)	0 (0%)	1 (5%)	3 (15%)
CD10 (γινόμενο)	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
ET-1	1 (5%)	17 (85%)	2 (10%)	0 (0%)

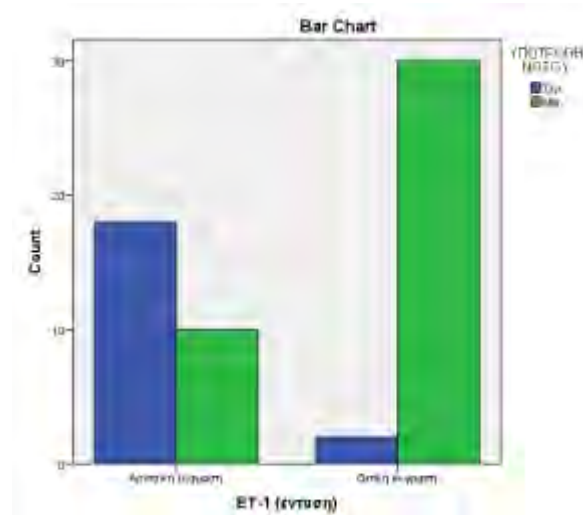
◆ Υποτροπή νόσου (Recurrence)

A) Μονοπαραγοντική ανάλυση

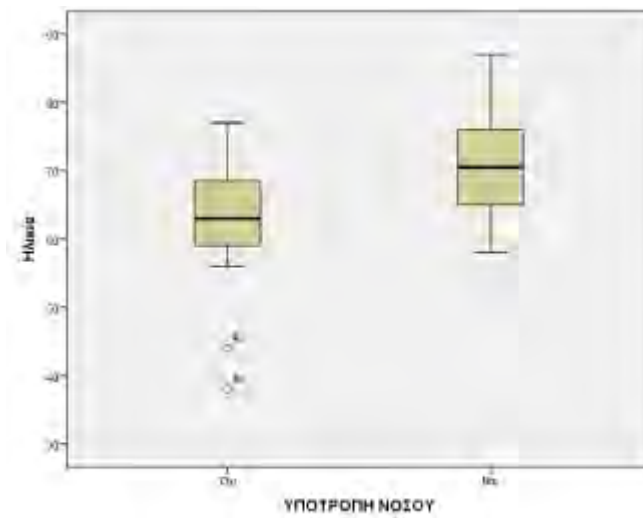
Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα), κλινικών (αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T) παραγόντων κατά την διάγνωση με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της υποτροπής νόσου (recurrence) εφαρμόστηκαν η δοκιμασία Chi-Square ή η δοκιμασία Fisher's Exact για τις κατηγορικές μεταβλητές (categorical, Πίνακας B5) και η δοκιμασία T-test για τις μεταβλητές κλίμακας (scale, Πίνακας B6). Συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με την υποτροπή νόσου η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 και η ηλικία (Εικόνες 1, 2 αντίστοιχα).

Πίνακας B5: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Κατηγορικές μεταβλητές (Chi-Square test ή Fisher's Exact test)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Φύλο	0.481
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	0.117
Αριθμός όγκων (Μονήρης/Πολλαπλός)	0.585
Μέγεθος όγκου (>3cm/<3cm)	0.419
Συνύπαρξη Cis	0.736
Στάδιο T	0.511
NFκB (γινόμενο)	0.242
CD10 (γινόμενο)	0.548
ET-1	0.000

Πίνακας Β6: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Μεταβλητές κλίμακας (T-test)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Ηλικία	0.001



Εικόνα 3: Μονοπαραγοντική ανάλυση-Σημαντική συσχέτιση θετικής έκφρασης (τιμές έντασης 2 και 3) ET-1 και υποτροπής νόσου (Chi-Square test: p=0.000).



Εικόνα 4: Μονοπαραγοντική ανάλυση-Σημαντική συσχέτιση ηλικίας και υποτροπής νόσου (T-test: $p=0.001$).

B) Πολυπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα), κλινικών (αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T) παραγόντων κατά την διάγνωση με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της υποτροπής νόσου (recurrence) εφαρμόστηκε η δοκιμασία της πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης (Multiple logistic regression, Πίνακας B7). Συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με την υποτροπή νόσου η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 και η ηλικία.

Πίνακας B7: Πολυπαραγοντική ανάλυση – Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση (Multiple logistic regression)				
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value	Odds Ratio (OR)	95% Confidence Interval (CI)	
			Lower	Upper
ET-1	0.000	107.986	8.472	1376.338
Ηλικία	0.003	1.273	1.086	1.492

Η διερεύνηση της συσχέτισης των αλληλεπιδράσεων NFκB με NEP/CD10, NEP/CD10 με ET-1 και NFκB με NEP/CD10 και ET-1, βάσει όσων αναφέρονται στο κεφάλαιο “Ερευνητική υπόθεση–Κλινικό ενδιαφέρον”, με την υποτροπή της νόσου δεν κατέστη δυνατή, λόγω του μικρού αριθμού παρατηρήσεων, γεγονός που έκανε αδύνατη ή

ουσιαστικά ασήμαντη την οποιαδήποτε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

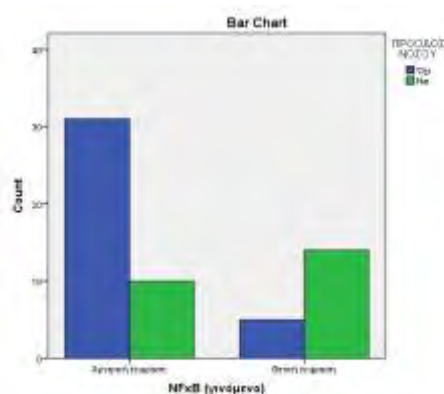
◆ Πρόοδος νόσου (Progression)

A) Μονοπαραγοντική ανάλυση

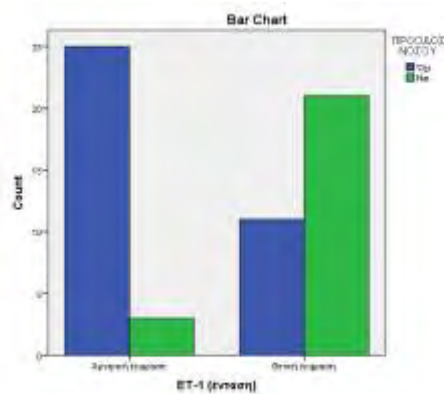
Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα), κλινικών (αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T) παραγόντων κατά την διάγνωση με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της προόδου νόσου (progression) εφαρμόστηκαν η δοκιμασία Chi-Square ή η δοκιμασία Fisher's Exact για τις κατηγορικές μεταβλητές (categorical, Πίνακας B8) και η δοκιμασία T-test για τις μεταβλητές κλίμακας (scale, Πίνακας B9). Συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με την πρόοδο νόσου η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 2 και 3, του NFκB και η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 (Εικόνες 3 και 4 αντίστοιχα).

Πίνακας B8: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Κατηγορικές μεταβλητές (Chi-Square test ή Fisher's Exact test)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Φύλο	1.000
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	0.804
Αριθμός όγκων (Μονήρης/Πολλαπλός)	1.000
Μέγεθος όγκου (>3cm/<3cm)	0.599
Συνύπαρξη Cis	0.741
Στάδιο T	0.517
NFκB (γινόμενο)	0.001
CD10 (γινόμενο)	0.156
ET-1	0.000

Πίνακας Β9: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Μεταβλητές κλίμακας (T-test)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Ηλικία	0.089



Εικόνα 5: Μονοπαραγοντική ανάλυση-Σημαντική συσχέτιση θετικής έκφρασης (τιμές γινόμενου 2 και 3) NFKB και προόδου νόσου (Chi-Square test: $p=0.001$).



Εικόνα 6: Μονοπαραγοντική ανάλυση-Σημαντική συσχέτιση θετικής έκφρασης (τιμές έντασης 2 και 3) ET-1 και προόδου νόσου (Chi-Square test: $p=0.000$).

B) Πολυπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα), κλινικών (αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T) παραγόντων κατά την διάγνωση με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της προόδου νόσου (progression) εφαρμόστηκε η δοκιμασία της πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης (Multiple logistic regression, Πίνακας B10). Συσχετίστικαν στατιστικώς σημαντικά με την πρόοδο νόσου η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 και η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 2 και 3, του NFκB.

Πίνακας B10: Πολυπαραγοντική ανάλυση – Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση (Multiple logistic regression)				
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value	Odds Ratio (OR)	95% Confidence Interval (CI)	
			Lower	Upper
ET-1	0.001	12.147	2.777	53.139
NFκB (γινόμενο)	0.014	5.940	1.426	24.749

Η διερεύνηση της συσχέτισης των αλληλεπιδράσεων NFκB με NEP/CD10, NEP/CD10 με ET-1 και NFκB με NEP/CD10 και ET-1, βάσει όσων αναφέρονται στο κεφάλαιο "Ερευνητική υπόθεση–Κλινικό ενδιαφέρον", με την πρόοδο της νόσου δεν κατέστη δυνατή, λόγω του μικρού αριθμού παρατηρήσεων, γεγονός που έκανε αδύνατη ή ουσιαστικά ασήμαντη την οποιαδήποτε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

◆ Ελεύθερη υποτροπής επιβίωση (Recurrence-free survival / RFS)

A) Μονοπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα), κλινικών (αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T) παραγόντων κατά την διάγνωση με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της ελεύθερης υποτροπής επιβίωσης (recurrence-free survival/RFS) εφαρμόστηκαν η δοκιμασία Log-rank Test για τις κατηγορικές μεταβλητές (categorical, Πίνακας B11) και η δοκιμασία πανινδρόμησης Cox (Cox regression) για τις μεταβλητές κλίμακας (scale, Πίνακας B12). Συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με την RFS η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1, όπως φαίνεται και στην αντίστοιχη καμπύλη Kaplan-Meier (Εικόνα 5), και η ηλικία.

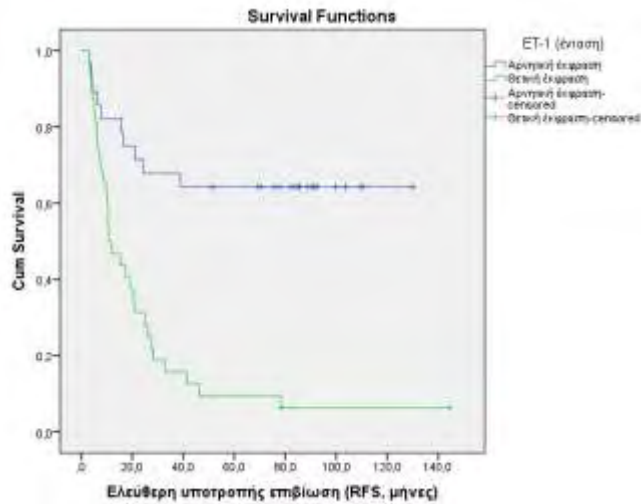
Πίνακας B11: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Κατηγορικές μεταβλητές (Log-rank test)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Φύλο	0.295
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	0.109
Αριθμός όγκων (Μονήρης/Πολλαπλός)	0.372
Μέγεθος όγκου (>3cm/<3cm)	0.946
Συνύπαρξη Cis	0.392
Στάδιο T	0.596
NFκB (γινόμενο)	0.234
CD10 (γινόμενο)	0.285
ET-1	0.000

Πίνακας Β12: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Μεταβλητές κλίμακας (Cox regression)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Ηλικία	0.013

B) Πολυπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα), κλινικών (αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T) παραγόντων κατά την διάγνωση με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της ελεύθερης υποτροπής επιβίωσης (recurrence-free survival/RFS) εφαρμόστηκε η δοκιμασία της παλινδρόμησης Cox (Cox regression analysis, Πίνακας B13). Συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά μόνο η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1, όπως φαίνεται και στην αντίστοιχη καμπύλη Kaplan-Meier (Εικόνα 5).

Πίνακας B13: Πολυπαραγοντική ανάλυση (Cox regression analysis)				
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value	Hazard Ratio (HR)	95% Confidence Interval (CI)	
			Lower	Upper
ET-1	0.000	4.340	2.037	9.246



Εικόνα 7: Πολυπαραγοντική ανάλυση-Σημαντική συσχέτιση θετικής έκφρασης (τιμές έντασης 2 και 3) ET-1 με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για υποτροπή νόσου. Το αποτέλεσμα αποτυπώνεται και στην αντίστοιχη καμπύλη Kaplan-Meier (Cox regression analysis: $p=0.000$, HR:4.340, 95% CI: 2.037-9.246).

Η διερεύνηση της συσχέτισης των αλληλεπιδράσεων NFκB με NEP/CD10, NEP/CD10 με ET-1 και NFκB με NEP/CD10 και ET-1, βάσει όσων αναφέρονται στο κεφάλαιο “Ερευνητική υπόθεση–Κλινικό ενδιαφέρον”, με την RFS δεν κατέστη δυνατή, λόγω του μικρού αριθμού παρατηρήσεων, γεγονός που έκανε αδύνατη ή ουσιαστικά ασήμαντη την οποιαδήποτε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

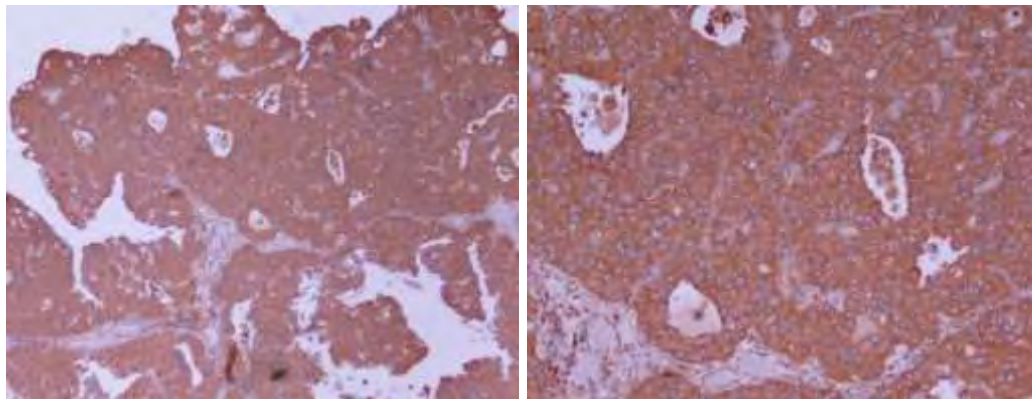
◆ Ελεύθερη προόδου επιβίωση (Progression-free survival / PFS)

A) Μονοπαραγοντική ανάλυση

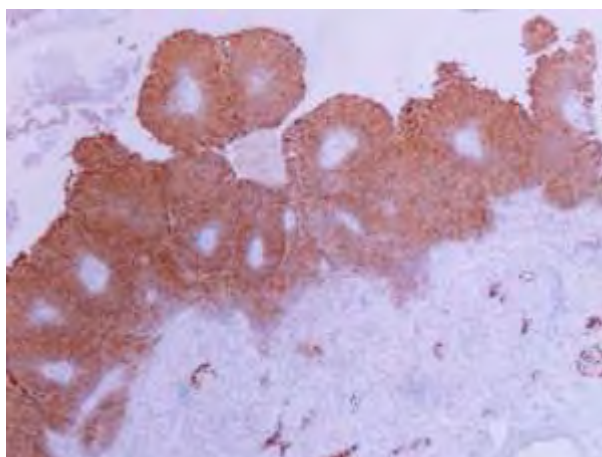
Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα), κλινικών (αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T) παραγόντων κατά την διάγνωση με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της ελεύθερης προόδου επιβίωσης (progression-free survival/PFS) εφαρμόστηκαν η δοκιμασία Log-rank Test για τις κατηγορικές μεταβλητές (categorical, Πίνακας B14) και η δοκιμασία πανινδρόμησης Cox (Cox regression) για τις μεταβλητές κλίμακας (scale, Πίνακας B15). Συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με την PFS η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 2 και 3, του NFκB (Εικόνα 6), η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 2 και 3, της CD10 (εύρημα αντίθετο προς τη σχετική υπό μελέτη υπόθεση εργασίας, Εικόνα 7) και η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1, όπως φαίνεται και στις αντίστοιχες καμπύλες Kaplan-Meier (Εικόνες 8, 9 και 10 αντίστοιχα).

