

# Izraženost imunskih liganada TIGIT, LAG-3 i PD-L1 u molekularnim podtipovima mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura

---

**Knežević, Matej**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:941494>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Matej Knežević**

**Izraženost imunskih liganada  
TIGIT, LAG-3 i PD-L1 u molekularnim  
podtipovima mišićno-invazivnog  
karcinoma mokraćnog mjehura**

**DISERTACIJA**



**ZAGREB, 2024.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Matej Knežević**

**Izraženost imunskih liganada  
TIGIT, LAG-3 i PD-L1 u molekularnim  
podtipovima mišićno-invazivnog  
karcinoma mokraćnog mjehura**

**DISERTACIJA**

**ZAGREB, 2024.**

Doktorski rad je izrađen u Klinici za urologiju i Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelji rada: doc.dr.sc. Monika Ulamec i izv.prof.dr.sc. Boris Ružić.

---

Svojim mentorima zahvaljujem na vodstvu i podršci koju su mi pružali tijekom planiranja i izrade ove disertacije.

Velika hvala izv.prof.dr.sc. Milanu Miloševiću na tehničkoj potpori.

Zahvaljujem i svim djelatnicima Klinike za urologiju i Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ koji su mi pomogli u izradi ove disertacije.

*Ovu disertaciju posvećujem svojoj obitelji, supruzi Nikolini, djeci Katji, Loti i Boni, zbog čije je podrške, razumijevanja i ljubavi ona bila izvediva.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA	1
1.2. ETIOLOŠKI FAKTORI KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA	4
1.3. SUSTAV KLASIFIKACIJE I PROCJENA STADIJA	7
1.4. DIJAGNOSTIKA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA	8
1.4.1. Klinička prezentacija i status	8
1.4.2. Primarna dijagnostička obrada	9
1.4.3. Slikovna procjena proširenosti bolesti	12
1.5. PATOLOGIJA I PATOHISTOLOGIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA	16
1.5.1. Anatomija mokraćnog mjehura	18
1.5.2. Procjena gradusa	19
1.5.3. Proširenost bolesti	19
1.6. MOLEKULARNA BIOLOGIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA	21
1.6.1. Molekularna klasifikacija urotelnih karcinoma	22
1.6.1.1. Ne-mišićno invazivni karcinom mokraćnog mjehura	22
1.6.1.2. Mišićno-invazivni karcinom mokraćnog mjehura	23
1.7. PROGNOСТИČKI I PREDIKTIVNI MARKERI	26
1.7.1. Klinički i patohistološki prognostički markeri	26
1.7.2. Prediktivni molekularni markeri	27
1.7.3. Potencijalni molekularni markeri	29
1.8. LIJEČENJE KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA	31
1.8.1. Intravezikalna terapija	31
1.8.2. Kirurško liječenje	32
1.8.2.1. Transuretralna resekcija tumora mokraćnog mjehura	32
1.8.2.2. Radikalna cistektomija	34
1.8.3. Kemoterapija	36
1.8.3.1. Neoadjuvantna kemoterapija	36
1.8.3.2. Adjuvantna kemoterapija	37
1.8.3.3. Kemoterapija u metastatskoj bolesti	38

1.8.4. Imunoterapija	38
1.8.4.1. Neoadjuvantna i adjuvantna imunoterapija	39
1.8.4.2. Imunoterapija kod metastatske bolesti	39
1.8.5. Radioterapija	40
1.8.6. Trimodalno liječenje	40
<b>2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA</b>	<b>42</b>
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>43</b>
3.1. OPĆI CILJ	43
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI	43
<b>4. MATERIJALI I METODE</b>	<b>44</b>
4.1. ISPITANICI	44
4.2. METODE	45
4.3. STATISTIČKA ANALIZA	48
<b>5. REZULTATI</b>	<b>49</b>
5.1. PD-L1	55
5.2. LAG-3	57
5.3. TIGIT	62
5.4. KVANTITATIVNE I KORELACIJSKE ANALIZE	67
<b>6. RASPRAVA</b>	<b>75</b>
<b>7. ZAKLJUČCI</b>	<b>86</b>
<b>8. SAŽETAK</b>	<b>88</b>
<b>9. SUMMARY</b>	<b>90</b>
<b>10. LITERATURA</b>	<b>91</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS</b>	<b>113</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>ADC</b>	(engl. <i>apparent diffusion coefficient</i> ) – manifestni koeficijent difuzije
<b>ASR</b>	(engl. <i>age standardised rate</i> ) – dobno-standardizirana stopa
<b>AUC</b>	(engl. <i>atypical urothelial cells</i> ) - atipične urotelne stanice
<b>ATM</b>	(engl. <i>ataxia teleangiectasia mutated</i> ) – gen mutacije ataksije teleangiektazije
<b>APOBEC</b>	(engl. <i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide</i> ) – apolipoprotein B enzim, katalitički polipeptid, koji popravljaju glasničku ribonukleinsku kiselinu
<b>BC</b>	(engl. <i>bladder cancer</i> ) – karcinom mokraćnog mjehura
<b>BCG</b>	Bacillus Calmete-Guerin
<b>CEUS</b>	(eng. <i>contrast-enhanced ultrasound</i> ) – kontrastom unaprijeđeni ultrazvuk
<b>CIS</b>	(engl. <i>carcinoma in situ</i> ) – karcinom in situ
<b>CISCA</b>	cisplatina, ciklofosfamid i adriamicin
<b>CK</b>	(engl. <i>cytokeratin</i> ) – citokeratin
<b>CPS</b>	(engl. <i>combined positive score</i> ) – kombinirani pozitivni skor
<b>CSM</b>	(engl. <i>cancer specific mortality</i> ) - mortalitet povezan s karcinomom
<b>CSS</b>	(engl. <i>cancer specific survival</i> ) – preživljenje povezano s karcinomom
<b>CT</b>	(engl. <i>computed tomography</i> ) - kompjuterizirana tomografija
<b>CTLA-4</b>	(engl. <i>cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4</i> ) - citotoksični T limfocitno-povezani protein 4

<b>cTNM</b>	(engl. <i>clinical tumor, node, metastases</i> ) – klinička TNM klasifikacija (tumor, limfni čvorovi, metastaze)
<b>DCE-MRI</b>	(engl. <i>dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging</i> ) – dinamička kontrastom – pojačana magnetska rezonancija
<b>ddMVAC</b>	(engl. dose-dense metotrexate, vinblastine, doxorubicin, cisplatin), dozno-specifična kemoterapija uz primjenu metotreksata, vinblastina, doksorubicina i cisplatine
<b>DNA</b>	(engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> ) – deoksiribonukleinska kiselina
<b>DW-MRI</b>	(engl. <i>diffusion-weighted magnetic resonance imaging</i> ) – difuzijski ponedirirana magnetska rezonancija
<b>EAU</b>	(engl. <i>European Association of Urolog</i> ) – Europsko urološko udruženje
<b>ECOG</b>	(eng. <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> ) – Istočna onkološka kooperativna skupina
<b>EGFR</b>	(engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> ) – receptor epidermalnog faktora rasta
<b>ELF3</b>	(engl. <i>epithelial cell-specific transcription factor</i> ) – epitelijalni za stanicu specifični transkripcijski faktor
<b>ERRC2</b>	(engl. <i>excision repair cross-complementation group 2</i> ) - skupina gena za popravak križne komplementacije 2
<b>FDG</b>	(engl. <i>fluorodeoxyglucose</i> ) - fluordeoksiglukoza
<b>FFPE</b>	(engl. <i>formalin fixed paraffin-embedded</i> ) – umetnut u parafin fiksiran formalinom
<b>FGFR3</b>	(engl. <i>fibroblast growth factor receptor 3</i> ) – receptor faktora rasta fibroblasta 3



<b>GATA3</b>	(engl. <i>transcription factor that recognizes G-A-T-A nucleotide sequences</i> ) - transkripcijski faktor koji prepoznaje G-A-T-A nukleotidne sekvence
<b>HE</b>	hemalaun – eozin
<b>HGUC</b>	(engl. <i>high-grade UC</i> ) - urotelni karcinom viskog gradusa
<b>IC</b>	(engl. <i>immune cell</i> )
<b>ICI</b>	(engl. <i>immune checkpoint inhibition</i> ) – inhibicija imunskih nadzornih točaka
<b>ICP</b>	(engl. <i>immune check-point proteins</i> ) – proteini imunskih nadzornih točaka
<b>IgSF</b>	(engl. <i>immunoglobulin superfamily</i> ) – imunoglobulinska superobitelj
<b>IL-2</b>	Interleukin 2
<b>KDM6A</b>	(engl. <i>lysine demethylase 6A</i> ) – gen lizinske demetilaze 6A
<b>KK</b>	korelacijski koeficijent
<b>KOPB</b>	kronična opstruktivna plućna bolest
<b>KT</b>	Kemoterapija
<b>LAG-3</b>	(engl. <i>lymphocyte activation gene 3</i> ) – limfocitni aktivacijski gen 3
<b>LGUC</b>	(engl. <i>low-grade UC</i> ) - urotelni karcinom niskog gradusa
<b>LN</b>	(engl. <i>lymph node</i> ) – limfni čvor
<b>LSAB</b>	(engl. <i>labeled streptavidin – biotin</i> ) – markirani streptavidin – biotin
<b>MIBC</b>	(engl. <i>muscle invasive bladder cancer</i> ) - mišićno invazivni karcinom mokraćnog mjehura
<b>MLL2</b>	(engl. <i>mixed-lineage leukemia 2</i> ) – gen miješane leukemijske loze 2

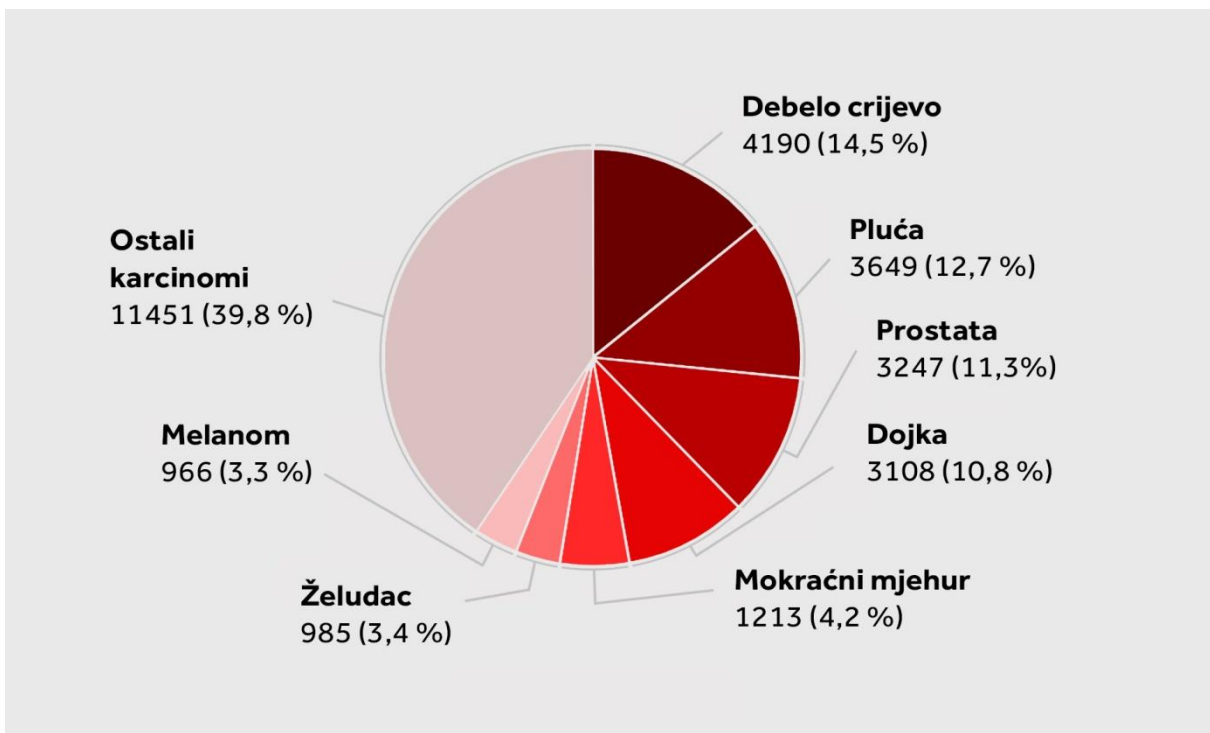
<b>mpMRI</b>	(engl. <i>multiparametric magnetic resonance imaging</i> ) - multiparametrijska magnetska rezonanca
<b>MRI</b>	(engl. <i>magnetic resonance imaging</i> ) - magnetska rezonancija
<b>mRNA</b>	(engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> ) – glasnička ribonukleinska kiselina
<b>MSIP</b>	(engl. <i>Microwave Streptavidin ImmunoPeroxidase</i> ) – Mikrovalna streptovidin imunoperoksidaza
<b>MVAC</b>	Metotreksat, vinblastin, doksorubicin, cisplatina
<b>NAC</b>	(engl. <i>neoadjuvant chemotherapy</i> ) – neoadjuvantna kemoterapija
<b>NK</b>	(engl. <i>natural killerI</i> ) – stanice prirodne ubojice
<b>NMIBC</b>	(engl. <i>non-muscle invasive bladder cancer</i> ) ne-mišićno invazivni karicnom mokraćnog mjehura
<b>OS</b>	(engl. <i>overall survival</i> ) sveukupno preživljenje
<b>PD-1</b>	(engl. <i>programmed cell death protein -1</i> ) - protein programirane stanične smrti – 1
<b>PD-L1</b>	(engl. <i>programmed death ligand -1</i> ) - ligand programirane stanične smrti – 1
<b>PET</b>	pozitronska emisijska tomografija
<b>pTNM</b>	(engl. <i>pathological tumor, node, metastases</i> ) – patološka TNM klasifikacija (tumor, limfni čvorovi, metastaze)
<b>QoL</b>	(engl. <i>quality of life</i> ) – kvaliteta života
<b>RB1</b>	(engl. <i>retinoblastoma – associated protein 1</i> ) – protein povezan s retinoblastomom - 1
<b>RC</b>	radikalna cistektomija

<b>RCC</b>	(engl. <i>renal cell carcinoma</i> ) – karcinom bubrega
<b>RT</b>	Radioterapija
<b>TCGA</b>	(engl. <i>The Cancer Genome Atlas</i> ) – Genomski atlas karcinoma
<b>TERT</b>	(engl. <i>telomerase reverse transcriptase</i> ) – telomeraza reverzna transkriptaza
<b>TIGIT</b>	(engl. <i>T-cell immunoglobulin with ITIM domain</i> ) – T- stanični imunoglobulin s ITIM domenom
<b>TIM-3</b>	(engl. <i>T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-3</i> ) – T-stanična imunoglobulin domena i mucin domena 3
<b>TMB</b>	(engl. <i>tumor mutation burden</i> ) - tumorsko mutacijsko opterećenje
<b>TMT</b>	(engl. <i>trimodal treatment</i> ) – trimodalno liječenje
<b>TNM</b>	(engl. <i>tumor, node, metastases</i> ) - TNM klasifikacija (tumor, limfni čvorovi, metastaze)
<b>TP53</b>	Tumorski protein 53
<b>TPS</b>	(engl. <i>tumor proportion score</i> )
<b>TURBT</b>	(engl. <i>transurethral resection of bladder tumor</i> ) - transuretralna resekcija tumora mokraćnog mjehura
<b>UC</b>	(engl. <i>urothelial carcinoma</i> ) – urotelijalni karcinom
<b>VEGF</b>	(engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> ) – vaskularni endotelijalni faktor rasta
<b>VI-RADS</b>	(engl. <i>vesical imaging – reporting and data system</i> ) – sustav slikovne procjene karcinoma mokraćnog mjehura
<b>WHO</b>	(engl. <i>World Health Organisation</i> ) - Svjetska zdravstvena organizacija

# 1. UVOD

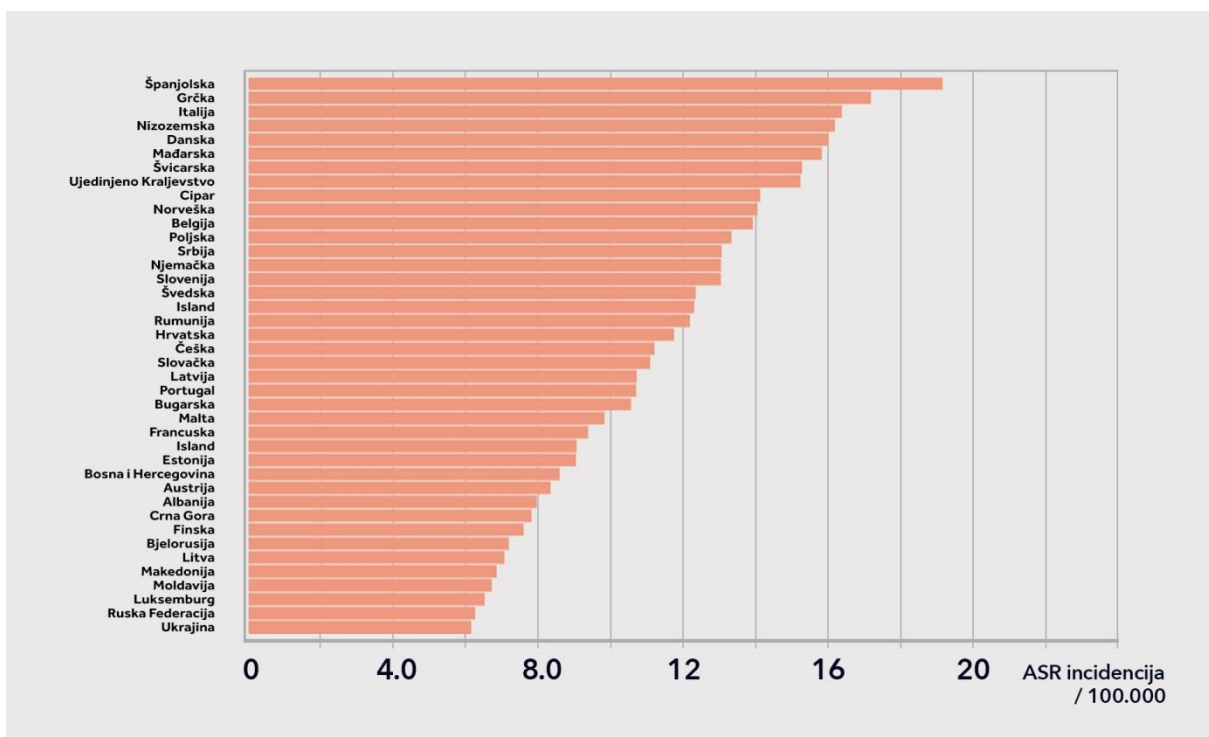
## 1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Karcinom mokraćnog mjehura (engl. *bladder cancer*, BC) čini 3 % svih karcinoma globalno, s većom učestalošću u razvijenim zemljama. BC je po učestalosti na šestom mjestu kod muškaraca, dok je na devetom mjestu kada se uračunaju oba spola. Dobno-standardizirana stopa (engl. *age standardised rate*, ASR) incidencije za 2022. godinu na globalnoj razini je 9,3 u muškaraca i 3,1 u žena na 100.000. U Europi ASR incidencije iznosi 21,1 u muškaraca i 5,0 u žena na 100.000 (1). Zemlje zapadne Europe i Sjeverne Amerike imaju visoku incidenciju, a zemlje istočne Europe i Azije imaju najnižu incidenciju BC (2). Prema posljednjim podacima iz GLOBOCAN baze podataka za 2022. godinu, BC je u Hrvatskoj po broju novootkrivenih slučajeva na petom mjestu s 1213 novih slučajeva (Slika 1) (1).



**Slika 1.** Incidencija karcinoma kod oba spola u Hrvatskoj za 2022. godinu prema podacima iz GLOBOCAN baze (1).

U Hrvatskoj ASR incidencije iznosi 11,7 na 100.000 te je time Hrvatska rangirana kao devetnaesta od 40 europskih zemalja (Slika 2).



**Slika 2.** Dobno-standardizirana stopa (engl. *age standardised rate*, ASR) incidencije karcinoma mokraćnog mjehura u Europi za 2022. godinu, prema podacima iz GLOBOCAN baze (1).

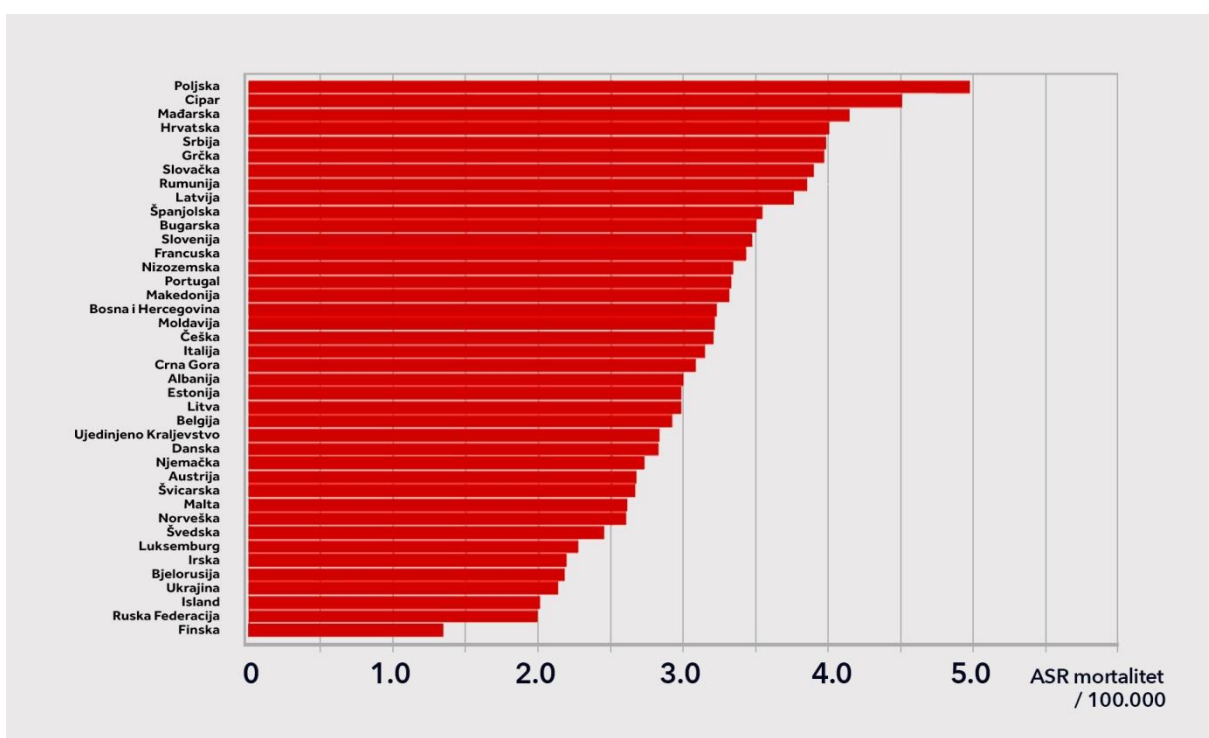
Od BC uglavnom oboljevaju pripadnici starije populacije i čak 75 % pacijenata je starije od 65 godina (3). Medijan dobi pri dijagnozi je 65 godina. Incidencija je veća u muškoj populaciji. Iako među ženskom populacijom postoji niža sveukupna incidencija, žene češće oboljevaju od uznapredovanih oblika BC (4, 5). Većina pacijenata s BC ne umire od osnovne bolesti, ali su izloženi učestalom tumorskom recidiviranju (6).

BC je trinaesti najčešći uzrok smrti od karcinoma u svijetu, dok je na osmom mjestu u Europi. ASR mortaliteta za 2020. godinu globalno je 3,1 u muškaraca i 0,86 u žena na 100.000. U Europi ASR mortaliteta iznosi 5,4 u muškaraca i 1,2 u žena na 100.000. Sveukupna ASR mortaliteta u Hrvatskoj iznosi 4,0 na 100.000 što Hrvatsku svrstava na četvrto mjesto u Europi po stopi

mortaliteta (Slika 3). Prema tim istim podacima u Hrvatskoj je bilo 552 zabilježena smrtna slučaja u 2022. godini uzrokovanih karcinomom mokraćnog mjehura (1).

U razvijenim zemljama sveukupno petogodišnje preživljenje je oko 75 %, a kod metastatske bolesti svega do 5 %. Stopa mortaliteta u zapadnoj Europi pokazuje opadajući trend posljednja dva desetljeća, vjerojatno uslijed smanjenog utjecaja rizičnih faktora (7). Nasuprot tome, u zemljama istočne Europe postoji blagi trend porasta incidencije (8).

Stope incidencije i mortaliteta znatno variraju među pojedinim zemljama i regijama svijeta, što se objašnjava različitostima u izloženosti rizičnim faktorima, dijagnostičkim mogućnostima unutar pojedinog zdravstvenog sustava kao i dostupnosti liječenja. Varijacije su prisutne i zbog razlika u metodologiji studija i prikupljanju podataka.



**Slika 3.** Dobno-standardizirana stopa (engl. *age standardised rate*, ASR) mortaliteta karcinoma mokraćnog mjehura u Europi za 2022. godinu, prema podacima iz GLOBOCAN baze (1).

## 1.2. ETIOLOŠKI FAKTORI KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Uzrok većine slučajeva BC su okolišni faktori. Epitel koji oblaže sluznice mokraćnog sustava (urotel), izložen je potencijalnim karcinogenima koji se izlučuju urinom ili se aktiviraju iz prekursora u urinu. Takav efekt svojevrzne kancerizacije jedna je od hipoteza kojom se objašnjava multifokalnost pri pojavi tumora, što je karakteristika urotelnih karcinoma (engl. *urothelial carcinoma*, UC) (9).

Kao najznačajniji faktor rizika za BC ističe se pušenje. Detektirano je oko 60 poznatih karcinogena koji su prisutni u podlozi pušenja, a uključuju tvari poput aromatskih amina (4-aminobifenila i 2-naftilamina) ujedno izoliranih kao uzročnika u okupacijskim faktorima rizika za BC (10). Usporena hepatička acetilacija, odnosno detoksikacija ovih karcinogena, povećava izloženost urotela i posljedično njegovu neoplastičnu transformaciju (11, 12). Pušenje uzrokuje 50-65 % slučajeva BC među muškarcima i 20-30 % među ženama (13). Incidencija je direktno povezana s trajanjem pušenja, kao i s brojem konzumiranih cigareta na dan. Količinski i vremenski opseg pušenja je u direktnoj vezi i s agresivnošću BC te je kod skupine teških pušača veća vjerojatnost pojave BC visokog gradusa i invazivnih tumora pri inicijalnoj prezentaciji (14, 15). Nedavno je utvrđen dodatni porast rizika za pušače koji se dovodi u vezu s promjenama u sastavu cigareta (16). Početak pušenja u ranijoj dobi vezan je i uz povišen rizik smrti od BC. S druge strane, pri prestanku pušenja dolazi do trenutnog smanjenja rizika od BC, uz redukciju od 40 % u periodu od prve do četvrte godine prestanka pušenja, kao i 60 % nakon 25 godina od prestanka (17). Iako rizik za BC opada s vremenom za prethodne pušače, on i dalje zaostaje trajno povišen u odnosu na nepušače (18). Dodatno, prestanak pušenja reducira stopu recidiviranja tumora. Takozvano pasivno pušenje može povećati rizik za BC, naročito ukoliko se radi o izloženosti od strane jednog partnera tijekom perioda od deset i više godina u okviru domicilnog ili profesionalnog okruženja (19).

Okolišni faktori su drugi najčešći faktor rizika za BC koji uzrokuju 20-25 % svih slučajeva. Odnos između izloženosti karcinogenima u radnom okružju i povišenog rizika zamijećen je još početkom dvadesetog stoljeća tijekom industrijskog napretka. Profesionalni rizik podrazumijeva izloženost aromatskim aminima, policikličkim aromatskim i kloriranim ugljikovodicima, u sklopu zanimanja iz područja industrija guma, boja, lakova, tekstila, kože,

cementa i nafte. Osim rada u industriji s navedenim tvarima, rizik je povišen i u zanimanjima koja podrazumijevaju sekundarnu izloženost, primjerice radom u sektoru transporta (20, 21). Okupacijska izloženost aromatskim aminima znatno povećava rizik kroz dugotrajnu profesionalnu izloženost od 10 i više godina (22).

Ijatrogeni faktori rizika su također značajni za BC. Povećanje stope sekundarnih BC je zamijećeno nakon radioterapije zdjelice, provedene radi ginekoloških karcinoma, karcinoma debelog crijeva i karcinoma prostate (23, 24). Lijekovi poput fenacetina i ciklofosfamida su prepoznati kao rizični faktori za BC (25).

BC je povezan i s upalnim stanjima, poput kronične inflamacije urinarnog trakta, ali i dugotrajne iritacije uslijed trajne urinarne kateterizacije te kronične izloženosti urinarnim kamencima. Parazitarna kronična infekcija mokraćnog mjehura – šistosomijaza, je kritični patogen karcinogeneze u zemljama Afrike i Bliskog istoka (26). Svi navedeni upalni etiološki faktori dominantno povećavaju rizik ne-urotelijalnih karcinoma, posebice planocelularnih BC, za razliku od mnogo češćih UC uslijed drugih rizičnih faktora (27). Smatra se da kronična upala i iritacija aktivira procese koji dovode do metaplastičnih promjena, potom displazije i konačno karcinomske transformacije.

Prisutnost UC u gornjem urotaktu, odnosno kanalnom sustavu bubrega i u mokraćovodu, povećava rizik razvoja UC u mjehuru (28). Mehanizam nastanka ovih oblika BC je tumorskom implantacijom. Upravo zato je kod pacijenata kojima je proveden definitivni tretman za UC gornjeg dijela mokraćnog sustava potrebno redovno praćenje radi rizika od BC. U toj skupini pacijenata su i oni sa prepoznatom nefropatijom aristolohične kiseline. Prethodno poznato kao endemska nefropatija, ovo stanje nosi veći rizik razvoja UC gornjeg urotakta i mokraćnog mjehura (29).

Povezanost metaboličkih faktora i BC i dalje izaziva veliku pažnju. Potvrđen je povećan rizik za BC u pacijenata sa metaboličkim sindromom, dok povezanost šećerne bolesti i BC u istraživanjima pokazuje nekonzistentne rezultate (30). Prehrambeni faktori su široko istraživani u vezi sa BC, no povezanost je također i dalje kontroverzna. Višestruko je istraživani utjecaj povećanog unosa tekućine kao faktora protekcije od BC, mehanizmom potencijalne dilucije karcinogenih tvari u urinu i time redukcije kontakta sa urotelom. Ipak, nedavni rezultati nisu



potvrdili povezanost BC sa hidracijom, kao ni konzumacijom crvenog mesa, povrća i voća (31, 32).

Iako je veća vjerojatnost BC kod muškaraca, kod žena je prisutna češća pojava uznapredovale bolesti i lošija stopa preživljenja (33). Smatra se da je mogući razlog te pojave odgoda u postavljanju dijagnoze, obzirom da diferencijalna dijagnoza tegoba kod žena nerijetko uključuje učestalija stanja nego što je BC. Istraživan je i hormonski utjecaj na BC te je potvrđeno kako je u postmenopauzalnom periodu povećan rizik za BC uslijed smanjene zaštitne uloge estrogena (34).

Postoji rastuća količina dokaza koji potvrđuju obiteljsku povezanost i nasljednu sklonost za BC. U većini epidemioloških studija nađen je mali porast rizika u srodnika pacijenata oboljelih od BC, osobito ukoliko je BC dijagnosticiran prije 60 godina starosti (35). Detektirane su suspektne somatske genetske abnormalnosti i lokusi za BC, neovisno o pušenju kao faktoru rizika (36). U patogenezi BC su prepoznati i brojni onkogeni i tumor-supresorski geni, među kojima se izdvaja TP53 (tumorski protein 53) koji regulira stanični ciklus i čija mutacija je prepoznata u preko polovice BC (37).

### 1.3. SUSTAV KLASIFIKACIJE I PROCJENA STADIJA

Najraširenija metoda procjene stadija proširenosti bolesti (engl. *staging*) je TNM (od engl. *tumor, node, metastases*) klasifikacija (Tablica 1) (38).

**Tablica 1.** TNM klasifikacija karcinoma mokraćnog mjehura (Preuzeto i prilagođeno prema: Bertero L i sur. 2018 (38)).

<b>T - PRIMARNI TUMOR</b>	
Tx	Primarni tumor ne može se procijeniti
T0	Ne postoji dokaz primarnog tumora
Ta	Ne-invazivni papilarni karcinom
Tis	Karcinom in situ
T1	Tumor zahvaća subepitelijalno vezivno tkivo
T2	Tumor zahvaća mišićni sloj
T2a	Tumor zahvaća površinski mišić (unutarnja polovica)
T2b	Tumor zahvaća duboki mišić (vanjska polovica)
T3	Tumor zahvaća perivezikalno tkivo
T3a	Tumor zahvaća perivezikalno tkivo - mikroskopski
T3b	Tumor zahvaća perivezikalno tkivo – makroskopski (ektravezikalna masa)
T4	Tumor zahvaća bilo koju od navedenih struktura: prostatična stroma, sjemeni mjehurići, maternica, vagina, zdjelični zid, trbušni zid
T4a	Tumor zahvaća prostatičnu stromu, sjemene mjehuriće, uterus ili vaginu
T4b	Tumor zahvaća zdjelični ili trbušni zid

<b>N – REGIONALNI LIMFNI ČVOROVI</b>	
Nx	Regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
N0	Bez metastaza u regionalne limfne čvorove
N1	Metastaza u jedan regionalni limfni čvor u zdjelici (hipogastrični, opturatorni, vanjski ilijačni ili presakralni)
N2	Metastaze u više regionalnih limfnih čvorova u zdjelici (hipogastrični, opturatorni, vanjski ilijačni ili presakralni)
N3	Metastaze u zajedničkim ilijačnim limfnim čvorovima

<b>M – UDALJENE METASTAZE</b>	
M0	Bez udaljenih metastaza
M1a	Metastaze u neregionalne limfne čvorove
M1b	Druga sjela udaljenih metastaza

## 1.4. DIJAGNOSTIKA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

BC je bolest koja uključuje površinske tumore, tumore koji invadiraju u mišićni sloj mjehura, kao i metastatsku bolest. Svaki od navedenih dijelova spektra BC možemo razmatrati zasebnim stanjem sa specifičnim simptomima, kliničkim ponašanjem, biologijom tumora, terapijom i prognozom (39).

### 1.4.1. Klinička prezentacija i status

Bezbolna hematurija se smatra karakterističnim simptomom BC. Oko 85 % pacijenata ima makrohematuriju, dok gotovo svi imaju mikrohematuriju (40). Hematurija je najčešće intermitentnog karaktera. BC se može prezentirati iritativnim simptomima donjeg urinarnog trakta poput učestalog mokrenja, dizurije, urgencije, nokturije i inkontinencije, ali i otežanog mokrenja (41). Takve tegobe mogu dovesti do odgođenog dijagnosticiranja BC, obzirom da su iritativne smetnje mokrenja najčešće povezane sa patologijom prostate, urinarnim infekcijama i mokraćnim kamencima. Iritativne smetnje mokrenja češće su vezane uz karcinom *in situ* (engl. *carcinoma in situ*, CIS) kod kojeg dolazi do smanjenja kapaciteta mjehura i njegove pretjerane aktivnosti. Kod uznapredovalih i infiltrativnih tumora moguća je i pojava zdjelične boli (42). Opseg i distribucija boli povezani su sa veličinom i lokacijom primarnog tumora ili metastaza. Lokalna invazivnost tumora se najčešće prezentira suprapubičnom boli. Uznapredovali BC s invazijom mišićnog sloja su učestalo povezani i sa simptomima opstruktivne uropatije uslijed infiltracije mokraćovoda, uz posljedičnu hidronefrozu i bolnost u leđima. Slične smetnje mogu davati i neinvazivni tumori koji su većih dimenzija i mehanički blokiraju drenažu urina na ušću mokraćovoda u mjehur. Bolnost u kostima može sugerirati prisutnost koštanih metastaza. Uz BC, dodatno se mogu javiti i opći simptomi poput umora i gubitka na težini (43, 44).

