

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

Marušić, Zlatko

Doctoral thesis / Disertacija

2010

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

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

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-20**



Repository / Repozitorij:

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



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ



Središnja medicinska knjižnica

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

<http://medlib.mef.hr/854>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Zlatko Marušić

Miofibroblasti na i upalna reakcija
strome u neinvazivnom (Ta) i invazivnom
(T1) papilarnom urotelnom karcinomu
mokra nog mjeđura

DISERTACIJA



Zagreb, 2010. godine

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Zlatko Marušić

Miofibroblasti na i upalna reakcija
strome u neinvazivnom (Ta) i invazivnom
(T1) papilarnom urotelnom karcinomu
mokra nog mjeđura

DISERTACIJA

Zagreb, 2010. godine

Disertacija je izrađena u Klinici kom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Klinike bolnice „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu

Voditelj rada: Dr. sc. Davor Tomas

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

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

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

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

POPIS OZNAKA I KRATICA

ALA – 5-aminolevulinska kiselina

BCG – Bacillus Calmette-Guérin

BM – bazalna membrana

CIS – karcinom in situ

CK – citokeratin

CDKN2A – od engl. „cycline-dependent kinase inhibitor 2A“

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (od engl. „deoxyribonucleic acid“)

ECP – eozinofilni kationski protein

FGFR3 – receptor fibroblasti nog faktora rasta 3

HE – hemalaun-eozin

ISUP – od engl. „International Society of Urological Pathologists“

IP – invertirani papilom

MBP – od engl. „major basic protein“

PUNLMP – papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala

SMA – alfa glatkomisi ni aktin (od engl. „smooth muscle actin“)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TABE – od engl. „tumor-associated blood eosinophilia“

TATE – od engl. „tumor-associated tissue eosinophilia“

TUR – transuretralna resekcija

1. UVOD

1.1. ANATOMIJA MOKRA NOG MJEHURA

Mokra ni mjeđur je neparni šuplj organ miši ne stijenke koji u praznom stanju ima oblik obrnute etverostrane piramide. Funkcija mu je skladištenje i voljno pražnjenje mokra e. U dojen adi i manje djece je uvijek dijelom smješten u abdomenu, ak i u praznom stanju. Oko 6. godine života ulazi u veliku zdjelicu i tamo je jednim dijelom smješten sve do kraja puberteta. U odraslih se nalazi u prednjem donjem dijelu male zdjelice, dok se u punom stanju, u kojem može sadržavati 400 do 500 mL mokra e bez znatnijeg povišenja intraluminalnog tlaka, nalazi unutar trbušne šupljine dopiru i sve do razine pupka (1).

S prednje strane mokra nog mjeđura nalazi se simfiza stidne kosti, uz koju je dijelom fiksiran pubovezikalnim ligamentom u žena, odnosno puboprostati nim ligamentom u muškaraca. Mokra ni mjeđur je s gornje i stražnje strane prekriven parijetalnim listom potrbušnice koji u žena straga prelazi na prednju stranu trupa maternice, a u muškaraca na rektum. S donje strane mokra nog mjeđura u muškaraca se nalazi prostata, uz koju se sa stražnje strane mjeđura nalaze sjemeni mjeđuri i i sjemenovodi (2).

Mokra ni mjeđur sastoji se od tri osnovna dijela: vrha (apeksa) baze (fundusa) i tijela (korpusa). Apeks je to ka mokra nog mjeđura smještena najkranijalnije i mjesto s kojeg prema pupku polazi obliterirana embrionalna struktura urahus. U podruju fundusa nalazi se složena anatomska struktura oblika trokuta zvana trigonum. Na vrhovima trigonuma lateralno ulaze mokra ovoidi, a dalje se nastavlja mokra na cijev (3).

Za dinamiku pražnjenja mokra e najbitnija je muskulatura mokra nog mjeđura koja je sastavljena od miši nih niti smještenih u tri me usobno povezana sloja. Površni sloj prostire se uzdužno, a osobito je izražen na prednjoj i stražnjoj strani. U podruju fundusa u muškaraca se isprepli e s

miši nim nitima rektuma i prostate, a u žena s miši ima rodnice. U navedenom podruju površni uzdužni se nastavlja u kružni sloj, koji zatim prelazi u unutarnji uzdužni sloj (4).

U proksimalnim i lateralnim dijelovima trigonuma ureteri ulaze u mokra ni mjeđur pod kosim kutem. Miši ni sloj stijenke ispod submukoze u ovoj regiji kombinacija je glatkog miši a longitudinalnog miši nog sloja intramuralnog uretera i detrusora mokra nog mjeđura. Intramuralni dio uretera okružen je fibromuskularnom ovojnicom (Waldeyerova ovojnica) s kojom se stapa u miši ni sloj stijenke uretera. To fibromuskularno tkivo fiksira intramuralni ureter za mokra ni mjeđur. Širenjem mokra nog mjeđura okolna muskulatura vrši pritisak na koso smješteni intramuralni ureter, zatvarajući lumen uretera, što sprjeava povrat mokra e u ureter (2).

Glavnina arterijske krvi u mokra ni mjeđur dolazi putem donje vezikalne arterije, ogranka unutarnje ilijske arterije, dok ostatak arterijske krvi mjeđur dobiva putem gornje vezikalne, obturatorne i donje glutealne arterije, te uterine i vaginalne arterije u žena. Venska krv iz mokra nog mjeđura odlazi u vezikalni pleksus te preko njega u ilijalne vene. Limfna drenaža završava u limfnim vorovima smještenim uz vanjsku i unutarnju ilijsku arteriju. Mokra ni mjeđur je inerviran simpatičkim (Th11-L2), parasympatičkim (S2-S4) i senzornim živanim vlaknima. Impuls iz sakralnog dijela leđne moždine proveden parasympatičkim vlaknima potiče kontrakciju mišinih vlakana muskularis proprije koja uzrokuju mokrenje. Smatra se da u početku mokrenja ulogu ima i voljna relaksacija miši a dna zdjelice i pritisak prednje trbušne stijenke (5).

1.2. HISTOLOGIJA MOKRA NOG MJEĐURA

Histološki gledano, mokra ni mjeđur je na presjeku sastavljen od 4 sloja. Unutarnji sloj je epitelni pokrov kojem potporu daje lamina propria, sloj rahnijeg veziva, ispod koje se nalazi muskularis propria, tj. miši ni sloj stijenke mjeđura koji s vanjske strane pokriva četvrti sloj, adventicija. Ova

podjela koristi se za stupnjevanje bolesti u terapijske i prognostičke svrhe kod bolesnika koji boluju od karcinoma mokra nog mjeđura. Stoga je bitno pravilno mikroskopski raspozнати slojeve mokra nog mjeđura (6).

Epitel mokra nog mjeđura naziva se „prijeznom“ ili „tranzisionalnim“ epitelom. Taj je termin skovan zato što epitel koji oblaže mokra nog mjeđura svojim mikroskopskim izgledom dijelom podsjeća na nekeratiniziraju i višeslojni plosti, a dijelom na pseudostratificirani cilindri ni epitel. Mnogi histolozi i patolozi preferiraju naziv „urotel“ pred ovim relativno opšitim terminom. Valja spomenuti da se u području trigonuma i vrata mokra nog mjeđura nalazi manje područje nekeratinizirajućeg plostog epitelija koje je najizraženije u žena u postmenopauzi i perimenopauzi. Spomenuti epitel obiluje glikogenom te sadrži estrogenске i progesteronske receptore. Sličan epitel takođe može biti nešto izraženiji u muškaraca koji primaju estrogensku terapiju karcinoma prostate (7).

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

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

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

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

Bazalne stanice su kubi ne, i vidljive su samo u kontrahiranom mjeđuru. One se nalaze na tankoj, kontinuiranoj bazalnoj membrani sastavljenoj od 3 sloja: lamine lucide, lamine dense i sidre ih fibrila.

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

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

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

1.3. EMBRIOLOGIJA MOKRA NOG MJEHURA

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

1.4. BENIGNE EPITELNE NEOPLAZME I PREKURSORI KARCINOMA

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

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

govore u prilog benigne promjene. Kroni no ošte enje uzrokovano upalom uzrokuje nastanak upalne kripte urotela. Spomenuta kripta predstavlja nezrelu cistu, a Brunnova gnijezda predstavljaju dio presjeka navedene ciste (19).

Nakupljanjem stani nog detritusa ili mucina unutar ciste/gnijezda s vremenom dolazi do cisti nog proširenja pa se takva promjena naziva *cystitis cystica*. U nekim slu ajevima dolazi do žlezdane metaplazije epitela koji oblaže ciste, što se ozna ava nazivom *cystitis glandularis*. U sklopu žlezdane metaplazije može do i do intestinalne metaplazije, tj. žlezdani epitel može nalikovati na epitel crijeva (2).

Floridna Brunnova gnijezda mogu nalikovati na tzv. „nested“ varijantu urotelnog karcinoma mokra nog mjevara, a razlikovanje može biti zahtjevno. Kriteriji za malignitet su manja, nepravilnije raspore ena gnijezda koja pokazuju izraženiju razliku u veli ini. Ujedno, floridna Brunnova gnijezda ne pokazuju osobine infiltracije okolnog tkiva (17).

U ve ini istraživanja ove se reaktivne promjene nalaze u sklopu upale, no neki autori (18) opisali su ih i u potpunoj odsutnosti upale, što otvara mogu nost da je rije o sasvim normalnim varijantama histološkog izgleda mokra nog mjevara. Visoka pojavnost ovih promjena u normalnom mokra nom mjevaru ukazuje da se najvjerojatnije ne radi o premalignim promjenama i da nema uzro no-posljedi ne veze izme u njihove pojave i pojave karcinoma (20). Ponekad se navedene promjene nalaze uz karcinom, no vjerojatnije je da se u tim slu ajevima radi o reakciji na upalu, tj. ošte enje urotela koje izazove karcinom.

Metaplazija je proces pretvorbe jedne vrste tkiva u drugo koje nije karakteristi no za lokaciju na kojoj se pretvorba zbiva. Urotel esto podliježe metaplaziji, naj eš e plo astoj ili žlezdanoj. U podlozi metaplazije nalaze se kroni ni upalni procesi, kateterizacija i druge kroni ne ozljede.

Plo asta metaplazija naj eš e se nalazi u podru ju trigonuma mjevara u žena, no može se na i i na drugim mjestima unutar sluznice. Ponekad može biti prisutna keratinizacija epitela, parakeratoza i naglašen granularni sloj. Sama po sebi, plo asta metaplazija ne predstavlja premalignu promjenu,

no bolesnici s keratiniziraju om metaplazijom trebaju biti klini ki pra eni jer imaju pove ani rizik za pojavu karcinoma plo astih stanica (21).

Kod žljezdane metaplazije pokrovni epitel postaje visoki cilindri an, nalik na onaj u gastrointestinalnom traktu, uz žarišnu pojavu vr astih stanica te se ovaj tip metaplazije ponekad naziva i „intestinalni tip“. Kao i plo asta metaplazija, žljezdana metaplazija sama po sebi najvjerojatnije nije prekanceriza, no ipak postoje proturije na tuma enja o riziku za nastanak adenokarcinoma u osoba sa žljezdanom metaplazijom (22-23). Obzirom na oskudnost istraživanja u literaturi, pitanje je još uvijek otvoreno i postoji potreba klini kih kontrola bolesnika dok se kona ne smjernice ne postave (24).

Nefrogeni adenom predstavlja specifi an tip metaplazije. U sklopu kroni ne upale sluznice ili cijeljenja rane nakon traume odnosno operacije, urotel može biti zamijenjen jednim slojem kubi nih stanica. Te stanice proliferiraju ine i papile na površini i tubule ili mikrociste u lamini propriji. Stoga je naziv poprili no neprecizan, budu i da proliferacija nije nefrogena ve urotelnog porijekla, a nije ni rije o neoplazmi pa adenom nije najprikladniji naziv (17).

Oko dvije tre ine pacijenata s nefrogenim adenomom su muškarci, a razlog je taj što su u njih eš i operativni zahvati u mokra nom mjehuru zbog benignih promjena prostate i pra enja prethodnog karcinoma mokra nog mjehura ili prostate (25). Isto tako, nefrogeni adenom sve se eš e opisuje u imunokompromitiranih bolesnika, osobito nakon transplantacije organa. Obi no se klini ki prezentira nadražajnim simptomima ili hematurijom (17).

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

Pitanje da li nefrogeni adenom može biti prekursor adenokarcinomu mokra nog mjeđura još je otvoreno (17).

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

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

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

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

1.5. BENIGNE UROTELNE NEOPLAZME I PREKURSORI KARCINOMA

1.5.1. PAPILOM

Urotelni papilom je egzofiti ni tumor gra en od rahle fibrovaskularne strome obložene epitelom koji u potpunosti nalikuje na obi an uotel. Predstavlja nešto manje od 1% svih urotelnih neoplazmi, a nalazi se naj eš e u mla ih osoba i u djece. Odnos zahva enosti muškog i ženskog spola iznosi 1.9:1. Papilarni izdanci strome su nježni, uz blago naglašeno grananje, ali nikad nema fuzije papila. Površinske stanice esto su istaknute. U stromi se mogu na i edem i poja ana prisutnost upalnih stanica. Urotel nikad nema znakova atipije, a mitoze su ograni ene isklju ivo na bazalni sloj stanica (28).