Πίνακας B14: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Κατηγορικές μεταβλητές (Log-rank test)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Φύλο	0.744
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	0.861
Αριθμός όγκων (Μονήρης/Πολλαπλός)	0.958
Μέγεθος όγκου (>3cm/<3cm)	0.761
Συνύπαρξη Cis	0.591
Στάδιο T	0.538
NFκB (γινόμενο)	0.001
CD10 (γινόμενο)	0.032
ET-1	0.000

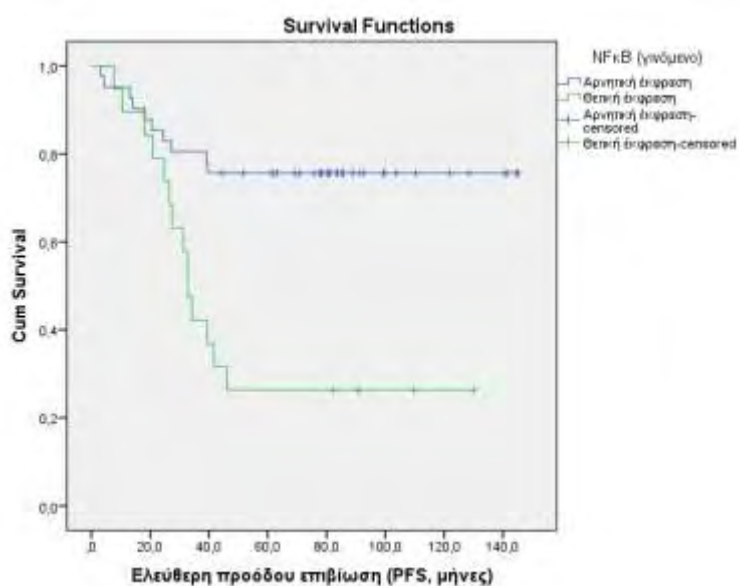
Πίνακας B15: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Μεταβλητές κλίμακας (Cox regression)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Ηλικία	0.086



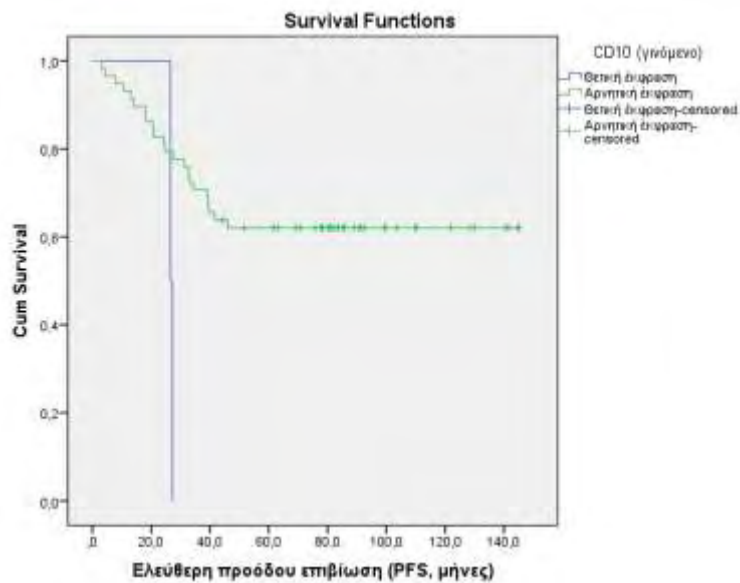
Εικόνα 8: Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα, υψηλού βαθμού κακοήθειας, παθολογοανατομικού σταδίου pT_a. Ανοσοϊστοχημική χρώση για NFκB (x100 Αριστερά, x400 Δεξιά).



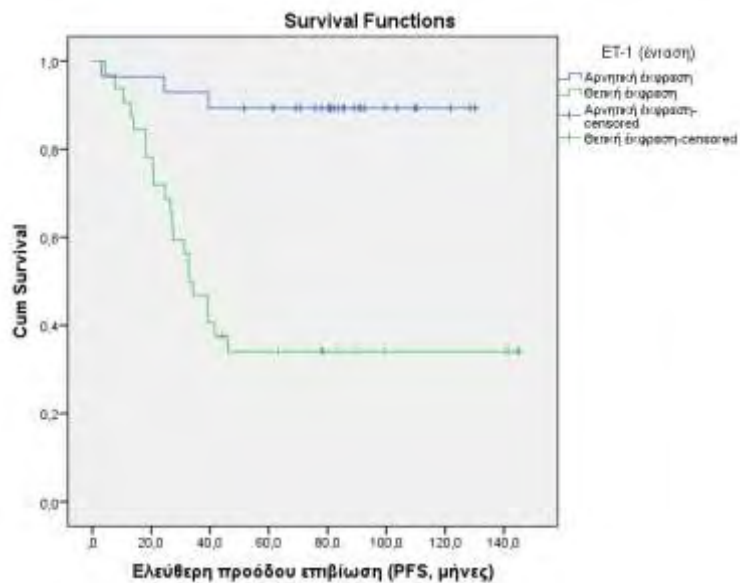
Εικόνα 7: Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα, υψηλού βαθμού κακοήθειας, παθολογοανατομικού σταδίου pTα. Ανοσοϊστοχημική χρώση για NEP/CD10 (x100).



Εικόνα 8: Μονοπαραγοντική ανάλυση-Σημαντική συσχέτιση θετικής έκφρασης (τιμές γινόμενου 2 και 3) NFKB και ελεύθερης προόδου επιβίωσης (Log-rank test: $p=0.001$).



Εικόνα 9: Μονοπαραγοντική ανάλυση-Σημαντική συσχέτιση θετικής έκφρασης (τιμές γινόμενου 2 και 3) CD10 και ελεύθερης προόδου επιβίωσης, εύρημα αντίθετο προς τη σχετική υπόθεση εργασίας (Log-rank test: $p=0.032$).



Εικόνα 10: Μονοπαραγοντική ανάλυση-Σημαντική συσχέτιση θετικής έκφρασης (τιμές έντασης 2 και 3) ET-1 και ελεύθερης προόδου επιβίωσης (Log-rank test: $p=0.000$).

B) Πολυπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα), κλινικών (αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T) παραγόντων κατά την διάγνωση με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της ελεύθερης προόδου επιβίωσης (progression-free survival/PFS) εφαρμόστηκε η δοκιμασία της παλινδρόμησης Cox (Cox regression analysis). Κανένας από τους υπό μελέτη παράγοντες δε συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά.

Η διερεύνηση της συσχέτισης των αλληλεπιδράσεων NFκB με NEP/CD10, NEP/CD10 με ET-1 και NFκB με NEP/CD10 και ET-1, βάσει όσων αναφέρονται στο κεφάλαιο “Ερευνητική υπόθεση–Κλινικό ενδιαφέρον”, με την PFS δεν κατέστη δυνατή, λόγω του μικρού αριθμού παρατηρήσεων, γεγονός που έκανε αδύνατη ή ουσιαστικά ασήμαντη την οποιαδήποτε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

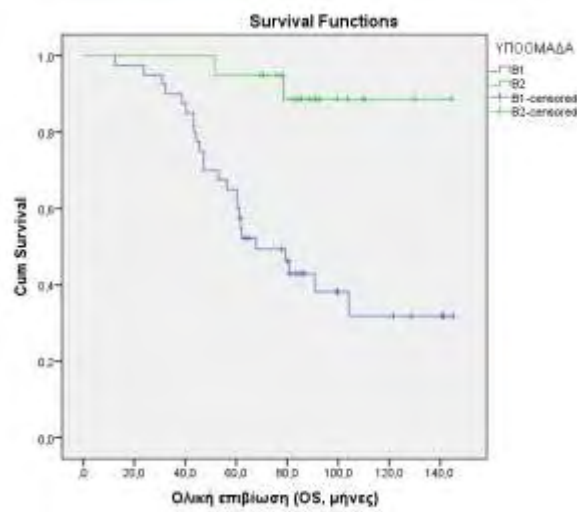
♦ Ολική επιβίωση (Overall survival / OS)

A) Μονοπαραγοντική ανάλυση

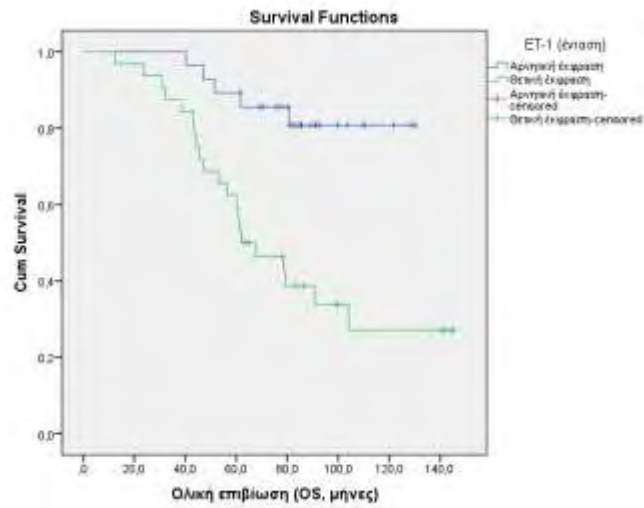
Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα), κλινικών (αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου, υποομάδα ασθενών) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T) παραγόντων κατά την διάγνωση με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της ολικής επιβίωσης (overall survival/OS) εφαρμόστηκαν η δοκιμασία Log-rank Test για τις κατηγορικές μεταβλητές (categorical, Πίνακας B16) και η δοκιμασία πανινδρόμησης Cox (Cox regression) για τις μεταβλητές κλίμακας (scale, Πίνακας B17). Συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με την OS η υποομάδα, στην οποία ανήκαν οι ασθενείς (B1, B2), και η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1, όπως φαίνεται και στις αντίστοιχες καμπύλες Kaplan-Meier (Εικόνες 11 και 12).

Πίνακας B16: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Κατηγορικές μεταβλητές (Log-rank test)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Φύλο	0.628
Κάπνισμα (Ναι/Όχι/Πρώην)	0.752
Αριθμός όγκων (Μονήρης/Πολλαπλός)	0.254
Μέγεθος όγκου (>3cm/<3cm)	0.852
Συνύπαρξη Cis	0.611
Στάδιο T	0.782
Υποομάδα (B1/B2)	0.000
NFκB (γινόμενο)	0.095
CD10 (γινόμενο)	0.685
ET-1	0.000

Πίνακας B17: Μονοπαραγοντική ανάλυση – Μεταβλητές κλίμακας (Cox regression)	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value
Ηλικία	0.062



Εικόνα 11: Μονοπαραγοντική ανάλυση-Σημαντική συσχέτιση υποομάδας στην οποία ανήκαν οι ασθενείς (B1, B2) και ολικής επιβίωσης (Log-rank test: $p=0.000$).



Εικόνα 12: Μονοπαραγοντική ανάλυση-Σημαντική συσχέτιση θετικής έκφρασης (τιμές έντασης 2 και 3) ET-1 και ολικής επιβίωσης (Log-rank test: $p=0.000$).

B) Πολυπαραγοντική ανάλυση

Για τη στατιστική διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης των υπό μελέτη μοριακών δεικτών (κυτταροπλασματικό NFκB, NEP/CD10 και ET-1), επιδημιολογικών (ηλικία, φύλο, κάπνισμα), κλινικών (αριθμός όγκων, μέγεθος όγκου, υποομάδα ασθενών) και παθολογοανατομικών (συνύπαρξη carcinoma *in situ*, στάδιο T) παραγόντων κατά την διάγνωση με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της ολικής επιβίωσης (overall survival/OS) εφαρμόστηκε η δοκιμασία της παλινδρόμησης Cox (Cox regression analysis, Πίνακας B18). Συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με την OS μόνο η υποομάδα, στην οποία ανήκαν οι ασθενείς (B1, B2), όπως φαίνεται και στην αντίστοιχη καμπύλη Kaplan-Meier (Εικόνα 11).

Πίνακας B18: Πολυπαραγοντική ανάλυση (Cox regression analysis)				
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	p-value	Hazard Ratio (HR)	95% Confidence Interval (CI)	
			Lower	Upper
Υποομάδα (B1, B2)	0.003	0.107	0.024	0.468

Η διερεύνηση της συσχέτισης των αλληλεπιδράσεων NFκB με NEP/CD10, NEP/CD10 με ET-1 και NFκB με NEP/CD10 και ET-1, βάσει όσων αναφέρονται στο κεφάλαιο "Ερευνητική υπόθεση-Κλινικό ενδιαφέρον", με την OS δεν κατέστη δυνατή, λόγω του μικρού αριθμού παρατηρήσεων, γεγονός που έκανε αδύνατη ή ουσιαστικά ασήμαντη την οποιαδήποτε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

♦ Σύνοψη αποτελεσμάτων ομάδας B (ομάδες B1 και B2)

i) Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 συσχετίστηκε μονοπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την υποτροπή και την πρόοδο νόσου (αρνητική κλινική έκβαση).

ii) Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 συσχετίστηκε πολυπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio) για υποτροπή και για πρόοδο νόσου, συγκριτικά με ασθενείς με αρνητική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 0 και 1, καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους.

iii) Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 συσχετίστηκε μονοπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την ελεύθερη υποτροπής επιβίωση.

iv) Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 συσχετίστηκε πολυπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για υποτροπή νόσου, συγκριτικά με ασθενείς με αρνητική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 0 και 1, καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους.

v) Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 2 και 3, του NFκB συσχετίστηκε μονοπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την πρόοδο νόσου, αλλά όχι και με την υποτροπή νόσου (αρνητική κλινική έκβαση).

vi) Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 2 και 3, του NFκB συσχετίστηκε πολυπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία

πιθανοτήτων (odds ratio) για πρόοδο νόσου, αλλά όχι και για υποτροπή νόσου, συγκριτικά με ασθενείς με αρνητική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 0 και 1, καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους.

vii) Η αύξηση της ηλικίας συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά, και μονοπαραγοντικά και πολυπαραγοντικά, με την υποτροπή νόσου, αλλά όχι και με την πρόοδο νόσου.

viii) Η αύξηση της ηλικίας συσχετίστηκε μονοπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την ελεύθερη υποτροπής επιβίωση.

ix) Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 συσχετίστηκε μονοπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την ελεύθερη προόδου επιβίωση.

x) Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 2 και 3, του NFκB συσχετίστηκε μονοπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την ελεύθερη προόδου επιβίωση.

xi) Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές γινομένου 2 και 3, της CD10 συσχετίστηκε μονοπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την ελεύθερη προόδου επιβίωση, εύρημα αντίθετο προς τη σχετική υπό μελέτη υπόθεση εργασίας.

xii) Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 συσχετίστηκε μονοπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την ολική επιβίωση.

xiii) Η υποομάδα, στην οποία ανήκαν οι ασθενείς (B1, B2), συσχετίστηκε μονοπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την ολική επιβίωση.

xiv) Η υποομάδα B1, δηλαδή οι ασθενείς που παρουσίασαν υποτροπή ± πρόοδο νόσου, συσχετίστηκε πολυπαραγοντικά σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αρνητική κλινική έκβαση, συγκεκριμένα με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για θάνατο, συγκριτικά με την υποομάδα B2, δηλαδή τους ασθενείς που δεν παρουσίασαν ούτε υποτροπή ούτε πρόοδο νόσου, καθόλη την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησής τους.

◆ Κλινική σημασία

Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά, και μονοπαραγοντικά και πολυπαραγοντικά, με την υποτροπή νόσου, την πρόοδο νόσου και την ελεύθερη υποτροπής επιβίωση. Επίσης, συσχετίστηκε σημαντικά, αλλά μονοπαραγοντικά, με την ελεύθερη προόδου επιβίωση και την ολική επιβίωση.

Τα ευρήματα, ιδίως αυτά στα οποία η συσχέτιση έχει τεκμηριωθεί και πολυπαραγοντικά, κρίνονται αξιόλογα, διότι δείχνουν ότι η αυξημένη έκφραση της ET-1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή κλινική πράξη ως μοριακός δείκτης νόσου υψηλού κινδύνου για τους ασθενείς με μη μυοδιηθητικό, υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Επομένως, με έγκαιρη εφαρμογή επιθετικότερης θεραπείας στους συγκεκριμένους ασθενείς, θα μπορούσε να επιτευχθεί μεγιστοποίηση του θεραπευτικού ωφέλους.