Urološki status kod sumnje na BC uključuje pregled abdomena, vanjskih genitalija, digitorektalni te kod žena i bimanualni vaginalni pregled, obzirom da je kod lokano uznapredovalih karcinoma moguća palpacija zdjelične mase.

#### 1.4.2. Primarna dijagnostička obrada

Cilj dijagnostičke evaluacije je potvrditi tumor, njegovu lokaciju i opseg bolesti. Analiza urina, uz ultrazvučni pregled urotakta iza kojeg slijedi uretrocistoskopija je standard dijagnostičke prakse.

Analizom urina se detektira mikrohematurija ili makrohematurija. Osim količine eritrocita, u sedimentu urina se mikroskopski može odrediti i njihovo porijeklo. Dismorfični eritrociti sugeriraju glomerularno porijeklo, dok eritrociti urednog izgleda označavaju krvarenje iz urotakta. Važno je napomenuti da urinarni pigmenti vezani za određenu hranu, bakterije i lijekove mogu simulirati hematuriju (45).

Dijagnostička obrada, gotovo bez iznimke, podrazumijeva ultrazvučni pregled cjelokupnog mokraćnog sustava. Mokraćni mjehur se pregledava kada je ispunjen urinom, sa ciljem detekcije abnormalnosti sluznice i intravezikalnih tumorskih tvorbi. Ujedno je potrebno provesti i pregled bubrega, kako bi se isključila prisutnost posljedične opstruktivne uropatije (46).

Neovisno o slikovnoj pretrazi kojom je nađena tumorska tvorba u mjehuru, kao temelj i zlatni standard inicijalne urološke obrade, preporučeno je potom izvesti uretro-cistoskopiju (47). Endoskopski pregled mokraćne cijevi i mokraćnog mjehura se obično izvodi ambulantno u lokalnoj anesteziji rigidnim ili fleksibilnim instrumentom. Rizik infekcije je minimalan obzirom da se pregled izvodi u sterilnim uvjetima. Nužna je detaljna dokumentacija lokalnog nalaza s opisom mjesta, veličine, broja i izgleda tumorskih tvorbi, kao i abnormalnosti sluznice kako bi se pravilno odredila strategija naknadnog operativnog liječenja (48). Izgled tumora može sugerirati i njegovo daljnje ponašanje. Neinvazivni tumori su češće papilarnog izgleda, na uskoj peteljci, dok su invazivni tumori solidni ili nodularni, na širokoj osnovi (49). Navedeni egzofitični tumori koji prominiraju u lumen mjehura u pravilu se lako vizualiziraju. Izazov cistoskopske detekcije može predstavljati CIS koji se najčešće prezentira crvenim i baršunastim arealima u razini sluznice (50). Osjetljivost cistoskopije je oko 73 %, dok je specifičnost svega 51 % (51). Kako bi se unaprijedila prediktivna vrijednost cistoskopije sve se češće koristi fotodinamička metoda fluorescentne cistoskopije. Pri ovoj metodi se intravezikalno aplicira 5-aminolevulonska kiselina koja se selektivno nakuplja u tumorskim stanicama, a odsutna je zdravim stanicama mjehura. Na taj način se pod kontrolom plavog svjetla, s većom točnošću

markira tumorsko područje čime se reducira pojava lažno pozitivnih nalaza konvencionalne cistoskopije, uz povećanje osjetljivosti pretrage za oko 20 % (52, 53). S druge strane, moguća je i pojava lažno pozitivnih nalaza u do 10 % slučajeva, osobito uslijed promjena vezanih uz prethodne resekcije mokraćnog mjehura, intravezikalnu primjenu imunoterapije i kemoterapije (KT) te postupalne promjene (54). Opisana metoda također nosi i zamjetno veći trošak u odnosu na standardnu cistoskopiju.

Citološka analiza urina je neinvazivna dijagnostička metoda koja je koristan pokazatelj maligniteta visokog gradusa i prisutnosti CIS-a. Pozitivan nalaz citologije urina nije isključiv pokazatelj BC, nego sugerira pojavu karcinoma koji je lociran bilo gdje unutar urotelom obloženog urinarnog trakta. Osjetljivost citologije urina za karcinome visokog gradusa je visoka te iznosi čak 84 %, no izrazito je niska za one niskog gradusa i iznosi do 16 % (55, 56). Tumori niskog gradusa nisu skloni tako obilnoj urinskoj ekfolijaciji stanica, poput onih visokog gradusa, čime su teže detektibilni u citološkoj analizi. Ukupna osjetljivost citologije urina je oko 50-60 % (57). Bitno je naglasiti kako negativan nalaz citologije ne može u cijelosti isključiti prisutnost karcinoma. Također, moguća je pojava i lažno negativnih nalaza, koji su prisutni u oko 20 % karcinoma visokog gradusa (58). Interpretacija nalaza zahtjeva veliko iskustvo citologa, unatoč kojem postoje znatna odstupanja u rezultatima nalaza uslijed subjektivne interpretacije morfoloških karakteristika (59). Poteškoće u interpretaciji nalaza i ovdje mogu stvoriti prisutnost urinarne infekcije, urinarni kamenci, prethodna intravezikalna aplikacija lijekova i stanje nakon radijacije zdjelice. Da bi se uniformirala interpretacija nalaza citologije urina kao i unaprijedila njihova reproducibilnost, 2016. godine su uvedeni standardizirani kriteriji, odnosno Pariški sustav dijagnostičkih kategorija citologije urina (Tablica 2) (60).

**Tablica 2.** Pariški sustav dijagnostičkih kategorija citologije urina (Preuzeto i prilagođeno prema: Barkan GA i sur. (60)).

- Negativan nalaz na urotelni karcinom visokog gradusa (engl. Negative)
- Atipične urotelne stanice (engl. atypical urothelial cells, AUC)
- Sumnja na urotelni karcinom visokog gradusa (engl. Suspicious)
- Urotelni karcinom visokog gradusa (engl. high-grade UC, HGUC)
- Urotelni karcinom niskog gradusa (engl. low-grade UC, LGUC)

Cistoskopija i citologija urina su osnove urološkog dijagnostičkog pristupa za BC, no niti zasebno, a niti u kombinaciji ne pokazuju optimalnu dijagnostičku točnost što je povećalo interes za korištenjem manje subjektivnih strategija. Tijekom posljednjeg desetljeća razvijeni su neinvazivni, točni i ekonomski dostupni testovi urina za dijagnozu i praćenje pacijenata s BC (61). Takvi testovi uključuju panele markera povezanih sa genskom ekspresijom i epigenetskim promjenama, kojima se u urinu detektiraju degradirani fragmenti tumorske DNA (od engl. *deoxyribonucleic acid*) (62). Najkorisnijima su se pokazali paneli za BC kojima se pronalaze mutacije TERT (od engl. *telomerase reverse transcriptase*) promotora i FGFR3 (od engl. *fibroblast growth factor receptor 3*) mutacije. U studijama je pokazano kako su te promjene prisutne mjesecima prije kliničke manifestacije BC (63). S druge strane niti jedan od komercijalno dostupnih markera nema dostatnu osjetljivost kako bi zamijenio cistoskopiju kod pacijenata suspektih za prisutnost BC te se ne savjetuje njihova rutinska primjena u dijagnostičkoj obradi hematurije. Potencijalni doprinos njihove primjene je kod praćenja pacijenata koji su već liječeni radi BC, kako bi se smanjila frekvencija cistoskopija te kod predviđanja ishoda liječenja intravezikalne imunoterapije (64).

Kada je tumor mjehura potvrđen provodi se kirurški zahvat, transuretralna resekcija tumora (engl. *transurethral resection of bladder tumor*, TURBT), koji ima terapijsku, dijagnostičku i prognostičku ulogu. Cilj zahvata je odstranjenje tumora, dobivanje patohistološke dijagnoze i

procjena stadija proširenosti bolesti. TURBT mora uključivati i mišićni sloj mokraćnog mjehura u reseciranom uzorku. U slučaju sumnje na mišićnu invaziju preporuča se zasebna resekcija i odvajanje uzoraka egzofitičnog dijela tumora od dubljih slojeva tumora, kako bi analiza tkiva bila specifičnija (65).

### **1.4.3. Slikovna procjena proširenosti bolesti**

U inicijalnoj dijagnozi BC, ali posebice u procjeni proširenosti, slikovne pretrage predstavljaju ključnu ulogu. Ultrazvučni pregled je često prvi korak evaluacije BC upravo zbog svoje široke dostupnosti. No, ultrazvuk može koristiti i kao sredstvo za procjenu stadija bolesti. Novija, kontrastom unaprijeđena ultrazvučna tehnologija (engl. *contrast-enhanced ultrasound*, CEUS) daje obećavajuće rezultate u predviđanju gradusa BC, tumorskog stadija i orijentacijskoj evaluaciji (66). Dodatne slikovne metode kojima se može dijagnosticirati BC su kompjuterizirana tomografija (engl. *computed tomography*, CT) i magnetska rezonancija (engl. *magnetic resonance imaging*, MRI) (67, 68).

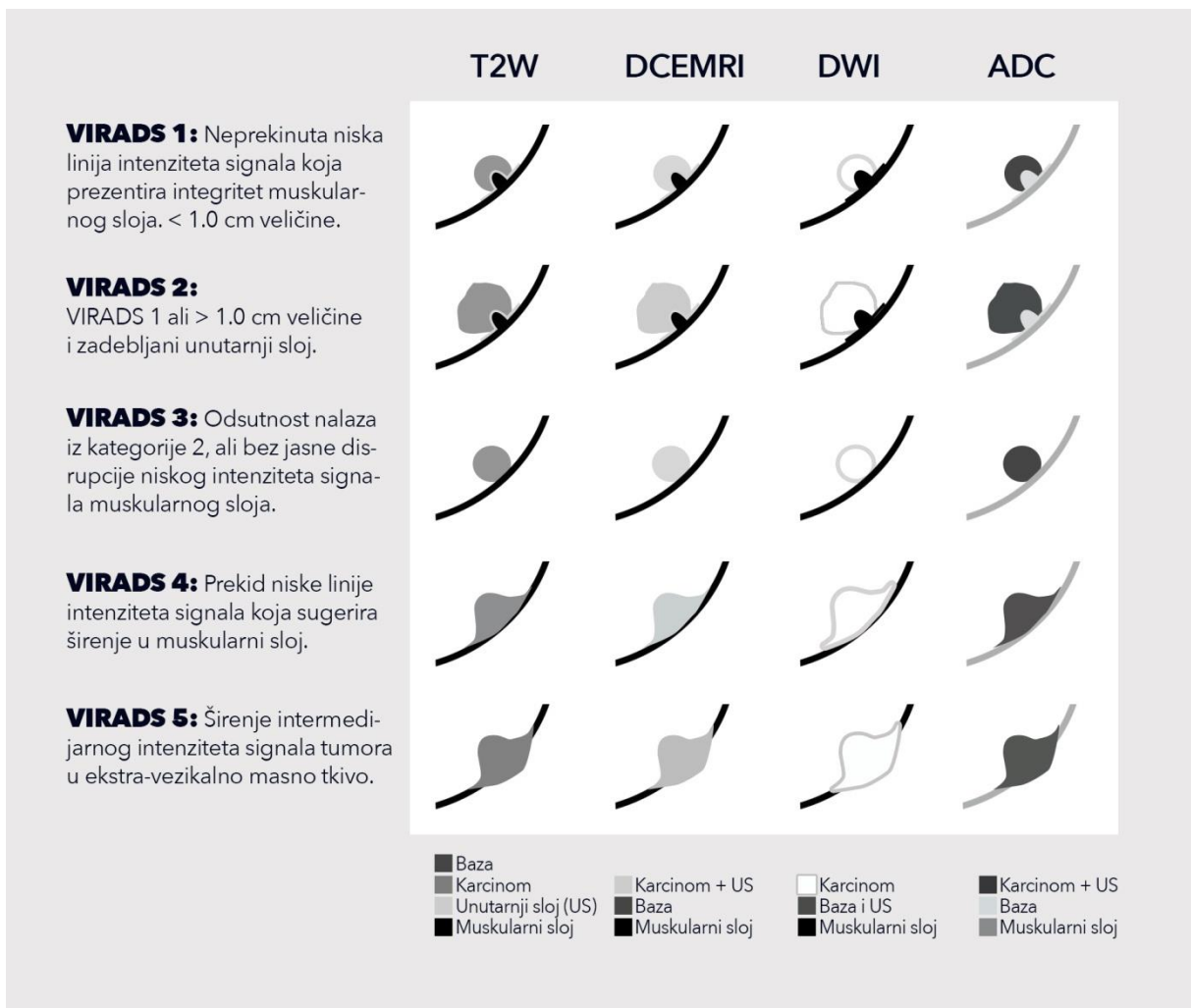
Stadij bolesti i gradus tumora su osnovni parametri kojima se vodimo kod odluke o tretmanu i predviđanju prognoze (69). Obzirom da ultrazvučna dijagnostika ima svoja ograničenja, CT je preporučen kao primarna slikovna pretraga za procjenu proširenosti tumora. Posljednjih godina CT urografija je gotovo u cijelosti zamijenila intravenoznu urografiju u dijagnostici i praćenju BC. Novija dodatna unaprijeđenja, koja uključuju povećanje rezolucije CT slika uz redukciju izloženosti zračenju, utvrdila su CT kao bazičnu slikovnu pretragu unatoč porastu i dostupnosti kompleksnijih i modernijih slikovnih metoda. Procjena stadija kod uznapredovanog BC uključuje CT toraksa, abdomena i zdjelice. CT ima visoku specifičnost i osjetljivost u detekciji BC (oko 83 % i 93 %) (70, 71). Unatoč tome, manjak rezolucije otežava mogućnost interpretacije statusa različitih slojeva mokraćnog mjehura i dubine prodora tumora, odnosno procjenu rizika mišićne invazivnosti tumora. Također, CT može izostaviti promjene manje od 1 cm veličine te otežano interpretirati postupalne i TURBT promjene mjehura tijekom praćenja (72, 73). Premda CT teško razlučuje razlike stadija tumora od Ta do T3a, pokazuje uspješnost u detekciji invazije u perivezikalno masno tkivo (T3b) kao i okolne organe (74). Unatoč tome što je CT kao pretraga cjenovno dostupan i izvedbeno brz, postoje varijabilnosti u subjektivnoj

interpretaciji nalaza, kao i nemogućnost interpretacije mekih tkiva i procjene mišićne invazije, što određenu prednost daje slikovnoj pretrazi MRI (75, 76).

MRI pokazuje superiornost u procjeni mekih tkiva nad CT snimkama (77). Velika rezolucija mekog tkiva omogućuje ne samo procjenu ekstenzije tumora u perivezikalno masno tkivo, već i razlikovanje između invazije u površinski ili duboki dio mišićnog sloja, odnosno T2a naspram T2b stadija.

Recentnijom opsežnijom uporabom multiparametrijskog (mp) MRI, uveden je standardizirani VIRADS (od engl. *vesical imaging reporting and data system*) sustav procjene vjerojatnosti invazije karcinoma u mišićni sloj, što je ključna klinička informacija (Slika 4). Ovaj sustav se pokazao kao vrijedan i precizan alat u primarnom razlikovanju neinvazivnog od invazivnog karcinoma (78, 79). Tom metodom se kombiniraju različite MRI sekvence: T1W i T2W te funkcionalne MRI metode uključujući DCE-MRI (od engl. *dynamic contrast-enhanced MRI*) i DW-MRI (od engl. *diffusion-weighted MRI*) (80). Sustav stupnjevanja vjerojatnosti invazije mišićnog sloja glasi: vrlo mala vjerojatnost (VIRADS 1), mala vjerojatnost (VIRADS 2), nalaz je dvosmislen (VIRADS 3), velika vjerojatnost (VIRADS 4), vrlo velika vjerojatnost (VIRADS 5). Osjetljivost i specifičnost VIRADS sustava za predviđanje MIBC je jako visoka te iznosi 83 %, odnosno 90 % (81).





**Slika 4.** VIRADS (od engl. *vesical imaging reporting and data system*) sustav stupnjevanja vjerojatnosti invazije karcinoma u mišićni sloj primjenom magnetske rezonancije (Preuzeto i prilagođeno prema: Panebianco V i sur. (80)). (DCE-MRI (od engl. *dynamic contrast-enhanced*) – dinamička kontrastom-pojačana magnetska rezonancija, DWI (od engl. *diffusion-weighted imaging*) – difuzijski ponderirani prikaz, ADC (engl. *apparent diffusion coefficient*) – manifestni koeficijent difuzije).

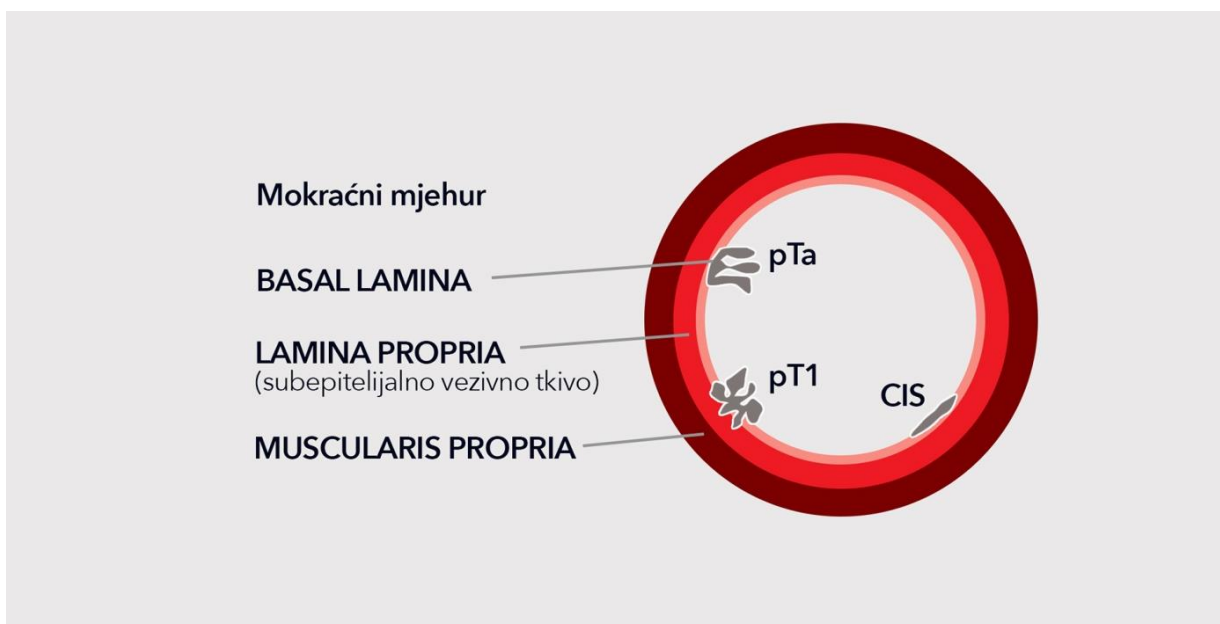
Niti CT, a niti mpMRI nisu u mogućnosti točno razjasniti mikroskopsku invaziju u perivezikalnu mast, odnosno razliku između T2 i T3a stadija (82). Pozitronska emisijska tomografija (PET) u kombinaciji sa MRI, odnosno MRI-PET sjedinjuje najveće prednosti obje pretrage, sagledavajući ujedno morfološke i funkcionalne promjene. Unatoč obećavajućoj uspješnosti ove metode u karakterizaciji BC, nema većih studija koje bi ju valorizirale niti jasno definiranih preporuka o standardiziranoj primjeni (83).

Osjetljivost i specifičnost procjene statusa limfnih čvorova (engl. *lymph node*, LN) konvencionalnim slikovnim metodama je malena, zato što CT i MRI nisu u mogućnosti detektirati metastaze u čvorovima normalne veličine niti razlikovati povećanje čvorova uslijed benignog stanja. Patološko uvećanje podrazumijeva promjer > 8 mm za zdjelice i > 10 mm za abdominalne LN (84). PET tehnologija u CT kombinaciji je u rastućoj upotrebi, no također sa još nedovoljnom evaluacijom u ovom području (85). Udaljene metastaze se detektiraju standardizirano putem CT toraksa, abdomena i zdjelice.

Budući razvoj u dijagnostici sugerira da će FDG-PET/CT (od engl. *fluorodeoxyglucose PET/CT*) imati potencijalno veći klinički značaj u procjeni stadija metastatskog BC (86). Također, radi se na unapređenju VIRADS sustava kako bi uključio i procjenu terapijskog odgovora, kao i perioperativne ishode (87).

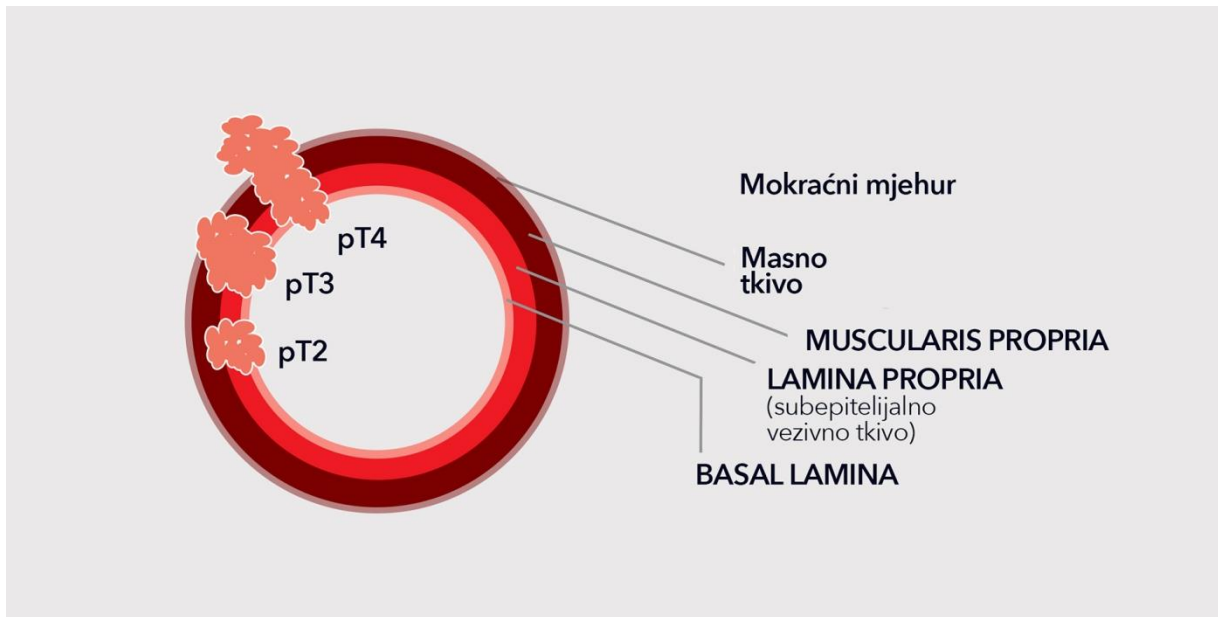
## 1.5. PATOLOGIJA I PTOHISTOLOGIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Histološka potvrda dijagnoze BC je najčešće temeljena analizom uzoraka dobivenih iza operativnog zahvata (TURBT). Iako je BC heterogena bolest, na morfološkoj razini najčešći histološki podtip je UC koji je prisutan u 90 % svih BC (88). Među njima, oko 85 % pacijenata ima bolest ograničenu na mukozu (ne-invazivni BC, pTa) ili submukozu (ne-mišićno invazivni BC, pT1), koji su prethodno nazivani površinskim BC i koji najčešće imaju povoljniji klinički tijek i ishode liječenja (Slika 5).



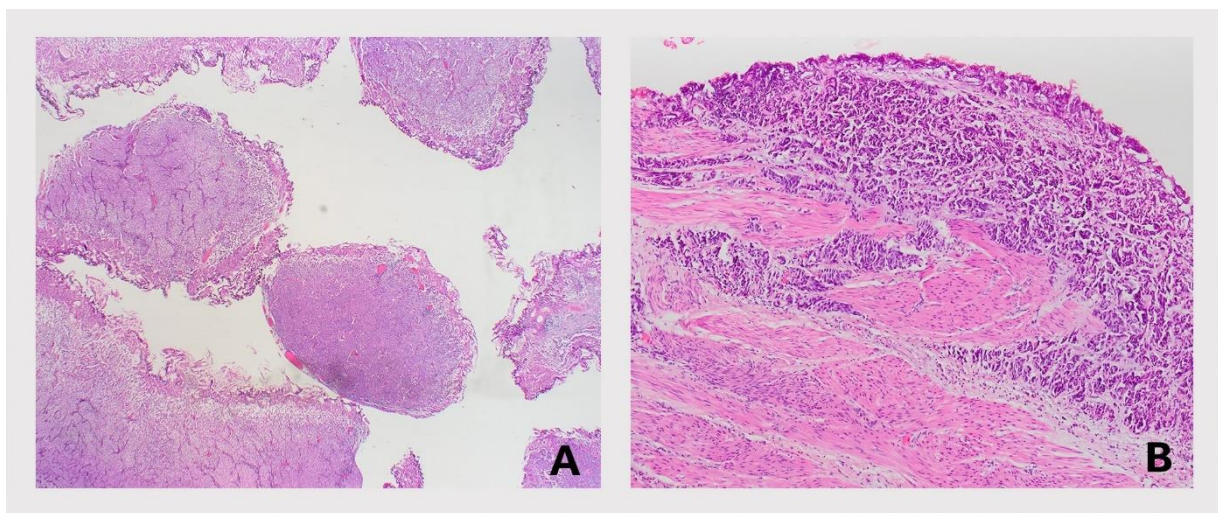
**Slika 5.** Ne-mišićno invazivni karcinom mokraćnog mjehura. (CIS (engl. *carcinoma in situ*) – karcinom in situ).

Mišićno-invazivni BC ( $\geq$ pT2) je s druge strane zaseban entitet i agresivna bolest koja zahtjeva rano otkrivanje sa odgovarajućom i brzom terapijskom reakcijom, kao i strategijom praćenja (Slika 6). U sklopu ove disertacije radi jasnoće će se koristiti slijedeća terminologija: ne-mišićno invazivni BC (engl. *non-muscle invasive BC*, NMIBC) i mišićno-invazivni BC (engl. *muscle-invasive BC*, MIBC).



**Slika 6.** Mišićno-invazivni karcinom mokraćnog mjehura.

Dijagnoza BC se temelji na arhitekturnim i citološkim karakteristikama tumora. Arhitekturno, BC pokazuje papilarni, solidno-infiltrativni ili miješani obrazac rasta (Slika 7).



**Slika 7.** Mišićno-invazivni karcinom mokraćnog mjehura (Hemalaun eozin prikaz: A; strukture slabo diferenciranog urotelnog karcinoma (HEX20), B; Invazija u mišićni sloj stijenke mokraćnog mjehura (HEX100)).

Opseg različitosti u diferencijaciji BC najbolje ocrta klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation, WHO*) iz 2022. godine (Tablica 3) (89).

**Tablica 3.** Histološki tipovi karcinoma mokraćnog mjehura (Preuzeto i prilagođeno prema: Netto GJ i sur. (89)).

- Urotelni karcinom (čisti ili miješani s drugim podtipovima)
- Pločasta diferencijacija
- Žljezdana diferencijacija
- Sarkomatoidna diferencijacija
- Trofoblastična diferencijacija
- „Nested“ varijanta
- Mikropapilarna varijanta
- Mikrocistična varijanta
- Karcinom sličan limfoepiteliomu
- Veliko-stanična varijanta
- Svjetlo-stanična varijanta
- Varijanta lipidnih stanica
- Neuroendokrina varijanta
- Urotelni karcinom s ostalim rijetkim diferencijacijama

### 1.5.1. Anatomija mokraćnog mjehura

Stijenka mokraćnog mjehura je građena od četiri sloja. Urotel je unutarnji epitelni sloj mokraćnog mjehura i predstavlja mjesto nastanka BC. Lamina propria (subepitelijalno vezivno tkivo) je razdvojena od utotela tankom bazalnom membranom. Muscularis propria ili mišić detruzor okružuje laminu propriu i sadrži glatko-mišićna vlakna. U ovom sloju su sadržane vaskularne strukture i limfni vodovi. Obzirom na takvu anatomske karakteristiku, prisutnost tumora u ovom sloju osigurava mu mogućnost lakše udaljene diseminacije. Adventicija označava perivezikalno masno tkivo prekriveno seroznim slojem (90).

### **1.5.2. Procjena gradusa**

U NMIBC gradus je i dalje najvažniji nalaz pri odlučivanju o terapiji i praćenju. WHO klasifikacija je od 2016. godine ustanovila novu podjelu BC na niski i visoki gradus (91). UC niskog gradusa karakteriziran je papilarnom arhitekturom, niskim stupnjem citoloških abnormalnosti, s više slojeva atipičnih stanica koje su relativno uniformne u veličini i bez pleomorfizma jezgara. Mitoze su rijetke, a u slučaju njihove pojave obično su vidljive u bazalnim slojevima tumora (92). UC visokog gradusa karakteriziran je značajnim arhitekturnim i citološkim deformacijama, sa anastomozama papila, nekohezivnim stanicama, uz prisutan pleomorfizam jezgara i anaplazije, prominentne nukleole i neorganiziran ustroj stanice. Mitoze su brojne i atipične te zauzimaju cijelu debljinu epitela (93).

U nekim ustanovama se i dalje koristi trostruki gradus sustav koji uključuje: dobru, umjerenu i lošu diferencijaciju UC. Preporuča se konverzija opisanog sustava procjene na način da se dobra i umjerena diferencijacija podrazumijeva kao UC niskog gradusa, a da se loša diferencijacija definira kao UC visokog gradusa (94). Procjena gradusa je najbitnija u NMIBC radi razlika u terapiji i prognozi. Nasuprot tome, svi MIBC su u pravilu karcinomi visokog gradusa, uz vrlo rijetke iznimke (95). Upravo zbog toga nikakav prognostički značaj ne proizlazi iz gradiranja MIBC (96). Kod MIBC je presudna identifikacija morfoloških podtipova koja pomaže u terapijskom odlučivanju i daje prognostičke informacije (97, 98).

### **1.5.3. Proširenost bolesti**

U cilju procjene stadija proširenosti bolesti kao najraširenija metoda koristi se TNM klasifikacija (Tablica 1) (99). Stadij tumora se određuje dubinom invazije tumora u slojeve stijenke mokraćnog mjehura. Anatomija i histologija mokraćnog mjehura je često varijabilna, no unatoč ograničenjima u pripremi uzoraka, kao i izvedbi operativnog TURBT zahvata, nužno je definirati dubinu invazije kao najveći patološki (pT) stadij za pojedini slučaj.

Kod NMIBC najbitnije je potvrditi očuvanost bazalne lamine i isključiti CIS kao i ne-invazivni UC. Invazivni rast tumora podrazumijeva napredovanje kroz bazalnu laminu. Stoga su

prisutnost ili odsutnost mišićnog sloja u uzorku, kao i njegova invazija, presudne informacije u donošenju odluka o daljnjem tretmanu. Kod MIBC, procjena stadija je najbitniji prognostički faktor. U TURBT uzorcima je potrebno provesti morfološku analizu kako bi se ispravno razlikovao mišićni sloj od hiperplastičnih mišićnih nakupina mukoze koje ga mogu imitirati, što može dovesti do predijagnosticiranja. Također je potrebna dobra analiza perivezikalnog tkiva na cistektomijskim uzorcima jer je pokazan znatno lošiji ishod kod pT3b, nego pT3a stadija tumora (100). Osim opisane procjene pTNM stadija, klinička procjena TNM (cTNM od engl. *clinical*) stadija uključuje i ostale dodatne slikovne dijagnostičke pretrage (poglavlje 1.4.3.).

## 1.6. MOLEKULARNA BIOLOGIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Svi maligni tumori su sastavljeni od različitih staničnih klonova, koji sadrže različit genetski ustroj i promjene u ekspresiji gena, uključujući i molekularne karakteristike primarnih i metastatskih tumora (101). UC je poznat po svojoj heterogenosti na morfološkoj i molekularnoj razini. Karakterističan je i po razvoju različitih subklonova tijekom progresije rasta, metastaskog rasapa i promjena induciranih terapijom. Prepoznavanje letalnih tumorskih subklonova i njihovog molekularnog potpisa je ključno kod pacijenata s MIBC i metastatskog BC. Također je ključno prepoznati one slučajeve NMIBC s potencijalom za agresivnu transformaciju i progresiju (102). Osnovni pokretači karcinogeneze UC su promjene u DNA. Različite mutacije DNA kod UC pacijenata objedinjene su u Genomskom atlasu karcinoma (engl. *The Cancer Genome Atlas*, TCGA) što je poslužilo kao baza buduće molekularne klasifikacije UC (103).

Molekularne promjene u BC dovode do nekontrolirane stanične proliferacije, a takve genetske promjene mogu biti podložne terapijskim intervencijama. Promjene DNA uključuju mutacije multiplih gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa, remodeliranje kromatina, signalizaciju kinaznog receptora, transkripcije i popravka DNA, kao i proces apoptoze. Najčešće mutirani gen kod UC je TP53. Gen TP53 sudjeluje u kontroli staničnog ciklusa, a njegova mutacija se može pronaći u oko polovice pacijenata. Mutirani TP53 je otporan na degradaciju, što rezultira povećanom intranuklearnom akumulacijom koja je detektibilna imunohistokemijski. Učestala je i mutacija MLL2 (engl. *mixed-lineage leukemia 2*) koji je odgovoran za epigenetsku regulaciju i remodeliranje kromatina. Također je česta i mutacija TERT promotorskih regija, neovisno o gradusu, stadiju i histološkom podtipu (104). Višestruko je istražena je i mutacija FGFR3 koji je odgovoran za staničnu signalizaciju. Molekularne i genetske karakteristike se mijenjaju tijekom vremena, što rezultira razlikama između ranih oblika karcinoma, uznapredovalih i metastatskih klonova, kao i klonova transformiranih uslijed primijenjene terapije. Učestalost i akumulacija mutacija tijekom vremena se prikazuje mjerom tumorskog mutacijskog opterećenja (engl. *tumor mutation burden*, TMB).



### **1.6.1. Molekularna klasifikacija urotelnih karcinoma**

U posljednje vrijeme ubrzano se razvijaju platforme bazirane na uzorcima krvi i urina, kojima se na brz način detektiraju promjene u molekularnom potpisu BC (105). Stoga je tijekom zadnjih pet godina predložena nova klasifikacija temeljena na molekularnim karakteristikama BC. Smatra se da postoje dva puta karcinogeneze mjehura, a time i dva jedinstvena fenotipa BC. Prvi put sačinjava 80 % NMIBC s papilarnom arhitekturom i urotelijalnom displazijom. To su lokalno rekurentni tumori bez velikog rizika za invazivnim rastom. Drugi put je povezan s invazivnim tumorima koji su visokog gradusa i karakteristikom infiltrativnog rasta, odnosno MIBC (106).