Bitne diferencijalno dijagnosti ke imunohistokemijske zna ajke papiloma uklju uju nizak proliferativni indeks mjerena s Ki-67 (33) i specifi nu izraženost citokeratina 20 (34). Naime, u papilomu, kao i u normalnom uotelu, površinske stanice za razliku od intermedijarnih stanica pokazuju izrazito pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na citokeratin 20.

S molekularnog stajališta, urotelni papilomi esto pokazuju mutacije receptora faktora rasta fibroblasta 3 (FGFR3), po emu su sli ni papilarnoj urotelnoj neoplazmi niskog malignog potencijala (PUNLMP) i papilarnom uotelnom karcinomu niskog gradusa (35). U papilomima se ne susre u mutacije p53 (33). Papilom tek rijetko recidivira (u oko 8% slu ajeva) (28).

1.5.2. INVERTIRANI PAPILOM

Invertirani papilom (IP) je benigni papilomatozni tumor koji, za razliku od egzofiti nog papilomatoznog na ina rasta uobi ajenog za ve inu uotelnih

tumora, pokazuje endofiti nu osobinu rasta urastanjem urotela u podleže u stromu. Spada u skupinu rje ih novotvorina (ini <1% svih urotelnih tumora) (17), a nalazi se naj eš e u starijih odraslih osoba. Odnos zahva enosti muškog i ženskog spola iznosi 4.5:1. Histološki, za invertirani papilom karakteristi na je relativno glatka kontura površine prekrivena arhitekturalno i citološki normalnim urotelom. Od površine polaze oto i ili trake urotela širine 7-10 stanica i urastaju u podleže u laminu propriu. Periferne bazalne stanice esto su raspore ene palisadno, a unutarnje stanice poprimaju vretenast i izduljen izgled. Stanice tumora su jednolike, a mitoze su rijetke. esto se nalaze žarišta plo aste diferencijacije. Stroma tumora je rahla vezivna i sadrži brojne tankostijene krvne žile (36).

Unato više izvještaja o malignoj alteraciji IP unutar mokra nog sustava (37-39), mogu nost maligne alteracije i dalje je dvojbena. Prije svega, za razliku od obi nog papiloma, u do 15% IP mogu se na i citološke atipije izražene do odre ene mjere, što može dovesti do pogrešne dijagnoze karcinoma. Broussard i sur. (40) opisali su 11 slu ajeva IP sa citološkom atipijom. Njihovi bolesnici bili su klini ki pra eni u razdoblju od 5 mjeseci do 7 godina. U svim slu ajevima, podru ja s atipijom bila su žarišna i sastojala su se od stanica prominentnih jezgrica, stanica s atipi nom plo astom metaplasijom, displasti nih i multinuklearnih orijaških stanica. Ki-67 je bio blago povišen u nekim slu ajevima. U dva slu aja bila je izražena imunohistokemijska reakcija na p53. Niti jedan od bolesnika nije imao prethodan niti naknadan tumor mokra nog mijehura (40).

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

zna ajke lezije. Urotelni karcinom s invertiranim na inom rasta pruža deblje trake u laminu propriu, a širina traka je nejednolika te postoji prijelaz traka i tra aka u solidnije nakupine. Karakteristi no pravilno sazrijevanje, vretenaste stanice i palisadiranje perifernih stanica koje možemo na i u IP su op enito odsutni ili neuo lji u karcinomu s invertiranim na inom rasta. Ukoliko postoji nedvojbena invazija u laminu propriu ili miši ni sloj stijenke, dijagnoza IP je isklju ena (42).

Zanimljiva molekularno-patološka studija prikazana je 2005. na godišnjem sastanku Akademije patologije Sjedinjenih država i Kanade (USCAP). Tom prilikom je objavljeno istraživanje o razlici u ekspresiji gena izme u IP i urotelnog karcinoma s invertiranim na inom rasta (43). Istraživane su mutacije gena za FGFR3 koje su dio patogenetske sekvene u nastanku urotelnog karcinoma te izražaj proliferacijskog markera Ki-67. Razlika u u stalosti mutacije FGFR3 i izražaju Ki-67 izme u IP i invertiranog urotelnog karcinoma bila je statisti ki zna ajna, a prisutnost mutacije i ekspresija Ki-67 u >5% stanica mogu su razlu iti karcinom od papiloma s osjetljivoš u od 69% i specifi noš u od 91%. Zaklju ak studije bio je da je IP benigna lezija koja ne prikazuje specifi ne genetske promjene koje se mogu na i u neinvazivnim egzofiti nim papilarnim urotelnim tumorima (43).

1.5.3. UROTELNA DISPLAZIJA

Displazija je lezija ograni ena na uotel sa citološkim i arhitekturalnim karakteristikama koje ukazuju na preneoplaziju, ali nedovoljno izražena za dijagnozu karcinoma in situ (CIS). Displasti ni uotel sadrži me usobno povezane stanice karakterizirane promjenama jezgre poput nepravilnog gomilanja i hiperkromazije. Jezgrice mogu biti istaknute, a mitoze, ukoliko su prisutne, uglavnom su smještene bazalno. Površinske stanice uglavnom su prisutne. Ve ina stani nih abnormalnosti u displaziji ograni ena je na bazalni i intermedijarni sloj stanica (44-45).

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

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

1.6. RAK MOKRA NOG MJEHURA

1.6.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

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

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

razdoblju od 1999-2003. prosje na dob bolesnika (uklju uju i oba spola) pri postavljanju dijagnoze bila je 73 godine (55).

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

ak i u bolesnika u kojih je karcinom otkriven u nekom od navedenih ranijih stadija, nakon lije enja može se o ekivati recidiv bolesti u 50–70% slu ajeva, a napredovanje bolesti u 15–25% (56). Zbog visoke stope recidiva i potencijalno agresivnog tijeka bolesti, potrebno je intenzivno klini ko pra enje bolesnika. U Sjedinjenim ameri kim državama se na karcinom mokra nog mjeđura od dijagnoze do smrti potroši više nov anih sredstava po bolesniku nego u bilo koje druge maligne bolesti (57).

Postoji niz imbenika rizika za razvoj karcinoma mokra nog mjeđura, od kojih se najvažnijim smatraju pušenje cigareta i profesionalna izloženost odre enim karcinogenima, ponajprije anilinskim bojama. Bitno je naglasiti da je ve ina potencijalnih karcinogena inaktivna, a aktiviraju se uspomo enzima koji pokazuju genetski definirane razlike u aktivnosti. Iz ovog razloga osjetljivost na karcinogene varira izme u pojedinaca i populacija (58).

Pušenje cigareta dovodi se u vezu s karcinomom mokra nog mjeđura od 60-tih godina prošlog stolje a (59); smatra se da je taj imbenik rizika odgovoran za pojavu ak 66% svih slu ajeva u muškaraca i 30% u žena (60). Puša i imaju 2 do 6 puta viši rizik za nastanak karcinoma mokra nog mjeđura od nepuša a. Rizik je ve i i u nekadašnjih puša a, u kojih iznosi oko 1.9:1. Ustanovljeno je da je potrebno oko 20 godina pušenja cigareta za razvoj karcinoma, a rizik raste s brojem popušenih cigareta dnevno (61). U puša a sa neinvazivnim karcinomom mokra nog mjeđura remisija bolesti dulja je u onih bolesnika koji prestanu pušiti nakon dijagnoze. To an mehanizam kojim duhanski proizvodi uzrokuju karcinom mokra nog mjeđura

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

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

Epidemiološka povezanost pojave karcinoma i profesionalne izloženosti ovisi o nivou industrijalizacije. U visoko industrijaliziranim društvima, ak tretina urotelnih karcinoma pripisuje se profesionalnoj izloženosti. Period latencije između izloženosti i pojave karcinoma obično je produljen. Aromatski amini danas su zabranjeni, no kemijske supstance koje nastaju izgaranjem ugljena takođe povećavaju rizik nastanka karcinoma mokra nog mjeđura. Pojava karcinoma takođe je primjena u plinskih radnika, soboslikara i frizera (60).

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

pripisati pušenju, budu i da puša i unose više kofeina od nepuša a (70). Isto tako, postoje istraživanja provedena na glodavcima u kojima je uspješno induciran karcinom mokra nog mjejhura uz pomo umjetnih zasla iva a na bazi saharina (71), no epidemiološke studije nisu ukazale na kompatibilnost tih eksperimentalnih modela s razvojem tumora mokra nog mjejhura u ljudi (72).

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

1.6.2. KLINIKA SLIKA I RANO OTKRIVANJE BOLESTI

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

Nešto rje e, simptomi mogu biti dizuri ne prirode. Ova klini ka slika eš e se nalazi u bolesnika s difuznim karcinomom in situ ili invazivnim karcinomom. Ipak, ovi simptomi gotovo su uvijek pra eni barem mikroskopskom hematurijom. Ostali, rje i znaci i simptomi raka mokra nog mjejhura su bol u slabinama zbog opstrukcije mokra ovoda, edem donjih ekstramiteta i nalaz tumora u zdjelici. Tumori koji infiltriraju vezikoureteralno uš e mogu dovesti do pojave hidronefroze, koja se smara lošim prognosti kim znakom. Vrlo rijetko, bolesnici se pojavljuju sa simptomima uznapredovale bolesti, poput gubitka na težini, boli u kostima ili trbušnoj šupljini.

Osim detekcije hematurije, postoji još nekoliko dijagnosti kih oru a koja se mogu koristiti u ranom otkrivanju raka mokra nog mjejhura, kao što su citologija, proto na citometrija i kvantitativna analiza slika uz pomo fluorescentnih DNA proba.

Mikroskopskim pregledom sedimenta urina ili ispirka mokra nog mjejhura mogu e je dokazati maligne stanice, koje obi no imaju nešto ve e, hiperkromatske jezgre i oskudniju citoplazmu. Bolje diferencirani tumori imaju kohezivnije stanice koje se slabije odvajaju u mokra u, a istodobno su više nalik normalnim urotelnim stanicama. Stoga citologija ima nisku osjetljivost za tumore niskog gradusa. Osjetljivost za tumore visokog gradusa je najviše 80% (78), me utim specifi nost je vrlo visoka (79). Smatra se da je otkrivanje raka mokra nog mjejhura citološkim metodama isplativo samo u rizi nih skupina bolesnika, a ne u opoj populaciji (80).

Proto na citometrija mjeri sadržaj deoksiribonukleinske kiseline (DNA) u stanicama ije su jezgre obojene fluorescentnom bojom koja se veže na DNA. Na taj na in može se odrediti koli ina aneuploidnih stanic, kao i proliferativna aktivnost tumora. Poboljšanje osjetljivosti i specifi nosti proto ne citometrije mogu e je primjenom mnogostruktih parametara. Na primjer, proto ni citometar može se programirati da mjeri samo koli inu DNA u stanicama pozitivnim na citokeratine (epitelnim stanicama) (81). Tim pristupom izba ene su stаницe koje mogu lažno utjecati na rezultat, poput upalnih stanic. Dobro diferencirani tumori esto su diploidni i slabije

prepoznatljivi ovom metodom, tako da se osjetljivost i specifi nost proto ne citometrije uvelike poklapa s onom citologije urina (82). Op enito govore i, proto na citometrija nije se pokazala klini ki upotrebljivijom od citologije u ranom otkrivanju raka mokra nog mjeđura.

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

Iako se sumnja na rak mokra nog mjeđura ujedno može postaviti i ultrazvu nim pregledom ili kompjutoriziranom tomografijom, posljednja karika u postavljanju dijagnoze je uvijek cistoskopija. Prilikom cistoskopije, izvrši se biopsija ili transuretralna resekcija (TUR) tumora, pri emu valja i i dovoljno duboko da se dobiju uzorci miši nog sloja stijenke. Obzirom da postoji niz stanja koja makroskopski, pa i histološki mogu nalikovati na karcinom, kona na dijagnoza dobiva se patohistološkom analizom.

Zbog mogu e multicentri nosti promjena, prilikom cistoskopije preporu livo je uzeti nekoliko biopsija sluznice iz podru ja uz tumor, kao i iz podru ja suprotne strane mjeđura, trigonuma, fundusa i prostati nog dijela uretre. Jasno je da kod ovakvih nasumi nih biopsija postoji relativno velika mogu nost da dijelovi sluznice s premalignim ili malignim promjenama ne budu zamije eni.