Ο NFκB συσχετίστηκε σημαντικά, και μονοπαραγοντικά και πολυπαραγοντικά, με την πρόοδο νόσου αλλά όχι και με την υποτροπή αυτής. Το εύρημα κρίνεται αξιόλογο, διότι δείχνει ότι η υψηλή έκφραση του NFκB θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή κλινική

πράξη ως μοριακός δείκτης υψηλού κινδύνου για πρόοδο νόσου για τους ασθενείς με μη μυοδιηθητικό, υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Επομένως, με έγκαιρη εφαρμογή επιθετικότερης θεραπείας σ' αυτήν την κατηγορία ασθενών, θα μπορούσε να επιτευχθεί μεγιστοποίηση του θεραπευτικού ωφέλους.

6. Συζήτηση

◆ NFκB και καρκίνος της ουροδόχου κύστης

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι ο NFκB ενεργοποιείται και επιδεικνύει ισχυρό μεταγραφικό δυναμικό σε διάφορους τύπους καρκίνου²⁶⁷⁻²⁷³. Αναφέρεται ανάλογα ότι η μετακίνηση προς τον πυρήνα της υπομονάδας p65 είναι σημαντικά υψηλότερη σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος του στομάχου, του κόλου και του προστάτη απ' ό,τι σε φυσιολογικά κύτταρα²⁷⁴⁻²⁷⁶. Εντούτοις, τα δημοσιευμένα δεδομένα σχετικά με τον ρόλο της ενεργοποίησης του NFκB σε όγκους του ουροποιογεννητικού περιορίζονται σε λίγες αναφορές ανώμαλης ενεργοποίησης σε νεφροκυτταρικό και προστατικό καρκίνο²⁷⁶⁻²⁷⁸. Σε μία κινέζικη μελέτη η έκφραση του NFκB βρέθηκε υψηλότερη σε κύτταρα ουροθηλιακού καρκίνου κύστης απ' ό,τι σε κύτταρα μη νεοπλαστικού βλεννογόνου²⁷⁹. Οι Levidou et al. παρατήρησαν ότι το φυσιολογικό ουροθήλιο παρουσιάζει κυρίως κυτταροπλασματική ανοσοέκφραση του p65/RelA, ενώ η πλειοψηφία των όγκων κύστης (όλων των βαθμών διαφοροποίησης και όλων των σταδίων T) παρουσιάζει πυρηνική ανοσοέκφραση του p65/RelA²⁸⁰. Η ανοσοεντόπιση του NFκB στο κυτταρόπλασμα θεωρείται ότι αντιστοιχεί στην ανενεργό μορφή της NFκB πρωτεΐνης, ενώ η πυρηνική ανοσοδραστικότητα θεωρείται δείκτης της ενεργοποιημένης NFκB πρωτεΐνης²⁸⁰. Οι τελευταίες δύο θεωρήσεις φαίνεται να ισχύουν και σε άλλα νεοπλάσματα, όπως το αδενοκαρκίνωμα του προστάτη και του στομάχου^{276,280,281}.

Οι αναλυτικοί μηχανισμοί που διέπουν την ενεργοποίηση του NFκB στον ουροθηλιακό καρκίνο της κύστης παραμένουν ασαφείς²⁸⁰. Η ανάλυση των ρυθμιστικών οδών του NFκB και των μορίων για την ανίχνευση μεταλλάξεων, που πιθανώς προάγουν την ενεργοποίηση του NFκB σε διάφορους τύπους καρκίνου, είναι σε εξέλιξη. Η ενεργοποίηση

του NFκB αποδίδεται στην φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IκB από την κινάση IKK. Είναι όμως αντιληπτό ότι η ενεργοποίηση του NFκB είναι μία διαδικασία πολλών βημάτων στην οποία πολλά μόρια αλληλεπιδρούν, ώστε να εκκινήσει μία υψηλού συντονισμού διαδικασία²⁷¹. Διαφορική ενεργοποίηση και έκφραση αυτών των μορίων υπό διαφορετικές συνθήκες θα μπορούσε ενδεχομένως να ευθύνεται για τα αντιφατικά δεδομένα που έχουν προκύψει από διαφορετικούς ιστούς. Για παράδειγμα, μολονότι η NFκB-κινάση επαγωγής παίζει τον κύριο ρόλο στην ιδιοσυστατική ενεργοποίηση⁹ του NFκB στα κύτταρα του μελανώματος, στα καρκινικά προστατικά κύτταρα η ενεργοποίηση αυτή είναι αποτέλεσμα αυξημένης δραστηριότητας του συμπλέγματος της IKK κινάσης²⁸²⁻²⁸⁴. Σαφώς το ερώτημα των αλλαγών στο προς τα άνω μονοπάτι σηματοδότησης, που συντελούν στην ιδιοσυστατική ενεργοποίηση της NFκB πρωτεΐνης, σε κυτταρικές σειρές ουροθηλιακού καρκίνου της κύστης μένει να απαντηθεί²⁸⁰.

Στην δική μας προοπτική μελέτη των ασθενών με μυοδιθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Ομάδα Α) διερευνήσαμε την ενδεχόμενη συσχέτιση του NFκB με προγνωστικές παραμέτρους (πρόοδος νόσου, ελεύθερη πρόοδος επιβίωση και ολική επιβίωση). Μάλιστα, χρησιμοποιήσαμε για την αξιολόγηση του NFκB το μέγεθος του "γινόμενου", που συμπεριλαμβάνει τις παραμέτρους ένταση χρώσης και έκταση χρώσης (ως ποσοστό θετικώς ανοσοχρωσθέντων κυττάρων). Πήραμε αυτήν την απόφαση, ώστε να επιτύχουμε την κατά το δυνατόν μέγιστη αντικειμενική εκτίμηση της ανοσοχρώσης, ελαχιστοποιώντας την ενδεχόμενη επίδραση στα αποτελέσματα αφενός της υποκειμενικότητας στην αξιολόγηση της έντασης χρώσης και αφετέρου της απουσίας μεθοδολογικής ομοφωνίας ως προς την αξιολόγηση της

⁹ constitutive activation

έκτασης της χρώσης. Δεν διαπιστώσαμε καμία συσχέτιση. Στα μειονεκτήματα της μελέτης ανήκουν ο μικρός αριθμός ασθενών, η σχετικά βραχεία διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης και η μη ύπαρξη μεθοδολογικής ομοφωνίας ως προς την αξιολόγηση της ανοσοχρώσης. Στον αντίποδα τα πλεονεκτήματα είναι η προοπτική φύση της μελέτης, η ομοιογένεια της ομάδας των ενταγμένων ασθενών και η εύρωστη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Στην αναδρομική μελέτη των ασθενών με μη μυοδιηθητικό, υψηλού κινδύνου καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Ομάδα Β) διερευνήσαμε την ενδεχόμενη συσχέτιση του NFκB με προγνωστικές παραμέτρους (υποτροπή και πρόοδος νόσου, ελεύθερη υποτροπής και ελεύθερη πρόοδος επιβίωση και ολική επιβίωση). Η αξιολόγηση της χρώσης έγινε επίσης με το "γινόμενο" για το λόγο που ήδη αναφέρθηκε. Ο NFκB συσχετίστηκε σημαντικά, και μονοπαραγοντικά και πολυπαραγοντικά, με την πρόοδο νόσου αλλά όχι και με την υποτροπή αυτής. Το εύρημα κρίνεται αξιόλογο, διότι δείχνει ότι η υψηλή έκφραση του NFκB θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή κλινική πράξη ως μοριακός δείκτης νόσου υψηλού κινδύνου για τη συγκεκριμένη κατηγορία ασθενών. Επομένως, με έγκαιρη εφαρμογή επιθετικότερης θεραπείας σε ασθενείς με μη μυοδιηθητικό, υψηλού κινδύνου και αυξημένης έκφρασης NFκB καρκίνο, θα μπορούσε να επιτευχθεί μεγιστοποίηση του θεραπευτικού ωφέλους. Μειονεκτήματα της μελέτης είναι ο μικρός αριθμός ασθενών, ο αναδρομικός χαρακτήρας της και η μη ύπαρξη μεθοδολογικής ομοφωνίας ως προς την αξιολόγηση της ανοσοχρώσης. Στον αντίποδα τα πλεονεκτήματα είναι η ικανοποιητική διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης, η ομοιογένεια της ομάδας των ενταγμένων ασθενών και η εύρωστη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

◆ Ουδέτερη ενδοπεπτιδάση και καρκίνος ουροδόχου κύστης

Η εμπλοκή της νευροπεπτιδάσης (NEP/CD10) στην ουροθηλιακή ογκογένεση μπορεί να είναι ποικιλότητα. Τα αποτελέσματα μελετών της CD10 σε ανθρώπινους όγκους είναι αντιφατικά και αποκαλύπτουν ότι οι αλλαγές στην δραστηριότητα της CD10 μπορούν να προκαλούν διαφορετικές επιδράσεις σε διαφορετικούς τύπους όγκων.

Καταρχήν, η CD10 είναι μεταλλοπρωτεάση της κυτταρικής επιφάνειας και μπορεί να υποθέσει κανείς ότι οι όγκοι που την εκφράζουν έχουν την ικανότητα να δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον, που διευκολύνει την διήθηση από καρκινικά κύτταρα και τη μετάσταση²⁸⁵⁻²⁸⁷. Την υπόθεση αυτή υιοθετούν και οι Bahadır et al., μελετώντας την ανοσοέκφραση της CD10 σε σχέση με το παθολογικό στάδιο και τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας στη μεγαλύτερη σειρά ουροθηλιακών καρκινωμάτων (371 όγκοι) που έχει παρουσιαστεί ως σήμερα²⁸⁸. Εάν όντως η παραπάνω υπόθεση ισχύει, τότε μπορεί κάποιος να εικάσει ότι εφόσον τα διηθητικά καρκινώματα της κύστης πιθανότατα "κατάγονται" από επιφανειακές βλάβες υψηλού βαθμού κακοήθειας²⁸⁹⁻²⁹¹, τότε τέτοιες βλάβες (διηθητικές και υψηλού βαθμού κακοήθειας) θα εκφράζουν εντονότερα την CD10. Οι Murali et al. προτείνουν ότι η αυξημένη ανοσοϊστοχημική έκφραση της CD10 σε προχωρημένο στάδιο νόσου και σε υψηλό βαθμό κακοήθειας ίσως να δείχνει συγκέντρωση μεταλλαγμένης και μη λειτουργικής CD10 παρά φυσιολογικής και λειτουργικής²⁹².

Στον αντίποδα όμως, πρόσφατη μελέτη έδειξε συσχέτιση της έκφρασης της CD10 με υψηλότερο δείκτη απόπτωσης σε διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B κύτταρα²⁹³. Για τον δυνητικό ρόλο της CD10 κατά την διαδικασία της απόπτωσης υπάρχουν διάφορες υποθέσεις. Η CD10 θα μπορούσε να ευοδώνει την κυτταρική απόπτωση είτε

αποδομώντας κυτοκίνες ικανές να διανέμουν αντιαποπτωτικά σήματα είτε αποδομώντας πεπτιδικά σήματα²⁹⁴. Εκτός αυτού, η έκφραση της CD10 ίσως να συμμετάσχει στην αναστολή ανεπιθύμητης φλεγμονώδους αντίδρασης, που ξεκινά από ενεργοποιημένα κύτταρα που αποπίπτουν, και ίσως να προστατεύει τα κύτταρα αυτά από δυνητικές επιθέσεις του ανοσοποιητικού^{295,296}.

Νεοπλάσματα προερχόμενα από ιστούς οι οποίοι εκφράζουν την CD10 φυσιολογικά, όπως όγκοι στρώματος του ενδομητρίου, νεφροκυτταρικοί όγκοι, τροφοβλαστικοί όγκοι, συμπαγείς και ψευδοθηλωματώδεις όγκοι του παγκρέατος, ίσως να την εκφράζουν και αυτά²⁹⁷⁻³⁰³. Αντιθέτως, χαμηλή έκφραση ή πλήρης απουσία έκφρασης της CD10 έχει παρατηρηθεί σε διάφορους όγκους, συμπεριλαμβανομένων μικροκυτταρικών και μη μικροκυτταρικών καρκινωμάτων του πνεύμονα, καρκινώματων του στήθους, του στομάχου και του κόλου^{285,304-307}. Ερευνητές έχουν δείξει ότι η CD10 προάγει την απόπτωση και αναστέλλει την κυτταρική μετανάστευση στον καρκίνο του προστάτη^{308,309}. Επίσης, οι Papandreou et al. έχουν δείξει ότι η έκφραση της CD10 μειώνεται με την εξέλιξη του όγκου, ειδικά στους μεταστατικούς, ανδρογονοανεξάρτητους προστατικούς καρκίνους³¹⁰. Μελέτες όμως σε ασθενείς με μελάνωμα έχουν δείξει ότι η έκφραση της CD10 συσχετίζεται με πρόοδο του όγκου και μετάσταση³¹¹⁻³¹³. Έκφραση της CD10 στο στρώμα έχει επίσης παρατηρηθεί σε αδενώματα και καρκινώματα του κόλου και του ορθού, καθώς και σε διηθητικά πορογενή καρκινώματα του στήθους, αλλά όχι σε φυσιολογικούς ιστούς. Το συγκεκριμένο εύρημα ισχυροποιεί την υπόθεση ότι η CD10 ίσως να διευκολύνει την διήθηση και τη μετάσταση^{285,306,307}.

Σε αντίθεση με την τελευταία υπόθεση, ερευνητές έχουν δείξει ότι η έκφραση της CD10 είναι καλός προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και μη μικροκυτταρικό καρκίνο του

πνεύμονα και υποστηρίζουν την δράση της CD10 εναντίον του όγκου^{314,315}. Οι Xie et al. σε πρόσφατη πειραματική μελέτη στο μικροπεριβάλλον του όγκου έδειξαν ότι ινοβλάστες που εκφράζουν CD10, των οποίων η παραγωγή προκλήθηκε από ιντερλευκίνη-1 παραγόμενη από καρκίνωμα πλακώδους επιθηλίου, ανέστειλαν την διήθηση από καρκινικά κύτταρα μέσω αποδόμησης της ουσίας P³¹⁶. Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να δικαιολογηθούν από το γεγονός ότι η CD10 μπορεί να αποδομεί διάφορα βιοδραστικά πεπτίδια και κυτοκίνες, που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων³¹⁷. Για το λόγο αυτό δεν μπορεί να αποκλειστεί η υπόθεση ότι η CD10 εκφράζεται σε υψηλού βαθμού κακοήθειας και διηθητικούς όγκους, ώστε να σταματήσει την εξέλιξή τους³¹⁷.

Οι μελέτες της CD10 σε ουροθηλιακά καρκινώματα παρουσιάζουν επίσης αντιφατικά αποτελέσματα. Η πρώτη μελέτη εκτίμησης της δραστηριότητας της CD10 στην ουροδόχο κύστη έγινε από τους Koiso et al., που βρήκαν ότι και η ενζυμική δραστηριότητα και η ανοσοϊστοχημική έκφραση είναι υψηλότερες στους επιφανειακούς καρκίνους συγκριτικά με τους διηθητικούς και το φυσιολογικό ουροθήλιο³¹⁸. Οι Koiso et al. συμπέραναν ότι η CD10 εκφράζεται σε συγκεκριμένο στάδιο διαφοροποίησης κατά την νεοπλαστική διαδικασία. Σε παρόμοιο συμπέρασμα καταλήγει και μία νεότερη μελέτη του Jang TJ³¹⁷. Η απόδειξη της απουσίας ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της CD10 σε μη νεοπλαστικό ουροθήλιο έγινε δυνατή με την ανάπτυξη ενός μονοκλωνικού αντισώματος κατάλληλου για χρήση σε ιστούς ενσωματωμένους σε κύβους παραφίνης³¹⁹. Οι Chu και Arber ανέφεραν θετική κυτταροπλασματική χρώση στο 54% των ουροθηλιακών καρκινωμάτων, ενώ δεν υπήρξε καμία αντίδραση σε μη νεοπλασματικούς ιστούς²⁹⁷. Ωστόσο, στη μελέτη αυτή δε μελετήθηκε η συσχέτιση της έκφρασης της CD10 με το στάδιο της νόσου ή τον βαθμό

διαφοροποίησης. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι οι νεοπλασματικοί ιστοί, και όχι το μη νεοπλασματικό επιθήλιο, έχουν τάση έκφρασης της CD10.