#### *1.6.1.1. Ne-mišićno invazivni karcinom mokraćnog mjehura*

Molekularna raznolikost UC je odgovorna za različitost u kliničkom ponašanju, progresiji i odgovoru na terapiju. Kako bi se pojednostavila selekcija i unaprijedio klinički odgovor i prognoza, 2012. godine je predložena podjela NMIBC prema profilu genske ekspresije na slijedeće tipove: „sličan-urotelu“ (koji pokazuje dobru prognozu), „genomski nestabilan“ (sa srednje rizičnom prognozom) i „bazalni/pločastim stanicama sličan“ podtip (s najlošijom prognozom) (107). Dodatno je po prvi puta korištena imunohistokemijska analiza radi razlikovanja pojedinih tipova NMIBC te su potom definirana spomenuta tri tipa NMIBC (Tablica 4) (108). Prvi tip karakteriziraju FGF3 mutacije i ekspresija uroplakina, što korelira s dobrom prognozom. Drugi tip pokazuje luminalnu diferencijaciju s TP53 i ERCC2 (od engl. *excision repair cross-complementation group 2*) mutacijama i smatra se visoko rizičnim NMIBC. Treći tip ima FGF3 mutacije i bazalnu diferencijaciju (109).

**Tablica 4.** Molekularni podtipovi NMIBC (Preuzeto i prilagođeno prema: Strogilos R i sur. (108)). (FGFR3 (engl. *fibroblast growth factor receptor 3*) – receptor faktora rasta fibroblasta 3, TP53 (engl. *tumor protein 53*) – tumorski protein 53, ERCC2 (engl. *excision repair cross-complementation group 2*) - skupina gena za popravak križne komplementacije 2, NMIBC (engl. *non-muscle invasive bladder cancer*) ne-mišićno invazivni karcinom mokraćnog mjehura).

TIP	MUTACIJA	PROGNOZA
sličan urotelu	I. FGFR3 / ekspresija uroplakina	Dobra
genomski-nestabilan	II. TP53 / ERCC2 (karakteristike luminalnog tipa)	Visoko rizični NMIBC
bazalni/pločastim stanicama sličan	III. FGFR3 (karakteristike bazalnog tipa)	Loša

#### 1.6.1.2. Mišićno-invazivni karcinom mokraćnog mjehura

Više je opisanih molekularnih subklasifikacija i za MIBC. Bazirano na ekspresiji cijelog genoma mRNA (od engl. *messenger ribonucleic acid*) i imunohistokemijskim profiliranjem, sugerirana je podjela MIBC na tipove: bazalni, luminalni i TP53 - sličan. Bazalni pokazuje pločastu i sarkomatoidnu diferencijaciju. Luminalni je karakteriziran uroplakinima, ekspresijom CK18 (od engl. *cytokeratin*), CK20, GATA3 (od engl. *transcription factor that recognizes G-A-T-A nucleotide sequences*), papilarnom arhitekturom, mutacijama FGFR3 i ERBB2 amplifikacijom. Kao podtip luminalnog izdvojen je TP53 - sličan, koji ima karakteristike luminalnog no rezistentnog na KT. Bazalni tip pokazuje agresivno ponašanje (110).

Dodatnim napretkom unutar profiliranja MIBC, 2019. godine donesena je nova klasifikacija i konsenzus o podjeli na šest molekularnih tipova, temeljenih na kliničko-patološkom nalazu i mRNA ekspresiji. Ona uključuje: luminalni - papilarni, luminalni - nespecificirani, luminalni - nestabilni, bogat stromom, bazalni - pločasti, sličan neuroendokrinom (Tablica 5) (111, 112). Luminalno - infiltrirajući pokazuje jaku stromalnu reakciju i proliferaciju miofibroblasta sa gustom intratumoralnom i peritumoralnom infiltracijom limfocita, kao znakom imunološkog odgovora. Ova karakteristika je ukazala na važnost shvaćanja mikrookoliša tumora kao mjesta odgovornog za tumorski rast i progresiju, ali i potencijalnog mjesta terapijske intervencije. U ovom podtipu markeri imunskih nadzornih točaka su visoko eksprimirani. Detektirani markeri su ligand programirane stanične smrti - 1 (engl. *programmed death ligand -1*, PD-L1) i citotoksični T limfocitno-povezani protein 4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*, CTLA-4). Izraženost ovih liganada sugerira da je upravo luminalni - infiltrirajući tip odgovarajući kandidat za imunoterapiju. Svi luminalni tipovi pokazuju urotelijalnu diferencijaciju i genetske promjene FGFR3. Luminalni - papilarni je najmanje agresivan podtip. Luminalni - nestabilni tip ima najviše mutacija, pogotovo onih vezanih za porodicu APOBEC proteina (od engl. *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide*) te je povezan sa dobrim odgovorom na KT. Bazalni - pločasti tip i sličan neuroendokrinom su se pokazali jako agresivnog ponašanja s najlošijom prognozom (113, 114).

**Tablica 5.** Molekularni podtipovi MIBC (Preuzeto i prilagođeno prema: Robertson AG i sur. (111)). (FGFR3 (engl. *fibroblast growth factor receptor 3*) – receptor faktora rasta fibroblasta 3, KDM6A (engl. *lysine demethylase 6A*) – gen lizinske demetilaze 6A, ELF3 (engl. epithelial cell-specific transcription factor) – epitelijalni za stanicu specifični transkripcijski faktor (, CIS (engl. carcinoma in situ) – karcinom in situ, TP53 (engl. *tumor protein 53*) – tumorski protein 53, ERCC2 (engl. *excision repair cross-complementation group 2*) - skupina gena za popravak križne komplementacije 2, APOBEC (engl. *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide*) – apolipoprotein B enzim, katalitički polipeptid, koji popravljja glasničku ribonukleinsku kiselinu, TMB (engl. *tumor mutation burden*) - tumorsko mutacijsko opterećenje, RB1 (engl. *retinoblastoma – associated protein 1*) – protein povezan s retinoblastomom – 1, EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) – receptor epidermalnog faktora rasta).

TIP	MUTACIJA	PROGNOZA
I. luminalni - papilarni	FGFR3 KDM6A	- najmanja agresivnost, mlađi pacijenti - benefit od terapije FGFR3 inhibitorima
II. luminalni - nespecificirani	ELF3	- mikropapilarne varijante - povezan s CIS
III. luminalni - nestabilni	TP53, ERCC2, APOBEC (povećan), visok TMB genomska nestabilnost	- snježivnost na kemoterapiju
IV. bogat - stromom		- prominentni fibroblasti i miofibroblasti, bogat T i B staničnim markerima - terapija imunosnih nadzornih točaka
V. bazalni - pločasti	TP53, RB1, EGFR	- pločasta diferencijacija - agresivan / loša prognoza
VI. sličan neuroendokrinom	TP53, RB1	- ekspresija neuroendokrinih markera - agresivan / slabo preživljenje

## 1.7. PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI MARKERI

Odluke o liječenju i prognozi pacijenata s BC se temelje na karakteristikama pacijenata i karakteristikama tumora. Prognoštičkim markerima pokušava se predvidjeti tijek bolesti i ishod liječenja što naglašava mogućnost individualiziranog pristupa pacijentu. Stoga je prisutan velik istraživački interes i razvoj u ovom području.

### 1.7.1. Klinički i patohistološki prognoštički markeri

Prognoštički faktori rizika primjenjivi u svakodnevnoj praksi se dijele na kliničke (koji su ujedno prediktori recidiva) i patohistološke (koji su prediktori progresije bolesti u viši stadij). Za NMIBC prediktori recidiva su veličina i broj tumora te učestalost ranijih recidiva. Faktore rizika progresije predstavljaju stadij, gradus i simultano prisutan CIS (115). Tako je sklonost recidiviranju za Ta i T1 tumore 40-80 % tijekom prve godine, a mogućnost progresije iznosi 10-25 % (116, 117).

Kada se radi o MIBC, prodorom tumora u mišićni sloj značajno se povećava vjerojatnost limfogenog i hematogenog širenja tumora. Upravo zato gotovo 50 % pacijenata s MIBC ima udaljene metastaze unutar dvije godine od dijagnoze i umire u okviru perioda od 5 godina neovisno o provedenom liječenju. Biološke različitosti između NMIBC i MIBC pokazuje i pretogodišnje preživljenje, koje iznosi 95 % naspram 50 % (118). Najznačajnija patohistološka prognoštička varijabla kod MIBC nakon provedenog radikalnog kirurškog liječenja je stadij tumora i LN status. Limfo-vaskularna invazija korelira s visokim rizikom rekurencije bolesti i mortalitetom povezanim s karcinomom (engl. *cancer specific mortality*, CSM), neovisno o patološkom stadiju i perioperativnoj KT (119). Broj pozitivnih LN iza limfadenektomije, LN - gustoća (omjer broja pozitivnih i broja odstranjenih LN), kao i ektranodalna ekstenzija tumora su direktno povezani s sveukupnim preživljenjem (engl. *overall survival*, OS) (120). S druge strane, parametri vezani za status LN ovisni su o tehničkim aspektima, odnosno kirurškim i patološkim faktorima, što umanjuje mogućnost uniformne primjene ovih prognoštičkih alata. Prognoza pacijenata kod kojih je infiltrativni tumor nastao progresijom iz NMIBC je lošija u usporedbi s primarnim MIBC. Također, istovremena CIS prisutnost u uzorcima iza cistektomije

je povezana s učestalijim tumorskim zahvaćanjem uretera i povišenim CSM. Ujedno je i lokacija tumora povezana s prognozom. Karcinomi locirani na vratu mokraćnog mjehura ili trigonumu nose povećani rizik LN metastaza, kao i smanjeno preživljenje (121). Sagledavajući u cjelini kliničke i patohistološke prediktore, pouzdanost ovih alata znatno oscilira. Upravo zato je u novije vrijeme veći fokus usmjeren na shvaćanje i detekciju genetskih promjena i molekularnih prediktornih markera.

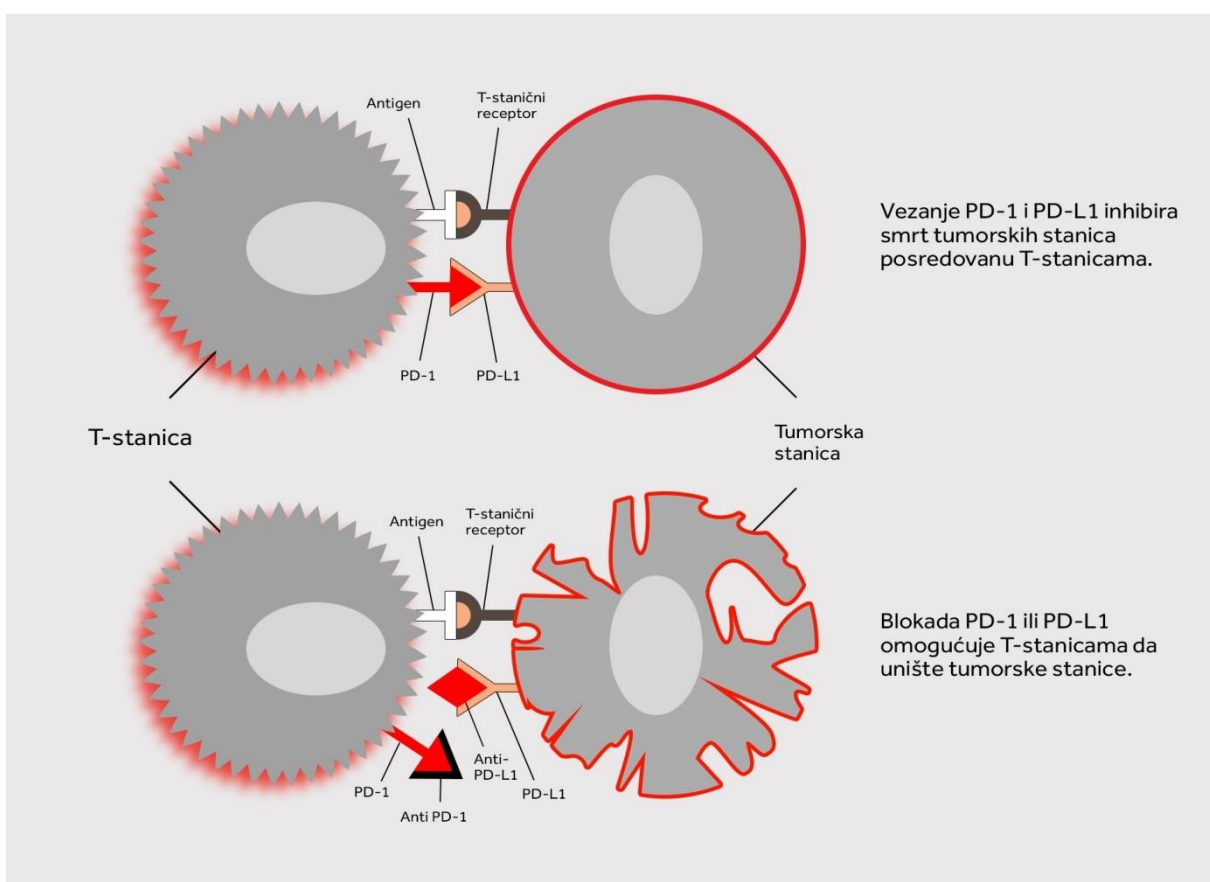
### 1.7.2. Prediktivni molekularni markeri

Molekularni markeri su temeljeni na TCGA skupini koja je izdvojila dva osnovna tipa MIBC: luminalni i bazalni, kao i već spomenutih 6 podtipova. Svi molekularni podtipovi MIBC su povezani s specifičnim profilom mutacija, onkogenim mehanizmima, patohistološkim karakteristikama, prognozom i terapijskim implikacijama (111, 122). Ipak, spomenuta molekularna klasifikacija ima veću biološku nego kliničku ulogu te se trenutno smatra istraživačkim sredstvom unutar retrospektivnih i prospektivnih studija, dok se ne ustanove kriteriji za njenu standardiziranu kliničku primjenu (123). Također, molekularno profiliranje i dalje napreduje te se smatra kako će doći do izdvajanja novih podtipova MIBC, što dodatno naglašava heterogenost u diferencijaciji ovog entiteta (124).

Osnovni pokretač karcinogeneze BC su promjene u DNA. MIBC karakterizira veliko opterećenje tumorskim mutacijama gena odgovornih za regulaciju različitih etapa staničnog ciklusa (104). Unutar tih promjena, više prediktivnih biomarkera je analizirano za MIBC. Tu su uključeni serumski vaskularni endotelijalni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) te geni za popravljivanje oštećenja DNA poput ERCC2, ATM (od engl. *ataxia teleangiectasia mutated*), RB1 (od engl. *retinoblastoma - associated protein 1*), kao i FGFR3. Cilj ovih biomarkera je predikcija odgovora na cisplatinom temeljenu neoadjuvantnu kemoterapiju (engl. *neoadjuvant chemotherapy*, NAC) (125) ili adjuvantnu kemoterapiju.

Posljednjih godina naponi su usmjereni u procjenu molekularnih markera za predviđanje odgovora na terapiju inhibitorima imunskih nadzornih točaka (engl. *immune checkpoint inhibition*, ICI). Prva u nizu detektiranih kontrolnih točaka kao ciljanog mjesta djelovanja ICI

bila je spomenuti ligand PD-L1. To je regulatorna molekula T-stanica izražena na tumorskim i imunološkim stanicama koje infiltriraju tumor. Pripada kontrolnim točkama koje ometaju imunološku funkciju omogućavajući nekontroliran rast tumorskih stanica. Povezivanjem PD-L1 s proteinom programirane stanične smrti (engl. *programmed cell death protein 1*, PD-1) sprječava se smrt tumorskih stanica inhibiranjem citotoksičnih T-limfocita (Slika 8) (126). Terapijskom blokadom tog procesa ICI djeluje antitumorskim efektom, odnosno T-stanice mogu neinhibirano djelovati protiv tumorskih stanica. Ovim mehanizmom se oporavlja antitumorska imunost pacijenata.



**Slika 8.** Mehanizam djelovanja inhibicije imunskih nadzornih točaka na razini PD-L1 i PD-1 (Preuzeto i prilagođeno prema: Caldwell CJ i sur. (126)). (PD-L1 (engl. *programmed death ligand -1*) - ligand programirane stanične smrti – 1, PD-1 (engl. *programmed cell death protein -1*) - protein programirane stanične smrti - 1).

Ekspresija PD-L1 je zamijećena u brojnim tumorima, a veliku kliničku važnost ima i kod BC (127). Izraženost PD-L1 se procjenjuje imunohistokemijski i to s više različitih sustava bodovanja pozitiviteta u tumorskim i imunsnim stanicama MIBC. Visoka izraženost je povezana s naprednim stadijem bolesti, sklonošću progresiji i lošijim OS nakon radikalnog liječenja. Naglašena PD-L1 pozitivnost sugerira potencijalno dobar odgovor na ICI (128). Glavno ograničenje primjene PD-L1 bojanja odnose se na značajan udio pacijenata sa negativnim PD-L1 koji ipak reagiraju na ICI (129). Unatoč ograničenjima, shvaćanje imunološkog okoliša tumora, kao i klinička primjena ovih saznanja su u fokusu istraživača posljednjih nekoliko godina. Veliki iskoraci u ovom području, koji uključuju dodatan razvoj molekularnog profiliranja, detekciju potencijalnih novih imunskih nadzornih točaka, kao i njihovu terapijsku blokadu, doveli su do promjene u paradigmi liječenja BC.

### **1.7.3. Potencijalni molekularni markeri**

Iako se istraživanje imunoonkologije razvija u punom jeku, studije fokusirane na izraženosti imunoloških kontrolnih točaka u MIBC i dalje su rijetke. Učinkovitost dosadašnjih ICI je potakla interes za pronalazak potencijalnih novih terapijskih meta - nadzornih točaka. Posljednjih godina se fokus s PD-L1 usmjerio i prema ligandima poput T-staničnog imunoglobulina s ITIM domenom (engl. *T-cell immunoglobulin with ITIM domain*, TIGIT) i limfocitnog aktivacijskog gena 3 (engl. *lymphocyte activation gene*, LAG-3), koji se eksprimiraju na T-stanicama i sudjeluju u antitumorskom imunološkom odgovoru, sugerirajući potencijalno bolji uspjeh ICI (130).

TIGIT je imunoreceptor koji se izražava u mikrookolini tumora i koji inhibira protektivne imunološke reakcije posredovane CD8<sup>+</sup> T-stanicama i prirodnim stanicama ubojicama (engl. *natural killer*, NK). Blokada TIGIT liganda restaurira T-stanice i pojačava antitumorski imunitet u akutnoj mijeloičnoj leukemiji, raku debelog crijeva i melanomu (131). Trenutno je nekoliko studija fokusirano na razvoj novih anti-TIGIT monoklonskih antitijela. Pretklinički modeli pokazali su da ta terapija sinergira s liječenjem protiv PD-L1. Međutim, TIGIT je slabo istražen u MIBC, a klinički značaj ostaje otvoren.

LAG-3 je transmembranski protein koji se eksprimira na aktiviranim T i NK stanicama. Pretkliničke studije potvrdile su da signalizacija LAG-3 dovodi do iscrpljivanja CD8<sup>+</sup> T-



stanica, a blokadom LAG-3 se aktiviraju T-stanice i imunološki odgovor. LAG-3 blokada također može sinergirati s anti-PD-L1 terapijom (132). Međutim, prognostička vrijednost LAG-3+ stanica i dalje je nedosljedna u različitim vrstama karcinoma. U karcinomu dojke i jajnika, obilje LAG-3+ stanica ukazalo je na poboljšanu prognozu i moglo bi biti povezano s razvojem trajnog antitumorskog imuniteta T-stanicama. Suprotno tome, infiltracija LAG-3+ bila je povezana s lošim preživljavanjem kod karcinoma pluća, što sugerira imunosupresivnu okolinu. Ligandi PD-L1, TIGIT i LAG-3 su ciljna mjesta imunoterapije, ali i dalje ostaje otvoreno pitanje njihovog kompletnog značaja i odnosa s imunološkim kontekstom u MIBC. Povezanost izraženosti opisanih liganada s molekularnim podtipovima MIBC sugerira potencijalnu višestruku kliničku vrijednost, kao prognostičkih i prediktivnih biomarkera, a time i eventualni budući personalizirani tretman za MIBC (133).

## **1.8. LIJEČENJE KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA**

Temelj u liječenju BC je već spomenuti kirurški zahvat TURBT, koji ima dijagnostički, terapijski i prognostički element. Iza inicijalne resekcije tumora može uslijediti intravezikalna aplikacija imunoterapije ili KT. Kod dokazano uznapredovalih slučajeva BC kirurško liječenje podrazumijevan radikalnu cistektomiju (RC), sa perioperativnom KT. Rastuća je primjena ICI. U selektiranim slučajevima opcija je i radioterapija (RT). Moguća je primjena i kombinirane terapije, takozvanog trimodalnog pristupa.

### **1.8.1. Intravezikalna terapija**

U većine pacijenata s NMIBC postoji velika sklonost rekurenciji tumora. Obzirom da dio tih slučajeva može progredirati gradusom, iza inicijalnog TURBT zahvata se primjenjuje intravezikalna terapija. Imunoterapijski i kemoterapijski agensi se mogu aplicirati intravezikalno putem urinarnog katetera kako bi se izbjegao morbiditet uslijed sistemske primjene lijeka.

BC prezentira paradigmu imunološki-reaktivne bolesti. Upravo zbog toga, standardni tretman je lokalna instalacija Bacillus Calmete-Guerin (BCG), atenuiranog soja Mycobacterium bovis. BCG djeluje kao intravezikalna imunomodulatorna tvar koja podiže imunološki odgovor. Svojom aktivnošću BCG uzrokuje lokalnu pojavu granuloma i mukozne ulceracije u kojima se mogu detektirati pomagački T-limfociti i interleukin-2 (IL-2). Svoju efikasnost potvrđuje i u terapijskoj i profilaktičkoj ulozi, no najefikasniji je u tretmanu CIS. BCG reducira rekurenciju i progresiju tumora te je uspješna terapija održavanja za pacijente s NMIBC srednjeg i visokog rizika (134). Također, BCG intravezikalna imunoterapija je pokazala nadmoć pri kontroli bolesti u odnosu na intravezikalnu KT. Unatoč tome što BCG odgađa progresiju NMIBC, 40 - 50 % pacijenata će progredirati unatoč terapiji i zahtijevati agresivniji tretman (135). Optimalni raspored aplikacije BCG terapije varira, no najčešći protokol podrazumijeva intravezikalnu primjenu jednom tjedno, tijekom 6 uzastopnih tjedana. Potom slijedi jednokratna terapija održavanja nakon trećeg i šestog mjeseca kod pacijenata visokog rizika. Učestalije nuspojave BCG terapije vezane su za lokalnu toksičnost i uključuju iritativne smetnje, poput frekventnijeg

mokrenja, urgencije i dizurije. Hemoragijski cistitis i opći upalni odgovor uz sistemsku toksičnost su rijetka stanja.

Intravezikalna KT označava lokalnu primjenu lijekova poput mitomicina i doksorubicina. Mehanizam djelovanja ovih tvari je na razini inhibicije sinteze DNA. Za razliku od BCG terapije, oni utječu na smanjenje rekurencije, ali ne i na smanjenje progresije tumora. Standardizirani način primjene je unutar dvanaest sati od izvedene resekcije tumora, čime se ostvaruje antitumorski efekt na mjestu resekcije, ali i na slobodno prisutne tumorske stanice u urinu zadržanom u mjehuru iza zahvata, čime se smanjuje vjerojatnost nove implantacije (136). Od nuspojava su učestale iritativne smetnje mokrenja. Apsorpcija ovih tvari unutar mjehura je mala te stoga sistemski odgovor nije čest. Kako bi se pojačala djelotvornost lokalne kemoterapijske aktivnosti, u novije vrijeme su dostupni i uređaji za mikrovalno induciranu hipertermijsku instalaciju ili elektro-posredovanu aplikaciju kemoterapeutika (137). Razmatrane su i kombinacijske terapije intravezikalnih tvari, no trenutno nisu u standardiziranoj primjeni.

## **1.8.2. Kirurško liječenje**

### *1.8.2.1. Transuretralna resekcija tumora mokraćnog mjehura*

TURBT je inicijalni oblik kirurškog liječenja za sve BC. Zahvat podrazumijeva resekciju svih vidljivih tumora unutar mokraćnog mjehura s dovoljnom dubinom stijenke, koja uključuje i mišićni sloj.

Primarni značaj u liječenju i procjeni stadija leži upravo u kvalitetno izvedenom TURBT zahvatu. Uzimajući u obzir ponašanje BC, većinu pacijenata moguće je uspješno liječiti ovim putem, dok će manji dio zahtijevati agresivniji kirurški pristup (138). Ponovljeni TURBT s ciljem ponovnog određivanja stadija bi se trebao izvesti 4 – 6 tjedana nakon inicijalne resekcije u slučajevima kada je prvi zahvat bio nepotpun, ako je prisutan T1 tumor visokog gradusa ili ako mišićni sloj nije prisutan u uzorku. Takozvani re-staging TURBT važan je kod NMIBC visokog gradusa obzirom da se tumor nađe i u 50 % slučajeva unatoč inicijalno kompletno

učinjenoj resekciji. Pacijenti kojima je proveden re-staging TURBT imaju znatno manje recidiva i produžen period preživljenja bez progresije (engl. *progression free survival*, PFS) (139). TURBT omogućava prilično točnu procjenu stadija tumora i gradusa te time i procjenu potrebe dodatnog tretmana. Pacijente s neinvazivnim tumorom niskog gradusa moguće je liječiti samo putem TURBT. Kod pacijenata s površinskom bolesti, no karakteristikama većeg rizika, intravezikalna terapija treba slijediti TURBT. TURBT kao samostalna terapija se rijetko primjenjuje u liječenju pacijenata s invazivnim karcinomom zbog velikog rizika rekurencije i progresije. Kod pacijenata s neinvazivnim karcinomom, nužno je pažljivo praćenje i uretrocistoskopija za tri mjeseca od inicijalne resekcije. Status bolesti u tom periodu je bitan prediktor naknadne rekurencije i progresije. U slučaju urednog statusa, potrebno je ponoviti cistoskopiju za 9 mjeseci. Pacijentima s inicijalno multiplim tumorima, visokim gradusom i koji imaju povrat bolesti nakon 3 mjeseca, potrebno je češće praćenje iza resekcije uz cistoskopije svaka 3 mjeseca. Pažljivo praćenje je nužno jer bolest recidivira u 40 - 80 % slučajeva (117, 140).

Kako bi se unaprijedila preciznost i obuhvatnost TURBT moguće je koristiti vizualizacijske metode koje uključuju fluorescentnu endoskopiju i uskopojasnu sliku. Ove metode omogućavaju detekciju promjena koje su u nastanku i nisu se još prezentirale kao intravezikalni proliferat. Na taj način se smanjuje rizik rekurencije, čime je ova metoda nadmoćnija od standardnog endoskopskog zahvata vođenog bijelim svjetlom. Fluorescentna endoskopija koristi plavo svjetlo za vizualizaciju promjena koje se bojaju intravezikalnom aplikacijom porfirina, poput 5-aminolevulonske kiseline (141). Kod uskopojasne tehnologije, uređaj integriran u endoskopsku kameru koristi prikaz specifičnih valnih duljina kako bi se unaprijedila vidljivost krvnih žila i tumora. Takva tehnologija omogućuje lak prelazak s prikaza bijelim svjetlom na uskopojasni prikaz bez instaliranja intravezikalnih pripravaka, kao što je slučaj kod fluorescentne endoskopije (142).

### *1.8.2.2. Radikalna cistektomija*

Radikalno kirurško liječenje je standardni tretman za lokalizirani MIBC. Ovaj zahvat indiciran je za pacijente s T2–T4a, N0–Nx, M0 bolesti (Slika 9). Ostale indikacije uključuju BCG-refraktorni, BCG-relapsirajući i BCG-neodgovarajući NMIBC, kao i opsežni BC koji se ne može kontrolirati samo liječenjem koje uključuje TURBT i intravezikalnu KT i imunoterapiju. Cistektomija spašavanja indicirana je i kod BC koji ne reagiraju na konzervativnu terapiju, recidiva nakon tretmana koji štede mjehur i kod ne-urotelnih karcinoma. Moguće je RC izvesti i u okviru palijsativnog liječenja kod recidivne hematurije ili boli (143).

RC je zahvat koji podrazumijeva odstranjenje prednjih zdjeličnih organa. Kod muškaraca to uključuje mokraćni mjehur s okolnim masnim tkivom, prostatu sa sjemenim mjehurićima i zdjeličnu limfadenektomiju. Kod žena, osim mokraćnog mjehura uključuje se i odstranjenje maternice, jajnika i prednjeg vaginalnog zida te regionalnih limfnih čvorova. U drugom dijelu operativnog zahvata, nakon odstranjenja opisanih struktura, slijedi urinarna derivacija koja se može postići cijelim nizom različitih tehnika. One mogu uključivati ureterokutanostomiju, zatim formiranje urinarnog rezervara ili kreiranje novog mjehura upotrebom dijela ileuma (144). Osim klasičnog kirurškog zahvata, moguć je pristup laparoskopskim putem, kao i robotski – asistirana RC. Opseg i tip zahvata, kao i vrstu derivacije urina uvelike diktiraju status pacijenta i konstitucija, nutricijska podloga, komorbidna stanja, bubrežna funkcija, kao i očekivani životni vijek (145). RC je opsežan zahvat sa znatnim morbiditetom. Rane komplikacije, koje uključuju one unutar 3 mjeseca, su vidljive u 58 % pacijenata (146), dok su kasne vezane specifično uz tip derivacije urina koji je izveden.

Rane komplikacije su najčešće one vezane za probavni sustav (poput ileusa), elektrolitski disbalans, sklonost urinarnim infekcijama te specifične urološke komplikacije vezane za drenažu urina. U pravilu, veći volumen operacija i veće iskustvo institucije s RC direktno koreliraju s boljim perioperativnim ishodima uključujući manje pozitivnih kirurških rubova, veći broj LN na limfadenektomiji, manje poteškoća s novo - formiranim mokraćnim mjehurom i općenito manjom stopom komplikacija (147).



**Slika 9.** Liječenje T2-T4aN0M0 urotelog karcinoma mokraćnog mjehura (Preuzeto i prilagođeno prema: Witjes JA i sur. (164)). (CT (engl. *computed tomography*) - kompjuterizirana tomografija, MRI (engl. *magnetic resonance imaging*) - magnetska rezonancija).

Pacijentima kod kojih je indicirana RC ista se treba provesti bez odgode, odnosno unutar tri mjeseca od postavljene indikacije. Smatra se da odgode u liječenju imaju negativan efekt na OS (148). Osim pravovremeno izvedenog radikalnog kirurškog liječenja bitan je odgovarajući odnos između procjene pretjeranog ili nedovoljnog tretmana bolesti, odnosno između rizika i dobiti kirurškog liječenja. Primjerice, veliku dilemu često stvara T1 bolest visokog gradusa, posebice u slučaju velikih tumora uz simultani CIS. Smatra se da u toj skupini pacijenata njih oko 10 % ima visoki rizik za razvoj progredirajuće smrtonosne bolesti u kratkom roku koja se bolje liječi putem RC nego intravezikalnom aplikacijom BCG koji slijedi iza TURBT zahvata (149). Međutim, prema istoj studiji također se napominje da je RC pretjeran tretman (engl. overtreatment) za većinu pacijenata s NMIBC visokorizičnom bolešću.

### **1.8.3. Kemoterapija**

Okultne udaljene metastaze su učestale čak i u pacijenata s lokaliziranim MIBC. Uz to, nakon RC čak 50 % pacijenata doživi metastatski relaps u periodu od jedne godine. RC kao samostalni tretman u pacijenata s MIBC nudi šansu za izlječenjem samo manjem broju pacijenata. Upravo zato je u posljednje vrijeme velik fokus usmjeren perioperativnoj KT, koja uključuje tretman prije ili iza radikalnog kirurškog liječenja, s posebnim naglaskom na dobit i potencijalno kurativni efekt neoadjuvantne kemoterapije (engl. *neoadjuvant chemotherapy*, NAC) (150).

#### *1.8.3.1. Neoadjuvantna kemoterapija*

NAC podrazumijeva primjenu cisplatina-temeljenih pripravaka. Aplikira se u ranom periodu liječenja kada se očekuje da je mikrometastatska bolest malog opsega. Također se očekuje da je podnošljivost primjene NAC bolja prije RC. Kao moguć ishod primjene NAC su ograničavanje bolesti, bolji patološki odgovor u uzorcima nakon kirurškog liječenja i negativni kirurški rubovi (151). S druge strane, odgoda RC može kompromitirati ishode liječenja kod pacijenata nereaktivnih na NAC. Odgoda RC od 12 tjedana i više je povezana s lošijim ishodima liječenja, no većina NAC protokola je prilagođena tom vremenskom okviru (152). NAC ne utječe na morbiditet vezan za RC. Smatra se da spol može biti vezan za kemoterapijski odgovor i

onkološke ishode te da ženski spol ima bolji odgovor tumora na NAC, u odnosu na muški spol (153). Postoje znatne varijacije u rezultatima istraživanja vezanih uz NAC, prije svega zbog različitosti u primjeni cisplatinom-temeljene NAC i raznih kombinacija lijekova, kao i monoterapije. Unatoč tome, smatra se da NAC sveukupno doprinosi smanjenju mortaliteta za 16 %, unaprjeđuje 10 – godišnje preživljenje s 30 na 36 % te doprinosi lokalnoj i regionalnoj kontroli bolesti neovisno o definitivnom tretmanu (154).

U pravilu se primjenjuje protokol od 3 ciklusa koji uključuju: metotreksat, vinblastin, doksorubicin i cisplatinu (MVAC). Standardna doza MVAC protokola nosi značajnu toksičnost. Svega 25 % pacijenata s MIBC je pogodno za primjenu takve cisplatinom-temeljene KT. Oko 50 % pacijenata s MIBC ima narušenu bubrežnu funkciju, što je preduvjet za aplikaciju NAC. Također, pacijenti su često starije životne dobi, narušenog općeg stanja i imaju anamnezu opterećenu komorbiditetima (155). U posljednje vrijeme se primjenjuju i protokoli prilagođene doze (engl. *dose-dense MVAC*, ddMVAC). Zamijećeno je kako onkološki ishod ovakvim pristupom nije ugrožen, uz kompletni patološki odgovor od 26 – 38 %, ali uz smanjenu toksičnost (156). Najčešći neželjeni ishodi liječenja su mijelosupresija i mukozitis, no bez životno-ugrožavajućih stanja, kao i odgoda RC. Noviji kemoterapijski pripravci poput kombinacije gemcitabin-cisplatina pokazuju sličnu efikasnost kao i MVAC, no manju toksičnost (157).

#### *1.8.3.2. Adjuvantna kemoterapija*

Adjuvantna KT podrazumijeva individualno kreiran tretman koji slijedi iza RC baziran na patološkom riziku i riziku relapsa. Nakon provedenog kirurškog liječenja, bolest visokog rizika koja zahtjeva daljnji tretman se smatra onom koja uključuje pozitivne LN, pT3-4 M0 bolest i pozitivne kirurške rubove. Samo mali dio pacijenata je sposoban primiti cisplatinom-temeljenu adjuvantnu KT, prije svega zbog morbiditeta kojeg nosi RC, dugotrajnog postoperativnog oporavka, učestalih ponovnih hospitalizacija, opće slabosti, malnutricije i oštećene bubrežne funkcije (158). Rizik koji adjuvantno liječenje putem KT nosi je učestalo pretjerano liječenje, zbog nemogućnosti procjene kemosenzitivnosti tumora. Najčešće se koristi MVAC protokol, no i cisplatin, ciklofosfamid i adriamicin (CISCA), kao i monoterapija cisplatinom. Premda



podatci vezani za primjenu KT u adjuvantnom kontekstu znatno variraju, preporuča se njena primjena kod pacijenata iza RC koji nisu primali NAC, a imaju visoko-rizičnu bolest bez metastaza (159).

