USPOREDBA IMUNOHISTOKEMIJSKIH ZNAČAJKI SUKCESIVNO UKLANJANIH TUMORA U BOLESNIKA S OPETOVANOM POJAVNOŠĆU RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA

Matić, Mate

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:343198

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Mate Matić

USPOREDBA IMUNOHISTOKEMIJSKIH ZNAČAJKI SUKCESIVNO UKLANJANIH TUMORA U BOLESNIKA S OPETOVANOM POJAVNOŠĆU RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA

Doktorska disertacija

Osijek 2019.

Disertacija je izrađena na Zavodu za onkologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: prof.dr.sc.Sven Kurbel, dr. med.

Komentor rada: prof.dr.sc. Ivan Mihaljević, dr. med.

Rad ima 76 listova

PREDGOVOR

Veliko hvala mojemu mentoru, prof.dr.sc. Svenu Kurbelu, za sve sugestije, znanstvenu i stručnu potporu u provođenju ovog istraživanja, i što je uvijek imao strpljenja i vremena za moje brojne upite.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Branku Dmitroviću i osoblju Zavoda za patologiju KBC Osijek na svesrdnoj pomoći pri izradi rada.

Hvala mojim roditeljima, Ivanu i Ljubici Matić, na životnim smjernicama, ljubavi, trudu i odricanju tijekom cijelog mog obrazovanja. Oni su uvijek bili uz mene, u svim životnim trenucima, bez njih sva moja dosadašnja postignuća ne bi bila moguća.

Hvala mojoj supruzi Suzani na bezgraničnoj potpori, strpljenju, razumijevanju i ljubavi.

I na kraju, najveća hvala mojim predivnim kćerima, Luciji i Mariji, koje su mi svojim osmijehom svaki dan učinile radosnim.

Osijek, lipanj 2019.

Mate Matić

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Etiologija 6

1.2. Epidemiologija 6

1.3. Prognoza 6

1.4. Klinička prezentacija 7

1.5. Dijagnostička obrada 7

1.6. Biološke značajke tumora prijelaznog epitela 8

1.7. Prognostički faktori 8

2. HIPOTEZA 11

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 12

4. MATERIJALI I METODE 13

4.1. Ustroj studije 13

4.2. Ispitanici 13

4.3. Metode istraživanja 14

4.4. Statistička obrada podataka 20

5. REZULTATI 21

5.1. Traženje razlika u imunohistokemijskim značajkama tumora kao prediktorima ukupnog broja recidiva i vrijednosti Ki-67 22

5.2. Traženje razlika u imunohistokemijskim značajkama uklonjenog i recidivnog tumora mokraćnog mjehura 25

5.2.1. Razlika u biologiji procesa recidiviranja ovisno o rednom broju recidiviranja 30

5.2.2. Razlika u biologiji procesa recidiviranja ovisno o ovisno o brzini pojave recidivnog procesa 33

5.2.3. Razdioba pojedinih bolesnika po pripadnosti njihovih procesa recidiviranja klasterima očekivane maksimalizacije.....39

6. RASPRAVA 44

7. ZAKLJUČAK 49

8. SAŽETAK 50

9. SUMMARY 52

10. LITERATURA.....54

11. ŽIVOTOPIS 62

Popis kratica rabljenih u tekstu

ANOVA	analiza varijanse, engl. *analysis of variance*
BCG	cjepivo protiv tuberkuloze, lat. *Bacillus Calmette- Guerin*
DNA	deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleal acyd*
DFS	razdoblje bez bolesti, engl. *disease free survival*
E-cadherin	epitelni kaderin, engl. *epithelial cadherin*
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta, engl. *epidermal growth factor receptor*
EM	maksimizacija očekivanja, engl. *expectation maximization*
HER2	humani epidermalni čimbenik rasta receptor 2, engl.*human epidermal growth factor receptor 2*
HER3	humani epidermalni čimbenik rasta receptor 3, engl.*human epidermal growth factor receptor 3*
HNPCC	nasljedni nonpolipozni kolorektalni karcinom, engl. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*
HR	omjer ugroženosti, engl. *hazard ratio*
IHC	imunohistokemija, engl. *immunohistochemistry*
LS	Linč sindrom, engl. *Lynch syndroma*

MAPK	mitogenom aktivirana proteinska kinaza, engl. *mitogen-activated protein kinases*
MARS	multivarijabilna adaptivna regresijska krivulja, engl. *multivariate adaptive regression splines*
MLH1	engl. *mutL protein homolog 1*
MSH2	engl. *mutS protein homolog 2*
MSH6	engl. *mutS protein homolog 6*
mTOR	ciljna meta rapamicina u sisavaca, engl. *mammalian target of rapamycin*
MMR	geni koji popravljaju pogreške DNA, engl. *mismatch repair gene*
PFS	razdoblje bez napredovanja bolesti, engl. *progression free survival*
PI3K	fosfoinositid 3-kinaza enzim
PMS2	engl. *post meiotic segregation 2*
Rb1	engl. *retinoblastom 1 gen*
TCC	karcinom prijelaznog epitela, engl. *trancitiocellulare cancer*
TUR	transuretralna resekcija