Αντιθέτως, οι Murali et al. έδειξαν θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για CD10 στο 50% δειγμάτων (5/10) μη νεοπλασματικού ουροθηλίου²⁹². Παρά το μειονέκτημα του περιορισμένου αριθμού των περιστατικών, βρήκαν ότι η CD10 εκφράζεται στο 80% των διηθητικών καρκινωμάτων και επίσης ότι η ένταση της χρώσης στους όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας είναι στατιστικώς σημαντικά εντονότερη, συγκριτικά με τους όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας²⁹². Σε άλλη μελέτη των Bircan et al. το 43% των ουροθηλιακών καρκινωμάτων (34/79) και μόνο μία περίπτωση μη νεοπλαστικού επιθηλίου έδειξαν θετική χρώση για CD10³²⁰. Οι Bircan et al. βρήκαν αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ έκφρασης CD10 και σταδίου νόσου, αλλά καμία συσχέτιση με τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου. Πρότειναν λοιπόν ότι η υψηλότερη έκφραση CD10 σε μη διηθητικούς όγκους αναστέλλει την κυτταρική διήθηση. Οι Abdou et al. διαπίστωσαν, σε μία σειρά 49 περιστατικών, ότι η έκφραση της CD10 συσχετίζεται σημαντικά με κάποιες παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων του προχωρημένου σταδίου, του μεγέθους του όγκου και της μικρότερης μέσης επιβίωσης αλλά όχι και του βαθμού διαφοροποίησης³²¹. Οι συγγραφείς διατύπωσαν την υπόθεση ότι η CD10 συσχετίζεται με την πρόοδο του όγκου και ότι θα μπορούσε να διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Την ίδια υπόθεση υποστηρίζουν και τα ευρήματα των Bahadir et al., οι οποίοι έδειξαν αύξηση της έντασης της χρώσης της CD10 με το στάδιο και τον βαθμό διαφοροποίησης²⁸⁸.

Στην προοπτική μελέτη των ασθενών με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Ομάδα Α) διερευνήσαμε την ενδεχόμενη συσχέτιση της CD10 με προγνωστικές παραμέτρους (πρόοδος νόσου, ελεύθερη

προόδου επιβίωση και ολική επιβίωση). Χρησιμοποιήσαμε για την αξιολόγηση της CD10 το μέγεθος του "γινόμενου", που συμπεριλαμβάνει τις παραμέτρους ένταση χρώσης και έκταση χρώσης (ως ποσοστό θετικώς ανοσοχρωσθέντων κυττάρων). Πήραμε αυτήν την απόφαση, ώστε να επιτύχουμε την κατά το δυνατόν μέγιστη αντικειμενική εκτίμηση της ανοσοχρώσης, ελαχιστοποιώντας την ενδεχόμενη επίδραση στα αποτελέσματα αφενός της υποκειμενικότητας στην αξιολόγηση της έντασης χρώσης και αφετέρου της απουσίας μεθοδολογικής ομοφωνίας ως προς την αξιολόγηση της έκτασης της χρώσης. Η ερευνητική μας υπόθεση δεν επιβεβαιώθηκε και γενικά δεν διαπιστώσαμε καμία συσχέτιση. Στα μειονεκτήματα της μελέτης ανήκουν ο μικρός αριθμός ασθενών, η σχετικά βραχεία διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης και η μη ύπαρξη μεθοδολογικής ομοφωνίας ως προς την αξιολόγηση της ανοσοχρώσης. Στον αντίποδα τα πλεονεκτήματα είναι η προοπτική φύση της μελέτης, η ομοιογένεια της ομάδας των ενταγμένων ασθενών και η εύρωστη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Διερευνήσαμε αναδρομικά ασθενείς με μη μυοδιηθητικό, υψηλού κινδύνου καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Ομάδα Β) για την ενδεχόμενη συσχέτιση της CD10 με προγνωστικές παραμέτρους (υποτροπή και πρόοδος νόσου, ελεύθερη υποτροπής και ελεύθερη προόδου επιβίωση και ολική επιβίωση). Η αξιολόγηση της χρώσης έγινε επίσης με το "γινόμενο" για το λόγο που ήδη αναφέρθηκε. Διαπιστώσαμε μόνο ότι η θετική έκφραση της CD10 συσχετίστηκε σημαντικά, στη μονοπαραγοντική ανάλυση, με την ελεύθερη προόδου επιβίωση, εύρημα όμως αντίθετο προς την αρχικά διατυπωμένη ερευνητική υπόθεση. Το συγκεκριμένο εύρημα σε συνδυασμό με τον εναντιωματικό του χαρακτήρα, ως προς την υπόθεση εργασίας μας, θεωρείται ότι είναι σύμφωνο με την αντιφατικότητα των αποτελεσμάτων, των έως τώρα

μελετών, για τον ρόλο της CD10 σε ουροθηλιακά καρκινώματα. Επιπροσθέτως, είναι μια συσχέτιση τεκμηριωμένη με μονοπαραγοντική ανάλυση, γεγονός που καθιστά ισχυρή τη σημασία της. Μειονεκτήματα της μελέτης είναι ο μικρός αριθμός ασθενών, ο αναδρομικός χαρακτήρας της και η μη ύπαρξη μεθοδολογικής ομοφωνίας ως προς την αξιολόγηση της ανοσοχρώσης. Στον αντίποδα τα πλεονεκτήματα είναι η ικανοποιητική διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης, η ομοιογένεια της ομάδας των ενταγμένων ασθενών και η εύρωστη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Εν κατακλείδι, φαίνεται ότι η CD10 πιθανώς να συμβάλλει στη νεοπλασματική διαδικασία των διαφόρων ιστών με διαφορετικούς ή ατελώς κατανοητούς, έως σήμερα, μηχανισμούς.

◆ Ενδοθηλίνη-1 και καρκίνος ουροδόχου κύστης

Η ενδοθηλίνη-1 (Endothelin-1/ET-1) και οι υποδοχείς της, A (endothelin A receptor/ETAR) και B (endothelin B receptor/ETBR), που συνοπτικά αποκαλούνται "άξονας της ενδοθηλίνης", φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην βιολογία του καρκίνου. Η ET-1 ανήκει σε μία ομάδα πολυλειτουργικών πεπτιδίων (ET-1, ET-2, ET-3). Απομονώθηκε το 1998 από ενδοθηλιακά κύτταρα χοίρου³²². Έχει ισχυρή αγγειοσυσταλτική δράση³²³, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου³²⁴ και τέλος έχει αντιαποπτωτική³²⁵ και νεοαγγειογενετική³²⁶ επίδραση στους ανθρώπινους όγκους. Ο ρόλος της λοιπόν στην βιολογία του καρκίνου διαφόρων όγκων δείχνει να είναι αυξανόμενος.

Οι ενδοθηλίνες ασκούν τη φυσιολογική τους λειτουργία αλληλεπιδρώντας με τους ETAR, ETBR, που είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνη G και απαντώνται σε αγγειακό και μη αγγειακό ιστό. Ο ETAR είναι εκλεκτικός για τις ET-1, ET-2 και ο ETBR είναι εκλεκτικός και για τις 3 ισομορφές³²³. Ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων και η μετανάστευση, όπως επηρεάζονται από την ET-1, μεσολαβούνται από ενεργοποίηση του ETBR, ενώ η διέγερση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων, η μιτογένεση των περικυττάρων¹⁰ και η παραγωγή αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor/VEGF) επιτυγχάνονται κυρίως μέσω του ETAR³²⁷⁻³³⁰.

Οι Saenz de Tejada et al. έχουν περιγράψει στη φυσιολογική ουροδόχο κύστη, χρησιμοποιώντας μια ανοσοϊστοχημική τεχνική με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ET-1, μία ανοσοαντιδραστικότητα

¹⁰ Περικύτταρα: Συσπώμενα κύτταρα που περιβάλλουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών και των φλεβιδίων σε όλο το σώμα.

τύπου ενδοθηλίνης³³¹. Διαπιστώσανε έκφραση ενδοθηλίνης στο μεταβατικό επιθήλιο και το αγγειακό ενδοθήλιο καθώς και σε λείες μυϊκές ίνες και ινοβλάστες του εξωστήρα μη της κύστης. Με περαιτέρω ανάλυση (northern blot, in situ υβριδισμός) επιβεβαίωσαν το ρόλο της ET-1 στην δομή του κυστικού τοιχώματος, τον έλεγχο του λείου μυϊκού τόνου της κύστης και την αιματική ροή³³¹. Άλλοι ερευνητές ανίχνευσαν mRNA των ETAR και ETBR σε καλλιέργεια κυττάρων εξωστήρα με κυριαρχία του ETAR³³². Η πυκνότητα κατανομής των ETAR, ETBR διαφέρει στις διάφορες περιοχές της κύστης³³³. Πάντως, στην βάση της κύστης και την ουρήθρα οι ETAR, ETBR υπάρχουν σε ίδια αναλογία.

Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης ο "άξονας της ενδοθηλίνης" υπερεκφράζεται σημαντικά στην πλειοψηφία των διηθητικών όγκων συγκριτικά με το φυσιολογικό ουροθήλιο^{323,334}. Οι Wülfing et al. πραγματοποίησαν την πρώτη μελέτη του "άξονα της ενδοθηλίνης" στον καρκίνο της κύστης. Τον μελέτησαν προοπτικά, με ανοσοϊστοχημεία και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ανάστροφης τρανσκριπτάσης (RT-PCR), σε 22 δείγματα ριζικής κυστεκτομής καθώς επίσης και αναδρομικά, με ανοσοϊστοχημεία, σε μία σειρά 42 ριζικών κυστεκτομών. Χρησιμοποίησαν ακόμα 4 σειρές καρκινικών κυττάρων κύστης. Στην RT-PCR ανάλυση ανιχνεύτηκαν mRNA της ET-1, του ETAR και του ETBR σε ποσοστά 100%, 100% και 50% αντίστοιχα. Αντιθέτως, η ανοσοϊστοχημεία έδειξε ότι ο ETBR είναι ο κυρίαρχος υποδοχέας και έπονται ο ETAR και η ET-1. Η ταυτόχρονη μελέτη φυσιολογικού ουροθηλίου έδειξε ότι ο "άξονας της ενδοθηλίνης" δεν υπερεκφράζεται σ' αυτό, δείχνοντας έτσι μια ειδική υπερέκφραση στον ιστό από όγκους³³⁴. Η χαμηλότερη έκφραση του ETBR στην RT-PCR μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική σύνδεση του mRNA, αλλά αυτό είναι κάτι που πρέπει να αποσαφηνιστεί με περαιτέρω έρευνα³³⁵.

Σε άλλη μελέτη των Wülfing et al. μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία 157 δείγματα ριζικών κυστεκτομών και διαπιστώθηκε ότι κυρίαρχος υποδοχέας είναι ο ETBR. Κατηγοριοποιώντας τους ασθενείς βάσει παθολογοανατομικών και κλινικών παραμέτρων βρέθηκε ότι οι ETBR θετικοί όγκοι συσχετίζονται με μεγαλύτερη ελεύθερη νόσου επιβίωση³²³. Ο ρόλος του ETAR παραμένει αδιευκρίνιστος μιας και δεν βρέθηκε συσχέτισή του ούτε με παθολογοανατομικές και κλινικές παραμέτρους ούτε με ρυθμούς επιβίωσης.

Οι Wülfing et al. πραγματοποίησαν μία προκλινική μελέτη σε αλλομοσχέδια κυστικών όγκων, με σκοπό να εκτιμήσουν το ρόλο του ETAR³³⁶. Καρκινικά κύτταρα κύστης KU-19-19, που εκφράζουν την ET-1 και τον ETAR αλλά όχι και τον ETBR, εμφυτεύτηκαν σε ποντίκια. Αφού αναπτύχθηκαν οι όγκοι η μία ομάδα ποντικίων έλαβε ενδοπεριτοναϊκή αγωγή με Atrasentan¹¹ και η άλλη με placebo. Συγκρίνοντας τις 2 ομάδες ποντικίων οι ερευνητές βρήκαν ότι η ομάδα του Atrasentan παρουσίασε μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης του όγκου με αυξημένο ποσοστό νέκρωσης εντός αυτού, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων του³³⁶. Η έκφραση του ETAR, όπως εκτιμήθηκε με τη χρήση RT-PCR, ήταν αυξημένη στην ομάδα του Atrasentan, υπονοώντας έτσι ένα μηχανισμό διαφυγής, με σκοπό να ξεπεραστεί η αντιπολλαπλασιαστική επίδραση που προκλήθηκε με τη στόχευση με Atrasentan του ETAR³³⁶.

Οι Herrmann E et al. μελέτησαν αναδρομικά το 2007 τη σχέση του "άξονα της ενδοθηλίνης" με την μικροαγγειακή πυκνότητα (microvessel density/MVD) και κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους σε μυοδιηθητικούς όγκους. Η μελέτη χρησιμοποίησε ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των ET-1,

¹¹ Atrasentan: Εκλεκτικός ανταγωνιστής του ETAR.

ETAR, ETBR και CD34 (MVD) σε 120 δείγματα ασθενών που υποβλήθηκαν σε ριζική κυστεκτομή. Διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της υπερέκφρασης της ET-1 με αυξημένη MVD και εντοπισμένη στην κύστη νόσο. Επομένως, η ET-1 και η MVD θα μπορούσαν να θεωρηθούν καλοί προγνωστικοί παράγοντες³³⁷.

Οι Eltze E et al. μελέτησαν πρώτοι τις πρωτεΐνες του "άξονα της ενδοθηλίνης" σε επιφανειακό καρκίνο της κύστης. Σε μικροσυστοιχίες ιστού¹² από 154 συνεχόμενους ασθενείς σταδίου pTa-T2 έγιναν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για ET-1, ETAR, ETBR, Tumor Protein 53 (TP53) και Kinase inhibitor 67 (Ki-67). Επίσης, αναζητήθηκαν μεταλλάξεις του Fibroblast Growth Factor Receptor 3 γονιδίου (FGFR3) με SNaPshot ανάλυση. Τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων της ειδικής της νόσου επιβίωσης, της συνολικής επιβίωσης και της ελεύθερης υποτροπής επιβίωσης. Οι ερευνητές διαπίστωσαν έκφραση του "άξονα" στους όγκους³³⁸. Η έκφραση των ETAR, ETBR συσχετίζεται με ευνοϊκές παραμέτρους (χαμηλό στάδιο όγκου, χαμηλός βαθμός κακοήθειας, χαμηλός δείκτης πολλαπλασιασμού)³³⁸. Η έκφραση του ETBR συσχετίζεται επίσης με το status μετάλλαξης του FGFR3 και με καλύτερη πρόγνωση, εννοώντας σημαντικά μεγαλύτερη ελεύθερη υποτροπής επιβίωση, στην υποομάδα ασθενών με πολυεστιακούς όγκους, όγκους χαμηλής έκφρασης TP53, όγκους με μετάλλαξη του FGFR3 και όγκους χαμηλού δείκτη πολλαπλασιασμού³³⁸. Η συσχέτιση του "άξονα ενδοθηλίνης" με προγνωστικούς μοριακούς δείκτες (FGFR3, TP53, Ki-67) του καρκίνου της κύστης δείχνει ότι αυτός ίσως να παίζει ρόλο στην εξέλιξη της επιφανειακής νόσου.