### *1.8.3.3. Kemoterapija u metastatskoj bolesti*

Metastatski BC je neizlječiva bolest i trenutne smjernice i dalje preporučavaju cisplatinom-temeljenu KT kao standardni pristup za one pacijente koji su sposobni podnijeti terapiju. Očekivani odgovor na cisplatinске kombinacijske pripravke je 40 - 60 % sa medijanom preživljenja 13 – 16 mjeseci (160). Kao i kod NAC, i ovdje su dostupni MVAC, gemcitabin-cisplatin, ddMVAC, koji se smatraju terapijom prve linije za M+ bolest. Kod pacijenata gdje nije moguća primjena cisplatine, u kombinacijama je moguća zamjena s karboplatinom. Protokoli kemoterapijskog liječenja za metastatsku bolest su nepromijenjeni posljednjih 30 godina, no u novije vrijeme se ta utemeljena paradigma liječenja znatno mijenja dolaskom ciljane imunoterapije.

### **1.8.4. Imunoterapija**

Uzimajući u obzir da je mali broj pacijenata sposoban primiti cisplatinom-temeljenu KT unutar okvira NAC ili u sklopu adjuvantnog liječenja, veliki fokus je usmjeren na ICI. Također, već je spomenuto kako u NMIBC korištenje BCG intravezikalne imunoterapije aktivira imunološki odgovor, djelujući kao imunomodulacijska tvar koja smanjuje vjerojatnost rekurencije i progresije tumora. Time se BC ističe kao izrazito imunološki reaktivan entitet. U vremenu dubljeg shvaćanja molekularnih tumorskih mehanizama, otkrića visokog TMB u BC, kao i uvida u peritumoralni stanični odgovor, terapija ICI je postala značajna opcija u neoadjuvantnom, adjuvantnom okružju, ali i kod metastatske bolesti (161).

#### *1.8.4.1. Neoadjuvantna i adjuvantna imunoterapija*

U novije vrijeme istražuju se mogućnosti i uloga neoadjuvantne imunoterapije i kombinirane kemo–imunoterapije. ICI terapija blokadom nadzorne točke PD-L1 pokazala je znatan benefit kod neresektabilnih ili metastatskih BC u obliku druge linije liječenja iza NAC ili kod pacijenata koji nisu bili podobni za NAC. ICI se eksperimentalno primjenjuju i u neoadjuvantnom okviru, kao monoterapija ili kao kombinacijska terapija s NAC (162). Pembrolizumab je ICI koji djeluje na razini PD-L1 i kojim se postiže kompletna patološka remisija (pT0) u 42 % slučajeva te patološki odgovor (smanjenje od pT2) u 54 % slučajeva. Također je istraživan i atezolizumab koji pokazuje kompletni patološki odgovor u 31 % slučajeva (163). Trenutne preporuke Europskog urološkog udruženja (engl. *European Association of Urology*, EAU) prednost daju nivolumabu za pacijente koji nisu kandidati za cisplatinom-temeljenu NAC (164). Primjena ovih pripravaka, kao ICI monoterapije u neoadjuvantnom okviru ili u kombinacijskoj terapiji s NAC ima svoje prednosti, no trenutno nije dio rutinskog postupanja.

Adjuvantno se mogu primjenjivati svi PD-1/PD-L1 ICI u obliku monoterapije kod MIBC, uključujući pembrolizumab, atezolizumab ili nivolumab (165). Nivolumab je opcija za pacijente s MIBC koji imaju PD-L1 ekspresiju veću od 1 % i koji su pod većim rizikom povrata bolesti iza RC uključujući one s pT3/T4 bolesti s ili bez N+, ako prethodno NAC nije aplicirana te kod pacijenata koji ne mogu primiti cisplatinu.

#### *1.8.4.2. Imunoterapija kod metastatske bolesti*

U ovom području se ostvaruje veliki napredak i brojna istraživanja koja imaju za cilj integrirati ICI u standardnu terapiju prve linije. ICI je odobren kao tretman druge linije uznapredovanog BC i kod pacijenata s progresijom iza KT, uz PD-L1 pozitivitet. Također se razvijaju kombinacijske terapije koje uključuju KT uz pembrolizumab i atezolizumab, kao i durvalumab i termelimumab. Trenutno, indikacija za testiranje PD-L1 se odnosi na primjenu ICI kao monoterapije kod pacijenata sa lokalno - uznapredovanim ili metastatskim UC koji nisu pogodni za KT baziranu na cisplatinu i nisu prethodno primali terapiju, a imaju pozitivan PD-L1 status. U ovom kontekstu preporučeni su atezolizumab i pembrolizumab. Pozitivnost PD-L1 za korištenje pembrolizumaba definira se imunohistokemijom kao kombinirani pozitivni skor

(engl. *combined positive score*, CPS) veći od 10 koristeći platformu Dako 22C33, a za atezolizumab kao pozitivnost veća od 5 % tumorski infiltriranih imunoloških stanica koristeći Ventana SP142 (166, 167). U tijeku je razvoj dodatnih terapijskih monoklonskih protutijela. BC tako postaje model onkološkog uspjeha s više terapijskih opcija tijekom zadnjih nekoliko godina uz naglasak na ICI tretman.

### **1.8.5. Radioterapija**

S obzirom na visoku stopu lokalno i regionalnog neuspjeha nakon RC kod pacijenata s lokalno uznapredovanim BC koja iznosi oko 30 %, kao i visoki rizik od udaljenog rasapa bolesti te loše preživljavanje za ove pacijente, postoji interes za adjuvantnim terapijama koje se bave i rizikom lokalne i udaljene bolesti. Podaci o adjuvantnoj RT nakon RC su ograničeni, no dodatak RT uz KT povezan je sa značajnim poboljšanjem u preživljavanju bez lokalnih recidiva i to 96 % nakon dvije godine naspram 69 % u korist dodatka RT. Polje zračenja trebalo bi obuhvatiti područja s rizikom za prisutnost preostale mikroskopske bolesti na temelju patoloških nalaza nakon RC i može uključivati ležište cistektomije i zdjelične LN. Aplikiraju se doze u rasponu od 45 do 50,4 Gy. Neželjeni ishodi, poput značajne gastrointestinalne toksičnosti u slučajevima dodatka RT uz KT nisu bili česti, odnosno nađeni su u do 7 % slučajeva (168). Preoperativna RT se ne preporuča, obzirom da ne utječe na poboljšanje preživljenja, a odgađa i otežava izvođenje RC.

### **1.8.6. Trimodalno liječenje**

Osnovna strategija trimodalnog liječenja (engl. *trimodal treatment*, TMT) uključuje maksimalni TURBT iza kojeg slijedi istodobna primjena KT i RT. Očuvanje mokraćnog mjehura kao alternativa RC opcija je za pacijente s manjim pojedinačnim tumorima, negativnim limfnim čvorovima, bez obilnog CIS, bez hidronefroze povezane s tumorom i s dobrom funkcijom mjehura prije liječenja. TMT se treba razmotriti i kod pacijenata s kontraindikacijom za RC, bilo relativnom ili apsolutnom. TMT se primjenjuje s ciljem postizanja maksimalne lokalne kontrole tumora u mokraćnom mjehuru i susjednim limfnim čvorovima uz očuvanje mjehura i kvalitete života (engl. *quality of life*, QoL) bez ugrožavanja onkološkog ishoda. U okviru tog

cilja, ključna je selekcija pacijenata za postizanje dobrih rezultata (169). Unutar dosadašnjih provedenih istraživanja postoje znatna odstupanja u karakteristikama uspoređivanih skupina pacijenata. No, prema dostupnim dokazima, kod usporedbe rezultata liječenja TMT i RC, onkološki uspjesi su usporedivi u kratkoročnim ishodima. S druge strane, OS je značajno bolje u skupini pacijenata kod kojih se provodi RC. U usporedbi sa samom RT, TMT se pokazala nadmoćnijom terapijom (170). Petogodišnje stope preživljenja vezanog za karcinom (engl. *cancer specific survival*, CSS) variraju između 50 – 84 %, a OS između 36 – 74 %. Zamijećeno je kako je većina recidiva nakon TMT neinvazivna i može se kontrolirati konzervativno. Naknadna cistektomija spašavanja potrebna je kod 10 – 15 % pacijenata inicijalno liječenih s TMT (171).

## **2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

U skupini molekularnog luminalnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura izraženost TIGIT, LAG-3 i PD-L1 imunoloških liganada je viša u odnosu na molekularnu skupinu bazalnog podtipa.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. OPĆI CILJ**

Imunohistokemijski odrediti izraženost TIGIT, LAG-3 i PD-L1 u epitelnim stanicama luminalnog i bazalnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura, kao i u upalnim stanicama tumorske i peritumorske strome.

#### **3.2. SPECIFIČNI CILJEVI**

1. Imunohistokemijski odrediti izraženost TIGIT, LAG-3 i PD-L1 u luminalnom podtipu mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.
2. Imunohistokemijski odrediti izraženost TIGIT, LAG-3 i PD-L1 u bazalnom podtipu mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.
3. Utvrditi postoji li povezanost između izraženosti istraživanih liganada TIGIT, LAG-3 i PD-L1 u mišićno-invazivnom karcinomu mokraćnog mjehura.
4. Utvrditi postoji li povezanost izraženosti TIGIT, LAG-3 i PD-L1 s ostalim promatranim kliničko-patološkim obilježjima (spol, dob, ishod liječenja i preživljenje).

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. ISPITANICI

Provedeno je presječno prospektivno istraživanje u kojem su korišteni uzorci MIBC preuzeti iz arhivskog materijala Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, Zagreb. Uzorci su dobiveni slučajnim odabirom 62 pacijenta (od ukupno 185) kojima je od 01.01.2016. do 31.12.2021. godine učinjen TURBT zbog dijagnoze i liječenja BC te je postavljena dijagnoza MIBC. Pri odabiru se vodila briga o ujednačenom udjelu osnovnih molekularnih podtipova (luminalni i bazalni).

Podaci o bolesnicima prikupljeni su iz arhive navedenog Zavoda, Klinike za urologiju KBC Sestre milosrdnice kao i Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo. U istraživanju se nisu koristili osobni podaci koji bi otkrili identitet ili ugrozili privatnost bolesnika. Svaki bolesnik je dobio jedinstveni broj kojim je uključen u istraživanje, a pravi identitet ispitanika, radi zaštite osobnih podataka bolesnika, je poznat samo istraživačima. Klinički podaci o bolesnicima, podaci o patohistološkom nalazu i podaci o praćenju bolesnika dostupni su u arhivi bolesnika i bazama podataka Klinike za urologiju i Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, KBC Sestre milosrdnice. Period praćenja kliničko-patoloških obilježja bolesnika, poput ishoda liječenja i preživljenja, bio je u najkraćem trajanju od jedne godine.

Analizom snage testa za Fisherov egzaktni test je u tijeku pripreme istraživanja pretpostavljena razlika da će TIGIT, LAG-3 i PD-L1 ligandi biti značajno izraženiji kod luminalnog podtipa MIBC i to za 40%, uz razinu značajnosti  $\alpha = 0.05$  te snagu testa od 80 %. Analiza je pokazala kako je u istraživanje potrebno uključiti najmanje 28 ispitanika po skupini. Analiza snage testa je provedena je pomoću MedCalcR Statistical Software version 20.007 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2021). Stoga je u istraživanje uključeno 31 uzorak luminalnog podtipa MIBC i 31 uzorak bazalnog podtipa MIBC.

## 4.2. METODE

Klinički podaci o ispitanicima preuzeti su iz osobnih kartona bolesnika u Klinici za urologiju, a podaci o prethodnoj patohistološkoj analizi preuzeti su iz kompjutorizirane baze podataka Kliničkog zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“, KBC Sestre Milosrdnice. Iz istog zavoda su preuzeti FFPE (od engl. *formalin fixed paraffin-embedded*) blokovi tkiva transuretralne resekcije. Tkivo resekcije obrađeno je standardnom histološkom obradom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10 % puferiranom formalinu odmah po resekciji, dehidriranje u uzlaznom nizu alkohola, uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 µm, deparafiniziranje u ksilolu i bojenje standardnom metodom hemalaun eozin (HE). Pregledano je po 5 HE prereza za svakog ispitanika, potvrđena je dijagnoza MIBC, urotelnog karcinoma te je izabran odgovarajući parafinski blok za daljnju imunohistokemijsku analizu. Analiza je provedena na parafinskom bloku koji sadrži minimalno 10 uzoraka TURBT tkiva unutar kojeg karcinoma tkivo čini minimalno 50 % uzoraka. Uz tumorsko tkivo u uzorcima je bila prisutna i sluznica uredne građe, s održanim urotelom na površini.

Podjela na molekularne podtipove učinjena je temeljem imunohistokemijske analize markera CK 5/6 (DAKO IR78061-2) i GATA3 (Ventana L50-823). Kao pozitivna kontrola korišteno je tkivo kože za CK 5/6 i tkivo urotelnog karcinoma niskog gradusa za GATA3. Luminalni molekularni podtip podrazumijevao je karcinome čiji je imunoprofil pokazivao pozitivnu ekspresiju GATA3 u najmanje 70 % tumorskih stanica i negativnu reakciju na CK 5/6 (uz dozvoljeno bojanje bazalnih stanica). Bazalni molekularni podtip podrazumijevao je karcinome čiji je imunoprofil pokazivao pozitivnu ekspresiju CK 5/6 u najmanje 70 % tumorskih stanica, uz negativnu reakciju na GATA3. Karcinomi negativnog imunoprofila na GATA3 i CK 5/6 ili dvojbene morfologije i imunoreakcije isključeni su iz ovog istraživanja obzirom da se radi o nekom od preostalih molekularnih podtipova, a koji nisu predmet ovog istraživanja.

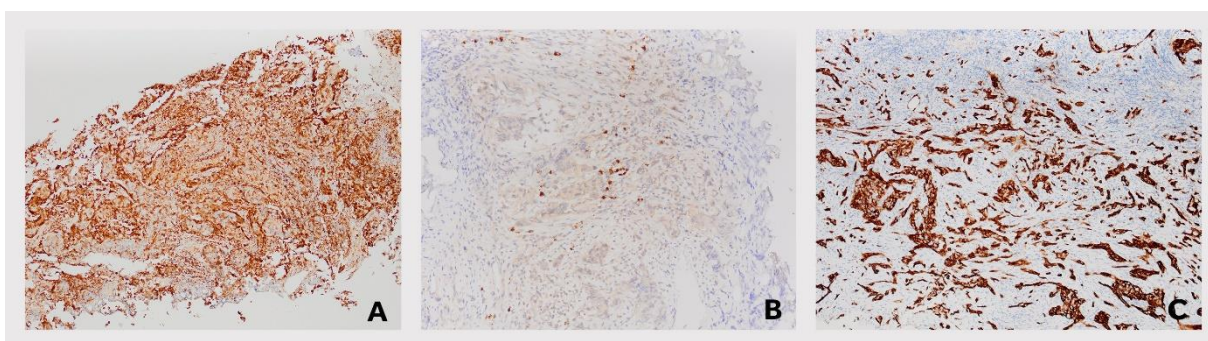
Za imunohistokemijsku analizu istraživanih liganada korištena su slijedeća protutijela: anti-TIGIT (ABCAM BLR047F), LAG-3 (Sigma-Aldrich HPA013967) i PD-L1 (Ventana SP142). Imunohistokemijska analiza za navedena protutijela učinjena je indirektnom ABC tehnikom, LSAB metodom (od engl. *labeled streptavidin - biotin*) kao vizualizacijskim sistemom na Dako TechMate TM i Ventana automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaze (engl. *Microwave Streptavidin ImmunoPeroxidase*, MSIP)



protokola prema preporuci proizvođača. Korištene su preporučene pozitivne kontrole: tonzila (za PD-L1), limfni čvor (za TIGIT i LAG-3) te negativna kontrola procesa, prema preporuci proizvođača.

Tumor je pregledan u cijelosti na HE i potom na imunohistokemijski obojanim preparatima na malom povećanju mikroskopa (40x), a zatim i na imunohistokemijski bojanim preparatima na velikom povećanju mikroskopa (200x i 400x). Imunohistokemijska reakcija na sva protutijela određena je semikvantitativno, određujući postotak pozitivnih epitelnih tumorskih stanica te postotak pozitivnih upalnih stanica u tumorskoj i peritumorskoj stromi.

Obrazac bojanja TIGIT i LAG-3 u epitelnim stanicama tumora odnosio se na smeđu pozitivnu reakciju u citoplazmi i membrani (Slika 10 A i B). Obrazac bojanja PD-L1 u epitelnim stanicama označavao je smeđu pozitivnu reakciju membrane (Slika 10 C).



**Slika 10.** Imunohistokemijska analiza: A; reakcija na TIGIT, umjereno jak intenzitet bojanja epitela, uz jak intenzitet bojanja upalnih stanica (TIGITx100), B; reakcija na LAG-3, blag intenzitet bojanja epitelnih stanica, uz umjeren intenzitet bojanja upalnih stanica (LAG-3x200), C; reakcija na PD-L1, jak intenzitet bojanja epitela, bez reakcije upalnih stanica (PD-L1x100).

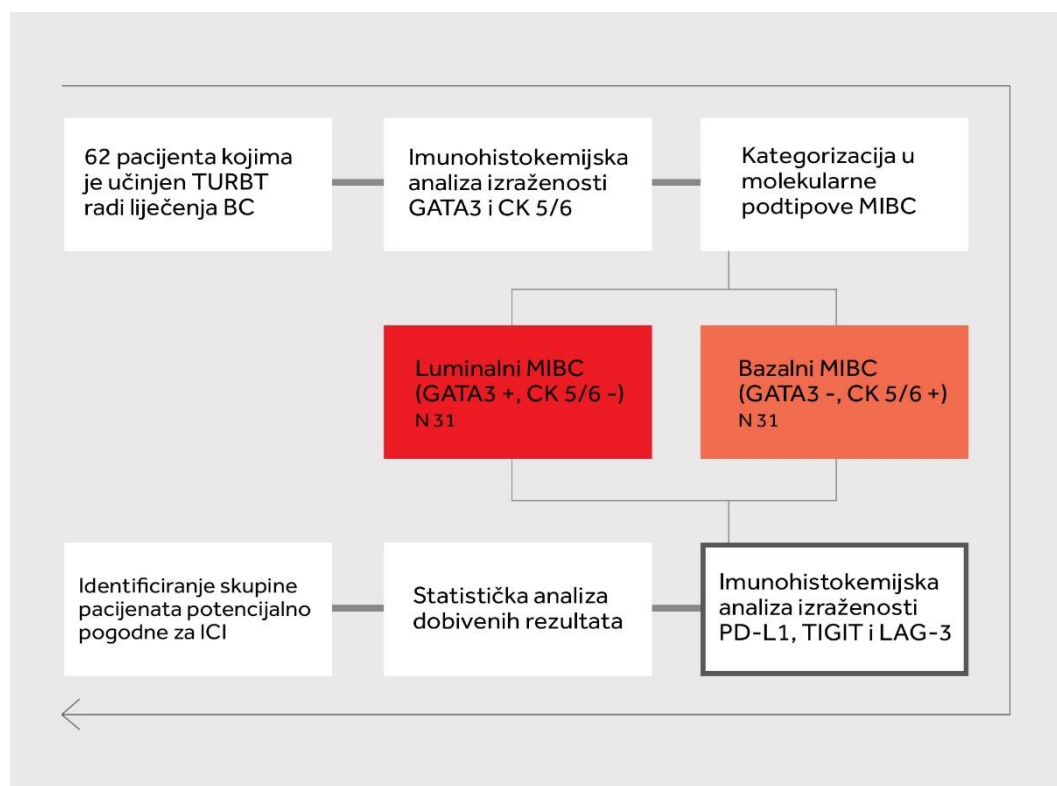
Određen je intenzitet bojanja kako slijedi: 1. slab intenzitet (vrlo slabo, jedva uočljivo, smečkasto obojenje), 2. umjeren intenzitet (jasno vidljivo smeđe bojanje) i 3. jak intenzitet (tamno smeđe bojanje). Uz intenzitet određen je i apsolutni postotak pozitivnih stanica unutar sveukupnog broja tumorskih stanica na pregledanom prerezu.

Obrazac bojanja TIGIT, LAG-3 i PD-L1 u upalnim stanicama (limfocitima i plazma stanicama) odnosio se na smeđu, sitno-zrnatu pozitivnu reakciju citoplazme. Reakcija je procijenjena samo

u upalnim stanicama neposredno uz tumor (peritumorska stroma) i unutar tumora (intratumorska stroma).

Određen je intenzitet bojanja kao i kod epitelne komponente tumora: slab, umjeren i jak intenzitet. Udio pozitivnih stanica odnosio se na udio nakupina pozitivnih stanica unutar procijenjene peri/intratumorske strome. Obrazac bojanja najčešće je uključivao manje nakupine limfocita, rjeđe difuzno rasprostranjene infiltrate (Slika 10). Pozitivna reakcija na istraživane ligande je podrazumijevala sve vrijednosti veće ili jednake 5 %. Učinjena je i analiza reakcije navedenih liganada u uzorcima uredne sluznice, odnosno u održanom urotelu.

Sažeti dijagram toka studije prikazan je na Slici 11.



**Slika 11.** Dijagram toka studije. (TURBT (engl. *transurethral resection of bladder tumor*) - transuretralna resekcija tumora mokraćnog mjehura; BC (engl. *bladder cancer*) – karcinom mokraćnog mjehura; GATA3 (engl. *transcription factor that recognizes G-A-T-A nucleotide sequences*) - transkripcijski faktor koji prepoznaje G-A-T-A nukleotidne sekvence; CK (engl. *cytokeratin*), MIBC (engl. *muscle invasive bladder cancer*) - mišićno invazivni karcinom mokraćnog mjehura; PD-L1 (engl. *programmed death ligand -1*) - ligand programirane stanične smrti – 1; TIGIT (engl. *T-cell immunoglobulin with ITIM domain*) – T- stanični imunoglobulin

s ITIM domenom; LAG-3 (engl. *lymphocyte activation gene 3*) – limfocitni aktivacijski gen 3; ICI (engl. *immune checkpoint inhibition*) – inhibicija imunskih nadzornih točaka).

### 4.3. STATISTIČKA ANALIZA

Podaci su prikazani tablično i grafički. Napravljena je analiza normalnosti raspodjele numeričkih podataka (Smirnov-Kolmogorovljev test) te su se shodno dobivenim rezultatima primijenili odgovarajući neparametrijski statistički testovi. Kvantitativni podaci su prikazani kroz medijane i interkvartilne raspone. Kategorijski podaci su prikazani kroz apsolutne frekvencije i pripadajuće udjele. Razlike u kvantitativnim vrijednostima su analizirane Mann-Whitney U testom kod razlika koje su se odnosile na usporedbu kontinuiranih vrijednosti između dviju skupina. Razlike u kategorijskim varijablama su analizirane Fisherovim egzaktnim testom u slučajevima usporedbi formata 2x2, odnosno Fisher-Freeman-Haltonovim egzaktnim testom kada su se uspoređivali formati tablica 2x3 ili veći. Korelacijska analiza je provedena pomoću Kendalovih tau<sub>b</sub> korelacijskih koeficijenata. Analiza preživljenja prikazana je Kaplan-Meierovom krivuljom s pripadajućim log-rank testom.

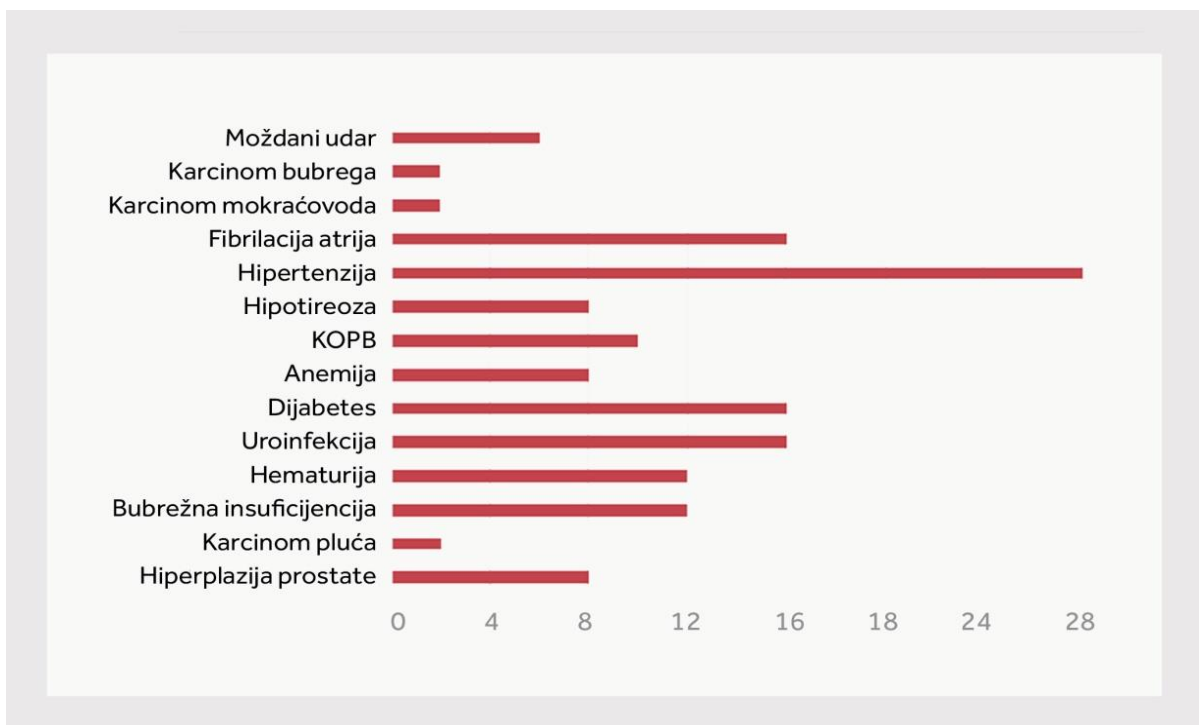
Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnima. U analizi je korištena programska podrška IBM SPSS Statistics for Windows, verzija 29.0.1.

## 5. REZULTATI

Istraživanje imunohistokemijske izraženosti biomarkera TIGIT, LAG-3 i PD-L1 provedeno je na 62 uzorka mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura. U Tablici 6 su prikazane osnovne karakteristike istraživane skupine pacijenata.

**Tablica 6.** Značajke pacijenata i inicijalni stadij bolesti pacijenata s mišićno-invazivnim karcinomom mokraćnog mjehura uključenih u istraživanje.

		Broj slučajeva	(%)
<b>Dob pacijenata (godine)</b>	Medijan 67 (49-85)		
<b>Spol pacijenata</b>	Ženski	15	24,19 %
	Muški	47	75,81 %
<b>ECOG</b>	0	30	48,39 %
	1	16	25,81 %
	2	14	22,58 %
	3	2	3,23 %
<b>Pušač</b>	Ne	21	33,87 %
	Da	41	66,13 %
<b>Fokalnost</b>	Unifokalan	56	90,32 %
	Multifokalan	6	9,68 %
<b>Inicijalni TN</b>	T2N0	38	61,29 %
	T2N1	7	11,29 %
	T2N2	2	3,23 %
	T3N0	3	4,84 %
	T3N1	2	3,23 %
	T3N2	2	3,23 %
	T3N3	5	8,06 %
	T4aN0	1	1,61 %
	T4N1	1	1,61 %
	T4N2	1	1,61 %
<b>Inicijalni stadij</b>	II	40	64,52 %
	IIIA	12	19,35 %
	IIIB	10	16,13 %



**Slika 12.** Najčešći komorbiditeti i simptomi pacijenata uključenih u istraživanje (KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest).

Prosječna starost pacijenata uključenih u istraživanje bila je 70 godina s medijanom od 67 godina (u rasponu od 49 do 85). Raspodjela zastupljenosti muškaraca naspram žena unutar skupine, iznosi 75,81 % prema 24,19 %, što odgovara očekivanoj epidemiološkoj spolnoj raspodjeli za BC. Opći status pacijenata prema ECOG skali (od engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*) kod gotovo polovice pacijenta je bio u cijelosti uredan. Najčešća komorbidna stanja uključivala su arterijsku hipertenziju, srčana oboljenja, dijabetes i uroinfekcije (Slika 12). Sagledavajući navike pacijenata, pušača je bilo 66,13 %, a nepušača 33,87 %. Analizom karakteristika BC, bolest je bila unifokalna kod čak 90 % pacijenata. Inicijalna procjena proširenosti MIBC bolesti kod 61,29 % pacijenata je odgovarala T2 stadiju bez pozitivnih LN.

**Tablica 7.** Liječenje i ishodi liječenja pacijenata uključenih u istraživanje (RC (engl. *radical cystectomy*) – radikalna cistektomija, TMT (engl. *trimodal treatment*) – trimodalno liječenje, TURBT (engl. *transurethral resection of bladder tumor*) - transuretralna resekcija tumora mokraćnog mjehura).

		Broj slučajeva	(%)
<b>Definitivno kirurško liječenje</b>	RC	33	53.23 %
	TMT	7	11.29 %
	TURBT	22	35.48 %
<b>Neoadjuvantna kemoterapija</b>	Ne	47	75.81 %
	Da	15	24.19 %
<b>Adjuvantna kemoterapija</b>	Ne	56	90.32 %
	Da	6	9.68 %
<b>Adjuvantna radioterapija</b>	Ne	58	93.55 %
	Da	4	6.45 %
<b>Trimodalno liječenje</b>	Ne	54	87.10 %
	Da	8	12.90 %
<b>Primarna radioterapija</b>	Ne	48	77.42 %
	Da	14	22.58 %
<b>Lokalni recidiv</b>	Ne	42	67.74 %
	Da	20	32.26 %
<b>Reginalni recidiv</b>	Ne	44	70.97 %
	Da	18	29.03 %
<b>Sistemska bolest</b>	Ne	36	58.06 %
	Da	26	41.94 %
<b>Ishod (smrt)</b>	Živ	35	56.45 %
	Mrtav	27	43.55 %

Za ovo istraživanje značajan je bio inicijalni TURBT, kao i patohistološka i imunohistokemijska analiza uzoraka dobivenih primarnom resekcijom. No kod svih pacijenata je u daljnjem tijeku provedeno dodatno liječenje izuzev inicijalnog TURBT (Tablica 7). Radilo se o daljnjem individualno prilagođenom liječenju koje je uključivalo RC kod 53,23 % pacijenata. NAC je primijenjena kod 24,19 %, a adjuvantna RT kod svega 9,68 % pacijenata. Mala stopa primjene KT odgovara prethodno prezentiranim podacima iz literature i već spomenutom malom broju pacijenata pogodnih za ovu terapiju, što ostavlja mogućnost imunoterapiji kao opciji liječenja. Primarnu RT primilo je 22,58 % pacijenata, a 12,90 % je uključeno u trimodalni pristup liječenja prezervacijom mokraćnog mjehura. Unatoč svim terapijskim opcijama BC je sklon recidiviranju. Lokalni recidiv je detektiran u 32,26 %, regionalni u 29,03 % slučajeva, dok je sistemsku bolest imalo 41,94 % pacijenata. Ukupno preživljenje u našem istraživanju iznosi 56,45 %. Od 62 pacijenta, njih 27 (43,55 %) je umrlo.

**Tablica 8.** Razlike u kategorijskim kliničkim varijablama između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

		Molekularni podtip				P
		Bazalni		Luminalni		
		N	%	N	%	
<b>Spol</b>	Muški	25	80,6 %	22	71,0 %	0,374
	Ženski	6	19,4 %	9	29,0 %	
<b>ECOG</b>	0	18	58,1 %	12	38,7 %	0,291
	1	7	22,6 %	9	29,0 %	
	2	6	19,4 %	8	25,8 %	
	3	0	0,0 %	2	6,5 %	
<b>Ishod (smrt)</b>	Živ	19	61,3 %	16	51,6 %	0,442
	Mrtav	12	38,7 %	15	48,4 %	
<b>Pušač</b>	Ne	11	35,5 %	10	32,3 %	0,788
	Da	20	64,5 %	21	67,7 %	
<b>Fokalnost</b>	Unifokalan	29	93,5 %	27	87,1 %	0,390
	Multifokalan	2	6,5 %	4	12,9 %	
<b>Inicijalni TN1</b>	T2N0	21	67,7 %	17	54,8 %	0,498
	T2N1	4	12,9 %	3	9,7 %	
	T2N2	1	3,2 %	1	3,2 %	
	T3N0	0	0,0 %	3	9,7 %	
	T3N1	1	3,2 %	1	3,2 %	
	T3N2	1	3,2 %	1	3,2 %	
	T3N3	1	3,2 %	4	12,9 %	
	T4aN0	0	0,0 %	1	3,2 %	
	T4N1	1	3,2 %	0	0,0 %	
	T4N2	1	3,2 %	0	0,0 %	
<b>Inicijalni stadij</b>	II	23	74,2 %	17	54,8 %	0,268
	IIIA	4	12,9 %	8	25,8 %	
	IIIB	4	12,9 %	6	19,4 %	

Razlike u kategorijskim kliničkim varijablama između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC prikazane su u Tablici 8 i 9. Nisu zabilježene statistički značajne razlike između ispitivanih skupina.

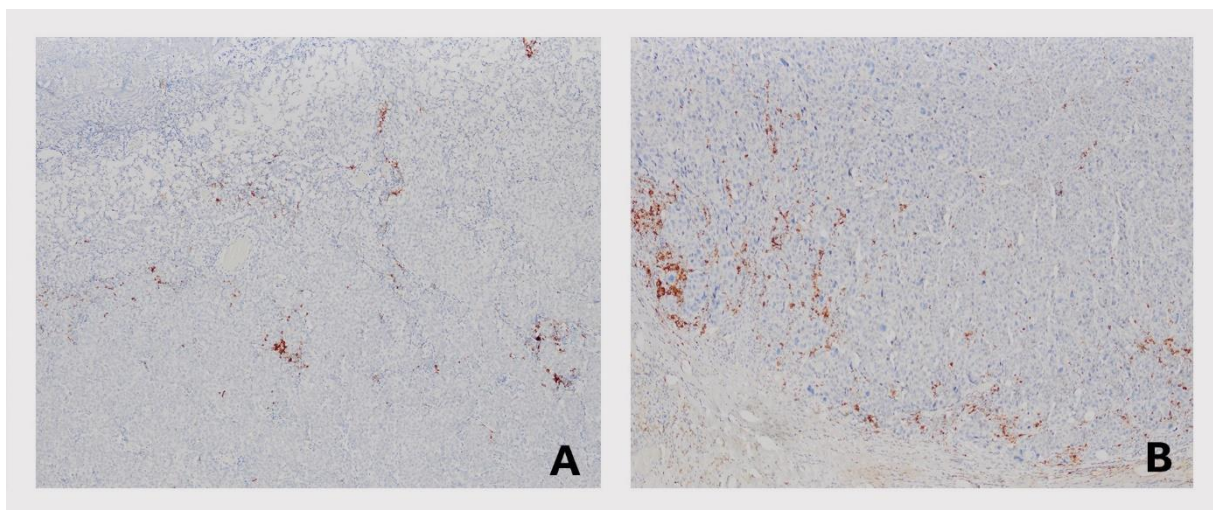


**Tablica 9.** Razlike u kategorijskim kliničkim varijablama između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura, s naglaskom na terapijske opcije i ishode liječenja (RC (engl. *radical cystectomy*) – radikalna cistektomija, TMT (engl. *trimodal treatment*) – trimodalno liječenje, TURBT (engl. *transurethral resection of bladder tumor*) - transuretralna resekcija tumora mokraćnog mjehura).