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

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

1.6.3. STUPNJEVANJE BOLESTI

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

Tumor

TX: Tumor se ne može procijeniti

T0: Nema dokaza tumora

Ta: Neinvazivni papilarni karcinom

Tis: Karcinom «in situ»; «ravni tumor»

T1: Invazija tumora u subepitelno vezivo

T2: Invazija tumora u mišićni sloj mjeđura

T3: Invazija tumora u perivezikalno tkivo

T4: Invazija tumora u prostatu, maternicu, vaginu, zid zdjelice ili zid abdomena

Nodus (limfni vor)

NX: Regionalni limfni vorovi se ne mogu procijeniti

N0: Nema metastaza u regionalne limfne vorove

N1: Stanice karcinoma mokra nog mjeđura pronađene u jednom limfnom voru iji je promjer dva centimetra ili manji

N2: Stanice karcinoma mokra nog mjeđura pronađene u jednom ili više limfnih vorova od kojih nijedan nije veći od pet centimetara u promjeru

N3: Stanice karcinoma mokra nog mjeđura pronađene u jednom ili više limfnih vorova koji mijere više od pet centimetara u promjeru

Metastaze

MX: Širenje karcinoma ne može se procijeniti

M0: Nema udaljenih metastaza

M1: Dokazano postojanje metastaza

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

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

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

1.6.4. PATOHISTOLOŠKA SLIKA

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

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

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

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

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

mokra nog mjeđura, no opisana je u ovom poglavlju zbog svoje sklonosti recidivima, kao i mogunosti napredovanja u gradusu, koje je srećom nešto rjeđe.

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

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

U istraživanju objavljenom 2008., Barbisan i sur. (90) zaključili su da su znatno rjeđe nego u bolesnika s neinvazivnim papilarnim urotelnim karcinomom (91). Rijetko, obično više godina nakon dijagnoze, može doći do pojave tumora višeg gradusa/stupnja bolesti u istog bolesnika. Srednje vrijednosti recidiva tumora, progresije u viši stupanj bolesti, i tumorspecifične mortalitete iznose otprilike 35%, 4% i 2% (89, 92-93).

Karcinom in situ (CIS) predstavlja proliferaciju citološki malignih urotelnih stanica ograničenih na sluzni ki epitel. U manje od 10% slučaja je pojavljaju se *de novo*, dok ostatak bolesnika s CIS ima povijest prethodnog ili istodobnog karcinoma (94). CIS je znatan imbenik rizika za pojavu invazivnog karcinoma, koji nastaje u ak 80% bolesnika unutar 4 godine. Progresija bolesti je u bolesnika s multifokalnim CIS (95).

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

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

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

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

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

Jezgre su jednoliko pove ane, s manjim razlikama u obliku, obrisima i rasporedu kromatina. Jezgrice mogu biti prisutne, ali su neuo ljive. Mitoze nisu este i mogu se pojaviti u bilo kojem sloju, ali eš e u bazalnim slojevima. Bitna napomena je da se izgled papila u mikroskopskom preparatu procjenjuje na mjestima uzdužnog prereza kroz fibrovaskularnu stromu. U suprotnom, može se ste i krivi dojam pove ane celularnosti, gubitka polarnosti jezgara i izraženije mitotske aktivnosti. Postoje tumori koji unato op em pravilnom izgledu žarišno pokazuju podru ja visokog gradusa; u ovim slu ajevima tumoru se dodjeljuje visoki gradus.

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

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

Neinvazivni papilarni karcinom visokog gradusa odlikuje se papilama koje se opsežnije granaju i eš e su spojene. Prevladava dojam nepravilnosti s izraženim arhitekturalnim i citološkim varijacijama, ak i pri malom pove anju. Za razliku od karcinoma niskog gradusa, jasno je prepoznatljiv nuklearni polimorfizam, umjerena do jaka anizokarioza i nepravilna distribucija kromatina. Jezgrice su izražene. Mitoze su este, a mogu biti atipi ne i pojavljivati se u bilo kojem sloju, ak i površinskom. Debljina urotela esto varira kao rezultat diskohezije stanica. Unutar ove kategorije postoji široki spektar atipije, od slabije izražene atipije do potpuno anaplasti nh

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

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

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

U ve ini slu ajeva prisutna je solitarna lezija, ponekad uz satelitske vori e. Na periferiji tumora mogu se na i displazija ili CIS, kao i na drugim mjestima prekrivenim urotelom, kao što su distalni mokra ovod, prostatni dio mokra ne cijevi, ili distalni prostatni duktus. Ponekad se *in situ* lezije mogu širiti ak i kroz *ductus ejaculatorius* i zahvatiti sjemene mjehuri e, no ipak, eš i put zahva anja svih navedenih organa je izravnim širenjem karcinoma kroz stijenku mokra nog mjehura.

Prepoznavanje invazije urotelnog karcinoma u laminu propriu esto predstavlja jedan od najzahtjevnijih zadatka u kirurškoj patologiji i treba biti zasnovano na preciznim kriterijima.

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

nekim izvještajima nalazi se ak u njih 70–96% (8). Kod tangencijalno presje enih neinvazivnih papilarnih tumora, granica strome i epitela djeluje glatko i pravilno. U slu ajevima prave invazije, vjerojatniji je nalaz gnijezda nepravilnog oblika i raznolike veli ine ili pojedina nih tumorskih stanica koje prodiru kroz stromu. Kod tangencijalnog prereza kroz neinvazivni tumor i kod karcinoma koji se pojavljuje u Brunnovom gnijezdu, bazalna membrana zadržava pravilan oblik, dok je esto odsutna ili prekinuta u slu ajevima prave invazije (8).

Invazivnu frontu tumora mogu sa injavati pojedina ne stanice ili nepravilno oblikovana gnijezda, a ponekad se s baze papila u podleže u stromu odvajaju prstoliki tra ci. Invazivna gnijezda esto se razlikuju izgledom od stanica neinvazivne komponente tumora u smislu da stanice imaju obilniju citoplazmu i izraženiji polimorfizam jezgara. U nekim slu ajevima, osobito u mikroinvazivnim tumorima, invazivne stanice imaju obilnu eozinofilnu citoplazmu što se naziva paradoksalnom diferencijacijom. Ultrastruktorno, invazivne stanice esto pokazuju redukciju broja dezmosoma što utje e na smanjenu kohezivnost tumorskih stanica (105).

Uz invazivni karcinom esto se nalaze histološke promjene nastale kao posljedica prethodnih biopsija, intravezikalne terapije BCG-om, radioterapijom ili kemoterapijom (106). Spomenute promjene mogu biti toliko izražene da prikrivaju istovremenu prisutnost karcinoma. U takvim slu ajevima, imunohistokemijska pretraga reaktivnosti na citokeratin može biti od pomo i. Imunohistokemijska analiza može pomo i i u diferencijaciji invazivnog, slabo diferenciranog karcinoma prostate od slabo diferenciranog urotelnog karcinoma, od kojih potonji pokazuje pozitivnu reakciju na 34 E12 (107).

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

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

Pošto je dubina invazije najzna ajnji prognosti ki i terapijski imbenik (8), najbitniji dio izvještaja patologa osim postavljanja same dijagnoze je pažljiva procjena prisutnosti i dubine invazije. Prema Ro i sur. (10), u ak 91% bioptiranih pacijenata prisutan je sloj glatkog miši a unutar lamine proprije. Odsutnost tog sloja u pojedinim biopsijama objašnjava se injenicom da je esto u manjem ili ve em dijelu diskontinuiran. Taj je sloj naj eš e sastavljen od tankih snopova miši nih vlakana, iako u pojedinim slu ajevima snopovi mogu biti deblji i nalikovati na muskularis propriju. Stoga je potreban poseban oprez u interpretaciji invazije u miši ni sloj. Pretraživanjem literature mogu se na i pojedini medicinsko-pravni slu ajevi u kojima je zbog nepreciznog izražavanja patologa vezanog uz navedeni tanki miši ni sloj došlo do nepotrebno radikalne operacije i znatnog narušenja kvalitete života bolesnika (12).

Miši ni sloj stijenke (muskularis propria) sastoji se od snopova miši nih vlakana ve eg promjera. Prisutnost ili odsutnost muskularis proprie treba uvijek biti nazna ena u patohistološkom izvještaju, budu i da dokumentira dubinu urološkog zahvata i mogu nost ili nemogu nost procjene invazije dubljih slojeva stijenke. Otprilike 80% bolesnika s invazijom karcinoma u miši ni sloj (pT2) ima spomenuti stupanj invazije od po etka, dok se u ostalih radi o progresiji karcinoma nižeg stadija. Trenutno jedan od najve ih izazova kirurške patologije mokra nog mjehura je procjena

mogu nosti pojedinih pTa i pT1 karcinoma da recidiviraju i invadiraju u miši ni sloj stijenke (108).

Urotelni karcinom koji invadira miši ni sloj stijenke raste u obliku gnijezda, tra aka, manjih nakupina ili pojedina nih stanica koje su esto razdvojene dezmplasti nom stromom. Citoplazma je obično srednje obilna do obilna, amfofilna ili eozinofilna, a jezgre su velike, hiperkromatske, nepravilne i pleomorfne. Prisutnost i izgled jezgrica varijabilni su. Mitoze, osobito patološke, su vrlo este.

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

Karcinomi mokra nog mjeđu koji invadiraju u miši i izvan njega esto pokazuju dediferencijaciju tumorskih stanica te se uz konvencionalni oblik urotelnog karcinoma visokog gradusa u ak 37% slučajeva mogu naći posebni oblici karcinoma (109).

1.6.5. POSEBNI OBLICI PRIMARNOG KARCINOMA

MOKRA NOG MJEĐURA

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

Prema toj klasifikaciji, postoje histološki zasebni oblici karcinoma poput ploastog karcinoma mokra nog mjeđura koji ne pripadaju skupini urotelnih karcinoma. Zasebni oblici razlikuju se od urotelnog karcinoma po imbenicima rizika, patogenezi i prognozi te prelaze okvire ove disertacije.

Prepoznavanje podvarijanti urotelnog karcinoma bitno je jer se obično radi o tumorima koji imaju nešto lošiju prognozu, a esto se nalaze kao manja komponenta tumora unutar konvencionalnog urotelnog karcinoma mokra nog mjeđura. Najčešći oblik divergentne diferencijacije je plostasti, a

slijedi ga žljezdani tip diferencijacije. U ovu skupinu ne pripada sitnostani ni karcinom, budu i da prisutnost i najmanje koli ine te komponente nosi znatno lošiju prognozu od ostalih oblika i traži druga iju terapiju bolesti (28).

Plo asta diferencijacija definirana je prisutnoš u intercelularnih mosti a ili keratinizacije i susre e se u 21% svih urotelnih karcinoma mokra nog mjejhura (110). Iako klini ki zna aj plo aste diferencijacije nije u potpunosti razjašnjen, ini se da je rije o tumorima s nešto lošijom prognozom od konvencionalnih urotelnih karcinoma, što se objašnjava eš om pojavnoš u u karcinomima visokog gradusa (111).

Žljezdana diferencijacija nalazi se u oko 6% urotelnih karcinoma i o ituje se pojmom tubularnih žljezda ili žljezda enteri nog tipa koje lu e sluz. Ponekad se nalaze mucinozna varijanta rasta i varijanta sa stanicama tipa prstena pe atnjaka. Oskudna citoplazmatska sluz može se na i u preko polovice urotelnih karcinoma i ne smatra se znakom žljezdane diferencijacije. Klini ki zna aj žljezdane diferencijacije nije razjašnjen (110).

Tzv. „nested“ varijanta urotelnog karcinoma opisana je tek u oko 60 slu ajeva, od kojih je oko 50% dokumentirano nakon 2000. godine (17), no bitna je zbog prividno benignog izgleda. Rije je o manjim gnijezdima tumorskih stanica ije jezgre ve inom ne pokazuju znakove atipije, iako se pažljivim pregledom uvijek nalaze žarišta nedvojbeno anaplasti nih stanica prominentnih nukleola, a esto i invazija miši nog sloja stijenke. Bitno je razlikovati „nested“ varijantu od Brunnovih gnijezda, nefrogenog adenoma i paraganglioma. Prognoza je izrazito loša, pa ak oko 70% bolesnika umre unutar 3 godine od postavljanja dijagnoze (41).

Mikropapilarna varijanta je još jedna rje a varijanta urotelnog karcinoma, opisana u oko 70 slu ajeva od 1994. godine, koja se posljednjih godina nešto u estalije prepoznaje (112). Arhitekturnalno, ovaj oblik karcinoma nalikuje na serozni karcinom jajnika, rastu i u obliku sitnih, nježnih papila. Na mjestima invazije dolazi do karakteristi ne retrakcije oko spomenutih papila, koja može nalikovati na vaskularnu invaziju. Invazija u miši ni sloj stijenke gotovo je pravilo. Imunohistokemijski, ova je varijanta sli na uobi ajenom urotelnom karcinomu (CK 7 i CK 20 pozitivna, 34 E12

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

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

Karcinom nalik limfoepiteliomu je nediferencirani maligni epitelni tumor koji je histološki sli an istoimenom nazofaringealnom tumoru. Opisano je oko 50 slu ajeva do sad. Sastavljen je od nakupina slabo diferenciranih stanica krupnih jezgara i prominentnih nukleola okruženih obilnom limfati nom stromom. Imunohistokemijski, tumorske stanice pokazuju reaktivnost na citokeratin. *In situ* hibridizacijom nije na ena povezanost s Epstein-Barrovim virusom. Diferencijalno dijagnosti ki može do i do zamjene spomenutog karcinoma s floridnim cistitisom ili limfomom mokra nog mjehura. Od prvog se karcinom nalik na limfoepiteliom razlikuje kvantitativno, dok se od limfoma razlikuje po pristnosti i B i T limfocita. isti oblik tumora dobro reagira na kemoterapiju i ima bolju prognozu, dok oni slu ajevi u kojima je rije o manjoj komponenti unutar urotelnog karcinoma imaju sli nu prognozu kao i osnovni tumor (114).