¹² tissue microarrays

Πολλοί ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο της κύστης αναπτύσσουν θανατηφόρες μεταστάσεις στον πνεύμονα. Η ET-1 έχει συμμετοχή στη μεταστατική διαδικασία, αν και ο μηχανισμός με τον οποίον την προάγει παραμένει άγνωστος³³⁹. Οι Said N et al. σε πρόσφατη έρευνα εκτίμησαν εάν η έκφραση της ET-1 μπορεί να χρησιμεύσει ως μοριακός δείκτης για τις πνευμονικές μεταστάσεις και εάν η ET-1 είναι απαραίτητη για τη μεταστατική νόσο. Η εκτίμηση του mRNA της ET-1 και της πρωτεϊνικής έκφρασής της σε 4 κοόρτες ασθενών έδειξε ότι τα επίπεδα της ET-1 είναι υψηλότερα σε ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της κύστης, ο οποίος παρουσιάζει μεγαλύτερη επίπτωση μεταστάσεων, και ότι αυτά τα υψηλά επίπεδα ET-1 συσχετίζονται με ελαττωμένη ειδική της νόσου επιβίωση³³⁹. Σε συμφωνία με την προφλεγμονώδη δραστηριότητα της ET-1, διαπιστώθηκε ότι η προερχόμενη από τον όγκο ET-1 αφενός δρα μέσω του ETAR, ώστε να ενισχύσει τη μετανάστευση και την διήθηση τόσο των κυττάρων του όγκου όσο και των μακροφάγων, και αφετέρου επάγει την έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών και πρωτεασών³³⁹. Οι συγγραφείς, χρησιμοποιώντας καρκινικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικίου καθαυμένα από ET-1 και φαρμακολογικό αποκλεισμό των υποδοχέων της ET-1 σε μοντέλα πνευμονικής μετάστασης, βρήκανε ότι η έκφραση της ET-1 στον όγκο και η δραστηριότητα του ETAR είναι στοιχεία απαραίτητα για το μεταστατικό αποικισμό του πνεύμονα και ότι αυτή η διαδικασία προηγείται και εξαρτάται από την πνευμονική διήθηση με μακροφάγα³³⁹. Αντιθέτως, η έκφραση της ET-1 στον όγκο και η δραστηριότητα του ETAR φαίνονται να είναι λιγότερο σημαντικά στοιχεία για την ανάπτυξη του πρωτοπαθούς ή του μεταστατικού όγκου³³⁹. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν ισχυρά την υπόθεση ότι οι αναστολείς του ETAR (πχ. Atrasentan) ίσως να είναι πιο αποτελεσματικοί ως επικουρικοί θεραπευτικοί παράγοντες παρά ως αρχική αγωγή για προχωρημένη ή μεταστατική νόσο³³⁹.

Στην προοπτική μας μελέτη των ασθενών με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Ομάδα Α) διερευνήσαμε την ενδεχόμενη συσχέτιση της ET-1 με προγνωστικές παραμέτρους (πρόοδος νόσου, ελεύθερη πρόοδος επιβίωση και ολική επιβίωση). Χρησιμοποιήσαμε για την αξιολόγηση της ET-1 την ένταση της κυτταροπλασματικής χρώσης σε συμφωνία με τη μεθοδολογική έρευνα άλλων ερευνητών^{323,334}. Η υπερέκφραση ET-1 συσχετίστηκε, πολυπαραγοντικά, σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για πρόοδο νόσου. Επιπλέον, συσχετίστηκε, πολυπαραγοντικά, σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με αυξημένη αναλογία κινδύνου (hazard ratio) για θάνατο. Τα ευρήματα κρίνονται αξιόλογα, επειδή η αυξημένη έκφραση της ET-1 θα μπορούσε να λειτουργήσει ως μοριακός δείκτης κακής πρόγνωσης για τους συγκεκριμένους ασθενείς, που θα μπορούσαν να ωφεληθούν με την έγκαιρη εφαρμογή επικουρικής θεραπείας. Λαμβάνοντας ακόμη υπόψιν ότι για τον άξονα της ενδοθηλίνης υπάρχει ήδη διαθέσιμη μοριακά στοχευμένη θεραπεία (Atrasentan, ανταγωνιστής υποδοχέα τύπου Α της ET-1) ίσως η προοπτική καθιέρωσης της χρήσης της ET-1 ως μοριακού δείκτη πρόγνωσης να γίνεται ελκυστικότερη. Φυσικά, ο δρόμος ως την ενδεχόμενη καθιέρωση του Atrasentan ως θεραπείας σε ασθενείς με όγκους του ουροποιογεννητικού είναι μακρύς. Στα μειονεκτήματα της μελέτης ανήκουν ο μικρός αριθμός ασθενών και η σχετικά βραχεία διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης. Στον αντίποδα τα πλεονεκτήματα είναι η προοπτική φύση της μελέτης, η ομοιογένεια της ομάδας των ενταγμένων ασθενών και η εύρωστη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Στην αναδρομική μελέτη των ασθενών με μη μυοδιηθητικό, υψηλού κινδύνου καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Ομάδα Β) διερευνήσαμε την ενδεχόμενη συσχέτιση της ET-1 με προγνωστικές παραμέτρους (υποτροπή και πρόοδος νόσου, ελεύθερη υποτροπής και

ελεύθερη προόδου επιβίωση και ολική επιβίωση). Η αξιολόγηση της χρώσης έγινε επίσης με τη χρησιμοποίηση της έντασης. Η θετική έκφραση, δηλαδή τιμές έντασης 2 και 3, της ET-1 συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά, και μονοπαραγοντικά και πολυπαραγοντικά, με την υποτροπή νόσου, την πρόοδο νόσου και την ελεύθερη υποτροπής επιβίωση. Επίσης, συσχετίστηκε σημαντικά, αλλά μονοπαραγοντικά, με την ελεύθερη προόδου επιβίωση και την ολική επιβίωση. Τα ευρήματα, ιδίως αυτά στα οποία η συσχέτιση έχει τεκμηριωθεί και πολυπαραγοντικά, κρίνονται αξιόλογα, διότι δείχνουν ότι η αυξημένη έκφραση της ET-1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή κλινική πράξη ως μοριακός δείκτης νόσου υψηλού κινδύνου για τη συγκεκριμένη κατηγορία ασθενών. Επομένως, με έγκαιρη εφαρμογή επιθετικότερης θεραπείας σε ασθενείς με μη μυοδιηθητικό, υψηλού κινδύνου και αυξημένης έκφρασης ET-1 καρκίνο, θα μπορούσε να επιτευχθεί μεγιστοποίηση του θεραπευτικού ωφέλους. Μειονεκτήματα της μελέτης είναι ο μικρός αριθμός ασθενών και ο αναδρομικός χαρακτήρας της. Στον αντίποδα τα πλεονεκτήματα είναι η ικανοποιητική διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης, η ομοιογένεια της ομάδας των ενταγμένων ασθενών και η εύρωστη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Συμπερασματικά, η αυξημένη έκφραση της ET-1 έδειξε, συνολικά στη μελέτη μας, σημαντικές συσχετίσεις με κακή κλινική έκβαση τόσο στους ασθενείς με μυοδιηθητική νόσο όσο και στους ασθενείς με μη μυοδιηθητικό υψηλού κινδύνου καρκίνο. Κατά συνέπεια, η περαιτέρω διενέργεια νέων, προοπτικών και με μεγαλύτερο αριθμό ενταγμένων ασθενών μελετών έχει ερευνητικό ενδιαφέρον, μιας και θα αποσαφηνίσει εάν η ET-1 μπορεί να αποτελέσει μοριακό δείκτη κακής κλινικής έκβασης στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Βιβλιογραφία

1. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat S, Van Rhijn B, Compérat E, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J, Rouprêt M; members of the European Association of Urology (EAU) Guidelines Office. Guidelines on Non-muscle Invasive Bladder Cancer. In: EAU Guidelines, edition presented at the 28th EAU Annual Congress, Milan 2013. ISBN 978-90-79754-71-7, EAU Guidelines Office, Arnhem, The Netherlands.
2. Sexton WJ, Wiegand LR, Correa JJ, Politis C, Dickinson SI, Kang LC. Bladder cancer: A review of non-muscle invasive disease. *Cancer Control* 2010; 17(4): 256-268.
3. Messing EM. Urothelial tumors of the bladder. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell-Walsh Urology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
4. Wan J, Grossman HB. Bladder carcinoma in patients age 40 years or younger. *Cancer* 1989; 64(1): 178-181.
5. GLOBOCAN 2008: Cancer incidence and mortality worldwide, Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Lyon: IARC Cancer Base No10; 2010.
6. Tumours of the urinary system. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IE, editors. *WHO Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the urinary system and male genital organs*. Lyon: IARC Press; 2004.
7. vom Dorp F, Eisenhardt A, Göbell PJ, Gschwend J, Jäger T, Jakse G, Jocham D, Karl A, Krege S, Lümmer G, Otto T, Rettenmeier A, Rödel C, Rübber H, Schenck M, Schmid KW, Stief C, Stöckle M, Zaak D. Harnblasenkarzinom. In: Rübber H. *Uroonkologie*. 5. Auflage Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2009.

8. Micheli A, Mariotto A, Giorgi Rossi A, Gatta G, Muti P. The prognostic role of gender in survival of adult cancer patients. EUROCCARE Working Group. *Eur J Cancer* 1998; 14: 2271-2278.
9. Madeb R, Messing EM. Gender, racial and age differences in bladder cancer incidence and mortality. *Urol Oncol* 2004; 22(2): 86-92.
10. Μ.Δ. Μελέκος, Η.Χ. Μητσογιάννης. "Νεοπλάσματα ουροδόχου κύστης". Στο "Σύγχρονη Ουρολογία", 1^η Έκδοση, Αθήνα: Εκδ. Παρισιάνος; 2005.
11. Probert JL, Persad RA, Greenwood RP, Gillatt DA, Smith PJ. Epidemiology of transitional cell carcinoma of the bladder: profile of an urban population in the south-west of England. *Br J Urol* 1998; 82(5): 660-666.
12. Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, Depierreux MF et al. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med*. 2000; 342(23): 1686-1692.
13. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M, Miller F, Wu L, Moll U, Suzuki N, Fernandes A et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(29): 12129-12134.
14. Nikolov IG, Petkova-Bocharova D, Castegnaro M, Pfohl-Leskowicz A, Gill C, Day N, Chemozemsky IN. Molecular and epidemiological approaches to the etiology of urinary tract tumors in an area with Balkan endemic nephropathy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1996; 15(2-4): 201-207.
15. Michaud DS, Spiegelman D, Clinton SK, Rimm EB, Curhan GC, Willett WC, Giovannucci EL. Fluid intake and the risk of bladder cancer in men. *N Engl J Med*. 1999; 340(18): 1390-1397.

16. Larsson SC, Andersson SO, Johansson JE, Wolk A. Cultured milk, yogurt and dairy intake in relation to bladder cancer risk in a prospective study of Swedish women and men. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(4): 1083-1087.
17. Larsson SC, Andersson SO, Johansson JE, Wolk A. Fruit and vegetable consumption and risk of bladder cancer: a prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(9): 2519-2522.
18. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 2000; 86: 289-294.
19. Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H et al. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 461-467.
20. Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA), United Kingdom, "Pioglitazone: risk of bladder cancer", August 2011, available on line:
www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/DrugSafetyUpdate/CON125962
21. Pannek J. Transitional cell carcinoma in patients with spinal cord injury: a high risk malignancy? *Urology* 2002; 59(2): 240-244.
22. Hamid R, Bycroft J, Arya M, Shah PJ. Screening cystoscopy and biopsy in patients with neuropathic bladder and chronic suprapubic indwelling catheters: is it valid? *J Urol* 2003; 170: 425-427.
23. Tricker AR, Mostafa MH, Spiegelhalder B, Preussmann R. Urinary excretion of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in Schistosomiasis and bilharzia bladder cancer patients. *Carcinogenesis* 1989; 10(3): 547-552.

24. Jimenez-Pacheco A, Exposito-Ruiz M, Arrabal-Polo MA, Lopez-Luque AJ. Meta-analysis of studies analyzing the role of human papillomavirus in the development of bladder carcinoma. *Korean J Urol* 2012; 53(4): 240-247.
25. Griffiths TR, Mellon JK. Human papillomavirus and urological tumours: II. Role in bladder, prostate, renal and testicular cancer. *BJU Int.* 2000; 85(2): 211-217.
26. Cohen SM, Garland EM, St John M, Okamura T, Smith RA. Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 1992; 52(13): 3577-3581.
27. Schmähl D, Habs MR. Prevention of cyclophosphamide-induced carcinogenesis in the urinary bladder of rats by administration of mesna. *Cancer Treat Rev.* 1983; 10 Suppl A: 57-61.
28. Fernandes ET, Manivel JC, Reddy PK, Ercole CJ. Cyclophosphamide associated bladder cancer-a highly aggressive disease: analysis of 12 cases. *J Urol.* 1996; 156(6): 1931-1933.
29. Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, Pettersson F, Langmark F, Pedersen D, Prior P, Neal F et al. Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study. *Int J Cancer.* 1995; 63(1): 1-6.
30. Buzzeo BD, Heisey DM, Messing EM. Bladder cancer in renal transplant recipients. *Urology* 1997; 50(4): 525-528.
31. Kroft SH, Oyasu R. Urinary bladder cancer: mechanisms of development and progression. *Lab Invest* 1994; 71(2): 158-174.
32. Fontana D, Bellina, M, Scoffone C et al. Evaluation of c-ras oncogene product (p21) in superficial bladder cancer. *Eur Urol* 1996 ; 29(4): 470-476.
33. Masters JR, Vesey SG, Munn CF et al. C-myc oncoprotein levels in bladder cancer. *Urol Res* 1988; 16(5): 341-344.

34. Gorgoulis VG, Barbatis C, Poulias I et al. Molecular analysis of p53 gene in laryngeal premalignant and malignant lesions. p53 protein immunohistochemical expression is positively related to proliferating cell nuclear antigen labelling index. *Virchows Arch* 1995; 426(4): 339-344.
35. Del Senno L, Mestri I, Piva R et al. Differential hypomethylation of the c-myc protooncogene in bladder cancers at different stages and grades. *J Urol* 1989; 142(1): 146-149.
36. Tiniakos DG, Mellon K, Anderson JJ et al. C-jun oncogene expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Urol* 1994; 74(6): 757-761.
37. Lianes P, Orlow I, Zhang ZF et al. Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(17): 1325-1330.
38. Malats N, Bustos A, Nascimento CM et al. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol* 2005; 6(9): 678-686.
39. Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI et al. Predictive value of cell cycle biomarkers in nonmuscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *J Urol* 2007; 177(2): 481-487.
40. Schrier BP, Vriesema JL, Witjes JA et al. The predictive value of p53, p27(kip1) and alpha-catenin for progression in superficial bladder carcinoma. *Eur Urol* 2006; 50(1): 76-82.
41. Yurakh AO, Ramos D, Calabuig-Farinas S et al. Molecular and immunohistochemical analysis of the prognostic value of cell-cycle regulators in urothelial neoplasms of the bladder. *Eur Urol* 2006; 50(3): 506-515.

42. Shariat SF, Zlotta AR, Ashfaq R et al. Cooperative effect of cell-cycle regulators expression on bladder cancer development and biologic aggressiveness. *Mod Pathol* 2007; 20(4): 445-459.
43. Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancer in 2010: How far have we come? *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 244-272.
44. Eguchi S, Yamamoto Y, Sakano S, Chochi Y, Nakao M, Kawauchi S, Furuya T, Oga A, Matsuyama H, Sasaki K. The loss of 8p23.3 is a novel marker for predicting progression and recurrence of bladder tumors without muscle invasion. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 Jul 1; 200(1): 16-22.
45. Minner S, Kilgué A, Stahl P, Weikert S, Rink M, Dahlem R, Fisch M, Höppner W, Wagner W, Bokemeyer C, Terracciano L, Simon R, Sauter G, Wilczak W. Y chromosome loss is a frequent early event in urothelial bladder cancer. *Pathology* 2010 Jun; 42(4): 356-359.
46. Cai T, Nesi G, Dal Canto M, Mondaini N, Piazzini M, Bartoletti R. Prognostic role of loss of heterozygosity on chromosome 18 in patients with low-risk non-muscle-invasive bladder cancer: results from a prospective study. *J Surg Res.* 2010 Jun 1; 161(1): 89-94.
47. Albertsen HM, Smith SA, Melis R et al. Sequence, genomic structure, and chromosomal assignment of human DOC-2. *Genomics* 1996; 33(2): 207-213.
48. Karam JA, Shariat SF, Ashfaq R et al. Decreased DOC-2/DAB2 expression in urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2007; 13(15 Pt 1): 4400-4406.
49. Bastacky S, Ibrahim S, Wilczynski SP et al. The accuracy of urinary cytology in daily practice. *Cancer* 1999; 87(3): 118-128.
50. Wiener HG, Mian C, Haitel A et al. Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer? *J Urol* 1998; 159(6): 1876-1880.

51. Witjes JA, Van der Poel HG, VanBalken MR et al. Urinary NMP22 and karyometry in the diagnosis and follow-up of patients with superficial bladder cancer. *Eur Urol* 1998; 33(4): 387-391.
52. Vrooman O.P.J, Witjes J.A. Urinary markers in bladder cancer. *Eur Urol* 2008; 53: 909-916.
53. Chadeneau C, Hay K, Hirte HW et al. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55(12): 2533-2536.
54. Tahara H, Yasui W, Tahara E et al. Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene* 1999; 18(8): 1561-1567.
55. Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y et al. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(7): 2696-2701.
56. Clark GM, Osborne CK, Levitt D et al. Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(24): 1874-1881.
57. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T et al. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995; 1(3): 249-255.
58. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K et al. Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* 1997; 33(12): 1932-1936.
59. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350(6319): 569-573.
60. Kavalier E, Landman J, Chang Y et al. Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. *Cancer* 1998; 82(4): 708-714.