		Molekularni podtip				P
		Bazalni		Luminalni		
		N	%	N	%	
<b>Definitivno kirurško liječenje</b>	RC	18	58,1 %	15	48,4 %	0,202
	TMT	5	16,1 %	2	6,5 %	
	TURBT	8	25,8 %	14	45,2 %	
<b>Neoadjuvantna kemoterapija</b>	Ne	25	80,6 %	22	71,0 %	0,374
	Da	6	19,4 %	9	29,0 %	
<b>Adjuvantna kemoterapija</b>	Ne	28	90,3 %	28	90,3 %	1,000
	Da	3	9,7 %	3	9,7 %	
<b>Adjuvantna radioterapija</b>	Ne	28	90,3 %	30	96,8 %	0,301
	Da	3	9,7 %	1	3,2 %	
<b>Trimodalno liječenje</b>	Ne	26	83,9 %	28	90,3 %	0,449
	Da	5	16,1 %	3	9,7 %	
<b>Primarna radioterapija</b>	Ne	26	83,9 %	22	75,9 %	0,138
	Da	5	16,1 %	7	24,1 %	
<b>Lokalni recidiv</b>	Ne	22	71,0 %	20	64,5 %	0,587
	Da	9	29,0 %	11	35,5 %	
<b>Reginalni recidiv</b>	Ne	23	74,2 %	21	67,7 %	0,576
	Da	8	25,8 %	10	32,3 %	
<b>Sistemska bolest</b>	Ne	19	61,3 %	17	54,8 %	0,607
	Da	12	38,7 %	14	45,2 %	

## 5.1. PD-L1

Imunohistokemijska izraženost PD-L1 analizirana je u luminalnom i bazalnom podtipu MIBC (Slika 13).



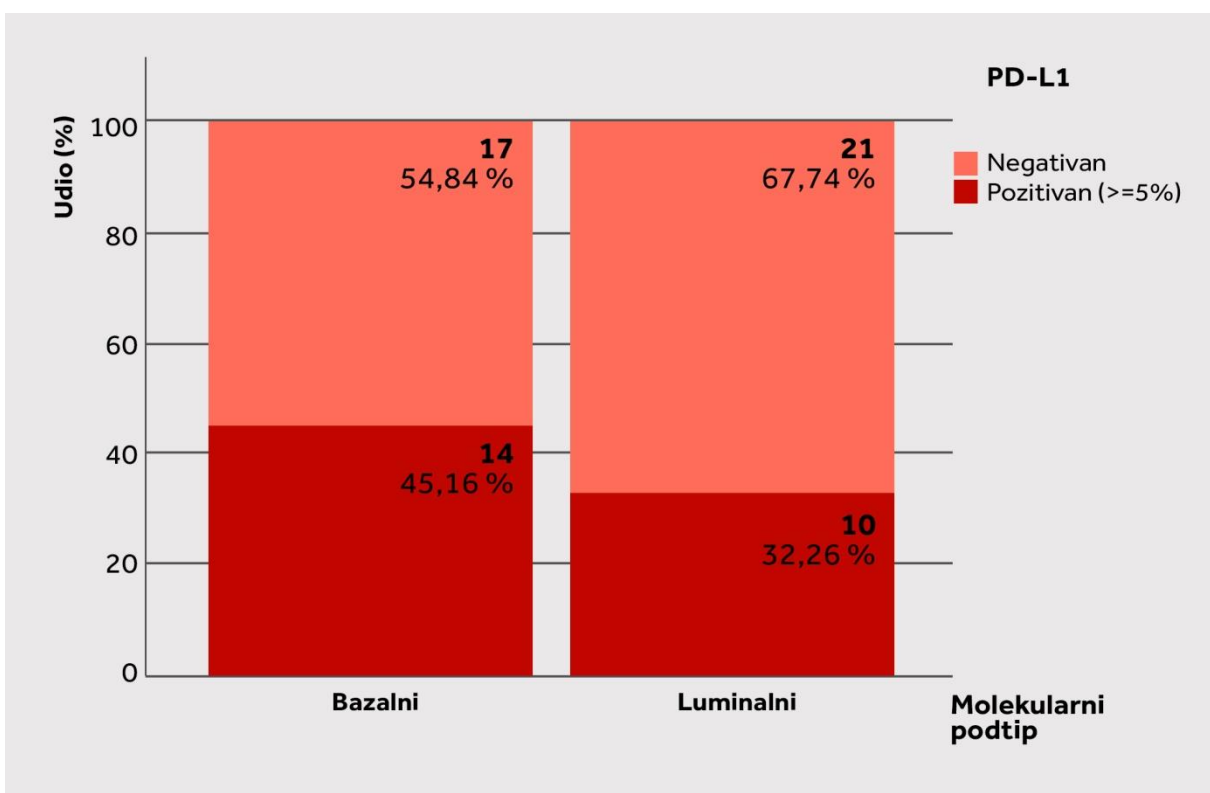
**Slika 13.** Imunohistokemijska izraženost PD-L1 (A; manje nakupine PD-L1 pozitivnih limfocita unutar tumora (x100), B; veće folikularne nakupine PD-L1 pozitivnih limfocita smještene pretežno na periferiji tumora (x100)).

Razlike u izraženosti PD-L1 između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC prikazane su u Tablici 10 i na Slici 14. Zabilježena je izraženost PD-L1 u epitelnim stanicama tumora kod dijela pregledanih pacijenata i to u 45,16 % bazalnih te 32,26 % luminalnih MIBC. Nije bilo statistički značajnih razlika u izraženosti PD-L1 između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC.

Raspon pozitivnosti PD-L1 seao je od 5 % do 20 %. U pojedinim MIBC zamijećena je izrazita pozitivna reakcija u samim epitelnim tumorskim stanicama (> 10 % pozitivnih stanica). Opisana reakcija je zamijećena u 9,3 % sveukupnih slučajeva, uglavnom u bazalnim podtipovima.

**Tablica 10.** Razlike u izraženosti PD-L1 između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

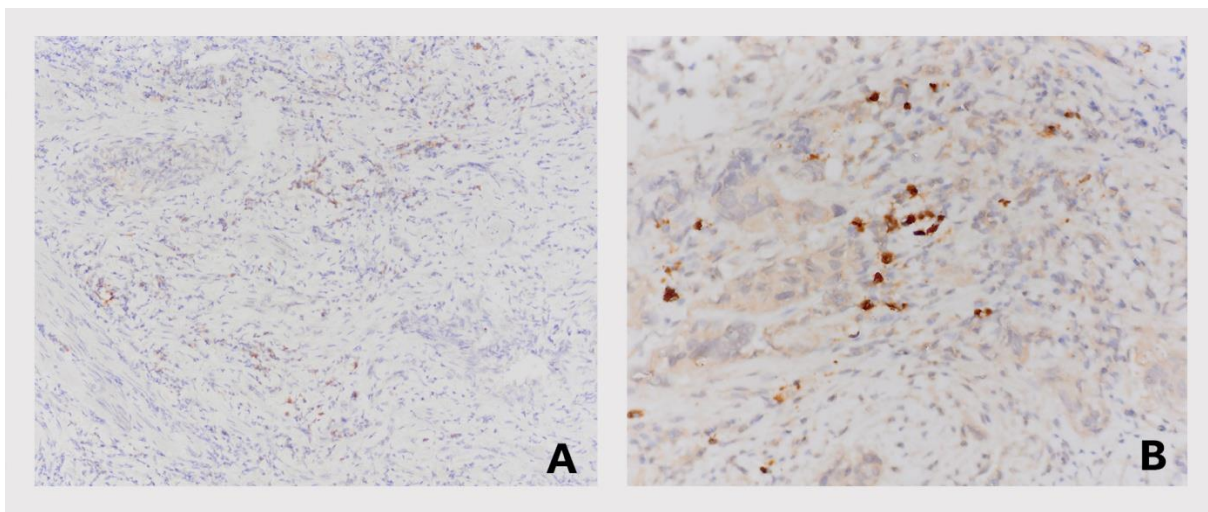
		Molekularni podtip				P
		Bazalni		Luminalni		
		N	%	N	%	
<b>PD-L1</b>	Negativan	17	54,8 %	21	67,7 %	0,297
	Pozitivan (>=5%)	14	45,2 %	10	32,3 %	



**Slika 14.** Razlike u izraženosti PD-L1 između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

## 5.2. LAG-3

Imunohistokemijska izraženost LAG-3 analizirana je u upalnim stanicama tumorske i peritumorske strome, kao i epitelnim stanicama tumora luminalnog i bazalnog podtipa MIBC (Slika 15).

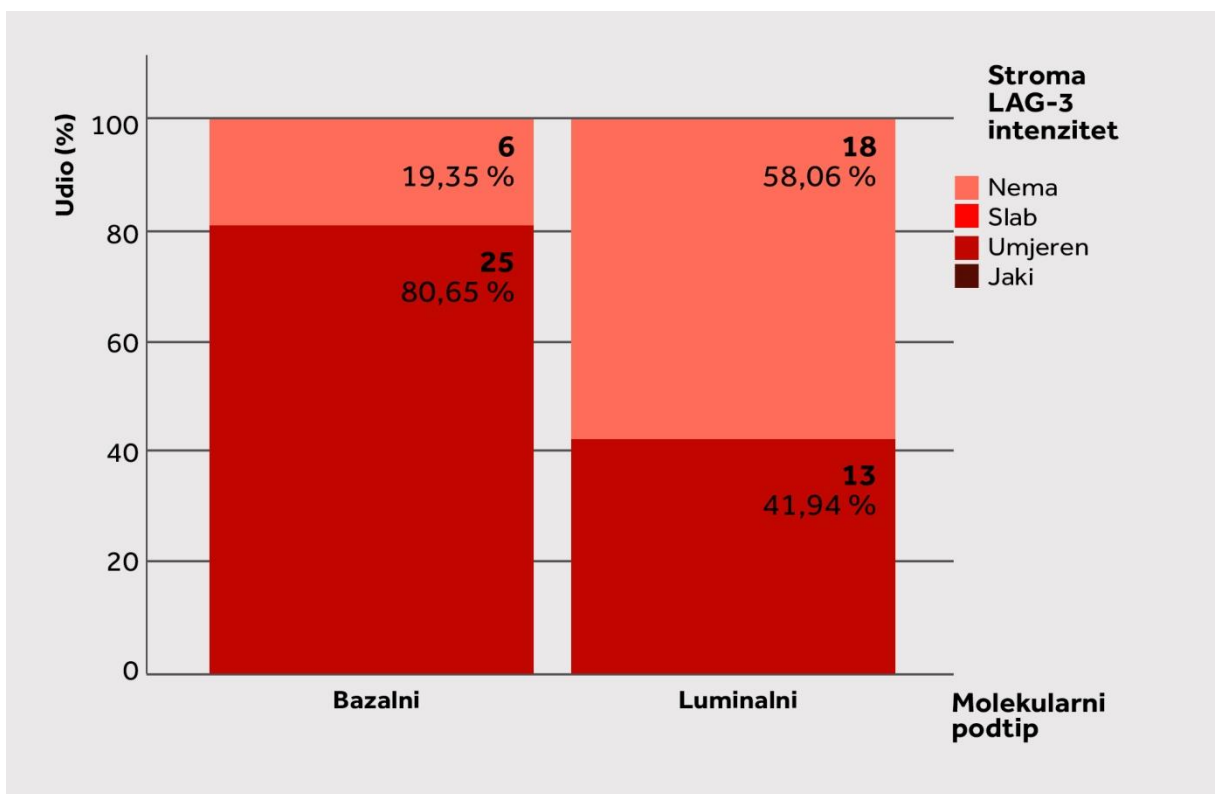


**Slika 15.** Imunohistokemijska izraženost LAG-3: A; nakupine pojedinačnih LAG-3 pozitivnih limfocita unutar tumora (x200), B; manje nakupine LAG-3 pozitivnih limfocita unutar tumora (x400).

Razlike u intenzitetu LAG-3 u stromi između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC prikazane su u Tablici 11 i na Slici 16. U pregledanim uzorcima oba molekularna podtipa u slučaju pozitivne reakcije zamijećen je umjeren intenzitet. Slab i jaki intenzitet nisu zabilježeni niti u jednom slučaju. Zabilježene su statistički značajne razlike između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC ( $P=0,002$ ) – u bazalnom molekularnom podtipu najzastupljeniji je bio umjereni intenzitet (80,6 %), dok je u luminalnom podtipu bio najzastupljeniji negativan nalaz (58,1 %).

**Tablica 11.** Razlike u intenzitetu LAG-3 u stromi između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

		Molekularni podtip				P
		Bazalni		Luminalni		
		N	%	N	%	
<b>Stroma LAG-3 intenzitet</b>	Nema	6	19,4 %	18	58,1 %	0,002
	Slab	0	0,0 %	0	0,0 %	
	Umjeren	25	80,6 %	13	41,9 %	
	Jaki	0	0,0 %	0	0,0 %	

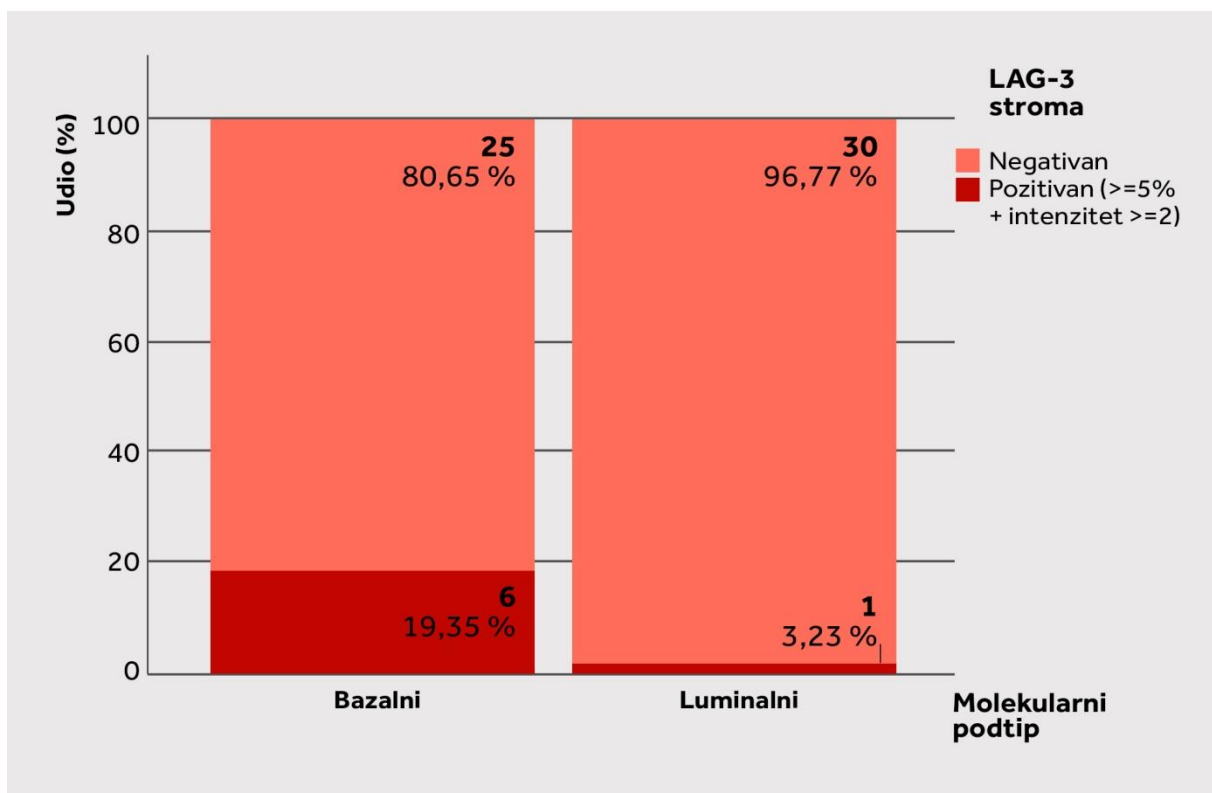


**Slika 16.** Razlike u intenzitetu LAG-3 u stromi između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

Razlike u izraženosti LAG-3 u stromi između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa karcinoma mokraćnog mjehura prikazane su u Tablici 12 i na Slici 17. Udio pozitivnih stanica u stromi sezao je od minimalnih 5 % do maksimalnih 10 %.

**Tablica 12.** Razlike u izraženosti LAG-3 u stromi između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

		Molekularni podtip				P
		Bazalni		Luminalni		
		N	%	N	%	
<b>LAG-3 stroma</b>	Negativan	25	80,6 %	30	96,8 %	0,045
	Pozitivan (>=5% + intenzitet >=2)	6	19,4 %	1	3,2 %	

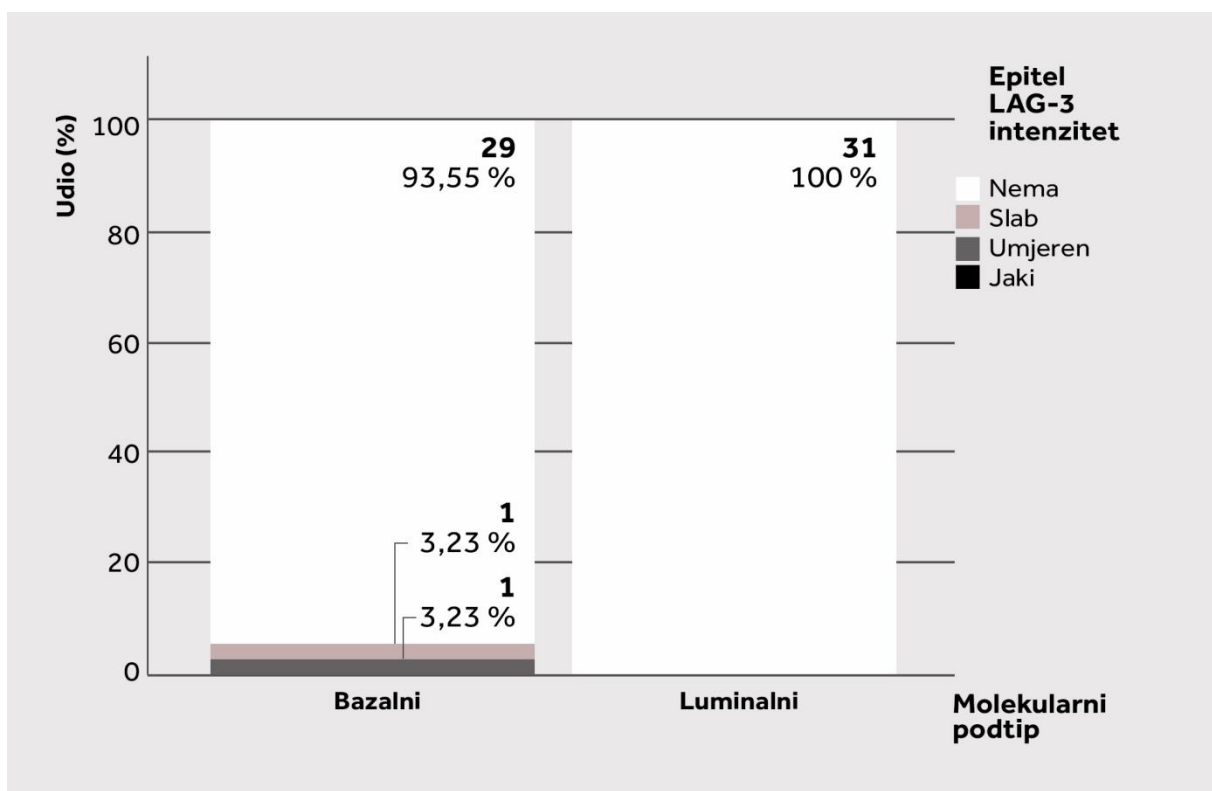


**Slika 17.** Razlike u intenzitetu LAG-3 u stromi između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

U bazalnom molekularnom podtipu zamijećena je statistički značajno veća pozitivna izraženost u odnosu na luminalni podtip: 19,4 % naprema 3,2 %, P=0,045.

**Tablica 13.** Razlike u intenzitetu LAG-3 u epitelu između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

		Molekularni podtip				P
		Bazalni		Luminalni		
		N	%	N	%	
<b>Epitel LAG-3 intenzitet</b>	Nema	29	93,5 %	31	100,0 %	0,356
	Slab	1	3,2 %	0	0,0 %	
	Umjeren	1	3,2 %	0	0,0 %	
	Jaki	0	0,0 %	0	0,0 %	



**Slika 18.** Razlike u intenzitetu LAG-3 u epitelu između bazalnog i luminalnog mišićno-invazivnog molekularnog podtipa karcinoma mokraćnog mjehura.

Razlike u intenzitetu LAG-3 u epitelu između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC prikazane su u Tablici 13 i na Slici 18. Kod analiziranih uzoraka nađene su samo dvije reakcije kod bazalnog podtipa, jedna slabog i jedna umjerenog intenziteta. Nije nađeno statistički značajnih razlika u intenzitetu LAG-3 između molekularnih podtipova (P=0,356).

**Tablica 14.** Razlike u izraženosti LAG-3 u epitelu između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

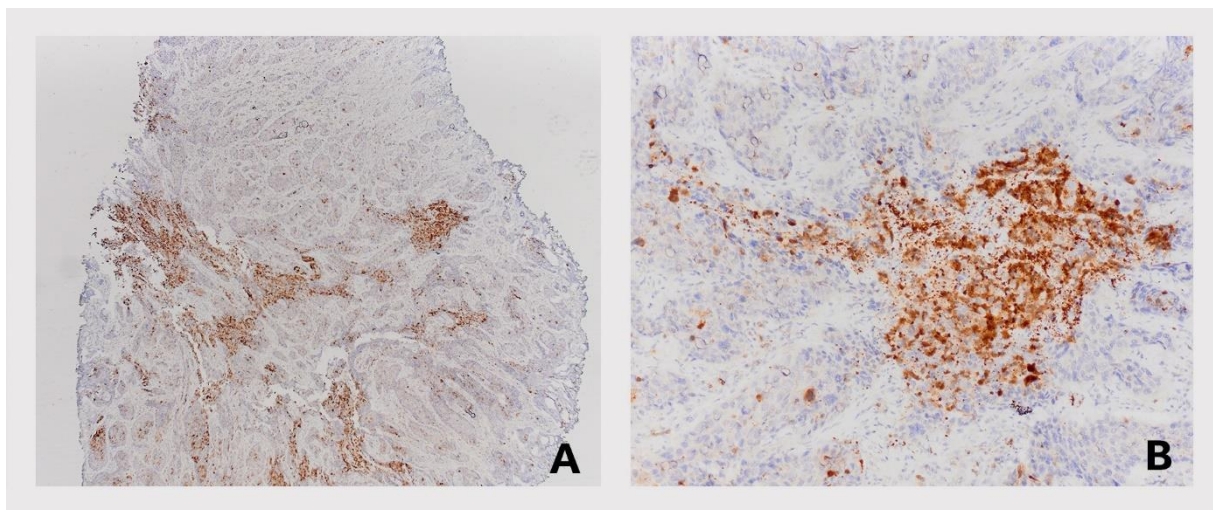
		Molekularni podtip				P
		Bazalni		Luminalni		
		N	%	N	%	
<b>LAG-3 epitel</b>	Negativan	31	100,0 %	31	100,0 %	na
	Pozitivan (>=5% + intenzitet >=2)	0	0,0 %	0	0,0 %	

Razlike u izraženosti LAG-3 u epitelu između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC prikazane su u Tablici 14. LAG-3 je bio negativan u svim slučajevima u našoj kohorti.



### 5.3. TIGIT

Imunohistokemijska izraženost TIGIT liganda analizirana je u epitelnim stanicama luminalnog i bazalnog podtipa MIBC kao i u upalnim stanicama tumorske i peritumorske strome (Slika 19).

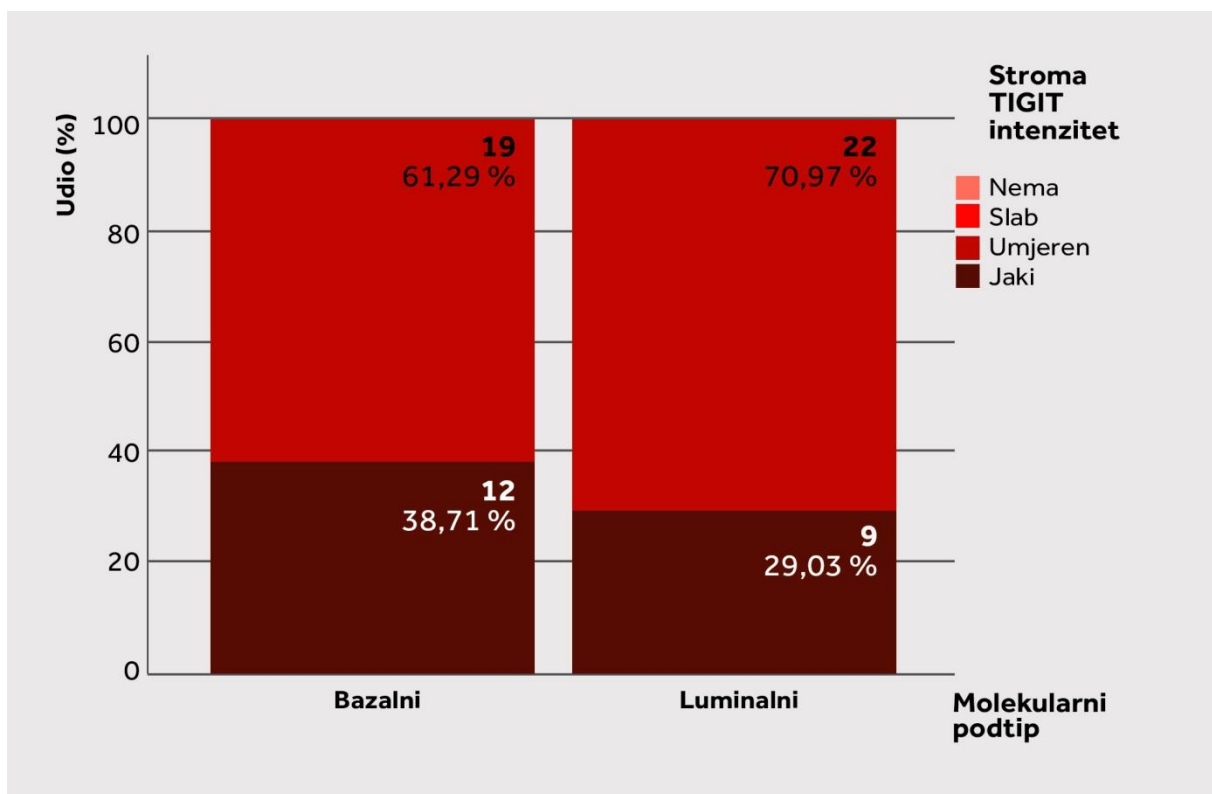


**Slika 19.** Imunohistokemijska izraženost TIGIT: A; obrazac nakupina TIGIT pozitivnih limfocita unutar tumora i u peritumorskoj stromi (x40), B; veće nakupine TIGIT pozitivnih limfocita unutar tumora (x400).

**Tablica 15.** Razlike u intenzitetu TIGIT u stromi između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

		Molekularni podtip				P
		Bazalni		Luminalni		
		N	%	N	%	
<b>Stroma TIGIT intenzitet</b>	Nema	0	0,0 %	0	0,0 %	0,421
	Slab	0	0,0 %	0	0,0 %	
	Umjeren	19	61,3 %	22	71,0 %	
	Jaki	12	38,7 %	9	29,0 %	

Razlike u intenzitetu TIGIT u upalnim stanicama strome između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC prikazane su u Tablici 15 i na Slici 20. Nije bilo statistički značajnih razlika ( $P=0,421$ ). No u svim pregledanim uzorcima oba podtipa intenzitet pozitivne reakcije u upalnim stanicama je bio prisutan i to barem umjerenog, a u zamjetnom broju i jakog intenziteta.



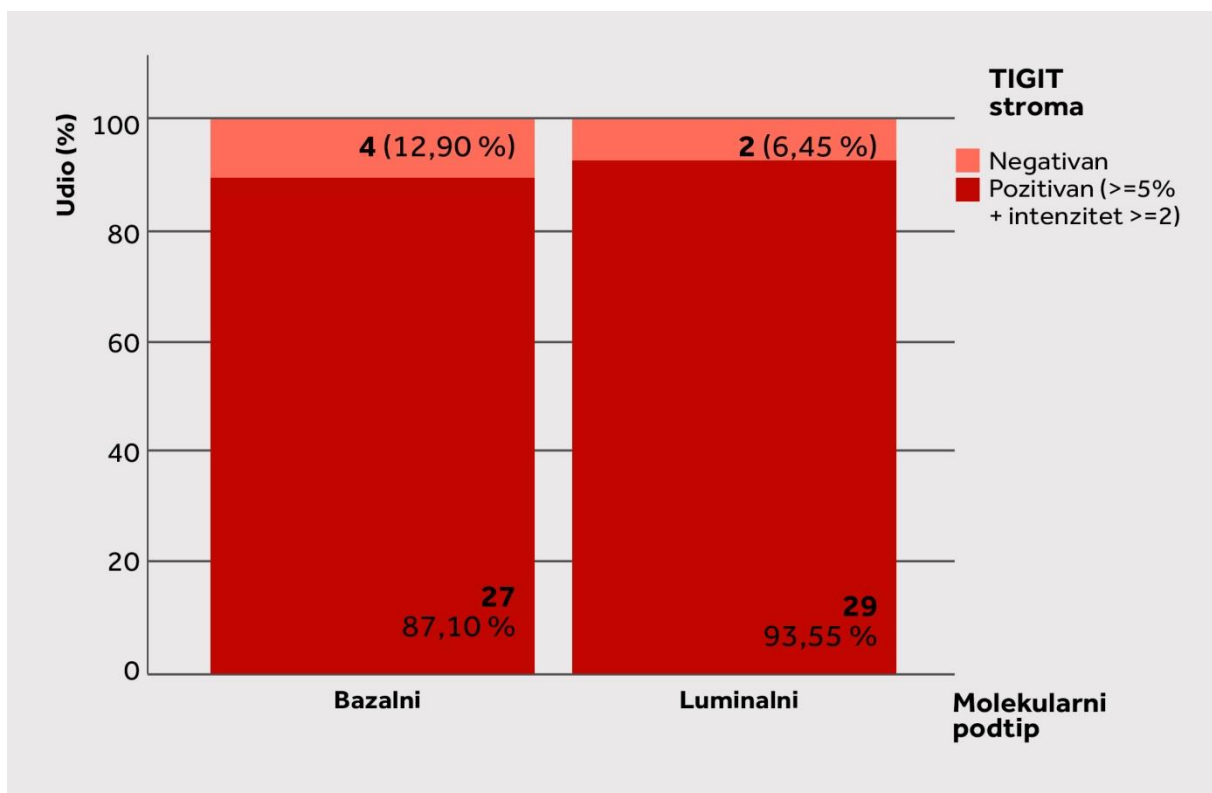
**Slika 20.** Razlike u intenzitetu TIGIT u stromi između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno- invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

Razlike u izraženosti TIGIT u stromi između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC prikazane su u Tablici 16 i na Slici 21. Udio pozitivnih stanica u stromi je iznosio od 5 % do 70 %. Pozitivna reakcija na TIGIT je zamijećena u gotovo svim slučajevima, odnosno u 87,10 % bazalnih i 93,55 % luminalnih MIBC. U malom broju negativnih reakcija (pri udjelu od < 5 % pozitivnih upalnih stanica) također je zamijećena TIGIT prisutnost manje izraženosti. Takva pozitivna izraženost u glavnini slučajeva može sugerirati TIGIT kao potencijalno ciljno

mjesto imunoterapije. Nije bilo statistički značajnih razlika u TIGIT izraženosti kod bazalnog naspram luminalnog MIBC (P=0,390).

**Tablica 16.** Razlike u TIGIT izraženosti u stromi između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

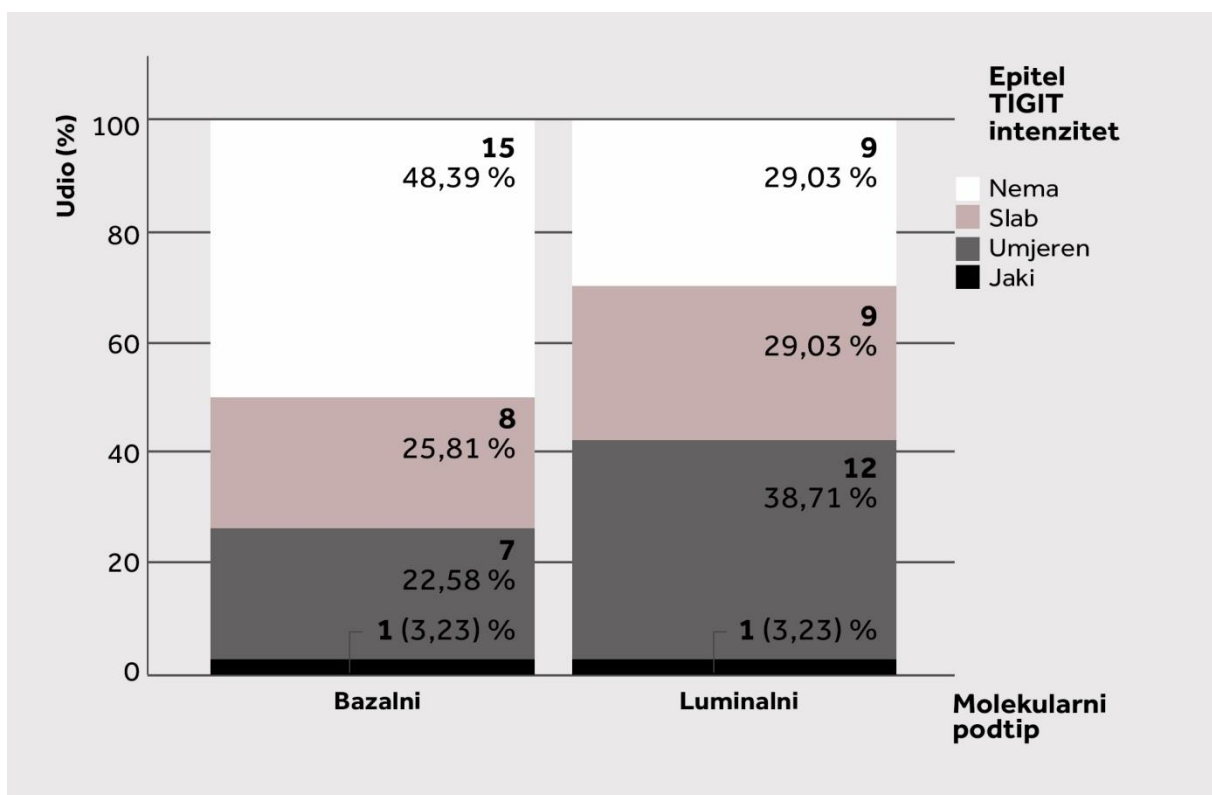
		Molekularni podtip				P
		Bazalni		Luminalni		
		N	%	N	%	
<b>TIGIT stroma</b>	Negativan	4	12,9 %	2	6,5 %	0,390
	Pozitivan (>=5% + intenzitet >=2)	27	87,1 %	29	93,5 %	



**Slika 21.** Razlike u izraženosti TIGIT u stromi između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

**Tablica 17.** Razlike u intenzitetu TIGIT u epitelu između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

		Molekularni podtip				P
		Bazalni		Luminalni		
		N	%	N	%	
<b>Epitel TIGIT intenzitet</b>	Nema	15	48,4 %	9	29,0 %	0,411
	Slab	8	25,8 %	9	29,0 %	
	Umjeren	7	22,6 %	12	38,7 %	
	Jaki	1	3,2 %	1	3,2 %	



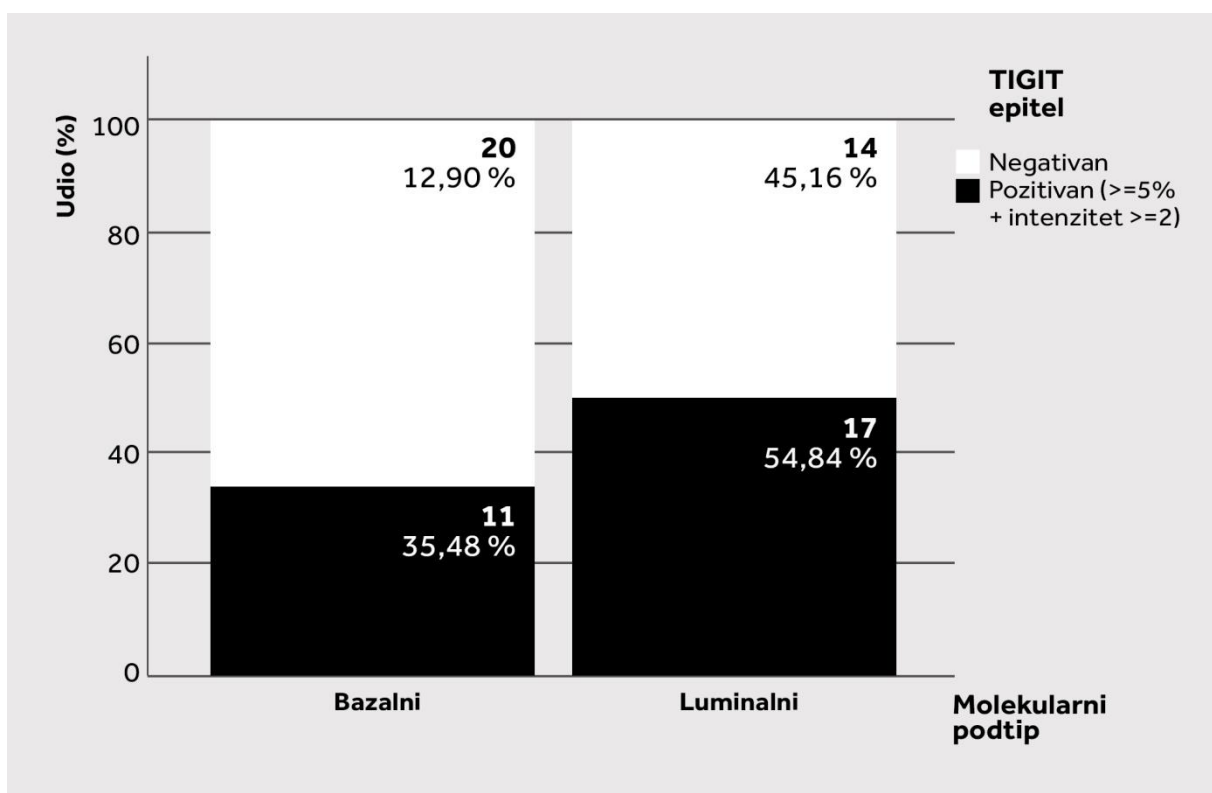
**Slika 22.** Razlike u TIGIT intenzitetu u epitelu između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

Razlike u intenzitetu TIGIT u epitelu između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC prikazane su u Tablici 17 i Slici 22. Nije bilo statistički značajnih razlika između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC (P=0,411). U slučaju pozitivne reakcije

pregledanih uzoraka oba molekularna podtipa MIBC ona je glavninom bila umjerenog ili slabog intenziteta.