Sarkomatoidna varijanta urotelnog karcinoma je bifazi na maligna neoplazma koja pokazuje morfološke i/ili imunohistokemijske zna ajke epitelne i mezenhimalne diferencijacije. Molekularna istraživanja ukazuju na monoklonalno porijeklo obje komponente. Ujedno mogu, ali i ne moraju biti prisutni heterologni elementi s pravom sarkomskom slikom, naj eš e slikom osteosarkoma. U bolesnika sa sarkomatoidnom varijantom est je anamnesti ki podatak o prethodnoj radijaciji i terapiji ciklofosfamidom.

Metastaze u limfne vorove i udaljene organe este su, a ak 70% bolesnika umre unutar 2 godine od postavljanja dijagnoze (115).

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

1.6.6. MOLEKULARNE I GENETSKE PROMJENE POVEZANE S KARCINOMOM MOKRA NOG MJEHURA

Razumijevanje biologije nastanka i napredovanja karcinoma mokra nog mjeđura klju no je da bi se poboljšao pristup dijagnozi i terapiji ove bolesti. Otkrivanje složenih bioloških mehanizama uklju enih u patogenetske procese trebalo bi olakšati bolju identifikaciju prognosti kih imbenika i pospješiti pronađazak novih terapijskih mogu nosti.

Zaklju ak znatnog broja istraživanja je da se neinvazivni papilarni urotelni karcinom (pTa) razlikuje od karcinoma *in situ* (CIS) i karcinoma koji invadiraju miši (pT2-nadalje) u pogledu molekularne patogeneze i puteva progresije. Broj genetskih promjena viši je u invazivnim tumorima, no ini se da postoji i kvalitativna razlika u smislu prisutnosti specifi nih genetskih promjena. Postoje barem dva značajna genetska puta uklju ena u razvoj i progresiju bolesti (35, 116-117).

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

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

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

Pažnja molekularnih biologa i patologa u posljednjem desetlje u osobito je usmjerena na drugi put. Proteini p53 i pRb koje prijelaz iz G1 u S fazu stani nog ciklusa, imaju vrše bitnu ulogu u njegovojo regulaciji. Nekoliko studija pokazalo je da je pojava ana imunohistokemijska reaktivnost tumorskih jezgara na p53 protein važan prediktor relapsa bolesti u bolesnika s karcinomom mokra nog mjeđura. Isto tako, kod bolesti ograničene na mokra ni mjeđur, akumulacija p53 u jezgri je jedini neovisni prediktor napredovanja bolesti, kad se uzmu u obzir stadij i gradus (120, 122-124).

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

Imunohistokemijskom analizom ekspresije p53, pRb i još jednog bitnog regulatora stani nog ciklusa, p21, može se prilično precizno procijeniti o ekivanom 5-godišnjem preživljjenje bolesnika s karcinomom mokra nog mjeđura. Iste studije pokazale su da je u spomenutom intervalu procjenjivanja prognostički bitniji broj mutiranih gena od toga koji je gen zahvaćen (126-127).

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

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

M fazu stani nog ciklusa (128). Istraživanje Cote i sur. pokazala su da su karcinomi mokra nog mjeđura s promjenama p53 osobito osjetljivi na kemoterapijske protokole koji sadrže cisplatin (130).

1.6.7. PROGNOSTI KI IMBENICI

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

Prognostički imbenici mogu se podijeliti na kliničke, morfološke i molekularne imbenike.

Koristeći i isključivo kliničke imbenike, općenito gledano, ne može se sa preciznošću odrediti pojedinačna prognoza infiltrativnog karcinoma. Multifokalnost tumora, tumori veći od 3 cm i istodobni karcinom *in situ* označeni su kao imbenici rizika za recidiv i progresiju (131). Širenje tumora izvan mokra nog mjeđura, infiltracija uša i uretera, metastaze u limfne vorove i prisutnost diseminacije karcinoma povezani su sa lošom prognozom (28).

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

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

prodora u laminu propriu može se odrediti i na temelju mjerena dubine invazije uspomo mikrometra spojenog s mikroskopom (134).

Karcinom *in situ* eš e se nalazi uz tumore višeg gradusa i stadija, a prisutnost limfati ne ili vaskularne invazije negativno utje e na petogodišnje preživljenje (44% u 5 godina) (45).

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

Od ostalih imbenika, isti e se na in rasta tumora. Tumori sa širokom frontom invazije pokazuju bolju prognozu od onih koji rastu u obliku sitnih infiltrativnih nakupina (28).

1.6.8. TERAPIJA I PROGNOZA

Terapija i prognoza karcinoma mokra nog mjehura trenutno ponajprije ovise o stadiju, a dijelom i o gradusu. Valja spomenuti da, iako je invazija prili no loš prognosti ki znak, u dijelu institucija i zemalja postoji obi aji podjele karcinoma na *površinski* i *duboko invazivni*. Prvi uklju uje karcinome bez invazije (pTa) i s invazijom u laminu propriu (pT1), dok se drugi odnosi na bolesnike s invazijom u muskularis propriu (pT2) nadalje (128).

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

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

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

Petogodišnje preživljjenje iznosi oko 95% za papilarne neinvazivne tumore niskog gradusa, oko 75% za tumore s invazijom u laminu propriju, dok se kod tumora s invazijom u miši ni sloj stijenke i probajem kroz isti očekuje preživljjenje između 21-63% bolesnika, ovisno o dubini invazije i stupnju zahvačenosti okolnih organa. U bolesnika sa zahvačenim limfnim vorovima, šansa za petogodišnje preživljjenje iznosi oko 35% (138).

1.7. MIOFIBROBLASTI

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

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

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

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

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

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

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

Tre a skupina patoloških procesa u koje su uklju eni miofibroblasti i kojoj se u posljednje vrijeme posve uje sve ve a pažnja jest stromalna reakcija koja se pojavljuje u sklopu lokalnog širenja i rasta mnogih malignih tumora (148).

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

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

U istraživanjima strome u invazivnim karcinomima mokra nog mjejhura, dokazane su promjene fenotipa stromalnih stanica u smislu gubitka odre enih biljega fibroblasta poput CD34 i pojave miofibroblasti nih biljega (156), kao i promjena rasporeda stromalnih miofibroblasta u odnosu na neinvazivne karcinome (157).

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

Nedavno je dokazano da tumorske epitelne stanice imaju sposobnost aktiviranja fibroblasta i njihovog pretvaranja u miofibroblaste. Pritom postoji više imbenika za koje se smatra da *in vivo* uvjetuju prijelaz fibroblasta u miofibroblaste. Glavne uloge imaju mehaničko naprezanje, transformirajući faktor rasta 1 (TGF- β 1), PDGF (od engl. „platelet-derived growth factor“) te stanični fibronektin. TGF- β 1 i PDGF se također mogu smatrati i ključnim molekulama koje sintetiziraju tumorske stanice, a njihova uloga promjena strome domaćina i omogućavanje progresije tumora (159).

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

Nedavno su neki od mehanizama uključujućih u spomenutoj komunikaciji tumorskih stanica i miofibroblasta pojašnjeni. Ovi se da istodobna proizvodnja faktora rasta i citokina (poput TGF- β 1, faktora rasta hepatocita i drugih) te određenih komponenata ekstracelularnog matriksa (poput fibronektina, tenascina, versikana i matriks metaloproteinaza) potiče invazivnost malignih epitelnih stanica (161-162). U stromi invazivnih karcinoma mokračnog mjeđuhrama također je uočena pojava ana ekspresija navedenih biljega (163-164).

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

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

1.8. UPALNA REAKCIJA STROME NA NEOPLAZIJU

Postoje dvije linije obrane organizma od karcinoma. Prva je preventivna i djeluje na stani noj razini, a ine je tumor supresorski geni. Jedan dio njih regulira stani nu proliferaciju, a ostali popravljaju ošte enja DNA. Drugu liniju obrane predstavlja imuni sustav koji je primarno usmjeren na obranu organizma od biokemijski stranih tvari zvanih antigeni, bili oni ksenogeni (porijekla druge vrste), alogeni (porijekla druge jedinke) ili izmijenjeni autogeni (vlastitog porijekla). Obrambena reakcija protiv tumorskih stanica najmanje je izražena od sve tri; iako se tumorske i normalne stanice poprili no razlikuju izgledom, biokemijske razlike izme u njih su vrlo suptilne i ne dozvoljavaju uvijek sigurno razlikovanje malignog od normalnog, što je preduvjet za u inkovitu obranu (166).

Svojstvo odbacivanja tumorskih presadaka u srodnih miševa (unato injenici da su transplantati kože bili prihva eni) dovelo je do spoznaja o postojanju tzv. tumor-specifi nih antigena (TSA) koji uzrokuju imunosni odgovor, a ne nalaze se u normalnim stanicama. Postoji popularna teorija imunosnog nadzora po kojoj po evši ve od fetalnog doba zbog ošte enja DNA u organizmu konstantno nastaju stanice s tumorskim potencijalom koje imunosni sustav prepoznaje i uklanja. Isto tako, imunosni sustav posredno smanjuje opasnost od tumora bore i se protiv tumorigenih virusa. Ipak, postoje mnogi na ini na koji tumori mogu izbjegi imunosni odgovor doma ina, npr. smanjenom ekspresijom molekula MHC I klase na površini stanica, lu enjem topljivih ekstracelularnih antigena koji preusmjeravaju pažnju imunog sustava te induciranjem imunosupresije i imunotolerancije (167).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. HIPOTEZA

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

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

Novija istraživanja ukazuju na blisku povezanost reakcije strome i invazije karcinoma, pri emu važnu ulogu imaju miofibroblasti i upalni odgovor u stromi (151-152, 156-157, 160-161, 165, 173, 175, 178-182, 185). Malo je istraživanja koja se bave miofibroblasti nom i upalnom reakcijom strome u urotelnom karcinomu mokra nog mjehura (156-157, 173, 175), i ve inom se bave spomenutim reakcijama kao prognosti kim pokazateljima, a manje kao dijagnosti kim. Nije razjašnjeno da li je mogu e razlikovati pTa od pT1 karcinoma na temelju izraženosti miofibroblasti ne i upalne reakcije strome.

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

2.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na temelju postavljene hipoteze ciljevi ovog istraživanja su:

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

3. BOLESNICI I METODE

3.1. BOLESNICI

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

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

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

3.2. METODE

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

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

3.2.1. HISTOKEMIJSKA I IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA

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

Mallory trikromnom metodom glatki miši i muskularis mukoze i muskularis proprie obojeni su crveno dok su kolagena vlakna obojena zeleno (186). Analizirano je nasumce odabрано подрује у десет великих видних поља (400x) у pTa папиларном уротелном карциному мокра ног мјехура и у подрују јима недовољне инвазије строме у pT1 карциному.

Obojenost kolagenih vlakana изражена је семиквантитативно и то као: 0. за одсутност зеленог оbojenja; 1, за слабо изражено зeleno obojenje; 2, за умјерено изражено зeleno obojenje и 3, зајако изражено зeleno obojenje (151-152).

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

Kao pozitivne kontrole коришћени су: за vimentin - tkivo miometrija (цитоплазматска реакција), за SMA – tkivo leiomiora (цитоплазматска реакција), за dezmin – tkivo leomioma (цитоплазматска реакција).

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

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

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

3.2.2. PROCJENA UPALNE REAKCIJE I INFILTRACIJA EOZINOFILA

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

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

3.3. STATISTIKA OBRADA PODATAKA

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

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

Za statistiku analizu dobivenih podataka korišten je računalni program SPSS (verzija 15.0 za Windows).