61. Yoshida K, Sugino T, Tahara H et al. Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 1997; 79(2): 362-369.
62. Kinoshita H, Ogawa O, Kakehi Y et al. Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(10): 724-730.
63. Gelmini B, Crisci A, Salvatori B et al. Comparison of telomerase activity in bladder carcinoma and exfoliated cells collected in urine and bladder washings, using a quantitative assay. *Clin. Cancer Res* 2000; 6: 2771-2776.
64. Muller M. Telomerase: its clinical relevance in the diagnosis of bladder cancer. *Oncogene* 2002; 21(4): 650-655.
65. Knudson W. Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion. *Am J Pathol* 1996; 148(6): 1721-1726.
66. Lokeshwar VB, Soloway MS, Block NL et al. Secretion of bladder tumor-derived hyaluronidase activity by invasive bladder tumor cells. *Cancer Lett* 1998; 131(1): 21-27.
67. Pham HT, Block NL, Lokeshwar VB. Tumor-derived hyaluronidase: a diagnostic urine marker for high-grade bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 57(4): 778-783.
68. Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT et al. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol* 2000; 163(1): 348-356.
69. Davis R, Jones JS, Barocas DA, Castle EP, Lang EK, Leveillee RJ et al. Diagnosis, evaluation and follow-up of asymptomatic microhematuria (AMH) in adults: AUA Guideline. *J Urol* 2012; 188: 2473-2481.

70. Miahle A, Louis J, Pasquier D et al. Expression of three cell adhesion molecules in bladder carcinomas: correlation with pathological features. *Anal Cell Pathol* 1997; 13: 125-136.
71. Grossman HB, Lee C, Bromberg J et al. Expression of the alpha6beta4 integrin provides prognostic information in bladder cancer. *Oncol Rep* 2000; 7(1): 13-16.
72. Wenger RH, Gassmann M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 1997; 378(7): 609-616.
73. Blancher V, Moore JW, Talks KL et al. Relationship of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2000; 60: 7106-7113.
74. Jones A, Fujiyama C, Blanche C et al. Relation of vascular endothelial growth factor production to expression and regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and hypoxia-inducible factor-2 alpha in human bladder tumors and cell lines. *Clin Cancer Res* 2001; 7(5): 1263-1272.
75. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60(24): 7075-7083.
76. Streeter EH, Harris AL. Angiogenesis in bladder cancer--prognostic marker and target for future therapy. *Surg Oncol* 2002; 11(1-2): 85-100.
77. Theodoropoulos VE, Lazaris AC, Kastriotis I et al. Evaluation of hypoxia-inducible factor 1alpha overexpression as a predictor of tumour recurrence and progression in superficial urothelial bladder carcinoma. *BJU Int* 2005; 95(3):425-431.

78. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935): 1306-1309.
79. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S et al. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1995; 55(3): 510-513.
80. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S et al. Two mechanisms of basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 57(1): 136-140.
81. Crew JP, Fuggle S, Bicknell R et al. Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumour progression. *Br J Cancer* 2000; 82(1): 161-166.
82. Crew JP, Jones A. p53 and p53-regulated genes in bladder cancer. *BJU Int* 1999; 83(4): 529-530.
83. Crew JP, O'Brien T, Bicknell R et al. Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates. *J Urol* 1999; 161(3): 799-804.
84. Arima J, Imazono Y, Takebayashi Y et al. Expression of thymidine phosphorylase as an indicator of poor prognosis for patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 2000; 88(5): 1131-1138.
85. Valles AM, Boyer B, Badet J et al. Acidic fibroblast growth factor is a modulator of epithelial plasticity in a rat bladder carcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1990; 87(3): 1124-1128.
86. Chopin DK, Caruelle JP, Colobmbel M et al. Increased immunodetection of acidic fibroblast growth factor in bladder cancer, detectable in urine. *J Urol* 1993; 150(4): 1126-1130.

87. Jouanneau J, Plouet J, Moens G et al. FGF-2 and FGF-1 expressed in rat bladder carcinoma cells have similar angiogenic potential but different tumorigenic properties in vivo. *Oncogene* 1997; 14(6): 671-676.
88. Messing EM, Murphy-Brooks N. Recovery of epidermal growth factor in voided urine of patients with bladder cancer. *Urology* 1994; 44(4): 502-506.
89. Diez de Medina SG, Chopin D, El Marjou A et al. Decreased expression of keratinocyte growth factor receptor in a subset of human transitional cell bladder carcinomas. *Oncogene* 1997; 14(3): 323-330.
90. Lokeshwar VB, Obek C, Soloway MS et al. Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 57(4): 773-777.
91. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S et al. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res* 1996; 56(11): 2515-2518.
92. Muramaki M, Miyake H, Hara I et al. Introduction of midkine gene into human bladder cancer cells enhances their malignant phenotype but increases their sensitivity to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14): 5152-5160.
93. Miyake H, Hara I, Yamanaka K et al. Increased angiogenin expression in the tumor tissue and serum of urothelial carcinoma patients is related to disease progression and recurrence. *Cancer* 1999; 86(2): 316-324.
94. Ozdemir E, Kakaehi Y, Okuno H et al. Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas. *J Urol* 1999; 161(4): 1359-1363.

95. Papathoma AS, Petraki C, Grigorakis A et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res* 2000; 20(3B): 2009-2013.
96. Gohji K, Fujimoto N, Fujii A et al. Prognostic significance of circulating matrix metalloproteinase-2 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio in recurrence of urothelial cancer after complete resection. *Cancer Res* 1996; 56(14): 3196-3198.
97. Naruo S, Kanayama H, Takigawa H et al. Serum levels of a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in bladder cancer patients. *Int J Urol* 1994; 1(3): 228-231.
98. Gakiopoulou H, Nakopoulou L, Siatelis A et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as a multifunctional molecule of which the expression is associated with adverse prognosis of patients with urothelial bladder carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9(15): 5573-5581.
99. Filella X, Menendez V, Molina R et al. TPA prognostic value in superficial bladder cancer. *Anticancer Res* 1996; 16(4B): 2173-2175.
100. Hasui Y, Marutsuka K, Asada Y et al. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in patients with superficial bladder cancer. *Urology* 1996; 47(1): 34-37.
101. Campbell SC, Volpert OV, Ivanovich M et al. Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res* 1998; 58(6): 1298-1304.
102. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(3): 219-227.

103. Goddard JC, Sutton CD, Jones JL et al. Reduced thrombospondin-1 at presentation predicts disease progression in superficial bladder cancer. *Eur Urol* 2002; 42(5): 464-468.
104. Osawa S, Terashima Y, Watanabe J et al. Antitumour effects of the angiogenesis inhibitor AGM-1470 on rat urinary bladder tumours induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *BJU Int* 1999; 83(1): 123-128.
105. Kong C, Zhu Y, Sun C et al. Inhibition of tumor angiogenesis during cisplatin chemotherapy for bladder cancer improves treatment outcome. *Urology* 2005; 65(2): 395-399.
106. Du Z, Hou S. The anti-angiogenic activity of human endostatin inhibits bladder cancer growth and its mechanism. *J Urol* 2003; 170(5): 2000-2003.
107. Soloway MS, Masters S. Urothelial susceptibility to tumor cell implantation: influence of cauterization. *Cancer* 1980 Sep 1; 46(5): 1158-1163.
108. Pan JS, Slocum HK, Rustum YM et al. Inhibition of implantation of murine bladder tumor by thiotepa in cauterized bladder. *J Urol* 1989 Dec; 142(6): 1589-1593.
109. Brocks CP, Büttner H, Böhle A. Inhibition of tumor implantation by intravesical gemcitabine in a murine model of superficial bladder cancer. *J Urol* 2005 Sep; 174(3): 1115-1118.
110. Oosterlinck W, Kurth KH, Schröder F et al. A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol* 1993 Apr; 149(4): 749-752.

111. Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden AP. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a metaanalysis of published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2004 Jun; 171(6 Pt 1): 2186-2190.
112. Berrum-Svennung I, Granfors T, Jahnsen S et al. A Single instillation of epirubicin after transurethral resection of bladder tumors prevents only small recurrences. *J Urol* 2008 Jan; 179(1): 101-105.
113. Gudjonsson S, Adell L, Merdasa F et al. Should all patients with non-muscle-invasive bladder cancer receive early intravesical chemotherapy after transurethral resection? The results of a prospective randomised multicentre study. *Eur Urol* 2009 Apr; 55(4): 773-780.
114. May M, Brookman-Amissah S, Roigas J et al. Prognostic accuracy of individual urologists in Non-invasive urinary bladder carcinoma: a multicentre study comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation Classifications. *Eur Urol* 2010 May; 57(5): 850-858.
115. van Rhijn BW, van Leenders GJ, Ooms BC et al. The pathologist's mean grade is constant and individualizes the prognostic value of bladder cancer grading. *Eur Urol* 2010 Jun; 57(6): 1052-1057.
116. Sylvester RJ. Natural history, recurrence and progression in superficial bladder cancer. *ScientificWorldJournal* 2006; 6: 2617-2625.
117. Pasin E, Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Stein JP. Superficial bladder cancer: An update on etiology, molecular development, classification and natural history. *Rev Urol* 2008; 10(1): 31-43.

118. Le Bret T, Bohin D, Kassardjian Z, Herve JM, Molinie V, Barre P, Lugagne PM, Botto H. Recurrence, progression and success in stage Ta grade 3 bladder tumors treated with low dose bacillus Calmette-Guérin instillations. *J Urol* 2000; 163: 63-67.
119. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA, Jakse G, Nonomura N, Cheng C, Torres A, Watson R, Kurth KH. High-Grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology* 2005; 66: 90-107.
120. Losa A, Hurle R, Lembo A. Low dose bacillus Calmette-Guérin for carcinoma in situ of the bladder: long-term results. *J Urol* 2000; 163: 68-72.
121. Jakse G, Hall R, Bono A, Hörtl W, Carpentier P, Spaander JP, van der Meijden AP, Sylvester RJ. Intravesical BCG in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder: long-term results of EORTC GU Group phase II protocol 30861. *Eur Urol* 2001; 40: 144-150.
122. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann MD, Hawkins IR. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 1983; 130: 1083-1086.
123. Cheng L, Chevillie JC, Neumann RM, Leibovich BC, Egan KS, Spotts BE, Bostwick DG. Survival of patients with carcinoma in situ of the urinary bladder. *Cancer* 1999; 85: 2469-2474.
124. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Algaba F, Vicente-Rodríguez J. Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence. *J Urol* 2000; 164: 680-684.
125. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, Newling DW, Kurth K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder

- cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006; 49: 466-477.
126. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Gonzalez M, Portillo J, Ojea A, Pertusa C, Rodriguez-Molina J, Camacho JE, Rabadan M, Astobieta A, Montesinos M, Isorna S, Muntañola P, Gimeno A, Blas M, Martinez-Piñeiro JA. Predicting non-muscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guérin: the CUETO scoring model. *J Urol* 2009 Nov; 182(5): 2195-2203.
127. Hake R, Vorreuther R, Bochmann P et al. Monoclonal antibodies (MIB 1, PC 10, 486p and p53) as prognostic factors for recurrent urothelial carcinoma of the urinary bladder]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1993; 77: 236-240.
128. Syrigos KN, Georgiou E, Harrington KJ. Mucins expression in gastric cancer: old molecules in new roles. *Intern J of Surgical Investigation* 2001; 11: 1-8.
129. McKnight JJ, Gray SB, O'Kane HF et al. Apoptosis and chemotherapy for bladder cancer. *J Urol* 2005; 173(3): 683-690.
130. Shariat SF, Kim J, Raptidis G et al. Association of p53 and p21 expression with clinical outcome in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder. *Urology* 2003; 61(6): 1140-1145.
131. Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J et al. P53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(6): 1014-1024.
132. Lichter P, Walczak H, Weitz S et al. The human APO-1 (APT) antigen maps to 10q23, a region that is syntenic with mouse chromosome 19. *Genomics* 1992 Sep; 14(1): 179-180.
133. Inazawa J, Itoh N et al. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics* 1992 Nov; 14(3): 821-822.

134. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88(3): 355-365.
135. Svatec SF, Herman MP, Lotan Y et al. Soluble Fas, A promising novel urinary marker for the detection of recurrent superficial bladder cancer. *Cancer* 2006; 106: 1701-1707.
136. Yamana K, Bilim V, Hara N et al. Prognostic impact of FAS/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression. *Br J Cancer* 2005; 93(5): 544-551.
137. Arai M, Sasaki A, Saito N et al. Immunohistochemical analysis of cleaved caspase-3 detects high level of apoptosis frequently in diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system. *Pathol Int* 2005; 55(3): 122-129.
138. Burton PB, Anderson CJ, Corbishly CM. Caspase 3 and p27 as predictors of invasive bladder cancer. *N Engl J Med* 2000; 343(19): 1418-1420.
139. Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI et al. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. *Lancet Oncol* 2007; 8(2): 128-136.
140. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275(5303): 1132-1136.
141. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3(8): 917-921.
142. Akhtar M, Gallagher L, Rohan S. Survivin: role in diagnosis, prognosis, and treatment of bladder cancer. *Adv Anat Pathol* 2006; 13(3): 122-126.

143. Smith SD, Wheeler MA, Plescia J et al. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *Jama* 2001; 285(3): 324-328.
144. Schultz IJ, Kiemeny LA, Karthaus HF et al. Survivin mRNA copy number in bladder washings predicts tumor recurrence in patients with superficial urothelial cell carcinomas. *Clin Chem* 2004; 50(8): 1425-1428.
145. Mattila AL, Saario I, Viikka L et al. Urinary epidermal growth factor concentrations in various human malignancies. *Br J Cancer* 1988; 57(2): 139-141.
146. Ravery V, Grignon D, Angulo J et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and c-erbB2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol Res* 1997; 25(1): 9-17.
147. Lipponen P, Eskelinen M. Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Br J Cancer* 1994; 69(6): 1120-1125.
148. Neal DE, Sharples L, Smith K et al. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 1990; 65(7): 1619-1625.
149. Coombs LM, Pigott DA, Eydmann ME et al. Reduced expression of TGF beta is associated with advanced disease in transitional cell carcinoma. *Br J Cancer* 1993; 67(3): 578-584.
150. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M et al. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 57(23): 5281-5285.
151. Shelley MD, Kynaston H, Court J, Wilt TJ, Coles B, Burgon K, Mason MD, A systematic review of intravesical bacillus Calmette-

- Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int* 2001; 88(3): 209-216.
152. Han RF, Pan JG, Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology* 2006; 67(6): 1216-1223.
153. Shelley MD, Wilt TJ, Court J, Coles B, Kynaston H, Mason MD, Intravesical bacillus Calmette-Guérin is superior to mitomycin C in reducing tumor recurrence in superficial bladder cancer: a meta-analysis of randomized trials. *BJU Int* 2004; 93(4): 485-490.
154. Böhle A, Jocham D, Bock PR, Intravesical bacillus Calmette-Guérin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol* 2003; 169(1): 90-95.
155. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL, Intravesical bacillus Calmette-Guérin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2002; 168(5): 1964-1970.
156. Böhle A, Bock PR, Intravesical bacillus Calmette-Guérin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology* 2004; 63(4): 682-687.
157. Zlotta AR, van Vooren JP, Huygen K, Drowart A, Decok M, Pirson M, Jurion F, Palfliet K, Denis O, Simon J, Schulmann CC, What is the optimal regimen for BCG intravesical therapy? Are six weekly instillations necessary? *Eur Urol* 2000; 37(4): 470-477.
158. Oddens J, Brausi M, Sylvester R et al. Final results of an EORTC-GU Cancers Group Randomized Study of Maintenance Bacillus Calmette-Guérin in Intermediate and High-Risk Ta, T1 Papillary Carcinoma of the Urinary Bladder: One-third Dose Versus Full Dose

- and 1 Year Versus 3Years of Maintenance. *Eur Urol* 2013 Mar; 63(3): 462-472.
159. Gallagher BL, Joudi FN, Maymi JL et al. Impact of previous bacille Calmette-Guérin failure pattern on subsequent response to bacille Calmette-Guérin plus interferon intravesical therapy. *Urology* 2008 Feb; 71(2): 297-301.
160. Rosevear HM, Lightfoot AJ, Birusingh KK et al. Factors affecting response to bacillus Calmette-Guérin plus interferon for urothelial carcinoma in situ. *J Urol* 2011 Sep; 186(3): 817-823.
161. Jensen JB, Ulhøi BP, Jensen KM. Lymph node mapping in patients with bladder cancer undergoing radical cystectomy and lymph node dissection to the level of the inferior mesenteric artery. *BJU Int* 2010 Jul; 106(2): 199-205.
162. Vazina A, Dugi D, Shariat SF, et al. Stage specific lymph node metastasis mapping in radical cystectomy specimens. *J Urol* 2004 May; 171(5): 1830-4.
163. Leissner J, Ghoneim MA, Abol-Enein H, et al. Extended radical lymphadenectomy in patients with urothelial bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *J Urol* 2004 Jan; 171(1): 139-144.
164. Roth B, Wissmeyer MP, Zehnder P, et al. A new multimodality technique accurately maps the primary lymphatic landing sites of the bladder. *Eur Urol* 2010 Feb; 57(2): 205-211.
165. Ghoneim MA, Abol-Enein H. Lymphadenectomy with cystectomy: is it necessary and what is its extent? *Eur Urol* 2004 Oct; 46(4): 457-461.
166. Fleischmann A, Thalmann GN, Markwalder R, et al. Extracapsular extension of pelvic lymph node metastases from urothelial carcinoma of the bladder is an independent prognostic factor. *J Clin Oncol* 2005 Apr; 23(10): 2358-65.