**Tablica 18.** Razlike u izraženosti TIGIT u epitelu između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

		Molekularni podtip				P
		Bazalni		Luminalni		
		N	%	N	%	
<b>TIGIT epitel</b>	Negativan	20	64,5 %	14	45,2 %	0,126
	Pozitivan (>=5% + intenzitet >=2)	11	35,5 %	17	54,8 %	



**Slika 23.** Razlike u izraženosti TIGIT u epitelu između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

Razlike u izraženosti TIGIT u epitelu između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC prikazane su u Tablici 18 i na Slici 23. TIGIT je bio pozitivan u epitelu u zamjetnom broju slučajeva i to kod 35,48 % bazalnih i 54,84 % luminalnih MIBC. Nije bilo statistički značajnih razlika između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa ( $P=0,126$ ). Raspon pozitivnih reakcija iznosio je između 5 - 50 % izraženosti.

#### **5.4. Kvantitativne i korelacijske analize**

Razlike u kvantitativnoj izraženosti LAG-3 u stromi i epitelu, TIGIT u stromi te dobi i vremenu praćenja prikazane su u Tablici 19. Statistički značajne razlike ( $P=0,002$ ) su bile prisutne u izraženosti LAG-3 u stromi – značajno veća izraženost bila je u bazalnom podtipu. Kod ostalih varijabli nije bilo značajnih razlika.

**Tablica 19.** Razlike u kvantitativnoj izraženosti LAG-3 u stromi i epitelu, TIGIT u stromi te dobi i vremenu praćenja.

	<b>Molekularni podtip</b>	<b>N</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Centile</b> <b>25. 50. (Medijan) 75.</b>		
Stroma LAG-3 (%)	Bazalni	31	0,00	10,00	1,00	1,00	3,00
	Luminalni	31	0,00	10,00	0,00	0,00	1,00
Stroma TIGIT (%)	Bazalni	31	1,00	70,00	5,00	15,00	30,00
	Luminalni	31	1,00	50,00	5,00	10,00	20,00
Epitel LAG-3 (%)	Bazalni	31	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00
	Luminalni	31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dob (godine)	Bazalni	31	53,00	89,00	63,00	72,00	76,00
	Luminalni	31	54,00	97,00	67,00	77,00	82,00
Vrijeme praćenja (mjeseci)	Bazalni	31	6,07	66,10	17,53	26,53	41,43
	Luminalni	31	5,27	61,33	11,40	27,23	39,57

	<b>Mann-Whitney U</b>	<b>Z</b>	<b>P</b>
Stroma LAG-3 (%)	268,500	-3,166	0,002
Stroma TIGIT (%)	430,000	-0,723	0,470
Epitel LAG-3 (%)	449,500	-1,426	0,154
Dob (godine)	354,500	-1,776	0,076
Vrijeme praćenja (mjeseci)	413,000	-0,951	0,342

Povezanost izraženosti PD-L1 s ostalim promatranim kliničko-patološkim obilježjima prikazana je u Tablici 20. Postoji statistički značajna pozitivna povezanost s intenzitetom LAG-3 u stroma, kao i TIGITom (%) u stroma.

**Tablica 20.** Povezanost izraženosti PD-L1 s ostalim promatranim kliničko-patološkim obilježjima (KK–korelacijski koeficijent).

<b>SVI PACIJENTI</b>		<b>PD-L1 %</b>
<b>Stroma LAG-3 intenzitet</b>	KK	0,315
	P	<b>0,005</b>
	N	62
<b>Stroma LAG-3 (%)</b>	KK	0,240
	P	<b>0,020</b>
	N	62
<b>Stroma TIGIT intenzitet</b>	KK	0,196
	P	0,079
	N	62
<b>Stroma TIGIT (%)</b>	KK	0,211
	P	<b>0,031</b>
	N	62
<b>TIGIT stroma</b>	KK	0,034
	P	0,762
	N	62
<b>Epitel LAG-3 intenzitet</b>	KK	0,068
	P	0,543
	N	62
<b>Epitel LAG-3 (%)</b>	KK	0,068
	P	0,543
	N	62
<b>Ishod (smrt)</b>	KK	0,043
	P	0,702
	N	62
<b>Vrijeme praćenja (mjeseci)</b>	KK	0,030
	P	0,748
	N	62
<b>Dob (godine)</b>	KK	-0,042
	P	0,651
	N	62
<b>Spol</b>	KK	0,007
	P	0,947
	N	62



**Tablica 21.** Povezanost izraženosti LAG-3 u stromi s ostalim promatranim kliničko-patološkim obilježjima (KK–korelacijski koeficijent).

SVI PACIJENTI		Stroma LAG-3 intenzitet	Stroma LAG-3 (%)
<b>Stroma TIGIT intenzitet</b>	KK	0,079	0,077
	P	0,537	0,518
	N	62	62
<b>Stroma TIGIT (%)</b>	KK	0,257	0,166
	P	<b>0,021</b>	0,109
	N	62	62
<b>TIGIT stroma</b>	KK	0,076	0,055
	P	0,553	0,640
	N	62	62
<b>Epitel LAG-3 intenzitet</b>	KK	0,144	0,260
	P	0,257	<b>0,028</b>
	N	62	62
<b>Epitel LAG-3 (%)</b>	KK	0,144	0,260
	P	0,257	<b>0,028</b>
	N	62	62
<b>Ishod (smrt)</b>	KK	-0,037	-0,068
	P	0,775	0,567
	N	62	62
<b>Vrijeme praćenja (mjeseci)</b>	KK	-0,029	0,007
	P	0,784	0,943
	N	62	62
<b>Dob (godine)</b>	KK	-0,098	-0,129
	P	0,358	0,191
	N	62	62
<b>Spol</b>	KK	-0,015	0,028
	P	0,907	0,814
	N	62	62

Povezanost izraženosti LAG-3 u stromi s ostalim promatranim kliničko-patološkim obilježjima prikazana je u Tablici 21. Postoje značajne pozitivne korelacije intenziteta LAG-3 u stromi s TIGIT (%) u stromi, kao i korelacije LAG-3 (%) s intenzitetom i izraženošću LAG-3 u epitelu.

**Tablica 22.** Povezanost izraženosti TIGIT u stromi s ostalim promatranim kliničko-patološkim obilježjima (KK –korelacijski koeficijent).

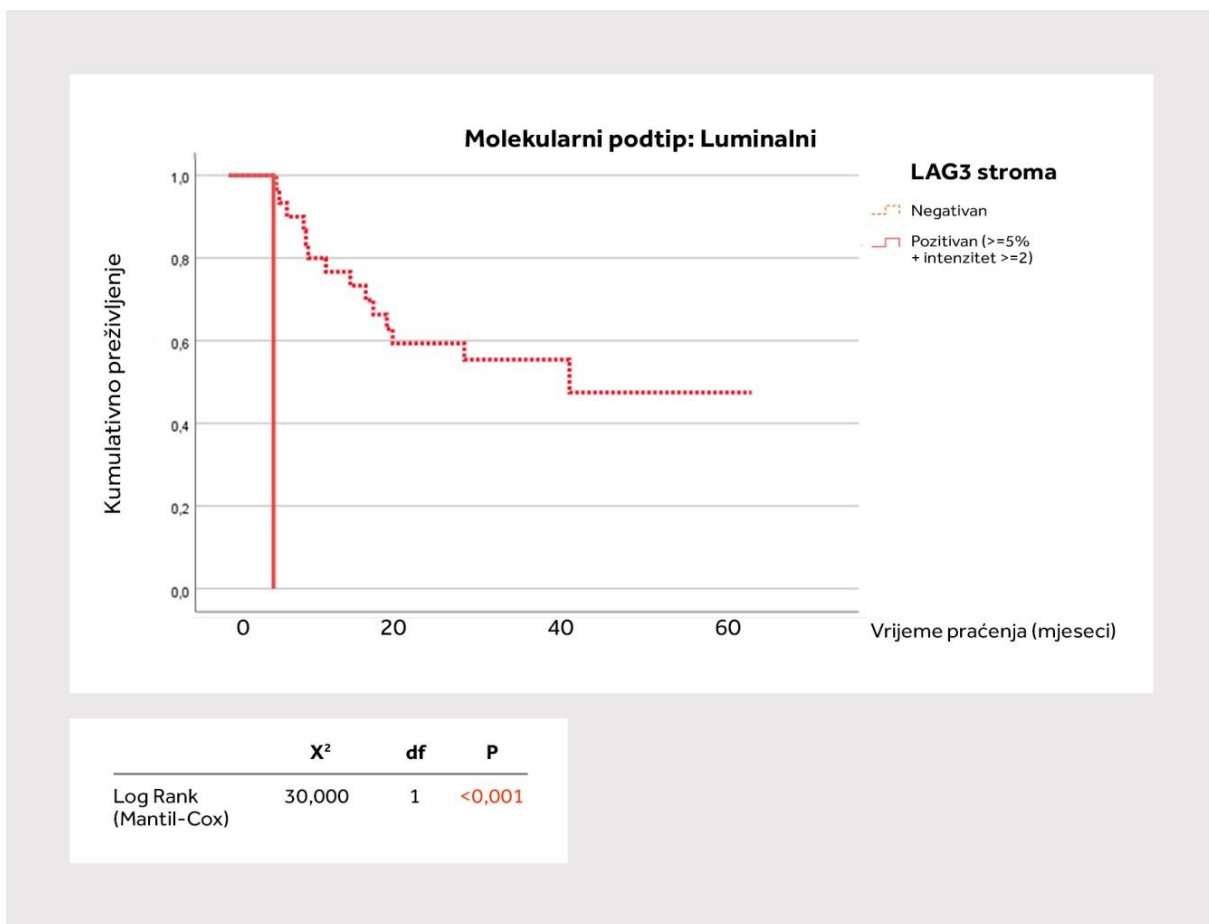
SVI PACIJENTI		Stroma TIGIT intenzitet	Stroma TIGIT (%)
<b>Epitel LAG-3 intenzitet</b>	KK	0,254	0,194
	P	<b>0,046</b>	0,082
	N	62	62
<b>Epitel LAG-3 (%)</b>	KK	0,254	0,194
	P	<b>0,046</b>	0,082
	N	62	62
<b>Ishod (smrt)</b>	KK	-0,216	0,108
	P	0,091	0,334
	N	62	62
<b>Vrijeme praćenja (mjeseci)</b>	KK	0,240	0,028
	P	<b>0,023</b>	0,762
	N	62	62
<b>Dob (godine)</b>	KK	-0,069	-0,130
	P	0,517	0,166
	N	62	62
<b>Spol</b>	KK	-0,006	0,045
	P	0,960	0,688
	N	62	62

Povezanost izraženosti TIGIT u stromi s ostalim promatranim kliničko-patološkim obilježjima prikazana je u Tablici 22. Postoje značajne pozitivne korelacije između TIGIT intenziteta i LAG-3 intenziteta i izraženosti u epitelu.

**Tablica 23.** Povezanost izraženosti LAG-3 u epitelu s ostalim promatranim kliničko-patološkim obilježjima (KK –korelacijski koeficijent).

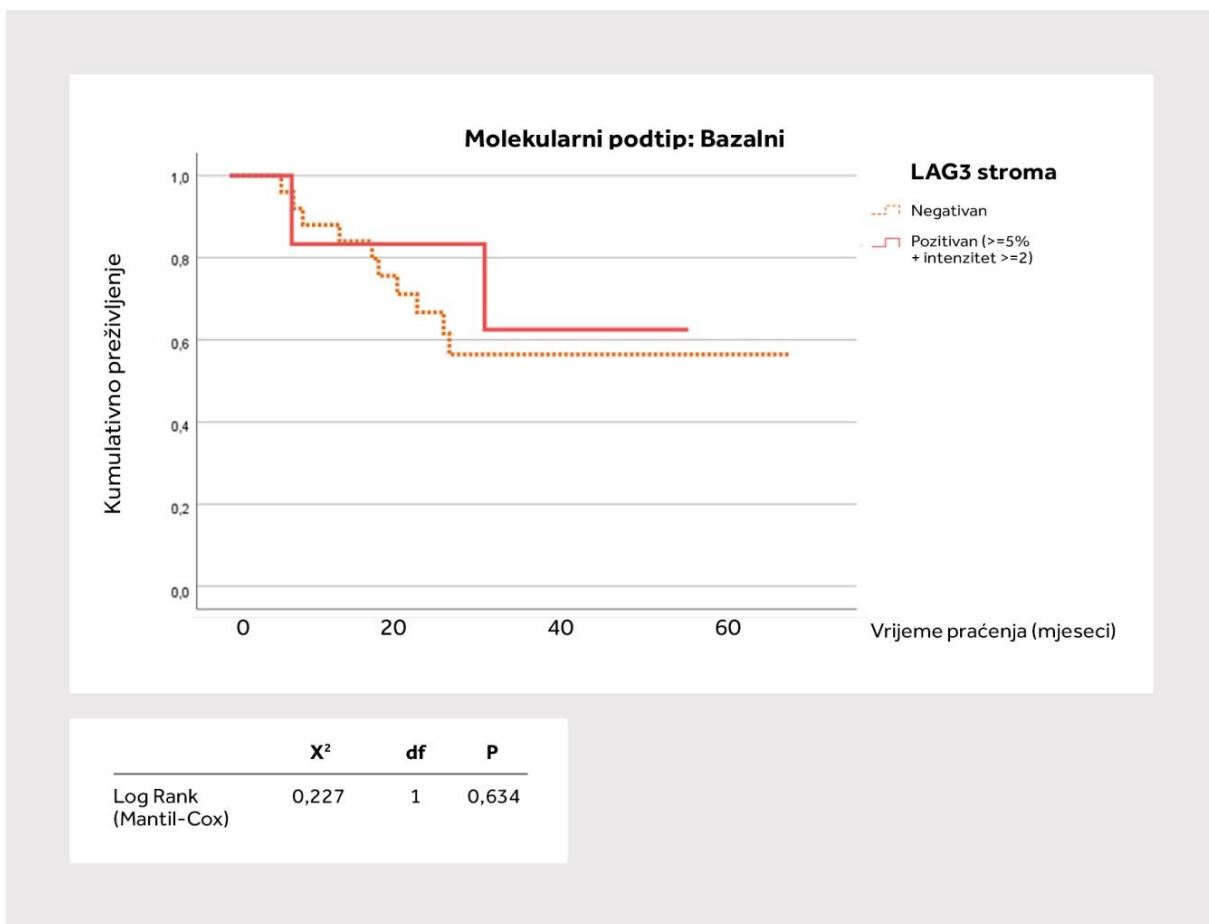
<b>SVI PACIJENTI</b>		<b>Epitel LAG-3 intenzitet</b>	<b>Epitel LAG-3 (%)</b>
<b>Ishod (smrt)</b>	KK	-0,160	-0,160
	P	0,210	0,210
	N	62	62
<b>Vrijeme praćenja (mjeseci)</b>	KK	0,187	0,187
	P	0,076	0,076
	N	62	62
<b>Dob (godine)</b>	KK	-0,106	-0,106
	P	0,319	0,319
	N	62	62
<b>Spol</b>	KK	-0,103	-0,103
	P	0,421	0,421
	N	62	62

Povezanost izraženosti LAG-3 u epitelu s ostalim promatranim kliničko-patološkim obilježjima prikazana je u Tablici 23. Nije bilo statistički značajnih korelacija.



**Slika 24.** Analiza preživljenja obzirom na pozitivnost LAG-3 u stromi luminalnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

Slika 24 i 25 prikazuju Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za pojedine molekularne podtipove MIBC u odnosu na pozitivnost nalaza LAG-3 u stromi. Dok u bazalnom podtipu MIBC nema statistički značajne povezanosti s preživljenjem ( $P=0,634$ ), ona je statistički značajna u luminalnom podtipu ( $P<0,001$ ) gdje je prosječno vrijeme preživljenja pozitivnih pacijenata 5,26 mjeseci, a negativnih 38,23 mjeseca.



**Slika 25.** Analiza preživljenja obzirom na pozitivnost LAG-3 u stromi bazalnog podtipa mišićno-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

## 6. RASPRAVA

Osnovni pokretač karcinogeneze BC su promjene u DNA. MIBC je prepoznat kao zaseban entitet unutar skupine BC kojeg posebice karakterizira veliko opterećenje tumorskim mutacijama gena odgovornih za regulaciju staničnog ciklusa (104). Kako bi se olakšalo shvaćanje i analiziranje ovih procesa, različite molekularne subklasifikacije za MIBC su kreirane temeljem cjelokupne genomske ekspresije mRNA te su uspostavljeni osnovni podtipovi MIBC: luminalni i bazalni. Luminalni podtip pokazuje papilarnu konfiguraciju, markere urotelijalne diferencijacije i pozitivitet GATA3. Luminalni podtip se klinički prezentira kemoterapijskom rezistencijom. Nasuprot tome bazalni podtip pokazuje pločastu i sarkomatoidnu diferencijaciju, CK5/6 pozitivitet i agresivno ponašanje, no dobar odgovor na kemoterapiju. Luminalni podtip je dalje podijeljen na pojedine podtipove, a nalazi se još i podtip koji pokazuje neuroendokrinu diferencijaciju, kao i podtip bogat dezmoplastičnom stromom. Posljednja dva podtipa su vrlo rijetka te nisu predmet našeg istraživanja.

U podlozi molekularnih podtipova dodatni fokus je usmjeren na mikrookolinu tumora, koja je posljednjih godina shvaćena kao ključno mjesto onkogenih mehanizama i imunološke ravnoteže, ali i ciljani prostor imunoterapije blokadom nadzornih točaka (172). Tumorska mikrookolina mokraćnog mjehura sastoji se od imunoloških stanica, mezenhimskih stanica, endotelnih stanica, molekula izvanstaničnog matriksa i upalnih medijatora. Interakcija između navedenih različitih komponenti i tumorskih stanica doprinosi regulaciji napredovanja raka mokraćnog mjehura, kao i odgovoru na liječenje. Obrasci izražavanja biomarkera i imunoloških gena su brojni u MIBC, a tumor-infiltrirajući limfociti mogu služiti kao korisni prediktori odgovora pacijenta na imuno-onkološku tretmane. Terapijskom aktivacijom regulatornih T-stanica te makrofaga, mastocita i B-stanica, moguće je utjecati na ravnotežu antitumorskog imuniteta u MIBC (173, 174). Upravo je napretkom u području molekularnog profiliranja i imunoprofiliranja postavljen temelj i potencijal za promjenu paradigme liječenja MIBC. Nositelj te promjene je ICI terapija, kojom se reaktivira antitumorska imunološka aktivnost. ICI djeluje preko kontrolnih točaka, a prva u nizu detektiranih kontrolnih točaka kao ciljnog mjesta ICI bio je PD-L1. Od tog trenutka je upotreba ICI postala opcija za MIBC i metastatski BC, koji kao imunogeni zloćudni tumor može trajno odgovoriti na blokadu imunološke kontrolne točke

(175). Tijekom posljednjih godina, više novih ICI lijekova je odobreno kao druga linija terapije uznapredovanog BC, kod pacijenata s progresijom iza kemoterapije u prvoj liniji. Ti lijekovi uključuju atezolizumab i pembrolizumab, a odobreni su i kao prva linija terapije kod pacijenata nepodobnih za kemoterapiju i pozitivnim PD-L1 statusom koji se određuje imunohistokemijski. Time su stvorene dodatne mogućnosti liječenja za MIBC koji oduvijek predstavlja terapijski izazov za uro-onkološke specijalnosti (176).

Iako se istraživanje imunoonkologije razvija u punom jeku, studije fokusirane na izraženosti imunoloških kontrolnih točaka kod MIBC i dalje su rijetke. Istraživanje MIBC sagledano u širem kontekstu karakterizira izrazita varijabilnost studija, prvenstveno zbog različitosti u karakteristikama analiziranih skupina pacijenata, raznolike histološke diferencijacije BC, predloženih molekularnih klasifikacija, ali i radi malog broja slučajeva unutar istraživanja. Unatoč opisanim ograničenjima, kada se uže sagleda područje imunoonkologije, učinkovitost dosadašnjih ICI je potaknula interes za pronalazak potencijalnih novih terapijskih meta - nadzornih točaka. Posljednjih godina se pažnja usmjerila dalje sa već etablirane kontrolne točke PD-L1 koja je višestruko istražena i ima stvarni klinički značaj i primjenu. Istražuju se ligandi poput TIGIT i LAG-3 koji se izražavaju na T-stanicama i predstavljaju novu skupinu ciljnih mjesta djelovanja ICI, koji se čine obećavajući kada je u pitanju liječenje različitih vrsta tumora (177).

Razvoj i rast tumorskih stanica, napredovanje tumora, otpornost na liječenje i loša prognoza, direktno su povezani s imunosupresijom, odnosno tumorskim izbjegavanjem imunološkog sustava. Mehanizmi koji stoje iza imunosupresije uključuju kompleksne međudnose unutar mikrookoline tumora, a ključni aspekt tih odnosa je iscrpljivanje citotoksičnih imunoloških stanica, odnosno T-limfocita i NK stanica (178). Iscrpljenost ovih obrambenih mehanizama se može prepoznati po povećanom izražavanju nekoliko proteina za kontrolu imunoloških nadzornih točaka (engl. *immune check-point proteins*, ICP), poput PD-1, CTLA-4, LAG-3, T-stanične imunoglobulin domene i mucin domene 3 (engl. *T-cell immunoglobulin domain and mucin domain – 3*, TIM-3), TIGIT te regulatora B i T limfocita. Kada su aktivirani, navedeni ICP inhibiraju sposobnost T-limfocita i NK stanica za uništavanjem tumorskih stanica povezivanjem s odgovarajućim ligandima izraženim na stanicama koje prezentiraju antigene, tumorskim stanicama i drugim stanicama u mikrookolini tumora (179). Upravo zbog opisanog

mehanizma, ICP predstavljaju svojevrsne blokatore T i NK stanica. Kada se putem ICI terapijski blokiraju veze između ICP i njihovih pripadajućih liganada oporavlja se antitumorski imunološki odgovor stanica, rezultirajući regresijom tumora. Osim izraženosti na imunološkim stanicama, neki ICP se izražavaju i na tumorskim stanicama, ponekad potičući proliferaciju i preživljavanje tih stanica. To ujedno znači da ICP blokada može imati dvostruki učinak, oporavak antitumorske imunosti i dodatno direktno onemogućavanje preživljenja tumorskih stanica (180).

Prvi ICI odobren za liječenje neke bolesti bio je ipilimumab, odnosno monoklonsko antitijelo anti-CTLA-4. Bio je uveden kao opcija liječenja melanoma 2014. godine. Od tada je ICI imunoterapija odobrena za liječenje različitih vrsta tumora u ranijim stadijima bolesti. Trenutno su odobrene četiri vrste ICI: anti-PD-1, PD-L1, CTLA-4 i LAG-3 monoklonska antitijela (181). Drugi ICI, poput blokatora TIM-3 i TIGIT, se dodatno ispituju u kliničkim ispitivanjima kao tretmani za različite solidne tumore i leukemiju. Učinkovitost ICI često varira te je također predmet suvremenih istraživanja. Razlozi za otpornost na blokadu putem ICI su još uvijek nejasni, ali prvenstveno nastaju zbog varijacija u izražavanju ICP i koizražavanju drugih ICP u različitim tumorima, zbog heterogenosti tumorske mikrookoline, uključujući smanjenu raznolikost imunoloških stanica i nedostatka aktivnih imunoloških stanica (182, 183). Blokatori PD-1/PD-L1 i CTLA-4 široko se koriste i temeljito proučavaju, ali karakteristike i učinkovitost blokade LAG-3 i TIGIT još nisu potpuno opisani.

LAG-3 je opisan 1990. godine na NK stanicama, no izražen je i na T i B stanicama, kao i dendritičnim stanicama u fiziološkim uvjetima. Strukturno se sastoji od ekstracelularnog, transmembranskog, i citoplazmatskog dijela. Ekstracelularni dio ima četiri IgSF domene (od engl. *immunoglobulin superfamily*), koje su ključne za vezanje liganda. Vezanjem liganada se ostvaruje LAG-3 aktivnost, koji potom može negativno regulirati funkciju T-stanica, imajući važne učinke na održavanje homeostaze imunološkog sustava u normalnim uvjetima i poticanje imunološkog bijega tumorskih stanica u tumorskom mikrookolišu (184). Signalizacija LAG-3 dovodi do iscrpljivanja CD8+ T-stanica, a obrnuto ICI blokadom LAG-3 se aktiviraju T-stanice i antitumorski imunološki odgovor. S obzirom na ovu važnu biološku ulogu, LAG-3 se smatra obećavajućim novim ciljem za imunoterapiju karcinoma. Do danas je korišteno više od dvadeset anti-LAG-3 antitijela u kliničkim ispitivanjima za imunoterapiju različitih tumora. Blokada



LAG-3 također može sinergirati s anti-PD-L1 terapijom (185). Relatlimab je prvo komercijalno razvijeno anti-LAG-3 monoklonsko protutijelo koje je ušlo u primjenu zajedno s inhibitorom PD-1 nivolumabom u kombinacijskom liječenju za više tumora. Prekomjerno izražavanje LAG-3 identificirano je na limfocitima infiltriranim u tumor kod melanoma, glioma, karcinoma pluća, karcinoma dojke, karcinoma želuca, limfoma i leukemije (186). Međutim, prognostička vrijednost LAG-3 pozitivnih stanica i dalje je nedosljedna u različitim vrstama karcinoma. U karcinomu dojke i jajnika, pozitivitet LAG-3 je ukazao na poboljšanu prognozu i mogao bi biti povezan s razvojem trajnog antitumorskog imuniteta povezanog s T-stanicama. Suprotno tome, većina podataka iz različitih kliničkih istraživanja ukazuje da je povećano izražavanje LAG-3 povezano s lošijim kliničkim ishodima. Infiltracija s LAG-3 kod karcinoma pluća sugerira imunosupresivnu okolinu koja je povezana s ranim postoperativnim recidivom, pogoršanom prognozom i lošijim OS. Visoke razine izražavanja LAG-3 povezane su s lošijom prognozom i za karcinom bubrega (engl. *renal cell carcinoma*, RCC), lošim OS bolesnika s gliomom visokog ili niskog stupnja i niskim preživljavanjem bez bolesti kod bolesnika s karcinomom gušterače. LAG-3 infiltracija stromalnih stanica kod MIBC također ukazuje na lošu prognozu (187-189).

TIGIT je identificiran 2009. godine tijekom analiza genoma koje su provođene s ciljem utvrđivanja izraženosti kostimulacijskih ili inhibicijskih molekula T-stanica, a posebno gena izraženih u NK i T-stanicama. TIGIT kodira protein koji nosi varijabilnu domenu imunoglobulina, transmembranski dio i ITIM domenu inhibicije na bazi tirozin imunoreceptora. TIGIT pokreće aktivaciju niza signalnih putova koji utječu na funkciju imunoloških stanica i imunološki odgovor, čime uzrokuje ukupni imunosupresivni odgovor u stanicama. Izraženošću u mikrookolini tumora inhibira protektivne imunološke reakcije posredovane CD8+ T-stanicama i NK stanicama (190). Blokada TIGIT liganda restaurira T-stanice i pojačava antitumorski imunitet u akutnoj mijeloičnoj leukemiji, karcinomu debelog crijeva i melanomu (191-193). Trenutno je nekoliko studija fokusirano na razvoj novih anti-TIGIT monoklonskih antitijela. Pretklinički modeli pokazali su da anti-TIGIT blokada sinergira s PD-L1 blokadom (194). Međutim, TIGIT je slabo istražen u MIBC, a klinički značaj ostaje otvoren.

Ligandi PD-L1, TIGIT i LAG-3 su ciljna mjesta imunoterapije, ali i dalje je otvoreno pitanje njihovog kompletnog značaja i odnosa s imunološkim kontekstom u MIBC. Povezanost izraženosti opisanih liganada s molekularnim podtipovima MIBC sugerira potencijalnu

višestruka kliničku vrijednost, kao prognostičkih i prediktivnih biomarkera, a time i eventualni budući personalizirani tretman za MIBC (195).

U okviru ovog doktorskog rada proučavana je imunohistokemijska izraženost TIGIT, LAG-3 i PD-L1 u epitelnim stanicama luminalnog i bazalnog podtipa MIBC, kao i u upalnim stanicama tumorske i peritumorske strome. Cilj istraživanja je bio analizirati postoji li dodatno i međusobna povezanost u izraženosti ciljnih liganada u MIBC. Također, uspoređivana je i imunohistokemijska izraženost u odnosu na kliničko–patološka obilježja (spol, dob, ishod liječenja i preživljenje). Istraživanje je provedeno na uzorku od 62 pacijenta s MIBC, gdje se pacijente razvrstalo u dvije skupine: 31 s luminalnim i 31 s bazalnim podtipom. Podjela pacijenata u skupine prema molekularnom profilu uz analizu povezanosti izraženosti liganada s određenim molekularnim fenotipom, mogla bi sugerirati izdvajanje skupina pacijenta koji bi potencijalno bili pogodni za ICI. Obzirom da su dostupni ICI efikasni kod dijela pacijenata, identifikacija specifičnih parametara koji bi mogli poslužiti kao potencijalni prediktori odgovora na terapiju blokadom ICP su od velikog značaja te u fokusu istraživača. PD-L1 izraženost je u ovom trenutku jedini takav alat koji se koristi u kliničkoj praksi. Iako se PD-L1 izraženost smatra preduvjetom za primjenu ICI, ona nije pouzdan kriterij za selekciju pacijenata koji će imati korist od ICI. Ograničenja koja PD-L1 kao prediktivni marker nosi su nekonzistentnost u ekspresiji, varijacije u različitim testovima pojedinih proizvođača, različiti klonovi protutijela, što može donijeti dodatnu heterogenost podataka i rezultata.

Također, dodatne razlike mogu biti prisutne zbog različitosti u PD-L1 izraženosti u različitim stadijima tumora. Osim PD-L1, neke studije su sugerirale kako bi TMB bio potencijalni biomarker uspješnosti ICI, no mjera tumorske mutacijske opterećenosti je pokazivala konfliktne rezultate, prije svega zbog neutvrđene standardizirane TMB definicije (196). Standardizirani i reproducibilni markeri koji bi jasno vodili odluke o liječenju i predviđali odgovor pacijenata na ICI trenutno nisu dostupni (197). Obzirom na sve navedeno, doprinos novih parametara u predikciji odgovora na ICI bi bio značajan. TIGIT i LAG-3 bi mogli dati doprinos u ovako opisanoj selekciji pacijenata. Dakle prednost ove studije je svakako analiza izraženosti i potencijalne kliničke važnosti novih imunohistokemijskih liganada kod MIBC.

S druge strane postoje i određena ograničenja studije. U ovoj disertaciji nije provedena imunohistokemijska distinkcija svih luminalnih podkategorija MIBC, objavljenih

kategorizacijom iz 2019. godine. Dodatne podjele luminalnih tipova trenutno imaju malo kliničko značenje (198). Široka i kompleksna molekularna pozadina i podjela luminalnih podtipova MIBC, njihovo značajno preklapanje u karakteristikama u usporedbi s istraživanim ligandima te opsežna molekularna heterogenost MIBC bi donijela nekonzistentnost u podacima koji bi se teško interpretirali. Razmišljajući o svakodnevnoj primjeni imunohistokemije koristili smo uobičajene panele i standardne markere CK 5/6 i GATA3 kako bi se učinila distinkcija između osnovnih molekularnih tipova MIBC: luminalnih i bazalnih. Također, podatci su analizirani na arhivskim materijalima i to imunohistokemijski. U suvremenoj dijagnostici BC velike nade se polažu i u genomske tipiziranje koje bi diktiralo individualiziranu terapiju (199). Upravo iz tog razloga i radi povećanja senzitivnosti moguća je komplementarna provedba genomske analize uz imunohistokemijsku koja bi potencijalno dala dodatni dublji uvid u korelacije specifičnih genetskih alteracija i genskih potpisa sa imunohistokemijskom ekspresijom na TIGIT, LAG-3 i PD-L1. No takva komplemetarna analiza bi izašla van okvira ovog rada.