4. REZULTATI

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

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

Tablica 1. Raspodjela po spolu i gradusu tumora

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

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

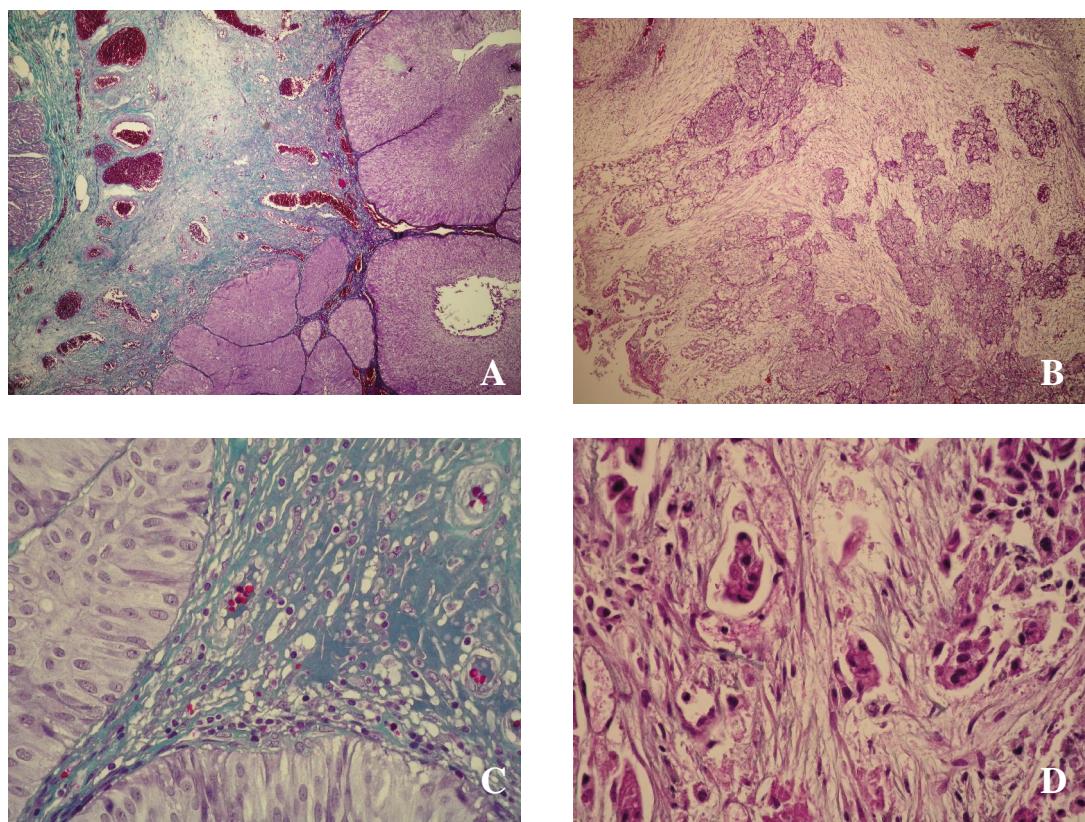
Tablica 2. Prisutnost muskularis mukoze i muskularis proprije

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

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

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

	Invazivni	Neinvazivni	
0	35 (70%)	0 (0%)	0 - odsutnost zelenog obojenja
1	13 (26%)	16 (32%)	1 - slabo izraženo zeleno obojenje
2	2 (4%)	27 (54%)	2 - umjereno izraženo zeleno obojenje
3	0 (0%)	7 (14%)	3 - jako izraženo zeleno obojenje
Ukupno	50 (100%)	50 (100%)	



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

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

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

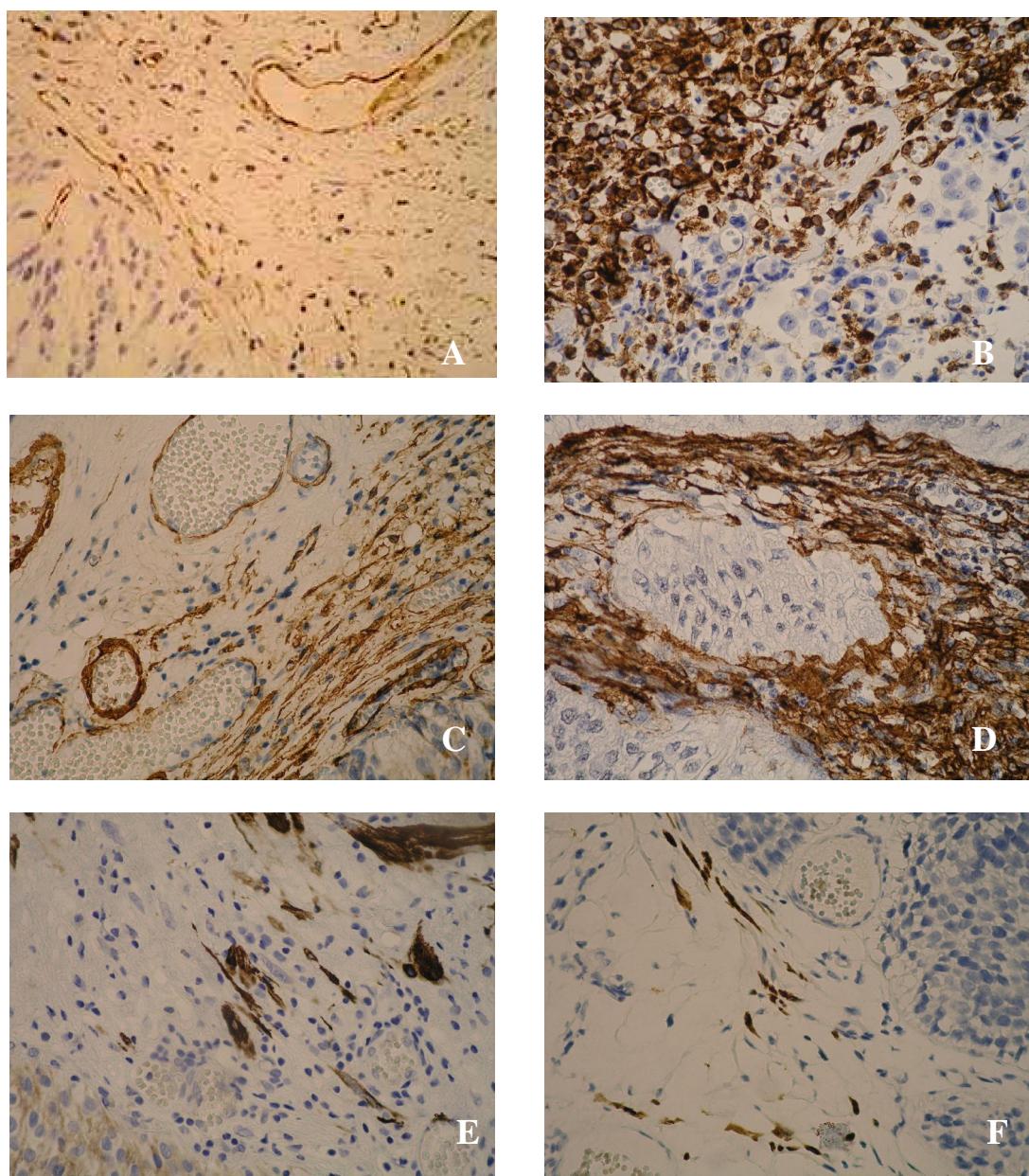
	Invazivni (pT1) karcinom			Nenvazivni (pTa) karcinom		
	vimentin	SMA	dezmin	vimentin	SMA	dezmin
0	0 (0%)	0 (0%)	8 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (26%)
1	2 (4%)	8 (16%)	34 (68%)	26 (52%)	35 (70%)	32 (64%)
2	21 (42%)	14 (28%)	8 (16%)	21 (42%)	11 (22%)	5 (10%)
3	27 (54%)	28 (56%)	0 (0%)	3 (6%)	4 (8%)	0 (0%)
Ukupno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

0 - odsutna reakcija

1 - slabo izražena reakcija, do 33% pozitivnih stanica

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

3 - jako izražena reakcija, preko 66% pozitivnih stanica



Slika 2. Imunohistokemijska izraženost vimentina (A,B), SMA (C,D) i dezmina (E,F) u neinvazivnom (A,C,E) i invazivnom karcinomu (B,D,F). Nalazi se izraženija reakcija na vimentin i SMA u stromi invazivnog (B,D) u odnosu na neinvazivni karcinom (A,C). Izraženost dezmina nije se razlikovala između neinvazivnog (E) i invazivnog karcinoma (F)

(sve mikroslike napravljene su pod velikim vidnim povećanjem, 400X).

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

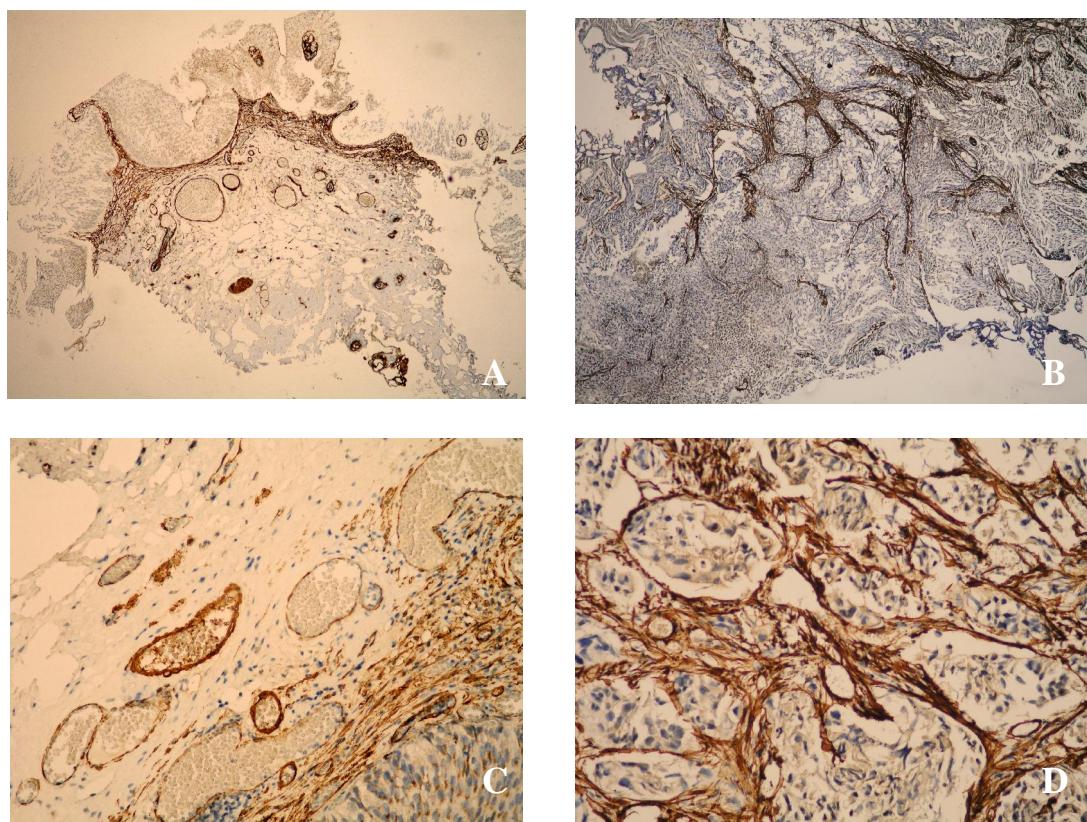
Retikularnu raspodjelu odlikuje prisutnost pojedina nih imunohistokemijski pozitivnih stanica u pravilnim paralelnim redovima u površinskom dijelu lamine proprije te oko velikih krvnih žila u dubljem sloju lamine proprije.

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

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

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

R = retikularan, F = fascikularan



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

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

Tablica 6. Intenzitet upalne reakcije u invazivnom i neinvazivnom karcinomu

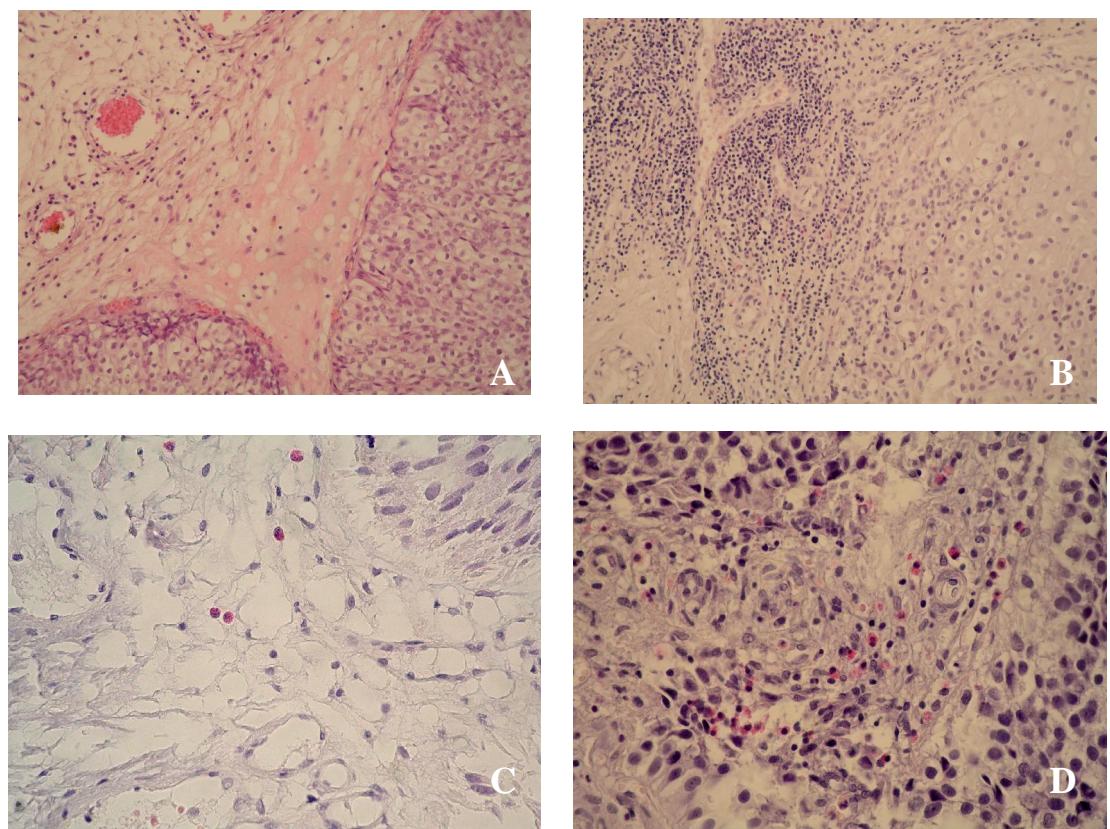
	Invazivni	Neinvazivni
0	0 (0%)	4 (8%)
1	21 (42%)	28 (56%)
2	21 (42%)	15 (30%)
3	8 (16%)	3 (6%)
Ukupno	50 (100%)	50 (100%)