167. Koppie TM, Vickers AJ, Vora K, Dalbagni G, Bochner BH: Standardization of pelvic lymphadenectomy performed at radical cystectomy: can we establish a minimum number of lymph nodes that should be removed? *Cancer* 2006 Nov; 107(10): 2368-74.
168. Wright JL, Lin DW, Porter MP. The association between extent of lymphadenectomy and survival among patients with lymph node metastases undergoing radical cystectomy. *Cancer* 2008 Jun; 112(11): 2401-8.
169. Studer UE, Collette L. Morbidity from pelvic lymphadenectomy in men undergoing radical prostatectomy. *Eur Urol* 2006 Nov; 50(5): 887-9; discussion 889-92.
170. Advanced Bladder Cancer Meta-analysis Collaboration. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2003 Jun; 361(9373): 1927-34.
171. Winquist E, Kirchner TS, Segal R et al. Genitourinary Cancer Disease Site Group, Cancer Care Ontario Program in Evidence-based Care Practice Guidelines Initiative. Neoadjuvant chemotherapy for transitional cell carcinoma of the bladder: a systematic review and meta-analysis. *J Urol* 2004 Feb; 171(2 Pt 1): 561-569.
172. Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. *Eur Urol* 2005 Aug; 48(2): 202-205; discussion 205-206.
173. Rosenblatt R, Sherif A, Rintala E et al. Pathologic downstaging is a surrogate marker for efficacy and increased survival following neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy for muscle-

- invasive urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2012 Jun; 61(6): 1229-1238.
174. Shelley MD, Barber J, Wilt T et al. Surgery versus radiotherapy for muscle invasive bladder cancer. *Cochrane database Syst Rev* 2002; (1): CD002079.
175. Bono A, Benvenuti C, Gibba A et al. Adjuvant chemotherapy in locally advanced bladder cancer. Final analysis of a controlled multicentre study. *Acta Urol Ital* 1997; 11(1): 5-8.
176. Freiha F, Reese J, Torti FM. A randomized trial of radical cystectomy versus radical cystectomy plus cisplatin, vinblastine and methotrexate chemotherapy for muscle invasive bladder cancer. *J Urol* 1996 Feb; 155(2): 495-9; discussion 499-500.
177. Stöckle M, Meyenburg W, Wellek S et al. Adjuvant polychemotherapy of nonorgan-confined bladder cancer after radical cystectomy revisited: long-term results of a controlled prospective study and further clinical experience. *J Urol* 1995 Jan; 153(1): 47-52.
178. Studer UE, Bacchi M, Biedermann C et al. Adjuvant cisplatin chemotherapy following cystectomy for bladder cancer: results of a prospective randomized trial. *J Urol* 1994 Jul; 152(1): 81-4.
179. Skinner DG, Daniels JR, Russell CA et al. Adjuvant chemotherapy following cystectomy benefits patients with deeply invasive bladder cancer. *Semin Urol* 1990 Nov; 8(4): 279-84.
180. Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. Adjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. Eur Urol* 2005 Aug; 48(2): 189-199; discussion 199-201.
181. Lehmann J, Retz M, Wiemers C, et al; AUO-AB 05/95. Adjuvant cisplatin plus methotrexate versus methotrexate, vinblastine,

- epirubicin, and cisplatin in locally advanced bladder cancer: results of a randomized, multicenter, phase III trial (AUO-AB 05/95). *J Clin Oncol* 2005 Aug; 23(22): 4963-74.
182. Loehrer PJ Sr, Einhorn LH, Elson PJ et al. A randomized comparison of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study. *J Clin Oncol* 1992 Jul; 10(7): 1066-73.
183. Logothetis CJ, Dexeus FH, Finn L et al. A prospective randomized trial comparing MVAC and CISCA chemotherapy for patients with metastatic urothelial tumors. *J Clin Oncol* 1990 Jun; 8(6): 1050-5.
184. Bamias A, Aravantinos G, Deliveliotis C et al.; Hellenic Cooperative Oncology Group. Docetaxel and cisplatin with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) versus MVAC with G-CSF in advanced urothelial carcinoma: a multicenter, randomized, phase III study from the Hellenic Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2004 Jan; 22(2): 220-8.
185. Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI et al. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. Efficacy and patterns of response and relapse. *Cancer* 1989 Dec; 64(12): 2448-58.
186. Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI et al. M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Urol* 1988 Mar; 139(3): 461-9.
187. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol* 2000 Sep; 18(17): 3068-77.

188. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2005 Jul; 23(21): 4602-8.
189. Gabrilove JL, Jakubowski A, Scher H et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional-cell carcinoma of the urothelium. *N Engl J Med* 1988 Jun; 318(22): 1414-22.
190. Sternberg CN, de Mulder PH, Schornagel JH et al.; European Organization for Research Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. Randomized phase III trial of high-dose-intensity methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin (MVAC) chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor versus classic MVAC in advanced urothelial tract tumors: European Organization for Research and Treatment of Cancer Protocol no. 30924. *J Clin Oncol* 2001 May; 19(10): 2638-46.
191. Sternberg CN, de Mulder P, Schornagel JH et al.; EORTC Genito-Urinary Cancer Group. Seven year update of an EORTC phase III trial of high-dose intensity M-VAC chemotherapy and G-CSF versus classic M-VAC in advanced urothelial tract tumours. *Eur J Cancer* 2006 Jan; 42(1): 50-4.
192. Bellmunt J, von der Maase H, Mead GM et al. Randomized phase III study comparing paclitaxel/cisplatin/gemcitabine and gemcitabine/cisplatin in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer without prior systemic therapy: EORTC Intergroup Study 30987. *J Clin Oncol* 2012 Apr 1; 30(10): 1107-13.

193. Bamias A, Efstathiou E, Moulopoulos LA et al. The outcome of elderly patients with advanced urothelial carcinoma after platinum-based combination chemotherapy. *Ann Oncol* 2005 Feb; 16(2): 307-13.
194. Bellmunt J, Choueiri TK, Fougeray R et al. Prognostic factors in patients with advanced transitional cell carcinoma of the urothelial tract experiencing treatment failure with platinum-containing regimens. *J Clin Oncol* 2010 Apr 10; 28(11): 1850-5.
195. Galsky MD, Mironov S, Iasonos A et al. Phase II trial of pemetrexed as second-line therapy in patients with metastatic urothelial carcinoma. *Invest New Drugs* 2007 Jun; 25(3): 265-70.
196. Culine S, Theodore C, De Santis M et al. A phase II study of vinflunine in bladder cancer patients progressing after first-line platinum-containing regimen. *Br J Cancer* 2006 May; 94(10): 1395-401.
197. Bellmunt J, Théodore C, Demkov T et al. Phase III trial of vinflunine plus best supportive care compared with best supportive care alone after a platinum-containing regimen in patients with advanced transitional cell carcinoma of the urothelial tract. *J Clin Oncol* 2009 Sep 20; 27(27): 4454-61.
198. Stadler WM. Gemcitabine doublets in advanced urothelial cancer. *Semin Oncol* 2002 Feb; 29(1 Suppl.3): 15-19.
199. Hussain M, Vaishampayan U, Du W et al. Combination paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine is an active treatment for advanced urothelial cancer. *J Clin Oncol* 2001 May; 19(9): 2527-33.
200. Herr HW, Donat SM, Bajorin DF. Post-chemotherapy surgery in patients with unresectable or regionally metastatic bladder cancer. *J Urol* 2001 Mar; 165(3): 811-814.

201. Sweeney P, Millikan R, Donat M et al. Is there a therapeutic role for post-chemotherapy retroperitoneal lymph node dissection in metastatic transitional cell carcinoma of the bladder? *J Urol* 2003 Jun; 169(6): 2113-7.
202. Siefker-Radtke AO, Walsh GL, Pisters LL et al. Is there a role for surgery in the management of metastatic urothelial cancer? The M.D. Anderson experience. *J Urol* 2004 Jan; 171(1): 145-8.
203. Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 2001 Jun; 27(3): 165-76.
204. Sternberg CN, Vogelzang NJ. Gemcitabine, paclitaxel, pemetrexed and other newer agents in urothelial and kidney cancers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003 Jun; 46(Suppl): S105-S15.
205. Meluch AA, Greco FA, Burris HA 3rd et al. Paclitaxel and gemcitabine chemotherapy for advanced transitional-cell carcinoma of the urothelial tract: a phase II trial of the Minnie pearl cancer research network. *J Clin Oncol* 2001 Jun; 19(12): 3018-24.
206. Kaufman DS, Carducci MA, Kuzel T et al. Gemcitabine (G) and paclitaxel (P) every two weeks (GP2w): a completed multicenter phase II trial in locally advanced or metastatic urothelial cancer (UC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: abstr 767.
207. Culine S, Theodore C, De Santis M et al. A phase II study of vinflunine in bladder cancer patients progressing after first-line platinum-containing regimen. *Br J Cancer* 2006 May; 94(10): 1395-1401.
208. Bellmunt J, Théodore C, Demkov T et al. Phase III trial of vinflunine plus best supportive care compared with best supportive care alone after a platinum-containing regimen in patients with

- advanced transitional cell carcinoma of the urothelial tract. *J Clin Oncol* 2009 Sep 20; 27(27): 4454-4461.
209. Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 2001 Jun; 27(3):165-76.
210. Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ et al. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: recommendations of an international expert panel. *Ann Oncol* 2008 Mar; 19(3): 420-32.
211. Henry DH, Costa L, Goldwasser F et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2011 Mar; 29(9): 1125-32.
212. Weiss C, Wolze C, Engehausen DG et al. Radiochemotherapy after transurethral resection for high-risk T1 bladder cancer: an alternative to intravesical therapy or early cystectomy? *J Clin Oncol* 2006 May; 24(15): 2318-2324.
213. Rödel C, Grabenbauer GG, Kühn R et al. Combined-modality treatment and selective organ preservation in invasive bladder cancer: long-term results. *J Clin Oncol* 2002 Jul; 20(14): 3061-71.
214. Krause FS, Walter B, Ott OJ et al. 15-year survival rates after transurethral resection and radiochemotherapy or radiation in bladder cancer treatment. *Anticancer Res* 2011 Mar; 31(3): 985-90.
215. Zapatero A, Martin de Vidales C, Arellano R et al. Updated results of bladder-sparing trimodality approach for invasive bladder cancer. *Urol Oncol* 2010 Jul-Aug; 28(4): 368-74.
216. Maarouf AM, Khalil S, Salem EA et al. Bladder preservation multimodality therapy as an alternative to radical cystectomy for

- treatment of muscle invasive bladder cancer. *BJU Int* 2011 May; 107(10): 1605-10.
217. Villavicencio H, Rodriguez Faba O, Palou J et al. Bladder preservation strategy based on combined therapy in patients with muscle-invasive bladder cancer: management and results at long-term followup. *Urol Int* 2010; 85(3): 281-286.
218. Aboziada MA, Hamza HM, Abdraham AM. Initial results of bladder preserving approach by chemoradiotherapy in patients with muscle invading transitional cell carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst* 2009 Jun; 21(2): 167-174.
219. Gilmore TD. NF-kappa B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell* 1990 Sep 7; 62(5): 841-843.
220. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994; 78: 773-785.
221. Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 2006 Oct 30; 25(51): 6831-6843.
222. Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature* 1998; 391: 410-413.
223. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004 Sep 15; 18(18): 2195-2224.
224. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 759-763.
225. Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 2006 Oct 30; 25(51): 6685-6705.

226. Ganchi PA, Sun SC, Greene WC, Ballard DW. I kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding. *Mol Biol Cell*. 1992 Dec; 3(12): 1339-1352.
227. Chen LF, Mu Y, Greene WC. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-κB. *EMBO J*. 2002; 21: 6539-6548.
228. Gao Z, Chiao P, Zhang X, Zhang X, Lazar MA, Seto E, Young HA, Ye J. Coactivators and corepressors of NF-kappaB in IkappaB alpha gene promoter. *J Biol Chem*. 2005 Jun 3; 280(22): 21091-21098.
229. Demartino GN, Gillette TG. Proteasomes: machines for all reasons. *Cell*. 2007 May 18; 129(4): 659-662.
230. Vlachostergios PJ, Patrikidou A, Daliani DD, Papandreou CN. The ubiquitin-proteasome system in cancer, a major player in DNA repair. Part 1: post-translational regulation. *J Cell Mol Med*. 2009 Sep; 13(9B): 3006-3018.
231. Vlachostergios PJ, Patrikidou A, Daliani DD, Papandreou CN. The ubiquitin-proteasome system in cancer, a major player in DNA repair. Part 1: post-translational regulation. *J Cell Mol Med*. 2009 Sep; 13(9B): 3019-3031.
232. Pickart CM, Cohen RE. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Mar; 5(3): 177-187.
233. Rechsteiner M, Hill CP. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol*. 2005 Jan; 15(1): 27-33.
234. Drews O, Zong C, Ping P. Exploring proteasome complexes by proteomic approaches. *Proteomics*. 2007 Apr; 7(7): 1047-1058.

235. Papandreou CN, Logothetis CJ. Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Res.* 2004 Aug 1; 64(15): 5036-5043.
236. Jiang XH, Wong BC, Lin MC, Zhu GH, Kung HF, Jiang SH, Yang D, Lam SK. Functional p53 is required for triptolide-induced apoptosis and AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in gastric cancer cells. *Oncogene.* 2001; 20: 8009–8018.
237. Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C. Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci.* 2002 Jul; 27(7): 368-375.
238. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov 29; 1695(1-3): 55-72.
239. Miller J, Gordon C. The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett.* 2005 Jun 13; 579(15): 3224-3230.
240. Mani A, Gelmann EP. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 4776–4789.
241. Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Aug; 6(8): 599-609.
242. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, et al. Proteasome Inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999; 59: 2615–2622.
243. Papandreou CN, Daliani DD, Nix D et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2004 Jun 1; 22(11): 2108-2121.

244. Jung T, Bader N, Grune T. Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Jun 15; 462(2): 231-237.
245. Naujokat C, Fuchs D, Berges C. Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Sep; 1773(9): 1389-1397.
246. Boisvert FM, Lam YW, Lamont D, Lamond AI. A quantitative proteomics analysis of subcellular proteome localization and changes induced by DNA damage. *Mol Cell Proteomics.* 2010 Mar; 9(3): 457-470.
247. Lightcap ES, McCormack TA, Pien CS, Chau V, Adams J, Elliott PJ. Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin Chem.* 2000 May; 46(5): 673-683.
248. Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control.* 2003 Sep-Oct; 10(5): 361-369.
249. Richardson PG, Mitsiades C. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Future Oncol.* 2005 Apr; 1(2): 161-171.
250. Arber DA, Weiss LM. CD10: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 1997; 5: 125-140.
251. McIntosh GG, Lodge AJ, Watson P et al. NCL-CD10-270: a new monoclonal antibody recognizing CD10 in paraffinembedded tissue. *Am J Pathol.* 1999; 154: 77-82.
252. Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood.* 1984; 82: 1052-1070.