Sagledavajući našu kohortu koja proizlazi iz jednog centra, dobno-spolna raspodjela pacijenata sukladna je onoj iz literature (1, 200). Analizirali smo 75 % slučajeva MIBC kod muškaraca i 25 % kod žena, uz medijan dobi od 67 godina. Budući veći uzorak koji bi uključivao i širu geografsku disperziranost, a time i raznolike etničke i kulturalne skupine s različitim okolišnim čimbenicima, mogao bi u perspektivi dodatno unaprijediti primjenjivost rezultata (201). Pretragom povijesti bolesti uzorkovanih pacijenata utvrđena je najveća zastupljenost hipertenzije kao komorbiditeta, zatim fibrilacije atriya, šećerne bolesti i sklonosti uroinfekcijama. Takva klinička slika je očekivana te je u vezi s starijom životnom dobi naših pacijenata. Sagledavajući navike pacijenata, pušači su sačinjavali gotovo 70 % naše kohorte. Iako se iz pregleda literature može zaključiti da su tumori bazalnog tipa češće povezani s metastatskom bolešću (202), u našoj analizi takva korelacija nije uočena. Metastatski rasap bolesti je bio podjednako zamijećen u pojedinim molekularnim podtipovima i to kod 61 % slučajeva od svih bazalnih, kao i kod 54 % od svih luminalnih podtipova. Pojavnost drugih tumora mokraćnog sustava uočena je u četvero pacijenata. Nisu zabilježene statistički značajne razlike u kategorijskim kliničkim varijablama između bazalnog i luminalnog molekularnog podtipa MIBC.

Za ovo istraživanje ključna je bila patohistološka i imunohistokemijska analiza uzoraka MIBC dobivenih iza inicijalnog TURBT zahvata. Analizirano je i daljnje individualno prilagođeno liječenje. Kod polovice pacijenata naše kohorte ono je uključivalo RC. KT je primila manja skupina pacijenata i to u neoadjuvantnom kontekstu (24,19 %) i adjuvantno (9,68 %). Tako niska stopa primjene KT je usporediva s prethodno prezentiranim podacima iz literature i ukazuje na mali broj pacijenata pogodnih za ovu terapiju (155, 203). Razlog tome prije svega leži u slabijem općem stanju pacijenata, narušenoj bubrežnoj funkciji čija je stabilnost je preduvjet za primjenu KT, kao i toksičnosti terapije. Ovakve ograničene mogućnosti primjene KT kao nadopune RC, ostavljaju veliko područje primjeni imunoterapije kao opcije liječenja. Primarna RT opcija je bila za 22,58 % pacijenata, dok je 12,90 % pacijenata bilo uključeno u trimodalni pristup liječenju s ciljem očuvanja mokraćnog mjehura. Uz sve opisane terapijske opcije, BC ima visoku tendenciju recidiviranja i progrediranja. Verificiran je lokalni recidiv kod 32,26 % pacijenata, regionalni recidiv kod 29,03 %, a metastatska bolest je utvrđena kod 41,94 % pacijenata. Takvo ponašanje BC dovelo je do ukupnog preživljenja od 56,45 % u periodu praćenja od minimalno jedne godine.

Primarni fokus ove studije bio je usmjeren na imunohistokemijsku izraženost liganada u luminalnom i bazalnom podtipu MIBC. Kao prvi i najetabliraniji ligand istražen je PD-L1. Obradom rezultata nije utvrđena statistički značajna povezanost između molekularnog podtipa tumora i izražaja PD-L1 markera. Tumori kategorizirani u luminalni tip pokazali su pozitivnu reakciju u 32,26 % slučajeva, a bazalni tip u 45,16 % slučajeva. Ovakva raspodjela je u skladu s našim očekivanjima, obzirom da se PD-L1 dokazano više izražava u bazalnim MIBC. U okviru nekoliko neovisnih istraživanja, provedena je detekcija molekularnih podtipova MIBC korištenjem CK 5/6 i GATA3, jednaka onoj u našoj studiji (204, 205). Iza ove molekularne trijaže praćena je izraženost PD-L1. Goutas i suradnici su na taj način analizirali 77 slučajeva MIBC i pronašli veću pozitivnost PD-L1 bazalnih u odnosu na luminalne MIBC (82,6 % naspram 57,4 %) (206). Odstupanje u broju i odnosu pozitivnih slučajeva između dvije skupine unutar našeg istraživanja objašnjavamo razlikom u određenoj granici pozitivnosti. Za sve ligande unutar naše studije, uključujući i PD-L1, uzeta je granica pozitivnosti  $\geq 5\%$ , dok je u navedenoj studiji uzeta granice pozitivnosti  $> 1\%$  (u skladu s terapijskim smjernicama za primjenu ICI - nivolumaba, propisanih od strane Američke agencije za hranu i lijekove) (207). U raznolikim studijima postoji više dostupnih metoda interpretiranja PD-L1 pozitivnosti kao

nadopuna točnosti rezultatima. No raznolikost u interpretiranju daju i odstupanja koja otežavaju usporedivost. Jedna od spomenutih metoda je IC skor (od engl. *immune cell*), kojim se određuje postotak površine tumorskog područja koje je infiltrirano PD-L1 pozitivnim imunološkim stanicama. Moguće je i izračunavanje udjela PD-L1 pozitivnih tumorskih stanica prema ukupnom broju tumorskih stanica, odnosno TPS skor proporcije tumora (od engl. *tumor proportion score*). Konačno, dostupan je i CPS skor (od engl. *combined positive score*) koji uzima u obzir i tumorske i imunološke stanice. Računa se kao zbroj PD-L1 pozitivnih tumorskih stanica, limfocita i makrofaga, podijeljen s ukupnim brojem živih tumorskih stanica, pomnožen sa 100 (208). Svaki od ovih skorova daje različite informacije o izraženosti PD-L1 i može se koristiti za različite vrste analiza i interpretacija, no ove metode interpretacije nisu do kraja definirane za preostale istraživane ligande, TIGIT i LAG-3. Radi lakšeg koreliranja rezultata svih liganada u odnosu na PD-L1, u našoj studiji nismo koristili sve opisane skorove već smo određivali udio pozitivnih epitelnih tumorskih stanica u sveukupnom broju tumorskih stanica (TPS skor), kao i udio nakupina pozitivnih upalnih stanica u peri/intratumoralnoj stromi (IC skor). Raspon PD-L1 pozitivnosti kretao se od 5 % do 20 %. U nekim slučajevima MIBC zabilježena je izrazita pozitivna reakcija u epitelnim tumorskim stanicama (> 10 % pozitivnih stanica). Takva reakcija je zamijećena u 9,3 % ukupnih slučajeva, većinom u bazalnim podtipovima. Iako korelacije bazalnog i luminalnog podtipa nisu dosegnule razine statističke značajnosti, veća izražajnost PD-L1 u bazalnom podtipu uz izrazite pozitivne reakcije, ističe ovaj podtip kao onaj koji bi mogao imati veću dobrobit od primjene ICI. Ovaj podatak je dodatno korisniji obzirom da je upravo bazalni podtip sklon agresivnijem ponašanju.

Već je spomenuto da potencijalni novi biomarkeri poput LAG-3 i TIGIT i dalje nemaju do kraja definirane optimalne granice pozitivnosti. Razine pozitivnosti su dodatno varijabilne kada se sagledavaju primarni uzorci MIBC i metastatski uzorci istog BC. Također, ovi biomarkeri su dinamični te im izraženost može biti izmijenjena pod utjecajem prethodnih apliciranih terapija. To dovodi do heterogenosti u interpretaciji nalaza i u usporedivnosti studija. Unutar našeg istraživanja uzeta je granica pozitivnosti  $\geq 5\%$  uz intenzitet  $\geq 2$ .

LAG-3 je novi i obećavajući biomarker koji je predmet interesa istraživača posljednjih godina, no nedovoljno istražen u BC. Iz malobrojnih dostupnih istraživanja ističe se da LAG-3 infiltracija stromalnih stanica definira lošu prognozu MIBC (189, 209). Zeng i suradnici

analizirali su stopu preživljenja kao i preživljenje bez bolesti kod 141. pacijenta s MIBC. LAG-3 u stromi bio je konzistentno povezan sa slabim OS, kao i suboptimalnim reakcijama na NAC. Obilje stromalnih LAG-3+ stanica ukazivalo je na okruženje s disfunkcionalnim CD8+ T stanicama te je predstavljalo neovisan prediktor za lošiji ishod preživljenja i otpornost na NAC u MIBC. Usporedivo s opisanom istraživanjem i u našoj studiji je dokazano lošije preživljenje uz LAG-3 pozitivnost. Također, proveli smo dodatnu analizu preživljenja u odnosu na molekularne podtipove MIBC. Nađena je statistički značajna negativna korelacija između LAG-3 pozitivnosti u upalnim stanicama peritumorske strome luminalnog podtipa MIBC i preživljenja pacijenata ( $P < 0,001$ ). Kaplan-Meierovom analizom pacijenti luminalnog podtipa MIBC s izraženim LAG-3 imali su lošije preživljenje nego pacijenti bazalnog podtipa MIBC. Prosječno vrijeme preživljenja unutar skupine luminalnog podtipa kod LAG-3 pozitivnih pacijenata bilo je svega 5,26 mjeseci, a kod negativnih pacijenata čak 38,23 mjeseca. I naši rezultati pokazuju konzistentnost s onima iz literature ukazujući na LAG-3 kao prediktor lošijeg OS.

Sagledavajući dodatno izraženost LAG-3, verificirana je značajna subpopulacija pacijenata unutar oba molekularna podtipa koja pokazuje izraženost LAG-3 u upalnim stanicama peritumorske strome, što bi ga označilo kao potencijalnim ciljnim mjestom za primjenu imunoterapije. U slučaju pozitivne reakcije, ona je redovito bila karakterizirana umjerenim intenzitetom (i to u 80,6 % bazalnih te 41,94 % luminalnih MIBC). U bazalnom molekularnom podtipu utvrđena je statistički značajno veća pozitivna izraženost LAG-3 (19,4 %) u peritumorskoj stromi u odnosu na luminalni podtip (3,2 %),  $P = 0,045$ . Dodatno, LAG-3 nije pokazivao izraženost u epitelnim stanicama tumora niti u jednom uzorku luminalnog podtipa. Time se zaključuje da je peritumorska stroma prostor od interesa koji je fokus ciljanja izraženosti LAG-3.

TIGIT je također biomarker čije razumijevanje funkcije i značaja raste zadnjih godina. Blokada TIGIT preokrenula je iscrpljenost antitumorskih NK stanica u više tumorskih modela. Ovaj signalni put povezan s tumorskim izbjegavanjem imunološkog sustava oporavlja NK stanice što je ključno za terapijske učinke ICI (130, 210, 211). Istraživanja odnosa TIGIT i BC su također malobrojna. Liu i suradnici su analizirali 259 pacijenata kako bi procijenili prognostičku vrijednost TIGIT liganda. Od navedenog uzorka pacijenata provedeno je istraživanje na

tumorskom tkivu 26 pacijenata. Rezultati su pokazali kako visoka infiltracija intratumoralnih TIGIT+ CD8+ T-stanica predviđa loše OS i slabiji odgovor na adjuvantnu KT kod MIBC. Obilje intratumoralnih TIGIT+ stanica koreliralo je s oslabljenim antitumorskim imunitetom CD8+ T-stanica i imunosupresivnom okolinom, naglašavajući TIGIT kao tumorskog promotora. Analizirajući izolirano TIGIT unutar našeg istraživanja, ovaj ligand se izražavao u upalnim stanicama peritumorske strome u svim pregledanim uzorcima naše kohorte u oba molekularna podtipa MIBC. TIGIT se obično izražavao u jakom postotku, čak do 70 %. Pozitivna reakcija na TIGIT je zamijećena u 87,10 % bazalnih i 93,55 % luminalnih MIBC. U malom broju negativnih reakcija (pri udjelu od < 5 % pozitivnih upalnih stanica) također je zamijećena TIGIT prisutnost manje izraženosti. Nije bilo statistički značajnih razlika u TIGIT izraženosti u stromi kod bazalnog naspram luminalnog MIBC ( $P=0,390$ ). Za razliku od LAG-3 koji je bio slabo pozitivan u epitelnim stanicama tumora, a pozitivan u stromi, TIGIT je bio pozitivan i u stromi, ali i u epitelnim stanicama u zamjetnom broju slučajeva. Pozitivnost u epitelu je nađena kod 35,48 % bazalnih i 54,84 % luminalnih MIBC, bez statistički značajnih razlika između molekularnih podtipova ( $P=0,126$ ). Raspon pozitivnih reakcija iznosio je od 5 % do 50 % izraženosti. Sagledavajući odnos TIGIT i OS, unutar naših rezultata nije zamijećena statistički značajnih korelacija. No kako je prikazano, potvrđena je sveprisutnost TIGIT liganda u peritumorskoj stromi luminalnog i bazalnog podtipa, kao i u zamjetnoj količini epitelnih stanica, s jakom pozitivnošću što upućuje na TIGIT kao potencijalno dobro ciljno mjesto za ICI čime naš nalaz korelira sa onima iz literature (212).

Prostor mikrookoline tumora smatra se područjem u kojem se odvijaju složeni međuzavisni mehanizmi i simultane reakcije različitih biomarkera. Njihovi međudnosi i ponašanje, zajednička izraženost i koinhibitorne aktivnosti su učestalo prisutni te su predmet intenzivnih istraživanja. (209, 213). Mikrookolina tumora je složena mreža interakcije raznovrsnih biomarkera, no unutar našeg istraživanja izdvojili smo i analizirali tri. Pretklinički modeli pokazali su da anti-TIGIT terapija, kao i blokada LAG-3 također može sinergirati s anti-PD-L1 terapijom (132, 214). Međutim, stvarni mehanizmi međusobne sinergističke izraženosti opisanih biomarkera ostaju otvoreni, pogotovo u kontekstu molekularnih podtipova MIBC (215, 216). Unutar našeg istraživanja analizirali smo upravo ova pitanja. Zamijetili smo višestruku simultanu izraženost analiziranih biomarkera, uz statistički značajne korelacije. Gledajući PD-L1 nađena je statistički značajna pozitivna povezanost izraženosti PD-L1 s intenzitetom

izraženosti LAG-3 ( $P=0,005$ ) i TIGIT ( $P=0,031$ ) u peritumorskoj stromi oba istraživana molekularna podtipa MIBC. Pri analizi korelacija LAG-3 za cijelu kohortu naših pacijenata verificirana je statistički značajna pozitivna korelacija intenziteta LAG-3 u peritumorskoj stromi s izraženosti TIGIT u stromi ( $P=0,021$ ), kao i pozitivne korelacije LAG-3 izraženosti s intenzitetom LAG-3 ( $P=0,028$ ) i izraženošću LAG-3 ( $P=0,028$ ) u epitelnim stanicama tumora. Sagledavajući korelacije TIGIT liganda, nađene su značajne pozitivne korelacije između intenziteta TIGIT u stromi i intenziteta LAG-3 ( $P=0,046$ ) te izraženosti LAG-3 ( $P=0,046$ ) u epitelima stanicama tumora. Sve opisane korelacije između istraživanih liganada dokazuju sklonost njihove simultane izraženosti. Takvi pozitivni međuodnosi liganada potvrđuju prostor mikrookoline tumora kao ključnog mjesta onkogenih mehanizama i imunološke ravnoteže. Normalni urotel u svim uzorcima pregledanih pacijenata u našoj studiji nije pokazao reakciju na niti jedan od istraživanih liganada što dodatno potvrđuje da je mikrookolina tumora područje odvijanja imunoloških aktivnosti važnih za razvoj antitumorskog imuniteta.

Stalnim razvojem i sve većom dostupnošću ICI došlo je do promjene u paradigmi liječenja MIBC. ICI su pokazali znatnu učinkovitost u kontroli uznapredovane bolesti, no unatoč tome bazični mehanizmi djelotvornosti ostaju i dalje nerazjašnjeni. Istraživanje izraženosti liganada LAG-3 i TIGIT, uz već etablirani PD-L1 kod BC, unaprjeđuje saznanja u ovom području. Prezentirani rezultati upućuju da bi istraživani ligandi mogli biti potencijalni novi biomarkeri za primjenu ICI. Dodatni značaj ovih rezultata je tim veći kada se sagleda u kontekstu molekularne podjele MIBC. Predstavljenom metodom molekularne trijaže na bazalni i luminalni podtip (analizom GATA3 i CK 5/6) moguće je u svakodnevnoj kliničkoj praksi optimizirati terapijske izbore zavisno o analiziranim biomarkerima i usmjeravati pacijenta prema individualiziranom tretmanu. Ključna uloga LAG-3 i TIGIT u dijagnostičkom i terapijskom pristupu MIBC, poglavito u kontekstu molekularnih podtipova, zahtijeva daljnju retrospektivnu i prospektivnu validaciju.



## 7. ZAKLJUČCI

1. Pacijenti luminalnog podtipa MIBC s izraženim LAG-3 imali su lošije preživljenje nego pacijenti bazalnog podtipa MIBC. Nađena je statistički značajna negativna korelacija između pozitivnosti LAG-3 u upalnim stanicama peritumorske strome luminalnog podtipa MIBC i preživljenja pacijenata ( $P < 0,001$ ).
2. LAG-3 je neovisni prediktor preživljenja pacijenata s luminalnim podtipom MIBC.
3. Zamijećena je subpopulacija pacijenata koja pokazuje izraženost LAG-3 u upalnim stanicama peritumorske strome, što bi ga označilo kao potencijalnim ciljnim mjestom za primjenu imunoterapije. U bazalnom molekularnom podtipu utvrđena je statistički značajno veća pozitivna izraženost LAG-3 u peritumorskoj stromi u odnosu na luminalni podtip ( $P = 0,002$ ).
4. Nađena je statistički značajna pozitivna korelacija intenziteta LAG-3 u peritumorskoj stromi s izraženosti TIGIT u stromi, kao i pozitivne korelacije izraženosti LAG-3 s intenzitetom i izraženošću LAG-3 u epitelnim stanicama tumora. Ovakvi pozitivni međuodnosi liganada sugeriraju da je prostor mikrookoline tumora ključno mjesto onkogenih mehanizama i imunološke ravnoteže.
5. LAG-3 nije pokazao izraženost u epitelnim stanicama tumora niti u jednom uzorku luminalnog podtipa. Time se zaključuje da je peritumorska stroma prostor jake izraženosti te da bi fokus ciljanja izraženosti LAG-3 trebao biti usmjeren na upalne stanice strome, a ne na epitelne stanice tumora.
6. Izraženost TIGIT se pokazala u upalnim stanicama peritumorske strome u svim pregledanim uzorcima naše kohorte u oba molekularna podtipa MIBC. Također, TIGIT se obično izražavao u visokom postotku. Sveprisutnost TIGIT liganada u peritumorskoj stromi luminalnog i bazalnog podtipa, s jakim pozitivitetom upućuje da bi TIGIT mogao biti potencijalno dobro ciljno mjesto imunoterapije.
7. Nađene su statistički značajne pozitivne korelacije između intenziteta TIGIT u stromi te intenziteta i izraženosti LAG-3 u epitelnim stanicama tumora.

8. Važnost imunološkog mikrookoliša tumora dodatno utvrđuje i zamijećena statistički značajna pozitivna povezanost izraženosti PD-L1 s intenzitetom izraženosti LAG-3 i TIGIT u peritumorskoj stromi oba istraživana molekularna podtipa MIBC. Sve opisane korelacije istraživanih liganada govore kako je prisutna međusobna sklonost simultanoj izraženosti liganada.
9. Nije bilo statistički značajne razlike u izraženosti PD-L1 između bazalnog i luminalnog podtipa MIBC.
10. Pregledani normalni urotel u svim uzorcima kod svih pacijenata u studiji nije pokazivao reakciju na TIGIT, LAG-3 i PD-L1. Time se iznova dodatno pokazuje kako je samo mikrookolina tumora područje imunoloških aktivnosti važnih za razvoj antitumorskog imuniteta.

## 8. SAŽETAK

UVOD: Mišićno-invazivni karcinom mokraćnog mjehura (engl. *muscle-invasive bladder cancer*, MIBC) je agresivna bolest koja zahtijeva multimodalno kirurško i onkološko liječenje. Uzimajući u obzir da je MIBC imunogeni tumor, posljednjih godina je razvijena imunoterapija koja cilja signalna mjesta u mikrookolini tumora i revitalizira antitumorski imunitet, čime je došlo je do promjene paradigme liječenja MIBC.

CILJ RADA: Ova studija kreirana je s ciljem istraživanja izraženosti liganda PD-L1 te novih potencijalnih biomarkera TIGIT i LAG-3 u molekularnim podtipovima MIBC.

MATERIJALI I METODE: Provedena je imnuohistokemijska analiza uzoraka arhivskog materijala MIBC 62 bolesnika, ravnomjerno podijeljenih u dvije skupine: luminalnog i bazalnog tipa MIBC. Izraženost je korelirana s kliničkim i patološkim parametrima.

REULTATI: Pacijenti s luminalnim podtipom MIBC i izraženim LAG-3 imali su statistički značajno lošije preživljenje nego pacijenti s bazalnim podtipom ( $P < 0,001$ ). Nađena je značajna subpopulacija pacijenata s izraženim LAG-3 u upalnim stanicama peritumorske strome, što ga čini potencijalnim ciljem za imunoterapiju. U bazalnom podtipu, LAG-3 je bio statistički značajno više izražen u peritumorskoj stromi nego u luminalnom podtipu ( $P = 0,002$ ). Ustanovljena je pozitivna korelacija između intenziteta LAG-3 u peritumorskoj stromi i izraženosti TIGIT, kao i između LAG-3 u stromi i epitelnim stanicama tumora. Izraženost TIGIT liganda se pokazala u upalnim stanicama peritumorske strome u svim uzorcima oba podtipa te značajno i u epitelnim stanicama tumora. Takva ubikvitarna prisutnost, TIGIT čini potencijalnim dobrim ciljem za imunoterapiju. Statistički značajne pozitivne korelacije su pronađene između intenziteta TIGIT u stromi i intenziteta LAG-3 u epitelnim stanicama tumora. Izraženost PD-L1 pokazala je statistički značajnu pozitivnu povezanost s intenzitetom LAG-3 i TIGIT u peritumorskoj stromi oba podtipa MIBC. Nije bilo statistički značajne razlike u izraženosti PD-L1 između bazalnog i luminalnog podtipa MIBC, dok normalni urotel nije pokazivao reakciju na TIGIT, LAG-3 i PD-L1.

ZAKLJUČAK: Uz već prepoznati dijagnostički i prognostički značaj PD-L1, pokazana je bogata imunološka aktivnost liganada TIGIT i LAG-3 u molekularnim podtipovima MIBC sa

značajnim korelacijama, što sugerira njihovu potencijalnu primjenu kao ciljnih točaka imunoterapije. Potrebna su daljnja istraživanja na većem uzorku MIBC kako bi se potvrdilo dodatno značenje novih biomarkera.

**KLJUČNE RIJEČI:** biomarkeri, imunohistokemija, LAG-3, mikrookolina tumora, mišićno-invazivni karcinom mokraćnog mjehura, PD-L1, TIGIT.

## **9. SUMMARY**

### **Expression of TIGIT, LAG-3 and PD-L1 immune ligands in molecular subtypes of muscle-invasive bladder cancer**

**Matej Knežević, Zagreb 2024.**

**INTRODUCTION:** Muscle-invasive bladder cancer (MIBC) is a severe condition that requires multimodal treatments. Recently, immunotherapy targeting the tumor microenvironment has emerged, altering the MIBC treatment paradigm.

**OBJECTIVE:** This study investigates the TIGIT, LAG-3 and PD-L1 biomarkers expression in molecular subtypes of MIBC.

**MATERIALS AND METHODS:** An immunohistochemical analysis was conducted on archival MIBC samples from 62 patients, divided into luminal and basal subtypes.

**RESULTS:** The study found that patients with luminal MIBC and high LAG-3 stroma expression had significantly poorer survival rates than those with the basal subtype, identifying LAG-3 as an independent predictor of poor survival in luminal MIBC. In the basal subtype, LAG-3 was more expressed in the peritumoral stroma in basal compared to the luminal subtype. TIGIT was universally present in the peritumoral stroma and epithelial tumor cells, making it a viable immunotherapy target. PD-L1 expression correlated positively with both LAG-3 and TIGIT intensities in the peritumoral stroma across both subtypes.

**CONCLUSION:** A rich immunological activity of the analyzed ligands suggests their potential application as targets of immunotherapy. Further research with a larger sample is necessary to confirm the significance of these biomarkers.

**KEYWORDS:** Biomarkers, Immunohistochemistry, LAG-3, Muscle-invasive bladder cancer, TIGIT, Tumor microenvironment, PD-L1.

## 10. LITERATURA

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, i sur. Global Cancer Observatory: Cancer Today. [Internet]. International Agency for Research on Cancer. [pristupljeno 12.02.2024.]. Dostupno na: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>.
2. Wong MCS, Fung FDH, Leung C, Cheung WWL, Goggins WB, i sur. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep*. 2018;8(1):1129.
3. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, i sur. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013;63(2):234.
4. Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, Comp erat EM, Cowan NC, Gakis G, i sur. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *Eur Urol*. 2021;79(1):82-104.
5. Scosyrev E, Noyes K, Feng C, Messing E . Sex and racial differences in bladder cancer presentation and mortality in the US. *Cancer*. 2009;115(1):68.
6. Sylvester RJ. Natural history, recurrence, and progression in superficial bladder cancer. *Scientific World Journal*. 2006;6:2617-25.
7. Teoh JY, Huang J, Ko WY, Lok V, Choi P, Ng C , i sur. Global Trends of Bladder Cancer Incidence and Mortality, and Their Associations with Tobacco Use and Gross Domestic Product Per Capita. *Eur Urol*. 2020;78(6):893-906.
8. Chavan S, Bray F, Lortet-Tieulent J, Goodman M, Jemal A. International variations in bladder cancer incidence and mortality. *Eur Urol*. 2014;66(1):59-73.
9. Jones TD, Wang M, Eble JN, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Zhang S, i sur. Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(18):6512.
10. Hecht SS. Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Langenbecks Arch Surg*. 2006;391(6):603.
11. Puente D, Hartge P, Greiser E, Cantor KP, King WD, Gonz alez CA, i sur. A pooled analysis of bladder cancer case-control studies evaluating smoking in men and women. *Cancer Causes Control*. 2019;202(6):1248-1254.

12. Grimmer G, Dettbarn G, Seidel A, Jacob J. Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers. *Sci Total Environ.* 2000;247(1):81-90.
13. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA.* 2011;306(7):737-45.
14. Pietzak EJ, Mucksavage P, Guzzo TJ, Malkowicz SB. Heavy Cigarette Smoking and Aggressive Bladder Cancer at Initial Presentation. *Urology.* 2015;86(5):968.
15. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, i sur. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer.* 2000;86(2):289-94.
16. van Osch FH, Jochems SH, van Schooten FJ, Bryan RT, Zeegers MP. Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies. *Int J Epidemiol.* 2016;45(3):857-70.
17. Al Hussein Al Awamlh B, Shoag JE, Ravikumar V, Posada L, Taylor BL, van der Mijn JC, i sur. Association of Smoking and Death from Genitourinary Malignancies: Analysis of the National Longitudinal Mortality Study. *J Urol.* 2019;202:1248.
18. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JW, La Vecchia C. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol.* 2016;70(3):458.
19. Skipper PL, Tannenbaum SR, Ross RK, Yu MC. Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(6):503.
20. Harling, M, Schablon A, Schedlbauer G, Dulon M, Nienhaus A. Bladder cancer among hairdressers: a meta-analysis. *Occup Environ Med.* 2010;67(5):351-8.
21. Weistenhofer W, Blaszkewicz M, Bolt HM, Golka K. N-acetyltransferase-2 and medical history in bladder cancer cases with a suspected occupational disease (BK 1301) in Germany. *J Toxicol Environ Health A.* 2008;71(13-14):906-10.
22. Rushton L, Bagga S, Bevan R, Brown TP, Cherrie JW, Holmes P. Occupation and cancer in Britain. *Br J Cancer.* 2010;102(9):1428-37.
23. Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, Zincke H, Blute M. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *J Urol.* 2005;174(1):107-10.

24. Zelefsky MJ, Housman DM, Pei X, Alicikus Z, Magsanoc JM, Dauer LT, i sur. Incidence of secondary cancer development after high-dose intensitymodulated radiotherapy and image-guided brachytherapy for the treatment of localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;83(3):953-9.
25. Daugherty SE, Pfeiffer RM, Sigurdson AJ, Hayes RB, Leitzmann M, Schatzkin A et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and bladder cancer: a pooled analysis. *Am J Epidemiol.* 2011;173(7):721.
26. Zaghloul MS, Zaghloul TM, Bishr MK, Baumann BC. Urinary schistosomiasis and the associated bladder cancer: update. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2020;32(1):44.
27. Bayne CE, Farah D, Herbst KW, Hsieh MH. Role of urinary tract infection in bladder cancer: a systematic review and metaanalysis. *World J Urol.* 2018;36(8):1181-90.
28. Raman JD, Sosa RE, Vaughan ED Jr, Scherr DS. Pathologic features of bladder tumors after nephroureterectomy or segmental ureterectomy for upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology.* 2007;69(2):251.
29. Karanović S, Tomić K, Dittrich D, Borovečki F, Zavadil J, Vuković-Lela I, i sur. Endemic (Balkan) nephropathy is aristolochic acid nephropathy. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki).* 2014;35(1):43-6.
30. Teleka S, Häggström C, Nagel G, Bjørge T, Manjer J, Ulmer H, i sur. Risk of bladder cancer by disease severity in relation to metabolic factors and smoking: A prospective pooled cohort study of 800,000 men and women. *Int J Cancer.* 2018;143(12):3071-3082.
31. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol.* 2006;3(6):327.
32. Zamora-Ros R, Sacerdote C, Ricceri F, Weiderpass E, Roswall N, Buckland G, *et al.* Flavonoid and lignan intake in relation to bladder cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Cancer.* 2014;111(9):1870-80.
33. Liu S, Yang T, Na R, Hu M, Zhang L, Fu Y, i sur. The impact of female gender on bladder cancer-specific death risk after radical cystectomy: a meta-analysis of 27,912 patients. *Int Urol Nephrol,* 2015;47(6):951-8.
34. Abufaraj M, Shariat S, Moschini M, Rohrer F, Papantoniou K, Devore E, i sur. The impact of hormones and reproductive factors on the risk of bladder cancer in women:



- results from the Nurses' Health Study and Nurses' Health Study II. *Int J Epidemiol.* 2020;49(2):599-607.
35. Martin C, Leiser CL, O'Neil B, Gupta S, Lowrance WT, Kohlmann W, i sur. Familial Cancer Clustering in Urothelial Cancer: A Population-Based Case-Control Study. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(5):527.
  36. Figueroa JD, Ye Y, Siddiq A, Garcia-Closas M, Chatterjee N, Prokunina-Olsson L, i sur. Genome-wide association study identifies multiple loci associated with bladder cancer risk. *Hum Mol Genet.* 2014;23(5):1387-98.
  37. Malats N, Bustos A, Nascimento CM, Fernandez F, Rivas M, Puente D, i sur. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol.* 2005;6(9):678.
  38. Bertero L, Massa F, Metovic J, Zanetti R, Castellano I, Ricardi U, i sur. Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria - What has changed and why? *Virchows Arch.* 2018;472(4):519-531.
  39. Veskimäe E, Espinos EL, Bruins HM, Yuan Y, Sylvester R, Kamat AM, i sur. What Is the Prognostic and Clinical Importance of Urothelial and Nonurothelial Histological Variants of Bladder Cancer in Predicting Oncological Outcomes in Patients with Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer? A European Association of Urology Muscle Invasive and Metastatic Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur Urol Oncol.* 2019;2(6):625-42.
  40. Matulewicz RS, DeLancey JO, Pavey E, Schaeffer EM, Popescu O, Meeks JJ. Dipstick Urinalysis as a Test for Microhematuria and Occult Bladder Cancer. *Bladder Cancer.* 2017;3(1):45.
  41. Dobruch J, Daneshmand S, Fisch M, Lotan Y, Noon AP, Resnick MJ, i sur. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol.* 2016;69(2):300-10.
  42. Mitra AP, Skinner EC, Schuckman AK, Quinn DI, Dorff TB, Daneshmand S. Effect of gender on outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder: a critical analysis of 1,994 patients. *Urol Oncol.* 2014;32(1):52.e1-9.

43. Liedberg F, Gerdtham U, Gralén K, Gudjonsson S, Jahnson S, Johansson I, i sur. Fast-track access to urologic care for patients with macroscopic haematuria is efficient and cost-effective: results from a prospective intervention study. *Br J Cancer*. 2016;115(7):770-5.
44. Khadra MH, Pickard RS, Charlton M, Powell PH, Neal DE. A prospective analysis of 1930 patients with hematuria to evaluate current diagnostic practice. *J Urol*. 2000;163:524-7.
45. Potton L, Bonadona A, Minet C, Timsit JF. Pink urine. *Intensive Care Med*. 2013;39(3):389.
46. Tan WS, Sarpong R, Khetrupal P, Rodney S, Mostafid H, Cresswell J, i sur. Can Renal and Bladder Ultrasound Replace Computerized Tomography Urogram in Patients Investigated for Microscopic Hematuria? *J Urol*. 2018;200(5):973-80.
47. Blick CGT, Nazir SA, Mallett S, Turney BW, Onwu NN, Roberts ISD, i sur. Evaluation of diagnostic strategies for bladder cancer using computed tomography (CT) urography, flexible cystoscopy and voided urine cytology: results for 778 patients from a hospital haematuria clinic. *BJU Int*. 2012;110(1):84-94.
48. Mariappan P, Zachou A, Grigor KM. Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker of resection quality, predicts risk of early recurrence, and is dependent on operator experience. *Eur Urol*. 2010;57(5):843-9.
49. Satoh E, Miyao N, Tachiki H, Fujisawa Y. Prediction of muscle invasion of bladder cancer by cystoscopy. *Eur Urol*. 2002;41(2):178.
50. Kimura S, Mari A, Foerster B, Abufaraj M, Vartolomei MD, Stangl-Kremser J, et al. Prognostic Value of Concomitant Carcinoma In Situ in the Radical Cystectomy Specimen: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Urol*. 2019;201(1):46-53.
51. Renshaw AA. Urine and bladder washings. U: Cibas ES, Ducatman BS, ur. *Cytology - Diagnostic principles and clinical correlates*. Edinburgh: WB Saunders; 2003. Str. 97-117.
52. Burger M, Grossman HB, Droller M, Schmidbauer J, Hermann G, Drăgoescu O, i sur. Photodynamic diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer with

- hexaminolevulinate cystoscopy: a meta-analysis of detection and recurrence based on raw data. *Eur Urol.* 2013;64(5):846-54.
53. Krieg RC, Messmann H, Rauch J, Seeger S, Knuechel R. Metabolic characterization of tumor cell-specific protoporphyrin IX accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. *Photochem Photobiol.* 2002;76(5):518.
  54. Grossman HB, Gomella L, Fradet Y, Morales A, Presti J, Ritenour C i sur. Comparison of hexaminolevulinate (HAL) fluorescencia cystoscopy and white light cystoscopy for detection of superficial papillary lesions in patients with bladder cancer. *J Urol.* 2007;178:62-7.
  55. National Collaborating Centre for Cancer (UK). *Bladder Cancer: Diagnosis and Management.* London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE); 2015. PMID: 26180884.
  56. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol.* 2015;33(2):66.e25-31.
  57. Irani J, Heidenreich A, Motter N, Lechevallier E. What is new in bladder cancer diagnosis and management? *Eur Urol Suppl.* 2008;7:484-93.
  58. Brown FM. Urine cytology. It is still the gold standard for screening? *Urol Clin North Am.* 2000;27:25-37.
  59. van Rhijn BWG, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol.* 2005;47(6):736-48.
  60. Barkan GA, Wojcik EM, Nayar R, Savic-Prince S, Quek ML, Kurtycz DFI, i sur. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *Adv Anat Pathol.* 2016;23(4):193-201.
  61. Batista R, Vinagre N, Meireles S, Vinagre J, Prazeres H, Leão R, i sur. Biomarkers for Bladder Cancer Diagnosis and Surveillance: A Comprehensive Review. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(1):39.
  62. Lodewijk I, Dueñas M, Rubio C, Munera-Maravilla E, Segovia C, Bernardini A, i sur. Liquid Biopsy Biomarkers in Bladder Cancer: A Current Need for Patient Diagnosis and Monitoring. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2514.