0 – nema upalne reakcije

1 - slabo izražena upalna reakcija

2 - umjereno izražena upalna reakcija

3 - jako izražena upalna reakcija



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

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

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

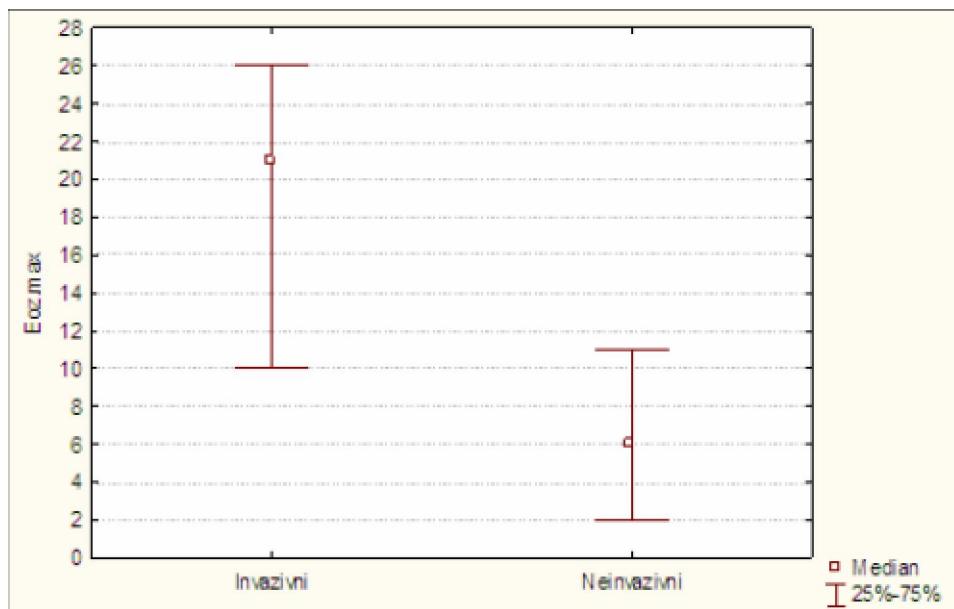
	Skupina	Broj	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum
E_{\max}	Invazivni	50	19.9	13.1	0	47
	Neinvazivni	50	7.5	6.7	0	35
E_{uk}	Invazivni	50	74.5	65.4	0	321
	Neinvazivni	50	22.1	20.9	0	98

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

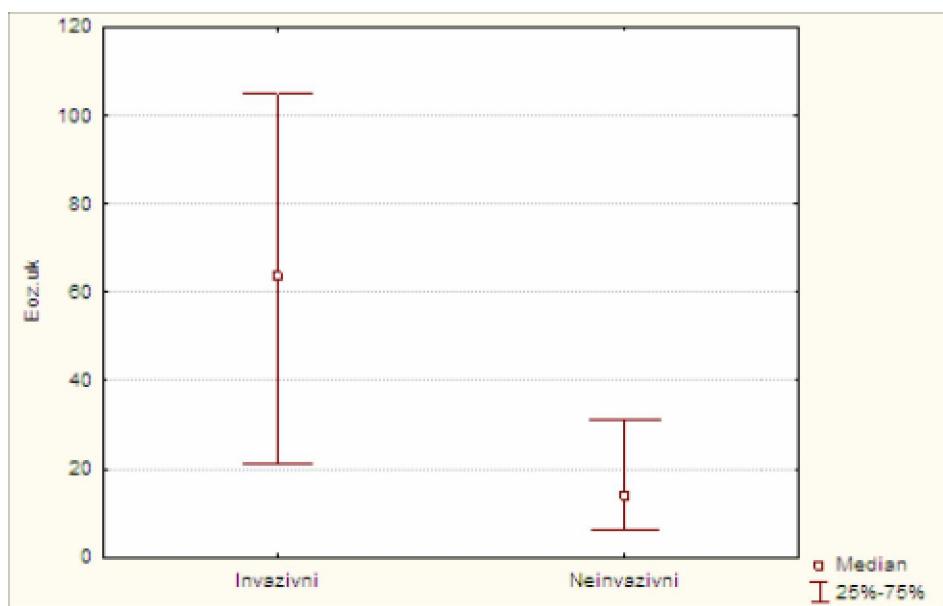
	Osjetljivost	Specifi nost	PPV	NPV
E_{\max}^*	54%	96%	93%	68%
E_{uk}^{**}	52%	94%	90%	66%

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

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



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



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

Rezultati Spearmanovog koeficijenta korelacijske za odabране параметре у инвазивном (pT1) карциному приказани су у таблици 9.

Таблица 9. Пrikaz Spearmanovog koeficijenta korelacijske za odabране параметре у инвазивном (pT1) карциному

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

*p<0,001

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

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

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

*p<0.001, **p<0.05

4.1. STATISTIKA ANALIZA REZULTATA

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

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

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

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

Izraženost vimentina i glatkomiši nog aktina bila je statisti ki zna ajno razlika u invazivnom karcinomu u usporedbi s neinvazivnim (χ^2 -test, $p<0.001$), dok zna ajne razlike u izraženosti dezmina izme u dviju ispitanih skupina nije bilo (χ^2 -test, $p=0.378$).

U lamini propriji invazivnog karcinoma mokra nog mjehura bio je statisti ki zna ajno ve i postotak vimentin pozitivnih stanica u usporedbi s neinvazivnim karcinomom. Slično, u lamini propriji invazivnog karcinoma mokra nog mjehura bio je statisti ki zna ajno ve i postotak SMA pozitivnih stanica u usporedbi s neinvazivnim karcinomom.

Lamina propria invazivnih i neinvazivnih karcinoma nije se razlikovala samo po postotku stanica pozitivnih na spomenute biljege, ve i po na inu

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

Fascikularan/neorganiziran raspored vimentin pozitivnih stanica unutar lamine proprije na en je u statisti ki zna ajno ve em broju invazivnih karcinoma (χ^2 -test, $p<0.001$), dok je u neinvazivnom karcinomu bio zna ajno ve i broj uzoraka s retikularnim/organiziranim rasporedom. Raspored SMA pozitivnih stanica bio je tako er statisti ki zna ajno eš e fascikularan u invazivnom karcinomu za razliku od neinvazivnog karcinoma, u kojem je pretežno bio retikularan (χ^2 -test, $p<0.001$).

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

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

Utvr ena je statisti ki zna ajna razlika u op oj izraženosti upalne reakcije u invazivnom i neinvazivnom karcinomu (χ^2 -test, $p<0.05$).

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

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

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

Ujedno su izra unate osjetljivost, specifi nost, pozitivna prediktivna vrijednost i negativna prediktivna vrijednost brojanja eozinofila u lamini propriji u razlikovanju invazivnih od neinvazivnih karcinoma. Grani ne vrijednosti odabrane su obzirom na medijane vrijednosti E_{\max} i E_{uk} , a iznose 20 eozinofila/VVP i 60 eozinofila/10VVP.

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

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

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

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

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

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

5. RASPRAVA

Iako je karcinom mokra nog mjehura po incidenciji deveti naj eš i maligni tumor u oba spola te sedmi naj eš i u muškaraca (53), na njegovo lije enje se od dijagnoze do smrti potroši više nov anih sredstava po bolesniku nego u bilo koje druge maligne bolesti (57).

U posljednjih 50-tak godina uvelike su rasvijetljeni rizi ni faktori za nastanak karcinoma mokra nog mjehura, pa ak i mehanizam samog nastanka (55, 58-61, 63-65, 71-72, 93). Me utim, mehanizam razvoja i širenja bolesti nije u potpunosti razjašnjen. Novije spoznaje iz istraživanja provedenih na razli itim vrstama karcinoma govore u prilog teze da je osim epitelnog i stromalni dio tumora jednako važan u rastu, razvoju i širenju tumora (148-152, 160). Sli ni zaklju ci dobiveni su i iz istraživanja provedenih na karcinomu mokra nog mjehura (156-157, 173).

Stroma tumora (od gr. $\sigma\tau\mu$ = krevet) je vezivno tkivo koje u obliku mreže okružuje tumorske stanice i pruža im funkcionalnu potporu. Gra ena je od fibroblasta, miofibroblasta, endotelnih i upalnih stanica koje lu e humoralne imbenike kao što su imbenici rasta i enzimi koji razgra uju izvanstani ni matriks. Na taj na in stromalne stanice mogu predstavljati bitne imbenike u rastu i širenju tumora. Smatra se da miofibroblasti predstavljaju jednu od najvažnijih, ako ne i najvažniju vrstu stanica u tom procesu (161, 165, 167).

Po definiciji, miofibroblast je mezenhimalna stanica vretenasta oblika koja dijeli histološka, imunohistokemijska i ultrastruktturna obilježja glatkomisi ne stanice i fibroblasta (2). Novija istraživanja ukazuju na komunikaciju miofibroblasta i tumorskih stanica i zna aj mehanizama uspomo kojih se ta komunikacija odvija. I ni se da istodobno lu enje faktora rasta i ili citokina (poput transformiraju eg imbenika rasta beta – TGF i imbenika rasta hepatocita) i sinteza komponenata izvanstani nog matriksa (poput tenascina) od strane stromalnih miofibroblasta stimulira invazivnost malignih epitelnih stanica. Spomenuta komunikacija sli na je onoj koja se

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

Miofibroblasti su osobito brojni u stromi dezmplasti nih primarnih invazivnih i metastatskih karcinoma. Tako er su opisani u blizini neinvazivnih neoplasti nih promjena poput skvamoznih intraepitelnih lezija vrata maternice (CIN I-III), gdje su smješteni pod bazalnom laminom, u ve em broju i intenzivnije obojani u lezijama s višim gradusom displazije (153). Ipak, op enito gledano, miofibroblasti se znatno rje e nalaze u stromi koja okružuje neinvazivne karcinome, što upu uje da miofibroblasti nu stromalnu reakciju poti e disruptija bazalne membrane i širenje karcinoma u podleže e vezivo (149-150, 157).

Miofibroblasti nisu jednoliko raspore eni unutar strome dezmplasti nih karcinoma. Prema istraživanju Schurčha i sur. (155) provedenom na invazivnom duktalnom karcinomu dojke, miofibroblasti su najbrojniji unutar mlade mezenhimalne strome, zatim unutar podru ja koja odgovaraju ranoj stromalnoj invaziji i unutar periferne invazivne fronte tumorskih stanica. U centralnim sklerotima podru jima tih karcinoma broj miofibroblasta je znajno smanjen, što je vjerojatno posljedica apoptoze (155).

Prema istom istraživanju, u invazivnom duktalnom karcinomu dojke postoje tri tipa miofibroblasti ne stromalne reakcije: (a) preuranjena, u kojoj miofibroblasti ulaze u okolno tkivo dublje nego karcinomske stanice; (b) istovremena, u kojoj su miofibroblasti raspore eni izme u karcinomske stanice; i (c) kasna, u kojoj se miofibroblasti nalaze centralno od invazivne fronte karcinomske stanice. Istovremena reakcija obično je najizraženija. Analizom kolagenog matriksa, na ena je pove ana koli ina kolagena tipa III unutar mlade mezenhimalne strome koja sadrži najviše miofibroblasta. S druge strane, kolagen tipa I je najistaknutiji unutar središnje skleroti ne zone karcinoma dojke, u kojoj su miofibroblasti zamijenjeni fibroblastima (155).

Prisutnost miofibroblasta dokazana je i u stromi karcinoma mokra nog mjehura (11, 156-157, 188). U ovom istraživanju, miofibroblasti na reakcija strome procjenjivana je uspomo izraženosti imunohistokemijske reakcija

stanica lamine proprie na vimentin i glatkomisi ni aktin (SMA), a ujedno je u injeno imunohistokemijsko bojanje dezminom kako bi se razlikovali miofibroblasti od glatkomisi nih stanica muskularis mukoze. Izrazenost spomenutih biljega analizirana je u prethodno ozna enim podru jima na preparatima bojenim Mallory trikrom metodom. Miofibroblasti pokazuju pozitivnu reakciju na vimentin i SMA dok je reakcija na dezmin negativna. Fibroblasti su pozitivni na vimentin, a negativni na SMA i dezmin. Glatki miši i su pozitivni su na SMA i dezmin, a reakcija na vimentin je negativna.