253. Shipp MA, Stefano GB, D'Adamio L et al. Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase 24.11. *Nature*. 1990; 347: 394-396.
254. Sumitomo M, Shen R, Walburg M et al. Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest*. 2000; 106: 1399-1407.
255. Murali R, Delprado W. CD10 Immunohistochemical staining in urothelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 371-379.
256. Masaki T. The endothelin family: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000; 35(4 Suppl 2): S3-5.
257. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Feb; 3(2): 110-116.
258. Bagnato A, Rosanò L. The endothelin axis in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(8): 1443-1451.
259. Bagnato A, Spinella F, Rosanò L. The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008 Aug; 86(8): 473-484.
260. Kopetz ES, Nelson JB, Carducci MA. Endothelin-1 as a target for therapeutic intervention in prostate cancer. *Invest New Drugs* 2002; 20(2): 173-182.
261. Salani D, Di Castro V, Nicotra MR et al. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2000; 157: 1537-1547.
262. Bek EL, McMillen MA. Endothelins are angiogenic. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: S135-139.
263. Spinella F, Rosanò L, Di Castro V et al. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 27850.

264. Wülfing P, Diallo R, Kersting C et al. Endothelin-1, Endothelin-A- and Endothelin-B-receptor expression in preinvasive and invasive breast disease. *Oncol Rep* 2004; 11: 791.
265. Grant ES, Brown T, Roach A et al. In vitro expression of endothelin-1 (ET-1) and the ETA and ETB ET receptors by the prostatic epithelium and stroma. *J ClinEndocrinol Metab* 1997; 82(2): 508-513.
266. Wülfing C, Eltze E, Piechota Hj et al. Expression of endothelin-1 and endothelin-A and -B receptors in invasive bladder cancer. *Oncol Reports* 2005; 13: 223–228.
267. Bours V, Dejardin E, Goujon-Letawe F, Merville MP, Castronovo V. The NF- κ B transcription factor and cancer: high expression of NF- κ B and I κ B-related proteins in tumour cell lines. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 145–149.
268. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; 25(51): 6680–6684.
269. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li AW. NF κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 301–310.
270. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Sledge GW. Constitutive activation of NF- κ B during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3629–3639.
271. Pryor JP. Factors influencing the survival of patients with transitional cell tumours of the urinary bladder. *Br J Urol* 1973; 45: 586–591.
272. Visconti R, Cerutti J, Battista S, Fedele M, Trapasso F, Zeki K, Miano MP, Nigris F, Casalino L, Curcio F, Santoro M, Fusco A. Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma

- cell lines requires NF- κ B p65 protein expression. *Oncogene* 1997; 15: 1987–1994.
273. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor- κ B/RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999; 5:119–127.
274. Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, Moldawer LL, Copeland EM 3rd, Mackay S. Nuclear factor- κ B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* 2001; 2: 363–369.
275. Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, Yao T, Tsuneyoshi M, Noshiro H, Nakamura K, Yamanaka T, Uchiyama A, Tanaka M, Katano M. Nuclear factor- κ B p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res* 2001; 12: 4136–4142.
276. Shukla S, MacLennan GT, Fu P, Patel J, Marengo SR, Resnick MI, Gupta S. Nuclear factor- κ B/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia* 2004; 6(4): 390–400.
277. Lessard L, Mes-Masson AM, Lamarre L, Wall L, Lattouf JB, Saad F. NF- κ B nuclear localization and its prognostic significance in prostate cancer. *BJU Int* 2003; 91: 417–420.
278. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999; 18(49): 6853–6866.
279. Xie DH, Tang XD, Xia SJ, Tan JM, Wang XH, Cai Y. Expression of NF- κ B in human bladder cancer and its clinical significance. *Ai Zheng* 2002; 21(6): 663–667.
280. Levidou G, Saetta AA, Korkolopoulou P, Papanastasiou P, Gioti K, Pavlopoulos P, Diamantopoulou K, Thomas-Tsagli E, Xiromeritis K, Patsouris E. Clinical significance of nuclear factor (NF)- κ B

- levels in urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Virchows Arch.* 2008 Mar; 452(3): 295-304.
281. Levidou G, Korkolopoulou P, Nikiteas N, Tzanakis N, Thymara I, Saetta AA et al. Expression of nuclear factor kappaB in human gastric carcinoma: relationship with IkappaBa and prognostic significance. *Virchows Arch.* 2007; 450(5): 519–527.
282. Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* 2002; 115: 141–151.
283. Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD. Constitutive activation of IκB kinase α and NF-κB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* 1999; 18: 7389–7394.
284. Suh J, Payvandi F, Edelstein LC, Amenta PS, Zong WX, Gelinas C, Rabson AB. Mechanisms of constitutive NFκappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate* 2002; 52 (3): 183–200.
285. Iwaya K, Ogawa H, Izumi M, Kuroda M, Mukai K. Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. *Virchows Arch* 2002; 440: 589-593.
286. Basset P, Wolf C, Rouyer N, Bellocq JP, Rio MC, Chambon P. Stromelysin-3 in stromal tissue as a control factor in breast cancer behavior. *Cancer* 1994; 74: 1045-1049.
287. Talvensaaari-Mattila A, Pääkkö P, Höyhtyä M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 1153-1162.

288. Bahadir B, Behzatoglu K, Bektas S, Bozkurt ER, Ozdamar SO. CD10 expression in urothelial carcinoma of the bladder. *Diagn Pathol*. 2009 Nov 16; 4: 38.
289. Cheng L, Neumann RM, Nehra A, Spotts BE, Weaver AL, Bostwick DG. Cancer heterogeneity and its biologic implications in the grading of urothelial carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 1663-1670.
290. Lee R, Droller MJ. The natural history of bladder cancer: implications for therapy. *Urol Clin N Am* 2000; 27: 1-13.
291. Cheng L, Cheville JC, Neumann RM, Bostwick DG. Natural history of urothelial dysplasia of the bladder. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 443-447.
292. Murali R, Delprado W. CD10 immunohistochemical staining in urothelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 371-379.
293. Bai M, Agnantis NJ, Skyrilas A, Tsanou E, Kamina S, Galani V, Kanavaros P. Increased expression of the Bcl6 and CD10 proteins is associated with increased apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. *Mod Pathol* 2003; 16: 471-480.
294. Morabito F, Mangiola M, Rapezzi D, Zupo S, Oliva BM, Ferraris AM, Spriano M, Rossi E, Stelitano C, Callea V, Cutrona G, Ferrarini M. Expression of CD10 by B-chronic lymphocytic leukemia cells undergoing apoptosis in vivo and in vitro. *Haematologica* 2003; 88: 864-873.
295. Cutrona G, Leanza N, Ulivi M, Melioli G, Burgio VL, Mazzarello G, Gabutti G, Roncella S, Ferrarini M. Expression of CD10 by human T cells that undergo apoptosis both in vitro and in vivo. *Blood* 1999; 94: 3067-3076.
296. Di Maria GU, Bellofiore S, Geppetti P. Regulation of airway neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. *Eur Respir J* 1998; 12: 1454-1462.

297. Chu P, Arber DA. Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma. *J Clin Pathol* 2000; 113: 374-382.
298. Chu PG, Arber DA, Weiss LM, Chang KL. Utility of CD10 in distinguishing between endometrial stromal sarcoma and uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical comparison of 34 cases. *Mod Pathol* 2001; 14: 465-471.
299. McCluggage WG, Sumathi VP, Maxwell P. CD10 is a sensitive and diagnostically useful immunohistochemical marker of normal endometrial stroma and of endometrial stromal neoplasms. *Histopathology* 2001; 39: 273-278.
300. Toki T, Shimizu M, Takagi Y, Ashida T, Konishi I. CD10 is a marker for normal and neoplastic endometrial stromal cells. *Int J Gynecol Pathol* 2002; 21: 41-47.
301. Notohara K, Hamazaki S, Tsukayama C, Nakamoto S, Kawabata K, Mizobuchi K, Sakamoto K, Okada S. Solidpseudopapillary tumor of the pancreas: immunohistochemical localization of neuroendocrine markers and CD10. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 1361-1371.
302. Ordi J, Romagosa C, Tavassoli FA, Nogales F, Palacin A, Condom E, Torne A, Cardesa A. CD10 expression in epithelial tissues and tumors of the gynecologic tract: a useful marker in the diagnosis of mesonephric, trophoblastic, and clear cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 178-186.
303. Cameron RI, Ashe P, O'Rourke DM, Foster H, McCluggage WG. A panel of immunohistochemical stains assists in the distinction between ovarian and renal clear cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22: 272-276.

304. Sunday ME, Hua J, Torday JS, Reyes B, Shipp MA. CD10/neutral endopeptidase 24.11 in developing human fetal lung. Patterns of expression and modulation of peptide-mediated proliferation. *J Clin Invest* 1992; 90: 2517-2525.
305. Cohen AJ, Bunn PA, Franklin W, Magill-Solc C, Hartmann C, Helfrich B, Gilman L, Folkvord J, Helm K, Miller YE. Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux. *Cancer Res* 1996; 56: 831-839.
306. Ogawa H, Iwaya K, Izumi M, Kuroda M, Serizawa H, Koyanagi Y, Mukai K. Expression of CD10 by stromal cells during colorectal tumor development. *Hum Pathol* 2002; 33: 806-811.
307. Yao T, Takata M, Tustsumi S, Nishiyama K, Taguchi K, Nagai E, Tsuneyoshi M. Phenotypic expression of gastrointestinal differentiation markers in colorectal adenocarcinomas with liver metastasis. *Pathology* 2002; 34: 556-560.
308. Sumitomo M, Shen R, Walburg M, Dai J, Geng Y, Navarro D, Boileau G, Papandreou CN, Giancotti FG, Knudsen B, Nanus DM. Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* 2000; 106: 1399-1407.
309. Dai J, Shen R, Sumitomo M, Goldberg JS, Geng Y, Navarro D, Xu S, Koutcher JA, Garzotto M, Powell CT, Nanus DM. Tumor suppressive effects of neutral endopeptidase in androgen-independent prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1370-1377.
310. Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP, Nanus DM. Neutral endopeptidase 24.11 loss

- in metastatic human prostate cancer contributes to androgenindependent progression. *Nat Med* 1998; 4: 50-57.
311. Kanitakis J, Narvaez D, Claudy A. Differential expression of the CD10 antigen (neutral endopeptidase) in primary versus metastatic malignant melanomas of the skin. *Melanoma Res* 2002; 12: 241-244.
312. Carrel S, Zografos L, Schreyer M, Rimoldi D. Expression of CALLA/CD10 on human melanoma cells. *Melanoma Res* 1993; 3: 319-323.
313. Bilalovic N, Sandstad B, Golouh R, Nesland JM, Selak I, Torlakovic EE. CD10 protein expression in tumor and stromal cells of malignant melanoma is associated with tumor progression. *Modern Pathology* 2004; 17: 1251-1258.
314. Terauchi M, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Mizutani S, Kikkawa F. Anti-progressive effect of neutral endopeptidase 24.11 (NEP/CD10) on cervical carcinoma in vitro and in vivo. *Oncology*. 2005; 69: 52-62.
315. Tokuhara T, Adachi M, Hashida H, Ishida H, Taki T, Higashiyama M et al. Neutral endopeptidase/CD10 and aminopeptidase N/CD13 gene expression as a prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001; 49: 489-496.
316. Xie L, Moroi Y, Tsuji G, Liu M, Hayashida S, Takahara M et al. CD10-bearing fibroblast inhibits matrigel invasive potency of interleukin-1alpha-producing squamous cell carcinoma by diminishing substance P levels in the tumor microenvironment. *Cancer Sci*. 2010; 101: 2570-2578.
317. Jang TJ. CD10 is again expressed at a certain stage during the neoplastic process of bladder transitional cell carcinomas. *Cancer Res Treat*. 2012; 44(4): 262-266.

318. Koiso K, Akaza H, Ohtani M, Miyanaga N, Aoyagi K. A new tumor marker for bladder cancer. *Int J Urol* 1994; 1: 33-36.
319. McIntosh GG, Lodge AJ, Watson P, Hall AG, Wood K, Anderson JJ, Angus B, Horne CH, Milton ID. NCL-CD10-270: a new monoclonal antibody recognizing CD10 in parafin-embedded tissue. *Am J Pathol* 1999; 154: 77-82.
320. Bircan S, Candir O, Kapucuoglu N, Serel TA, Ciris M, Karahan N. CD10 expression in urothelial bladder carcinomas: A pilot study. *Urol Int* 2006; 77: 107-113.
321. Abdou AG. CD10 expression in tumour and stromal cells of bladder carcinoma: an association with bilharziasis. *APMIS* 2007; 115: 1206-1218.
322. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411–415.
323. Wülfing C, Eltze E, Yamini J, Wülfing P, Bierer S, Böcker W, Hertle L, Semjonow A, Sievert KD. Expression of the endothelin axis in bladder cancer: Relationship to clinicopathologic parameters and long-term survival. *Eur Urol.* 2005; 47: 593-600.
324. Ali H, Dashwood M, Dawas K, Loizidou M, Savage F, Taylor I. Endothelin receptor expression in colorectal cancer. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: S69–71.
325. Wu-Wong JR, Chiou WJ, Dickinson R, Opgenorth TJ. Endothelin attenuates apoptosis in human smooth muscle cells. *Biochem J* 1997; 328: 733–737.
326. Bagnato A, Spinella F. Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 44–50.

327. Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosano L, Tecce R, Venuti A, et al. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2000; 157: 1537–1547.
328. Bek EL, McMillen MA. Endothelins are angiogenic. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: S135–139.
329. Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1 α in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 27850.
330. Wülfing P, Diallo R, Kersting C, Wülfing C, Poremba C, Greb RR, et al. Endothelin-1, Endothelin-A- and Endothelin-B-receptor expression in preinvasive and invasive breast disease. *Oncol Rep* 2004; 11: 791.
331. Saenz de Tejada I, Mueller JD, de Las Morenas A, Machado M, Moreland RB, Krane RJ, Wolfe HJ, Traish AM. Endothelin in the urinary bladder. I. Synthesis of endothelin-1 by epithelia, muscle and fibroblasts suggests autocrine and paracrine cellular regulation. *J Urol*. Oct 1992; 148(4): 1290-1298.
332. Obara K, Walden PD, Hatano A, Tomita Y, Takahashi K, Lepor H. Expression of the ET(A) and ET(B) endothelin receptor subtype mRNA in human detrusor cultured smooth muscle cells. *Urol Int*. 2000; 65(2): 68-72.
333. Sullivan ME, Mumtaz FH, Khan MA, Dashwood MR, Thompson CS, Mikhailidis DP, Morgan RJ. Endothelins in the urinary tract. *BJU Int*. Jul 2000; 86(1): 97-106.
334. Wülfing C, Eltze E, Piechota H, Abol-Enein H, Wülfing P, Bode ME, Hertle L, Sievert KD. Expression of endothelin-1 and endothelin-A and -B receptors in invasive bladder cancer. *Oncol Rep*. Feb 2005; 13(2): 223-228.

335. Herrmann E, Bögemann M, Bierer S, Eltze E, Hertle L, Wülfing C. The endothelin axis in urologic tumors: mechanisms of tumor biology and therapeutic implications. *Expert Rev Anticancer Ther.* Jan 2006; 6(1):73-81.
336. Wülfing C, Tiemann A, Persigehl T et al. In vivo activity of ABT-627, a selective endothelin-A-receptor antagonist, in bladder cancer xenograft tumors. *Proc. Am. Soc. Cancer Res.* 2005; 3039.
337. Herrmann E, Bögemann M, Bierer S, Eltze E, Toma MI, Köpke T, Hertle L, Wülfing C. The role of the endothelin axis and microvessel density in bladder cancer – correlation with tumor angiogenesis and clinical prognosis. *Oncol Rep.* Jul 2007; 18(1): 133-138.
338. Eltze E, Wild PJ, Wülfing C, Zwarthoff EC, Burger M, Stöhr R, Korsching E, Hartmann A. Expression of the endothelin axis in noninvasive and superficially invasive bladder cancer: relation to clinicopathologic and molecular prognostic parameters. *Eur Urol.* Nov 2009; 56(5): 837-845.
339. Said N, Smith S, Sanchez-Carbayo M, Theodorescu D. Tumor endothelin-1 enhances metastatic colonization of the lung in mouse xenograft models of bladder cancer. *J Clin Invest.* Jan 2011; 121(1): 132-147.