Popis slika

Slika 4.1. Negativna reakcija (-): nema obojenja u tumorskim stanicama 16
Slika 4.2. Slabo pozitivna reakcija (+): manje od 10% tumorskih stanica pozitivno.....17
Slika 4.3. Umjereno pozitivna reakcija (++): 10-50 % tumorski stanica pozitivno 18
Slika 4.4. Jako pozitivna reakcija (+++): više od 50% tumorskih stanica pozitivno……19
Slika 5.1. Prikaz aritmetičkih sredina vrijednosti pokazatelja za klastere očekivane maksimalizacije 19 procesa recidiviranja bolesnika s najviše dva recidiva 36
Slika 5.2. Prikaz aritmetičkih sredina vrijednosti pokazatelja za klastere očekivane maksimalizacije61 procesa recidiviranja bolesnika s više od dva recidiva 37
Slika 5.3. Razdioba vrijednosti promjene ekspresije HER biljega tijekom procesa recidiviranja ovisno o brzini recidiviranja izraženoj u mjesecima proteklim između dva kirurška zahvatate ovisno o promjeni vrijednosti Ki-67 između dva sukcesivna tumora 38
Slika 5.4. Razdioba vrijednosti promjene ekspresije *Lynch* biljega ovisno o brzini izraženoj u mjesecima između dva razmaka te u promjeni vrijednosti Ki-67 između sukcesivnih tumora pojedinih procesa recidiviranja 39

Popis tablica

Tablica 5.1. Razdioba bolesnika prema ukupnom broju recidiva i dobi bolesnika u vrijeme uklanjanja prvog tumora 21
Tablica 5.2. Rezultati MARS analize imunohistokemijskih pokazatelja u predviđanju ukupnog broja recidiva tumora 22
Tablica 5.3. Rezultati MARS analize imunohistokemijskih pokazatelja u predviđanju vrijednosti Ki-67 tumora 24
Tablica 5.4. Razdioba vrijednosti bodovanja promjene biljega između tumora koji čine jedan proces recidiviranja 25
Tablica 5.5. Razdioba procesa recidiviranja prema rednom broju recidiva i dobi bolesnika u vrijeme uklanjanja prvog tumora 26
Tablica 5.6. Razdioba procesa recidiviranja prema brzini recidiviranja izraženoj brojem mjeseci između dva zahvata uklanjanja tumora 27
Tablica 5.7. Razdioba procesa recidiviranja prema razlici u vrijednosti biljega u HER porodici između početnog tumora i recidiva 28
Tablica 5.8. Razdioba procesa recidiviranja ovisno o razlici u vrijednosti biljega *Lynch* porodice 29
Tablica 5.9. Razdioba procesa recidiviranja ovisno o promjeni postotka Ki-67 između početnog tumora i recidiva 30
Tablica 5.10. Rezultati analize klastera očekivane maksimalizacije za tri kategorije procesa recidiviranja 32
Tablica 5.11. Rezultati analize klastera očekivane maksimalizacije za tri kategorije brzine recidiviranja tumora 33
Tablica 5.12. Rezultati analize klastera očekivane maksimalizacije između bolesnika s malim i onih s većim brojem recidiva 35
Tablica 5.13. Razdioba bolesnika s najviše dva procesa recidiviranja ovisno o pripadnosti procesa jednom od dva klastera očekivane maksimalizacije 41
Tablica 5.14. Razdioba bolesnika s više od dva procesa recidiviranja ovisno o pripadnosti procesa jednom od dva klastera očekivane maksimalizacije 43

1. UVOD

Karcinom mokraćnog mjehura jedinstven je među solidnim tumorima zbog svoje sklonosti učestalom recidiviranju. Zbog toga je važna njegova dostupnost i precizna dijagnostika što omogućava česte kontrolne dijagnostičko-terapijske zahvate. Kad se ukloni jedna tvorba često se javljaju druge, koje mogu biti blizu mjesta prvog tumora, odnosno duž iste strane urinarnog trakta, lijevo ili desno. Teorija nastanka raka kaže da rak nastaje zato što epigenetskom evolucijom stanica dolazi do pojave karcinomskog genotipa, a sam rak nastaje mutacijom jednog ili više ključnih gena koji pokreću nekontrolirano dijeljenje. Ova prihvaćena teza o kombinaciji epigenetske evolucije jedne ili dvije bitne mutacije koje dovode do stanica raka bi, u slučaju raka mokraćnog mjehura, mogla značiti da se cijela strana urinarnog trakta nalazi u nekom vidu prekanceroze i da je ona sva na putu karcinomskog fenotipa (1). Nasuprot tome,druga teorija tvrdi da negdje postoji tiho žarište koje šalje tumorske stanice, koje se implantiraju negdje udaljenije (2). Dakle, postoji nekoliko sukobljenih koncepata o nastanku jednog razmjerno čestog tumora. Zbog toga je potrebno ovaj fenomen pomnije istražiti i to tako da se što točnije odredi karcinomski fenotip početnog i recidivirajućeg tumora mokraćnog mjehura i na osnovu toga zaključiti koji su mogući mehanizmi ponovne pojave bolesti.