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

Statisti kom obradom podataka u ovom je istraživanju po prvi put potvr ena zna ajno izraženija reakcija na vimentin i SMA u lami proprie invazivnih (pT1) karcinoma u odnosu na neinvazivne (pTa) karcinome, što ukazuje da se pri invaziji urotelnog papilarnog karcinoma u lami proprie pove ava broj miofibroblasta.

Prvi opis miofibroblasta u lami proprie invazivnih karcinoma dali su 2006. Shimasaki i sur. (157), ije je istraživanje provedeno s nešto druga ijjim imunohistokemijskim biljezima i na znatno manjem broju uzoraka. Njihovo istraživanje provedeno je na 6 uzoraka invazivnog i 19 neinvazivnog karcinoma pri emu tumori nisu subklasificirani obzirom na papilarni i ravan na in rasta, a u skupinu invazivnih tumora uklju en je i manji broj karcinoma koji nisu bili urotelne diferencijacije. U njihovom istraživanju elektronskom i imunoelektronskom mikroskopijom potvr eno je da SMA pozitivne i h-kaldezmon negativne stanice u lami proprie imaju ultrastruktturna obilježja miofibroblasta, no nije kvantificirana izrazenost miofibroblasti nih biljega u lami proprie (157).

U istraživanju provedenom 2007., Nimpfius i sur. (156) utvrdili su razlike u zastupljenosti CD34-pozitivnih fibročita i SMA-pozitivnih miofibroblasta u lamini proprij u uzoraka mokra nog mjeđura sa i bez tumora. Prema njima, u mokra nom mjeđuru bez tumora postoji populacija CD34-pozitivnih i SMA-negativnih fibročita smještenih u dubljem dijelu lamine proprij. Stanice sa spomenutim fenotipom zadužene su za sintezu izvanstani nog matriksa. Tijekom nastanka tumora, ova populacija stanica mijenja fenotip i prelazi u CD34-negativne, SMA-pozitivne miofibroblaste. Iako je u njihovom istraživanju pokazana statistički znatna razlika u izraženosti SMA u uzorcima bez tumora i sa tumorom, nije bilo znatne razlike u pTa i pT1 karcinomima, što može biti rezultat nešto manjeg broja uzoraka (11 pTa uzoraka, 17 pT1 uzoraka) (156).

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

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

Budući da se radi o statistički znatno visokoj razini ($p<0.001$), zaključak ovog istraživanja u skladu je sa zaključkom Shimasakija i sur. (157) da je raspodjela miofibroblasti fascikularna u invazivnom, a retikularna u neinvazivnom karcinomu mokra nog mjeđura. Na osnovi dobivenih rezultata možemo zaključiti da procjena raspodjele miofibroblasti može pomoći u dijagnozi invazije u laminu propriju.

U ovom istraživanju rezultati histokemijskog bojenja strome Mallory trikrom metodom u skupini invazivnih karcinoma i skupini neinvazivnih, koja je služila kao kontrolna skupina, pokazali su da se stroma invazivnih karcinoma statisti ki zna ajno slabije boji zeleno u usporedbi sa laminom proprijom mokra nog mjeđura bez invazije.

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

Obzirom na statisti ki zna ajnu razliku u rezultatima histokemijskog bojenja strome dviju ispitivanih grupa, može se zaključiti da je u lamini proprij s invazivnim karcinomom došlo do promjena u odnosu na laminu propriju karcinoma bez invazije. Pošto se Mallory trikrom metodom kolagena vlakna boje zeleno, a miši na vlakna crveno (186), odsutnost ili oskudnost zelenog obojenja ukazuje da u lamini proprij mokra nog mjeđura s invazivnim karcinomom dolazi do promjene u količini ili sastavu kolagena.

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

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

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

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

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

Rezultati Spearmanovog testa korelacije pokazuju da u skupini invazivnih karcinoma fascikularna/neorganizirana raspodjela miofibroblasta korelira sa slabijim obojenjem lamine proprije Mallory trikromnom metodom. To ukazuje da bi promjene kolagena u obojenju mogli biti povezane s miofibroblastima ne strome. Odsutnost korelacije svih miofibroblasti nih biljega sa Mallory trikromnom metodom može biti odraz

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

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

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

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

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

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

U ovom istraživanju izraženost upalne reakcije bila je umjerena ili jaka u 29 (58%) uzoraka invazivnog pT1 karcinoma te u 18 (36%) uzoraka neinvazivnog karcinoma, što je predstavljalo statisti ki zna ajnu razliku (χ^2 -test, $p<0.05$). Iako ta razlika ne predstavlja vrlo sigurno dijagnosti ko oru e, rezultat sugerira pomnije traženje invazije u podru ju s izraženom upalnom reakcijom prilikom patohistološke analize.

Eozinofili su polimorfonuklearni leukociti ija je najzna ajnija evolucijska uloga obrana od parazita, a imaju važnu ulogu i u patogenezi alergijskih bolesti. Oni esto infiltriraju zlo udne tumore, osobito one epitelnog porijekla, a najizraženije nakupljanje eozinofila zabilježeno je u karcinomima velikih keratiniziraju ih stanica poput plo astog karcinoma kože, usne šupljine, vanjskih genitalija i anusa (177).

Istraživanje Simsona i sur. iz 2007. (195) pokazalo je da eozinofili imaju bitnu ulogu u imunološkom nadzoru tumora. Oni su tretirali miševe metilkolanrenom pokušavaju i izazvati fibrosarkom. Eksperiment je proveden s istim dozama karcinogena u skupini miševa divljeg tipa i nekoliko skupina transgeni nih miševa; IL-5 transgeni nih miševa koji imaju visoku razinu cirkuliraju ih eozinofila, zatim u miševa s nokautiranim genom za kemotakti ni protein eotaksin te u dva soja transgeni nih miševa koji uop e nemaju eozinofile. Najve a u estalost i najbrži rast tumora zabilježen je u sojevima bez eozinofila, malo manji u sojevima bez eotaksina, a znatno manji u miševa divljeg tipa i IL-5 transgeni nih miševa. Rezultati su tako er pokazali da su IL-5 transgeni ni miševi bili otporniji na nastanak tumora od miševa divljeg tipa, a u slu aju nastanka, tumori su bili znatno manji te infiltrirani znatno ve im brojem eozinofila (195).

U istraživanju iz 2006., Cormier i sur. (178) pratili su nakupljanje eozinofila u tumoru nakon uštrcavanja melanomskih stanica u miševe. Nakupljanje eozinofila bilo je kontinuirano i izraženo u nekroti nim podru jima i u kapsuli tumora od samog po etka pokusa, a degranulacija eozinofila bila je prisutna samo u podru jima nekroze. Istraživanje kemotaksije eozinofila u *in vitro* uvjetima ukazalo je na prisutnost nepoznatog kemotakti nog imbenika prisutnog isklju ivo u lizatu nekroti nog tumora, a

ne i u kulturi održanih tumorskih stanica. Ujedno je *in vivo* u injena deplecija CD4+ T limfocita uspomo protutijela koja nije utjecala na nakupljanje eozinofila. Stoga su autori zaklju ili da je nakupljanje eozinofila u zlo udnjim tumorima proces koji je kontinuiran i uklju en u rani imunološki odgovor te da nije ovisan o Th2 upalnom odgovoru (178).

Nekoliko novih istraživanja opisuje da odre ivanje broja eozinofila u stromi karcinoma može pomo i u dijagnozi invazije. Spiegel i sur. (179) usporedili su broj eozinofila koji okružuju intraepitelnu neoplaziju stidnice teškog stupnja i karcinom stidnice s invazijom te utvrdili da je broj eozinofila >20/VVP i 50/10 VVP ograni en na slu ajeve vulvarnog karcinoma plo astih stanica s invazijom. U istraživanju cervikalne intraepitelne neoplazije i invazivnog karcinoma plo astih stanica vrata maternice dobiveni su sli ni rezultati, s nešto druga ijjim vrijednostima eozinofila (180). Odre ivanje broja eozinofila može tako er biti korisno u procjeni invazije plo astog karcinoma u podru ju glave i vrata kao dijagnosti ki kriterij vrlo visoke specifi nosti (100%) i nešto niže osjetljivosti (61%) (181).

U mokra nom mjehuru su zamije ene promjene vezane uz infiltraciju eozinofila u sklopu nastanka urotelnog karcinoma. Lose i sur. (183) mjerili su koncentraciju eozinofilnog kationskog proteina (ECP) u urinu 18 pacijenata s karcinomom i 18 kontrolnih ispitanika te ustvrdili da je razina ECP zna ajno viša u skupini bolesnika s karcinomom.

Jedino u literaturi dostupno istraživanje koje se odnosi na odre ivanje broja eozinofila u urotelnom karcinomu mokra nog mjehura je ono koje su u inili Lowe i sur. (177). Koristili su jednostavnu metodologiju, odredivši broj od 100 eozinofila/10VVP kao izrazito povišen i ustanovili da znatno ve i postotak tumora s tim stupnjem eozinofilije pokazuje plo astu metaplaziju i tendenciju invazije u dublje slojeve, osobito miši ni sloj stijenke mokra nog mjehura. Spomenuto istraživanje ne sadrži procjenu osjetljivosti ili specifi nosti odre ivanja broja eozinofila u dijagnozi invazije (177).

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

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

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

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

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

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

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

Ovakav profil dobivenih vrijednosti ukazuje da invazija u laminu karcinoma mokra nog mjeđu nije uvijek prvena infiltracijom eozinofila, no izražena infiltracija eozinofila gotovo uvijek ukazuje na invazivni karcinom u pozadini procesa te poziva na dodatne dijagnostike napore u potvrđivanju iste.

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

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

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

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

6. ZAKLJU CI

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaklju iti:

1. Intenzitet zelenog obojenja lamine proprije Mallory trikrom metodom u pT1 papilarnom urotelnom karcinomu mokra nog mjehura bio je statisti ki zna ajno slabiji u odnosu na laminu propriju pTa karcinoma (χ^2 -test, $p<0.001$). Statisti kom analizom histokemijskih i imunohistokemijskih rezultata potvr ena je negativna korelacija izme u intenziteta zelenog obojenja Mallory trikrom metodom i fascikularne distribucije SMA (Spearmanov test korelacije, $p<0.05$), dok takva povezanost nije na ena za ostale miofibroblasti ne biljege (Spearmanov test korelacije, $p>0.05$).

Razlika u intenzitetu obojenja upu uje na zaklju ak da u stromi invazivnog karcinoma dolazi do promjene u koli ini ili sastavu kolagena. Promjena intenziteta zelenog obojenja Mallory trikrom metodom u stromi invazivnog karcinoma vjerojatno je dijelom rezultat miofibroblasti ne reakcije.

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

Kombinacija izraženosti vimentina i SMA karakteristi na je za fenotip miofibroblasta pa poja ana izraženost u stromi invazivnog karcinoma upu uje na pove an broj miofibroblasta. Izraženost dezmina u lamini propriji mokra nog mjehura nije pokazala razliku izme u ispitivanih skupina jer je karakteristi na za sloj muskularis mukoze koji je bio prisutan u približno jednakom postotku invazivnih i neinvazivnih karcinoma.

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

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

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

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

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

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

Odre ivanje broja eozinofila predstavlja dijagnosti ki kriterij vrlo visoke specifi nosti i pozitivne prediktivne vrijednosti za prisutnost invazije. Nakupljanje eozinofila u invazivnom karcinomu je tumor-specifi no, a u neinvazivnom ovisi o intenzitetu upalne reakcije.

Dobiveni rezultati potvr uju promjene u stromi papilarnog urotelnog karcinoma mokra nog mjejhura s invazijom u laminu propriu koje su dijelom posljedica miofibroblasti ne reakcije, a koje je mogu e histokemijski i imunohistokemijski dokazati te promjene u upalnoj reakciji koje su vidljive histološki. Mogu nost korištenja spomenutih promjena je iskoristiva u dijagnozi invazije u laminu propriu, posebice kada se radi o dvojbenim slu ajevima odnosno tzv. „mikroinvazivnom karcinomu“. Mallory trikrom metoda bi se mogla gotovo rutinski koristiti u dijagnozi invazije u laminu propriu jer je podjednako uspješna u otkrivanju reaktivne strome tumora kao i imunohistokemijske metode, a puno je jednostavnija, brža i jeftinija.

7. SAŽETAK

Rak mokra nog mjeđura predstavlja jednu od najčešćih malignih bolesti, osobito u muške populacije. Utjecaj rizičnih imbenika na njegov nastanak dobro je dijelom rasvijetljen, ali imbenici koji utječu na brzinu napredovanja bolesti nisu sasvim razjašnjeni. Novije spoznaje govore u prilog teze da je osim epitelnog i stromalnog dijela tumora jednako važan u rastu, razvoju i širenju tumora.

Hipoteza ovog istraživanja je da u stromi invazivnog (pT1) papilarnog urotelnog karcinoma mokra nog mjeđura postoji izraženija miofibroblasti na i upalna reakcija u odnosu na laminu propriu neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokra nog mjeđura te da histološka razlika u intenzitetu miofibroblasti ne i upalne reakcije može pomoći u diferencijalnoj dijagnozi tih dva stadija karcinoma.