63. Ward DG, Baxter L, Gordon NS, Ott S, Savage RS, Beggs AD, i sur. Multiplex PCR and Next Generation Sequencing for the Non-Invasive Detection of Bladder Cancer. *PLoS One*. 2016;11:e0149756.
64. Kamat AM, Dickstein RJ, Messetti F, Anderson R, Pretzsch SM, Gonzalez GN, i sur. Use of fluorescence in situ hybridization to predict response to bacillus Calmette-Guérin therapy for bladder cancer: results of a prospective trial. *J Urol*. 2012;187(3):862-7.
65. Feldman AS, Kulkarni GS, Bivalacqua TJ, Black PC, Delacroix S, Lerner SP, i sur. Surgical challenges and considerations in Tri-modal therapy for muscle invasive bladder cancer. *Urol Oncol*. 2022;40(10):442.
66. Guo S, Xu P, Zhou A, Wang G, Chen W, Mei J, i sur. Contrast - Enhanced Ultrasound Differentiation Between Low- and High- Grade Bladder Urothelial Carcinoma and Correlation With Tumor Microvessel Density. *J Ultrasound Med*. 2017;36(11):2287-97.
67. Wong VK, Ganeshan D, Jensen CT, Devine CE. Imaging and Management of Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1396.
68. Galgano SJ, Porter KK, Burgan C, Rais-Bahrami S. The Role of Imaging in Bladder Cancer Diagnosis and Staging. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(9):703.
69. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK, i sur. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population - based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*, 2017;67(2):93-99.
70. Huguen CM, Duddalwar V, Daneshmand S. Preoperative Imaging for Clinical Staging Prior to Radical Cystectomy. *Curr Urol Rep*. 2016;17(9):62.
71. Trinh TW, Glazer DI, Sadow CA, Sahni VA, Geller NL, Silverman SG. Bladder cancer diagnosis with CT urography: test characteristics and reasons for false-positive and false-negative results. *Abdom Radiol (NY)*. 2018;43(3):663-71.
72. Lee CH, Tan CH, Faria SC, Kundra V. Role of Imaging in the Local Staging of Urothelial Carcinoma of the Bladder. *AJR Am J Roentgenol*. 2017;208(6):1193-205.
73. Rais-Bahrami S, Pietryga JA, Nix JW. Contemporary role of advanced imaging for bladder cancer staging. *Urol Oncol*. 2016;34(3):124-33.
74. Kim B, Semelka BK, Ascher SM, Chaplin DB, Carroll PR, Hricak H, i sur. Bladder tumor staging: comparison of contrast-enhanced CT, T1- and T2-weighted MR imaging,

- dynamic gadolinium-enhanced imaging, and late gadolinium-enhanced imaging. *Radiology*, 1994;193(1): 239-45.
75. Srivastava A, Douglass LM, Chernyak V, Watts KL. Advances in Imaging in Prostate and Bladder Cancer. *Curr Urol Rep*. 2017;18(9):69.
  76. Wang HJ, Pui MH, Guo Y, Yang D, Pan BT, Zhou XH. Diffusion-weighted MRI in bladder carcinoma: the differentiation between tumor recurrence and benign changes after resection. *Abdom Imaging*. 2014;39(1):135-41.
  77. Huang L, Kong Q, Liu Z, Wang J, Kang Z, Zhu Y, i sur. The Diagnostic Value of MR Imaging in Differentiating T Staging of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Radiology*, 2018;286: 502-11.
  78. Kuzlik-Golebiowska K, Jurkowska A, Gołębiowski D, Sklinda K, Walecki J, Rogowski W. The role of multiparametric magnetic resonance in bladder cancer management. *Wiedza Medyczna* 2021;3(2):25-32.
  79. Del Giudice F, Barchetti G, De Berardinis E, Pecoraro M, Salvo V, Simone G, i sur. Prospective Assessment of Vesical Imaging Reporting and Data System (VI-RADS) and Its Clinical Impact on the Management of High-risk Non-muscle-invasive Bladder Cancer Patients Candidate for Repeated Transurethral Resection. *Eur Urol*, 2020;77(1):101-9.
  80. Panebianco V, Narumi Y, Altun E, Bochner BH, Efstathiou JA, Hafeez S, i sur. Multiparametric Magnetic Resonance Imaging for Bladder Cancer: Development of VI-RADS (Vesical Imaging-Reporting And Data Sys-tem). *Eur Urol* 2018; 74(3):294-306.
  81. Metwally MI, Zeed NA, Hamed EM, Elshetry ASF, Elfwakhry RM, Eldin AMA, i sur. The validity, reliability, and reviewer acceptance of VI-RADS in assessing muscle invasion by bladder cancer: a multicenter prospective study. *Eur Radiol*, 2021;31(9):6949-61.
  82. Paik ML, Scolieri MJ, Brown SL, Spirnak JP, Resnick MI. Limitations of computerized tomography in staging invasive bladder cancer before radical cystectomy. *J Urol*, 2000;163(6):1693-9.
  83. Civelek A, Apolo A, Agarwal P, Evers R, Bluemke D, Malayeri A, i sur. 18F-FDG PET-MRI in the management of muscle invasive bladder cancer: *Urol Oncol*. 2021;39(11):781.

84. Ha HK, Koo PJ, Kim SJ. Diagnostic Accuracy of F-18 FDG PET/CT for Preoperative Lymph Node Staging in Newly Diagnosed Bladder Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oncology*. 2018;95(1):31-38.
85. Vind-Kezunovic S, Bouchelouche K, Ipsen P, Høyer S, Bell C, Jensen JB. Detection of Lymph Node Metastasis in Patients with Bladder Cancer using Maximum Standardised Uptake Value and (18)F-fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography/Computed Tomography: Results from a High-volume Centre Including Long-term Follow-up. *Eur Urol Focus*, 2019;5(1):90-6.
86. Marandino L, Capozza A, Bandini M, Raggi D, Fare E, Pederzoli F, i sur. [18F]Fluoro-Deoxy-Glucose positron emission tomography to evaluate lymph node involvement in patients with muscle-invasive bladder cancer receiving neoadjuvant pembrolizumab. *Urol Oncol*, 2021;39(4):235.
87. Necchi A, Bandini M, Calareso G, Raggi D, Pederzoli F, Fare E, i sur. Multiparametric Magnetic Resonance Imaging as a Noninvasive Assessment of Tumor Response to Neoadjuvant Pembrolizumab in Muscle-invasive Bladder Cancer: Preliminary Findings from the PURE-01 Study. *Eur Urol*, 2020;77(5):636-43.
88. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. Tumours of the urinary tract. In: World Health Organization classification of tumours of the urinary system and male genital organs. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2016. Str. 77-90.
89. Netto GJ, Amin MB, Berney DM, Compérat EM, Gill AJ, Hartmann A, i sur. The 2022 World Health Organization Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Urinary Tract Tumors. *Eur Urol*. 2022 Nov;82(5):469-482.
90. Ulamec M, Kruslin B. Neuroendocrine tumors in the urinary bladder: a literature review. *Endocr oncol metab*. 2016;2(1):42-49.
91. Paner GP, Montironi R, Amin MB. Challenges in Pathologic Staging of Bladder Cancer: Proposals for Fresh Approaches of Assessing Pathologic Stage in Light of Recent Studies and Observations Pertaining to Bladder Histoanatomic Variances. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(3):113-27.
92. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, i sur. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 2005;66(6 Suppl 1):4-34.

93. Varma M, Srigley JR, Brimo F, Comp rat E, Delahunt B, Koch M, i sur. Dataset for the reporting of urinary tract carcinoma-biopsy and transurethral resection specimen: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Mod Pathol*, 2020;33(4):700-712.
94. Jordan B, Meeks JJ. T1 bladder cancer: current considerations for diagnosis and management. *Nat Rev Urol*. 2019;16(1):23-34.
95. Weiner AB, Desai AS, Meeks JJ, et al. Tumor Location May Predict Adverse Pathology and Survival Following Definitive Treatment for Bladder Cancer: A National Cohort Study. *Eur Urol Oncol*. 2019;2(3):304-310.
96. Jimenez RE, Gheiler E, Oskanian P, Tiguert R, Sakr W, Wood Jr DP, Pontes JE, Grignon DJ, i sur. Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progression-free survival. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):980-7.
97. WHO Classification of Tumours: Urinary and Male Genital Tumours, 5th ed, Srigley JR, Tsuzuki T, Rubin MA (Eds), International Agency for Research on Cancer, 2022. Vol 8.
98. Comperat E, Srigley JR, Brimo F, Delahunt B, Koch M, Lopez-Beltran A, i sur. Dataset for the reporting of carcinoma of the bladder-cystectomy, cystoprostatectomy and diverticulectomy specimens: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Virchows Arch*. 2020;476(4):521-534.
99. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, i sur. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Chicago, USA: Springer International Publishing; 2017. Str. 727-35.
100. Culp SH, Dickstein RJ, Grossman HB, Pretzsch SM, Porten S, Daneshmand S, i sur. Refining patient selection for neoadjuvant chemotherapy before radical cystectomy. *J Urol*. 2014;191(1):40-7.
101. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. 2017;168(4):613-28.
102. Œoipi Œ, Vu i  M, Spaji  B, KruŒlin B, Tomi  M, Ulamec M. Review of the bladder cancer molecular classification proposed: a new era - new taxonomy. *Acta Clin Croat*. 2022;60(3):519-24.

103. Rodriguez-Vida A, Lerner SP, Bellmunt J. The Cancer Genome Atlas Project in Bladder Cancer. *Cancer Treat Res.* 2018;175:259-71.
104. Guo CC, Czerniak B. Bladder Cancer in the Genomic Era. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143(6):695-704.
105. Batista R, Vinagre N, Meireles S, Vinagre J, Prazeres H, Leao R, i sur. Biomarkers for Bladder Cancer Diagnosis and Surveillance: A Comprehensive Review. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(1):39.
106. Meeks JJ, Al-Ahmadie H, Faltas BM, Taylor 3rd JA, Flaig TW, DeGraff DJ, i sur. Genomic heterogeneity in bladder cancer: challenges and possible solutions to improve outcomes. *Nat Rev Urol.* 2020;17(5):259-70.
107. Sjobahl G, Lauss M, Lovgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, i sur. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(12):3377-86.
108. Hedegaard, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Hoyer S, Ulhoi BP, i sur. Comprehensive transcriptional analysis of early stage urothelial carcinoma. *Cancer Cell.* 2016;30(1):27-42.
109. Stroggilos R, Mokou M, Latosinska A, Makridakis M, Lygirou V, Mavrogeorgis E, i sur. Proteome-based classification of nonmuscle invasive bladder cancer. *Int. J. Cancer.* 2020;146(1):281-94.
110. Terlević R, Ulamec M, Štimac G, Murgić J, Krušlin B. Molecular classification of muscle-invasive bladder cancer based on a simplified immunohistochemical panel using GATA3, CK5/6 and p16. *Biomol Biomed.* 2023;23(6):968-75.
111. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, i sur. Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer. *Cell.* 2017;171(3):540-56.
112. Kamoun A, de Reynies A, Allory Y, Sjobahl G, Robertson AG, Seiler R, i sur. Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2020;77: 420-33.
113. Al-Ahmadie H, Netto GJ. Updates on the Genomics of Bladder Cancer and Novel Molecular Taxonomy. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(1):36-43.



114. Ulamec M, Murgić J, Novosel L, Tomić M, Terlević R, Tomašković I, i sur. New Insights into the Diagnosis, Molecular Taxonomy, and Treatment of Bladder Cancer. *Acta Med Acad.* 2021;50(1):143-56.
115. Magers MJ, Kaimakliotis HZ, Barboza MP, Bandali E, Adra N, Koch MO, i sur. Clinicopathological characteristics of ypT0N0 urothelial carcinoma following neoadjuvant chemotherapy and cystectomy. *J Clin Pathol.* 2019;72(8):550-53.
116. Power NE, Izawa J. Comparison of Guidelines on Non-Muscle Invasive Bladder Cancer (EAU, CUA, AUA, NCCN, NICE). *Bl Cancer.* 2016;2(1):27-36.
117. Soukup V, Čapoun O, Cohen D, Hernández V, Babjuk M, Burger M. i sur. Prognostic Performance and Reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization Grading Classification Systems in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A European Association of Urology Non-muscle Invasive Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur Urol* 2017;72(5):801-13.
118. Garcia PV, Seiva FR, Carniato AP, Junior WDM, Duran N, Macedo AM, i sur. Increased toll-like receptors and p53 levels regulate apoptosis and angiogenesis in non-muscle invasive bladder cancer: mechanism of action of P-MAPA biological response modifier. *BMC Cancer.* 2016;16:422.
119. Mathieu R, Lucca I, Roupret M, Briganti AI, Shariat SF. The prognostic role of lymphovascular invasion in urothelial carcinoma of the bladder. *Nat Rev Urol,* 2016;13:471-9.
120. Oszwald A, Wasinger A, Wasinger G, Larnaudie L, Varinot J, Sebe P, Cussenot O, i sur. Pathological reporting of cystectomy lymph nodes: a retrospective analysis of experience in Paris. *World J Urol,* 2021;39:4029-35.
121. Dutta R, Abdelhalim A, Martin JW, Vernez SL, Faltas B, Lotan Y, i sur. Effect of tumor location on survival in urinary bladder adenocarcinoma: A population-based analysis. *Urol Oncol,* 2016;34: 531.e1.
122. Mitra AP. Molecular substratification of bladder cancer: moving towards individualized patient management. *Ther Adv Urol* 2016;8(3):215-33.
123. Morera DS, Hasanali SL, Belew D, Ghosh S, Klaassen Z, Jordan AR, i sur. Clinical Parameters Outperform Molecular Subtypes for Predicting Outcome in Bladder Cancer: Results from Multiple Cohorts, Including TCGA. *J Urol,* 2020;203(1): 62-72.

124. Comperat E, Amin MB, Epstein JI, Hansel DE, Paner G, AlAhmadie H, i sur. The Genitourinary Pathology Society Update on Classification of Variant Histologies, T1 Substaging, Molecular Taxonomy, and Immunotherapy and PD-L1 Testing Implications of Urothelial Cancers. *Adv Anat Pathol*, 2021;28(4): 196-208.
125. Loriot Y, Necchi A, Park SH, Garcia-Donas J, Huddart R, Burgess E, i sur. Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 2019;381(4): 338-48.
126. Caldwell CJ, Johnson CE, Balaji VN, Balaji GA, Hammer RD, Kannan R. Identification and Validation of a PD-L1 Binding Peptide for Determination of PDL1 Expression in Tumors. *Sci Rep* 2017;7:13682.
127. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braith FS, Loriot Y, Cruz C, i sur. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014;515(7528):558-62.
128. Jing W, Wang G, Cui Z, Xiong G, Jiang X, Li Y, i sur. FGFR3 Destabilizes PD-L1 via NEDD4 to Control T-cell-Mediated Bladder Cancer Immune Surveillance. *Cancer Res*. 2022;82(1):114-29.
129. Yan S, Zeng H, Jin K, Shao F, Liu Z, Chang Y, i sur. NKG2A and PD-L1 expression panel predicts clinical benefits from adjuvant chemotherapy and PD-L1 blockade in muscle-invasive bladder cancer. *J Immunother Cancer*. 2022;10(5):e004569.
130. Liu Z, Zhou Q, Wang Z, Zhang H, Zeng H, Huang Q, i sur. Intratumoral TIGIT+ CD8+ T-cell infiltration determines poor prognosis and immune evasion in patients with muscle-invasive bladder cancer. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):e000978.
131. Kong Y, Zhu L, Schell TD, Zhang J, Claxton DF, Ehmann WC, i sur. T-Cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) associates with CD8+ T-cell exhaustion and poor clinical outcome in AML patients. *Clin Cancer Res*. 2016;22:3057–66.
132. Jiang H, Ni H, Zhang P, Guo X, Wu M, Shen H, i sur. PD-L1/LAG-3 bispecific antibody enhances tumor-specific immunity. *Oncoimmunology*. 2021;10(1):1943180.
133. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity*. 2016;44(5):989–1004.

134. Peyton CC, Chipollini J, Azizi M, Kamat AM, Gilbert SM, Spiess PE. Updates on the use of intravesical therapies for non-muscle invasive bladder cancer: how, when and what. *World J Urol.* 2019;37(10):2017-29.
135. Schmidt S, Kunath F, Coles B, Draeger DL, Krabbe LM, Dersch R, i sur. Intravesical Bacillus Calmette-Guérin versus mitomycin C for Ta and T1 bladder cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;1(1):CD011935.
136. Vartolomei MD, Ferro M, Roth B, Teoh JYC, Gontero P, Shariat SF. Device-assisted intravesical chemotherapy treatment for nonmuscle invasive bladder cancer: 2022 update. *Curr Opin Urol.* 2022;32(5):575-83.
137. Zhao H, Chan VWS, Castellani D, Chan EOT, Ong WLK, Peng Q, i sur. Intravesical Chemohyperthermia vs. Bacillus Calmette-Guerin Instillation for Intermediate- and High-Risk Non-muscle Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Surg.* 2021;8:775527.
138. Štimac G, Knežević M, Grubišić I, Šoipi Š, Tomas D, Krušlin B. A rare case of squamous cell carcinoma in urinary bladder diverticulum successfully treated by bladder-sparing surgery. *Acta Clin Croat.* 2015;54(3):363-6.
139. Gordon PC, Thomas F, Noon AP, Rosario DJ, Catto JWF, i sur. Long-term Outcomes from Re-resection for High-risk Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Potential to Rationalize Use. *Eur Urol Focus* 2019;5(4):650-7.
140. Babjuk M, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, Escrig JLD, i sur. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). *Eur Urol.* 2022;81(1):75-94.
141. Chou R, Selph S, Buckley DI, Fu R, Griffin JC, Grusing S, i sur. Comparative Effectiveness of Fluorescent Versus White Light Cystoscopy for Initial Diagnosis or Surveillance of Bladder Cancer on Clinical Outcomes: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Urol* 2017;197:548-58.
142. Lai LY, Tafuri SM, Ginier EC, Herrel LA, Dahm P, Maisch P, i sur. Narrow band imaging versus white light cystoscopy alone for transurethral resection of non-muscle invasive bladder cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2022; 4(4):CD014887.
143. Lenis AT, Lec PM, Chamie K. Urinary Diversion. *JAMA.* 2020;324(21):2222.

144. Hautmann, RE, Abol-Enein H, Hafez K, Haro I, Mansson W, Mills RD, *i sur.* Urinary diversion. *Urology*, 2007;69: 17-49.
145. Ornaghi PI, Afferi L, Antonelli A, Cerruto MA, Mordasini L, Mattei A, *i sur.* Frailty impact on postoperative complications and early mortality rates in patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer: a systematic review. *Arab J Urol*, 2020;19(1):9-23.
146. Aminoltejari K, Black PC. Radical cystectomy: a review of techniques, developments and controversies. *Transl Androl Urol*. 2020;9(6):3073-81.
147. Richters A, Ripping TM, Kiemeny LA, Leliveld AM, van Rhijn BWG, Oddens JR, *i sur.* Hospital volume is associated with postoperative mortality after radical cystectomy for treatment of bladder cancer. *BJU Int*, 2021;128(4):511-18.
148. Russell B, Liedberg F, Khan MS, Nair R, Thurairaja R, Malde S, Kumar P, *i sur.* A Systematic Review and Meta-analysis of Delay in Radical Cystectomy and the Effect on Survival in Bladder Cancer Patients. *Eur Urol Oncol*, 2020;3(2):239-49.
149. Catto JWF, Gordon K, Collinson M, Poad H, Twiddy M, Johnson M, *i sur.* Radical Cystectomy Against Intravesical BCG for High-Risk High-Grade Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: Results From the Randomized Controlled BRAVO-Feasibility Study. *J Clin Oncol*. 2021;39(3):202.
150. Seiler R, Ashab HAD, Erho N, van Rhijn BWG, Winters B, Douglas J, *i sur.* Impact of Molecular Subtypes in Muscle-invasive Bladder Cancer on Predicting Response and Survival after Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur Urol*. 2017;72(4):544-54.
151. Ravi P, Pond GR, Diamantopoulos LN, Su C, Alva A, Jain RK, *i sur.* Optimal pathological response after neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: results from a global, multicentre collaboration. *BJU Int*, 2021;128:607-14.
152. Boeri L, Soligo M, Frank I, Boorjian SA, Thompson RH, Tollefson M, *i sur.* Delaying Radical Cystectomy After Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-invasive Bladder Cancer is Associated with Adverse Survival Outcomes. *Eur Urol Oncol*, 2019;2(4):390-6.
153. D'Andrea, D, Black PC, Zargar H, Zargar-Shoshtari K, Zehetmayer S, Fairey AS, *i sur.* Impact of sex on response to neoadjuvant chemotherapy in patients with bladder cancer. *Urol Oncol*, 2020;38(7):639.e1.

154. Flaig TW, Spiess PE, Agarwal N, Bangs R, Boorjian SA, Buyyounouski MK, i sur. Bladder Cancer, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020;18(3):329-54.
155. Koshkin VS, Barata PC, Rybicki LA, Zahoor H, Almassi N, Redden AM, i sur. Feasibility of Cisplatin-Based Neoadjuvant Chemotherapy in Muscle-Invasive Bladder Cancer Patients With Diminished Renal Function. *Clinical Genitourinary Cancer*. *Clin Genitourin Cancer*. 2018;16(4):e879-92.
156. Peyton CC, Tang D, Reich RR, Azizi M, Chipollini J, Pow-Sang JM, i sur. Downstaging and Survival Outcomes Associated with Neoadjuvant Chemotherapy Regimens among Patients Treated with Cystectomy for Muscle-Invasive Bladder Cancer. *JAMA Oncol*. 2018;4(11):1535-42.
157. Iyer G, Balar AV, Milowsky MI, Bochner BH, Dalbagni G, Donat SM, i sur. Multicenter Prospective Phase II Trial of Neoadjuvant Dose-Dense Gemcitabine Plus Cisplatin in Patients With Muscle-Invasive Bladder Cancer. *J Clin Oncol*, 2018;36(19):1949-56.
158. van der Heijden MS, Sonpavde G, Powles T, Necchi A, Burotto M, Schenker M, i sur. Nivolumab plus Gemcitabine-Cisplatin in Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 2023;389(19):1778.
159. Berg S, D'Andrea D, Vetterlein MW, Cole AP, Fletcher SA, Krimphove MJ, i sur. Impact of adjuvant chemotherapy in patients with adverse features and variant histology at radical cystectomy for muscle-invasive carcinoma of the bladder: Does histologic subtype matter? *Cancer*. 2019;125(9):1449-58.
160. Koufopoulou M, Miranda PAP, Kazmierska P, Deshpande S, Gaitonde P. Clinical evidence for the first-line treatment of advanced urothelial carcinoma: Current paradigms and emerging treatment options. *Cancer Treat Rev*. 2020;89:102072.
161. Rhea LP, Mendez-Marti S, Kim D, Aragon-Ching JB. Role of immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Treat Res Commun*. 2021;26:100296.
162. Necchi A, Anichini A, Raggi D, Briganti A, Massa S, Lucianò R, i sur. Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma (PURE-01): An Open-Label, Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol*. 2018;36(34):3353-60.

163. Szabados, B., Kockx M, Assaf ZJ, van Dam PJ, Rodriguez-Vida A, Duran I, i sur. Final Results of Neoadjuvant Atezolizumab in Cisplatin-ineligible Patients with Muscle-invasive Urothelial Cancer of the Bladder. *Eur Urol.* 2022;82(2):212-22.
164. Witjes JA, Bruins HM, Carrión A, Cathomas R, Compérat E, Efstathiou JA, i sur. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2023 Guidelines. *Eur Urol.* 2023:S0302-2838(23)03073-7.
165. Bellmunt J, Hussain M, Gschwend JE, Albers P, Oudard S, Castellano D, i sur. Adjuvant atezolizumab versus observation in muscle-invasive urothelial carcinoma (IMvigor010): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2021;22(4):525-37.
166. Powles T, Duran I, van der Heijden MS, Loriot Y, Vogelzang NJ, de Giorgi U, i sur. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2018;391(10122):748-57.
167. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee J-L, Fong L, i sur. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med.* 2017;376(11):1015-26.
168. Zaghoul MS, Christodouleas JP, Smith A, Abdallah A, William H, Khaled HM, i sur. Adjuvant Sandwich Chemotherapy Plus Radiotherapy vs Adjuvant Chemotherapy Alone for Locally Advanced Bladder Cancer After Radical Cystectomy: A Randomized Phase 2 Trial. *JAMA Surg.* 2018;153(1):e174591.
169. Pham A, Ballas LK. Trimodality therapy for bladder cancer: modern management and future directions. *Curr Opin Urol.* 2019;29(3):210-215.
170. Giacalone, NJ, Shipley WU, Clayman RH, Niemierko A, Drumm M, i sur. Long-term Outcomes After Bladder-preserving Tri-modality Therapy for Patients with Muscle-invasive Bladder Cancer: An Updated Analysis of the Massachusetts General Hospital Experience. *Eur Urol*, 2017;71(6):952-60.
171. Kulkarni GS, Hermanns T, Wei Y, Bhindi B, Satkunasivam R, Athanasopoulos P. i sur. Propensity Score Analysis of Radical Cystectomy Versus Bladder-Sparing Trimodal Therapy in the Setting of a Multidisciplinary Bladder Cancer Clinic. *J Clin Oncol*, 2017;35(20):2299-305.

172. Fu H, Zhu Y, Wang Y, Liu Z, Zhang J, Xie H, i sur. Identification and Validation of Stromal Immunity Predict Survival and Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Patients with Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24(13):3069-78.
173. Jiang Q, Fu Q, Chang Y, Liu Z, Zhang J, Xu L, i sur. CD19+ tumor-infiltrating B-cells prime CD4+ T-cell immunity and predict platinum-based chemotherapy efficacy in muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68:45–56.
174. Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjatic S, i sur. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(10):3967-72.
175. Mo Q, Nikolos F, Chen F, Tramel Z, Lee YC, Hayashi K, i sur. Prognostic Power of a Tumor Differentiation Gene Signature for Bladder Urothelial Carcinomas. *Natl Cancer Inst.* 2019;111(11):1236.
176. Song D, Powles T, Shi L, Zhang L, Ingersoll MA, Lu YJ. Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches. *J Pathol.* 2019;249(2):151-65.
177. Attalla K, Farkas AM, Anastos H, Audenet F, Galsky MD, Bhardwaj N, i sur. TIM-3 and TIGIT are possible immune checkpoint targets in patients with bladder cancer. *Urol Oncol.* 2020;S1078-1439(20)30275-1.
178. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell.* 2018;33(4):547-62.
179. Joller N, Anderson AC, Kuchroo VK. LAG-3, TIM-3, and TIGIT: Distinct functions in immune regulation. *Immunity.* 2024;57(2):206-222.
180. Wang Y, Zhang H, Liu C, Wang Z, Wu W, Zhang N, i sur. Immune checkpoint modulators in cancer immunotherapy: Recent advances and emerging concepts. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):111.
181. Korman AJ, Garrett-Thomson SC, Lonberg N. The foundations of immune checkpoint blockade and the ipilimumab approval decennial. *Nat Rev Drug Discov.* 2022;21(7):509–528.
182. Marin-Acevedo JA, Kimbrough EO, Lou Y. Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):45.

183. Liu S, Sun Q, Ren X. Novel strategies for cancer immunotherapy: Counter-immunoediting therapy. *J Hematol Oncol.* 2023;16(1):38.
184. Cai L, Li Y, Tan J, Xu L, Li Y. Targeting LAG-3, TIM-3, and TIGIT for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2023;16(1):101.
185. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev.* 2017;276(1):80-96.
186. Murga-Zamalloa CA, Brown NA, Wilcox RA. Expression of the checkpoint receptors LAG-3, TIM-3 and VISTA in peripheral T cell lymphomas. *J Clin Pathol.* 2020;73(4):197–203.
187. Fucikova J, Rakova J, Hensler M, Kasikova L, Belicova L, Hladikova K, i sur. Tim-3 dictates functional orientation of the immune infiltrate in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25:4820–31.
188. He Y, Yu H, Rozeboom L, Rivard CJ, Ellison K, Dziadziuszko R, i sur. LAG-3 protein expression in non-small cell lung cancer and its relationship with PD-1/PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes. *J Thorac Oncol.* 2017;12(5):814-23.
189. Zeng H, Zhou Q, Wang Z, Zhang H, Liu Z, Huang Q, i sur. Stromal LAG-3<sup>+</sup> cells infiltration defines poor prognosis subtype muscle-invasive bladder cancer with immunoevasive contexture. *J Immunother Cancer.* 2020;8(1):e000651.
190. Zhou XM, Li WQ, Wu YH, Han L, Cao XG, Yang XM, i sur. Intrinsic expression of immune checkpoint molecule TIGIT could help tumor growth in vivo by suppressing the function of NK and CD8(+) T cells. *Front Immunol.* 2018;9:2821.
191. Chauvin J-M, Pagliano O, Fourcade J, Sun Z, Wang H, Sander C, i sur. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells in melanoma patients. *J Clin Invest.* 2015;125:2046–58.
192. Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, i sur. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol.* 2018;19:723–32.
193. Harjunpaa H, Guillerey C. TIGIT as an emerging immune checkpoint. *Clin Exp Immunol.* 2020;200:108–19.
194. Solomon BL, Garrido-Laguna I. TIGIT: a novel immunotherapy target moving from bench to bedside. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67:1659–67.



195. Tran L, Xiao JF, Agarwal N, Duex JE, Theodorescu D. Advances in bladder cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(2):104-21.
196. Wankowicz S, Werner L, Orsola A, Novak J, Bowden M, Choueiri TK, i sur. Differential Expression of PD-L1 in High Grade T1 vs Muscle Invasive Bladder Carcinoma and its Prognostic Implications. *J.Urol*. 2017;198;817–23.
197. Boormans JL, Zwarthoff EC, Black PC, Goebell PJ, Kamat AM, Nawroth R, i sur. New horizons in bladder cancer research. *Urol Oncol*. 2020;38(12):867-85.
198. Dyrskjøt L, Vlahou A, Black PC, Droller M, Grossmann HB, Goebell PJ, i sur. 25 years International Bladder Cancer Network (IBCN): The past, the present, and the future. *Urol Oncol*. 2023;41(7):302-6.
199. Yatai KB, Dunning MJ, Wang D. Consensus Genomic Subtypes of Muscle-invasive Bladder Cancer: A Step in the Right Direction but Still a Long Way To Go. *Eur Urol*. 2020;77(4):434-35.
200. Lobo N, Afferi L, Moschini M, Mostafid H, Porten S, Psutka SP, i sur. Epidemiology, Screening, and Prevention of Bladder Cancer. *Eur Urol Oncol*. 2022;5(6):628-39.
201. Hayashi T, Fujita K, Hayashi Y, Hatano K, Kawashima A, McConkey DJ, i sur. Mutational Landscape and Environmental Effects in Bladder Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):6072.
202. Lopez-Beltran A, Cookson MS, Guercio BJ, Cheng L. Advances in diagnosis and treatment of bladder cancer. *BMJ*. 2024;384:e076743.
203. Yin M, Joshi M, Meijer RP, Glantz M, Holder S, Harvey HA, i sur. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. *Oncologist*. 2016;21(6):708-15.
204. Eckstein M, Cimadamore A, Hartmann A, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, i sur. PD-L1 assessment in urothelial carcinoma: A practical approach. *Ann. Transl. Med*. 2019;7: 690.
205. Queipo, F.J.; Unamunzaga, G.M.; Negro, B.F.; Fuertes, S.G.; Cortés, M.; Tejedor, E.C.; i sur. Immunohistochemistry subtyping of urothelial carcinoma is feasible in the daily practice. *Virchows Arch*. 2022;481:191–200.

206. Goutas D, Palamaris K, Stofas A, Politakis N, Despotidi A, i sur. Immunohistochemical Study of Bladder Cancer Molecular Subtypes and Their Association with PD-L1 Expression. *Cancers (Basel)*. 2022;15(1):188.
207. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, i sur. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(3): 312-22.
208. Cheung CC, Barnes P, Bigras G, Boerner S, Butany J, Calabrese F, i sur. Fit-For-Purpose PD-L1 Biomarker Testing For Patient Selection in Immuno-Oncology: Guidelines For Clinical Laboratories From the Canadian Association of Pathologists-Association Canadienne Des Pathologistes (CAP-ACP). *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* 2019;27:699–714.
209. Jin S, Shang Z, Wang W, Gu C, Wei Y, Zhu Y, i sur. Immune Co-inhibitory Receptors CTLA-4, PD-1, TIGIT, LAG-3, and TIM-3 in Upper Tract Urothelial Carcinomas: A Large Cohort Study. *J Immunother*. 2023;46(4):154-59.
210. Attalla K, Farkas AM, Anastos H, Audenet F, Galsky MD, Bhardwaj N, i sur. TIM-3 and TIGIT are possible immune checkpoint targets in patients with bladder cancer. *Urol Oncol*. 2022;40(9):403-6.
211. Wu K, Zeng J, Shi X, Xie J, Li Y, Zheng H, i sur. Targeting TIGIT Inhibits Bladder Cancer Metastasis Through Suppressing IL-32. *Front Pharmacol*. 2022;12:801493.
212. Liu Z, Zeng H, Jin K, Yu Y, You R, Zhang H, i sur. TIGIT and PD-1 expression atlas predicts response to adjuvant chemotherapy and PD-L1 blockade in muscle-invasive bladder cancer. *Br J Cancer*. 2022;126(9):1310-17.
213. Nair SS, Weil R, Dovey Z, Davis A, Tewari AK. The Tumor Microenvironment and Immunotherapy in Prostate and Bladder Cancer. *Urol Clin North Am*. 2020;47(4S):e17-e54.
214. Chu X, Tian W, Wang Z, Zhang J, Zhou R. Co-inhibition of TIGIT and PD-1/PD-L1 in Cancer Immunotherapy: Mechanisms and Clinical Trials. *Mol Cancer*. 2023 Jun 8;22(1):93.
215. Dadhania V, Zhang M, Zhang L, Bondaruk J, Majewski T, Siefker-Radtke A, i sur. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the

Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *EBioMedicine*. 2016;12:105-117.

216. Ge Z, Peppelenbosch MP, Sprengers D, Kwekkeboom J. TIGIT, the Next Step Towards Successful Combination Immune Checkpoint Therapy in Cancer. *Front Immunol*. 2021;12:699895.

## 11. ŽIVOTOPIS

Matej Knežević je rođen 27.06.1983. u Slavonskom Brodu.

Osnovnu i srednju školu (Gimnazija „Matija Mesić“) završio je u Slavonskom Brodu. Diplomirao je 2008. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnik je Dekanove nagrade 2008. godine. Specijalizaciju urologije obavio je za Opću bolnicu „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. Specijalistički ispit iz urologije je položio 2015. godine. Od 2016. godine zaposlen je u Klinici za urologiju, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu. Ispit iz uže specijalizacije urolitijaze je položio 2018. godine. Član je Hrvatskog urološkog društva i Europskog urološkog udruženja. Usavršavao se u europskim centrima i sveučilišnim klinikama iz urološke onkologije i urolitijaze. Do sada je objavio 26 članaka u međunarodnim i domaćim indeksiranim časopisima, od kojih 5 indeksiranih u Current contentsu. Suradnik je na udžbeniku iz urologije „Bolesti urogenitalnog sustava“ objavljenog 2014. godine, kao i u izradi nacionalnih uroloških smjernica objavljenih 2020. i 2023. godine. Od 2014. do 2016. godine bio je koordinator istraživačkog tima vezanog za primjenu 3D print tehnologija u urologiji, u suradnji sa Strojarskim fakultetom iz Slavenskog Broda.

Završio je poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Oženjen je i otac je troje djece.