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

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

5. analizirati i usporediti izraženost upalne reakcije te broj eozinofila u laminu propriji invazivnog (pT1) i neinvazivnog (pTa) papilarnog urotelnog karcinoma mokra nog mjeđura.

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

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

8. SUMMARY

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

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

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

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

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

Zlatko Marušić , Zagreb, 2010.

9. LITERATURA

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

- pathologic staging of invasive urothelial carcinoma. Am J Surg Pathol 2009;33:91-8.
12. Epstein JI. Pathologists and the judicial process: how to avoid it. Am J Surg Pathol 2001;25:527-37.
 13. Jequier S, Rousseau O. Sonographic measurements of the normal bladder wall in children. AJR Am J Roentgenol 1987;149:563-6.
 14. Krause WJ. Essentials of human histology. 2. izdanje. New York: Little, Brown and Company, 1996.
 15. Philip AT, Amin MB, Tamboli P, Lee TJ, Hill CE, Ro JY. Intravesical adipose tissue: a quantitative study of its presence and location with implications for therapy and prognosis. Am J Surg Pathol 2000;24:1286-90.
 16. Moore KL. The urogenital system in the developing human. Clinically oriented embryology. 3. izdanje. Philadelphia: WB Saunders, 1982.
 17. Petersen RO, Sesterhenn I, Davis C. Urologic Pathology. 3. izdanje. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
 18. Goldstein AM, Fauer RB, Chinn M, Kaempf MJ. New concepts on formation of Brunn's nests and cysts in urinary tract mucosa. Urology 1978;11:513-7.
 19. Wiener DP, Koss LG, Sablay B, Freed SZ. The prevalence and significance of Brunn's nests, cystitis cystica and squamous metaplasia in normal bladders. J Urol 1979;122:317-21.
 20. Smith AK, Hansel DE, Jones JS. Role of cystitis cystica et glandularis and intestinal metaplasia in development of bladder carcinoma. Urology 2008;71:915-8.
 21. Tannenbaum M. Inflammatory proliferative lesion of urinary bladder: squamous metaplasia. Urology 1976;7:428-9.
 22. Bell TE, Wendel RG. Cystitis glandularis: benign or malignant? J Urol 1968;100:462-5.
 23. Corica FA, Husmann DA, Churchill BM, i sur. Intestinal metaplasia is not a strong risk factor for bladder cancer: study of 53 cases with long-term follow-up. Urology 1997;50:427-31.

24. Edwards PD, Hurm RA, Jaeschke WH. Conversion of cystitis glandularis to adenocarcinoma. *J Urol* 1972;108:568-70.
25. Oliva E, Young RH. Nephrogenic adenoma of the urinary tract: a review of the microscopic appearance of 80 cases with emphasis on unusual features. *Mod Pathol* 1995;8:722-30.
26. Young RH. Tumor-like lesions of the urinary bladder. *Mod Pathol* 2009;22 Suppl 2:S37-52.
27. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1435-48.
28. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I. WHO Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 6. izdanje. Lyon: IARC Press, 2004.
29. Obermann EC, Junker K, Stoehr R, i sur. Frequent genetic alterations in flat urothelial hyperplasias and concomitant papillary bladder cancer as detected by CGH, LOH, and FISH analyses. *J Pathol* 2003;199:50-7.
30. Baker PM, Young RH. Radiation-induced pseudocarcinomatous proliferations of the urinary bladder: a report of 4 cases. *Hum Pathol* 2000;31:678-83.
31. Chan TY, Epstein JI. Radiation or chemotherapy cystitis with "pseudocarcinomatous" features. *Am J Surg Pathol* 2004;28:909-13.
32. Lane Z, Epstein JI. Pseudocarcinomatous epithelial hyperplasia in the bladder unassociated with prior irradiation or chemotherapy. *Am J Surg Pathol* 2008;32:92-7.
33. Cina SJ, Lancaster-Weiss KJ, Leckstell K, Epstein JI. Correlation of Ki-67 and p53 with the new World Health Organization/International Society of Urological Pathology Classification System for Urothelial Neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:646-51.

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

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

- Epidemiology, and End Results (SEER) Program. Oncologist 2007;12:20-37.
56. Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. Eur Urol 2004;46:170-6.
 57. Riley GF, Potosky AL, Lubitz JD, Kessler LG. Medicare payments from diagnosis to death for elderly cancer patients by stage at diagnosis. Med Care 1995;33:828-41.
 58. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. Nat Clin Pract Urol 2006;3:327-40.
 59. Okada Y, Hanada M, Sugiura Y. Bladder Cancer and Smoking. Br Med J 1964;1:649-50.
 60. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks in Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon: IARC Press, 2004.
 61. Castelao JE, Yuan JM, Skipper PL, i sur. Gender- and smoking-related bladder cancer risk. J Natl Cancer Inst 2001;93:538-45.
 62. Dietrich H, Dietrich B. Ludwig Rehn (1849-1930)-pioneering findings on the aetiology of bladder tumours. World J Urol 2001;19:151-3.
 63. Mc DD, Lund RR. The role of the urine in vesical neoplasm. I. Experimental confirmation of the urogenous theory of pathogenesis. J Urol 1954;71:560-70.
 64. Beland FA, Beranek DT, Dooley KL, Heflich RH, Kadlubar FF. Arylamine-DNA adducts in vitro and in vivo: their role in bacterial mutagenesis and urinary bladder carcinogenesis. Environ Health Perspect 1983;49:125-34.
 65. Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF, Jr. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. Am J Epidemiol 1984;119:510-5.

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

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

88. Jones TD, Cheng L. Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential: evolving terminology and concepts. *J Urol* 2006;175:1995-2003.
89. Holmang S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C, Johansson SL. Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol* 2001;165:1124-8; discussion 1128-30.
90. Barbisan F, Santinelli A, Mazzucchelli R, i sur. Strong immunohistochemical expression of fibroblast growth factor receptor 3, superficial staining pattern of cytokeratin 20, and low proliferative activity define those papillary urothelial neoplasms of low malignant potential that do not recur. *Cancer* 2008;112:636-44.
91. Malmstrom PU, Busch C, Norlen BJ. Recurrence, progression and survival in bladder cancer. A retrospective analysis of 232 patients with greater than or equal to 5-year follow-up. *Scand J Urol Nephrol* 1987;21:185-95.
92. Holmang S, Johansson SL. Stage Ta-T1 bladder cancer: the relationship between findings at first followup cystoscopy and subsequent recurrence and progression. *J Urol* 2002;167:1634-7.
93. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, i sur. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005;66:4-34.
94. Lum BL, Torti FM. Therapeutic approaches including interferon to carcinoma in situ of the bladder. *Cancer Treat Rev* 1985;12 Suppl B:45-59.
95. Smith G, Elton RA, Beynon LL, Newsam JE, Chisholm GD, Hargreave TB. Prognostic significance of biopsy results of normal-looking mucosa in cases of superficial bladder cancer. *Br J Urol* 1983;55:665-9.
96. McKenney JK, Gomez JA, Desai S, Lee MW, Amin MB. Morphologic expressions of urothelial carcinoma in situ: a detailed evaluation of its

- histologic patterns with emphasis on carcinoma *in situ* with microinvasion. Am J Surg Pathol 2001;25:356-62.
97. Rosin MP, Cairns P, Epstein JI, Schoenberg MP, Sidransky D. Partial allelotype of carcinoma *in situ* of the human bladder. Cancer Res 1995;55:5213-6.
 98. Murphy WM, Busch C, Algaba F. Intraepithelial lesions of urinary bladder: morphologic considerations. Scand J Urol Nephrol Suppl 2000;67-81.
 99. Norming U, Tribukait B, Gustafson H, Nyman CR, Wang NN, Wijkstrom H. Deoxyribonucleic acid profile and tumor progression in primary carcinoma *in situ* of the bladder: a study of 63 patients with grade 3 lesions. J Urol 1992;147:11-5.
 100. Desai S, Lim SD, Jimenez RE, et al. Relationship of cytokeratin 20 and CD44 protein expression with WHO/ISUP grade in pTa and pT1 papillary urothelial neoplasia. Mod Pathol 2000;13:1315-23.
 101. Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML, et al. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. Am J Pathol 2002;161:1199-206.
 102. Pich A, Chiusa L, Formiconi A, Galliano D, Bortolin P, Navone R. Biologic differences between noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and low-grade (grade 1) papillary carcinomas of the bladder. Am J Surg Pathol 2001;25:1528-33.
 103. Richter J, Jiang F, Gorog JP, et al. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. Cancer Res 1997;57:2860-4.
 104. van Rhijn BW, Lurkin I, Radvanyi F, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. Cancer Res 2001;61:1265-8.

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

- carcinosarcoma of the urinary bladder. *Virchows Arch* 2002;440:436-40.
116. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *J Clin Oncol* 2006;24:5552-64.
 117. Spiess PE, Czerniak B. Dual-track pathway of bladder carcinogenesis: practical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:844-52.
 118. Yeager T, Stadler W, Belair C, Puthenveetil J, Olopade O, Reznikoff C. Increased p16 levels correlate with pRb alterations in human urothelial cells. *Cancer Res* 1995;55:493-7.
 119. Balazs M, Carroll P, Kerschmann R, Sauter G, Waldman FM. Frequent homozygous deletion of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (MTS1, p16) in superficial bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;19:84-9.
 120. Grossman HB, Liebert M, Antelo M, i sur. p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:829-34.
 121. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, i sur. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Res* 1998;58:1090-4.
 122. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, i sur. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol* 1995;13:1384-90.
 123. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, i sur. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:53-9.
 124. Lippinen PK. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 1993;53:365-70.
 125. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, i sur. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1251-6.

126. Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, i sur. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22:1007-13.
127. Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J, i sur. p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1014-24.
128. Weidner N, Cote R, Suster S, Weiss LM. Modern Surgical Pathology. 2. izdanje. Philadelphia: Saunders, 2009.
129. Mitra AP, Almal AA, George B, i sur. The use of genetic programming in the analysis of quantitative gene expression profiles for identification of nodal status in bladder cancer. *BMC Cancer* 2006;6:159.
130. Cote RJ, Esrig D, Groshen S, Jones PA, Skinner DG. p53 and treatment of bladder cancer. *Nature* 1997;385:123-5.
131. Rodriguez-Alonso A, Pita-Fernandez S, Gonzalez-Carrero J, Nogueira-March JL. Multivariate analysis of survival, recurrence, progression and development of metastasis in T1 and T2a transitional cell bladder carcinoma. *Cancer* 2002;94:1677-84.
132. Hasui Y, Osada Y, Kitada S, Nishi S. Significance of invasion to the muscularis mucosae on the progression of superficial bladder cancer. *Urology* 1994;43:782-6.
133. Younes M, Sussman J, True LD. The usefulness of the level of the muscularis mucosae in the staging of invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 1990;66:543-8.
134. Cheng L, Weaver AL, Neumann RM, Scherer BG, Bostwick DG. Substaging of T1 bladder carcinoma based on the depth of invasion as measured by micrometer: A new proposal. *Cancer* 1999;86:1035-43.
135. Jimenez RE, Gheiler E, Oskanian P, i sur. Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progression-free survival. *Am J Surg Pathol* 2000;24:980-7.
136. Abel PD, Hall RR, Williams G. Should pT1 transitional cell cancers of the bladder still be classified as superficial? *Br J Urol* 1988;62:235-9.

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

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

- gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest* 1993;68:696-707.
160. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 2001;166:2472-83.
 161. Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 2004;45 Suppl 2:S163-75.
 162. De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, i sur. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J* 2004;18:1016-8.
 163. Booth C, Harnden P, Selby PJ, Southgate J. Towards defining roles and relationships for tenascin-C and TGF β -1 in the normal and neoplastic urinary bladder. *J Pathol* 2002;198:359-68.
 164. Ioachim E, Michael M, Stavropoulos NE, i sur. Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21(Waf1/Cip1) and p27(Kip1) in urothelial carcinoma: correlation with other cell-cycle-related proteins (Rb, p53, Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *Urol Int* 2004;73:65-73.
 165. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003;200:500-3.
 166. Chandrasoma P, Taylor CR. Concise Pathology. 3. izdanje. Stamford: Appleton & Lange, 1998.
 167. Majno G, Joris I. Cells, Tissues and Disease: Principles of General Pathology. 2. izdanje. Oxford: Oxford University Press, 2004.
 168. Zhang L, Khayat A, Cheng H, Graves DT. The pattern of monocyte recruitment in tumors is modulated by MCP-1 expression and influences the rate of tumor growth. *Lab Invest* 1997;76:579-90.
 169. Russell SW, Gillespie GY, Pace JL. Evidence for mononuclear phagocytes in solid neoplasms and appraisal of their nonspecific cytotoxic capabilities. *Contemp Top Immunobiol* 1980;10:143-66.
 170. Perussia B. Tumor infiltrating cells. *Lab Invest* 1992;67:155-7.

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

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

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

10. ŽIVOTOPIS

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

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

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

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

Autor sam više radnica i kongresnih priopćenja koji su objavljeni ili prihvatieni za objavljivanje u indeksiranim asopisima od kojih je osam u Current Contentsu.

Oženjen sam i otac dvoje djece.