Novija istraživanja pokazuju da mišić neinvazivni i mišić invazivni karcinom mokraćnog mjehura imaju različite mehanizme nastanka karcinogeneze. Mišić neinvazivni uključuje mutaciju receptora HER3 koja dovodi do karcinoma niskog stupnja, koji često recidivira, ali je rijetko invazivan. Nasuprot tome, mišić inazivni karcinom i karcinom in situ češći je kod delecije ili mutacije TP53, RB1, HER2 (3).

Tumorski biomarkeri omogućuju raniju i točniju dijagnozu tumora. Ako bi se prognoza za svakog pacijenta mogla postaviti ranije, pacijenti s većom sklonošću povratima bolesti bi se mogli liječiti agresivnijim tretmanom, a ostali bi se mogli poštedjeti nepotrebnih radikalnih procedura, te bi se mogli izliječiti samo lokalnim tretmanom.

Također, bilo bi omogućeno personizirano liječenje, koje bi bilo i jeftinije od dosadašnjih metoda. Na taj način bi se smanjile moguće štetne nuspojave operacijskih zahvata.

Tumori mokraćnog mjehura dijele se na:

1. Karcinom prijelaznog epitela (engl. *transitional cell carcinoma*- TCC). Ovo je najčešći tip i obuhvaća 90 – 95% svih karcinoma mokraćnog mjehura. Sastoji se od dva podtipa, to su papilarni karcinom (raste u mokraćni mjehur) i ravni tip karcinoma.
2. Adenokarcinom mjehura: 1-2% svih tumora, povezan je s produljenom upalom i iritacijom. Većina adenokarcinoma mjehura je invazivna.
3. Karcinom pločastih stanica: 1-2% karcinoma, također je povezan s produženom infekcijom, iritacijom i upalom, što može biti uzrokovano mokraćnim kamencima.

Rijetki oblici karcinoma mokraćnog mjehura su mikrocelularni karcinom i sarkom.

U normalnim uvjetima mjehur, donji dio bubrega, ureteri i proksimalna uretra obloženi su mukoznom membranom iz prijelaznog epitela (također zvanom urotel). Većina karcinoma koji nastaju u urotraktu su urotelni karcinomi, nastaju iz prijelaznog epitela i mogu biti niskog i visokog stupnja. Karcinomi niskog stupnja često recidiviraju nakon operacijskog tretmana, ali rijetko invadiraju mišić ili metastaziraju. Karcinomi visokog stupnja također se često vraćaju i imaju visoku sklonost zahvaćanju mišića mjehura (4).

Pri dijagnozi se 30% karcinoma mokraćnog mjehura prezentira kao mišić-invazivni ili metastatski karcinom. Petogodišnje preživljenje manje je od 50%, usprkos agresivnoj lokalnoj terapiji. 70% karcinoma se dijagnosticira kao površinski karcinom prijelaznog epitela koji ne zahvaća mišić (pTa, pT1) i mogu se liječiti transuretralnom resekcijom i intravezikalnom terapijom (5). Oni su ograničeni na mukozu (70%) ili laminu propriju (30%) i imaju petogodišnje preživljenje 88 – 98%.

Neinvazivni tumori se dijele na papilarni i nepapilarni podtip. Nepapilarni tumori, zvani i karcinom *in situ* (CIS), često progrediraju u invazivni karcinom, za razliku od površinskih papilarnih tumora koji su obično niskog stupnja i manje agresivni. Kod gotovo 50% bolesnika povrat bolesti se javlja unutar 4 godine od početne dijagnoze (6).

Približno 50 – 70% karcinoma prijelaznog epitela recidivira, a 10 – 30% pokazuje viši stupanj i brzinu progresije (7).

Bolesnici se uobičajeno razvrstavaju u podgrupe temeljem morfologije tumora i prisutnosti imunohistokemijskih i drugih značajki s otprije poznatom prediktivnošću za pojedine načine liječenja, dok se uglavnom ne radi o pokazateljima vezanim za biologiju tog tipa tumora. Kako su za potvrdu prediktivne vrijednosti za ishod liječenja neke vrste tumora potrebni veliki randomizirani pokusi, pojava novih prediktora je rijetka i obično se događa u već detaljnije istraženim vrstama karcinoma. Zbog toga mnogi razmjerno česti karcinomi nemaju niti prikladan dijagnostički postupnik niti utemeljenu stratifikaciju bolesnika u skupine različitog rizika širenja ili recidiva bolesti. U ovom istraživanju je između

„zanemarenih” karcinoma, dakle onih koji nisu u kategoriji rijetkih tumora, izabran rak mokraćnog mjehura koji ima specifičnu biologiju tj. vrlo je sklon povratu bolesti. Neki povoljno reagiraju na lokalno izlaganje citostatiku ili na imunomodulaciju lokalnim izlaganjem oslabljenim BCG sojem uzročnika tuberkuloze, no postoje bolesnici s lokalnim širenjem kao i s udaljenim metastazama zbog čega je rak mokraćnog mjehura bitan uzrok smrtnosti od malignoma. U nedostatku jasnog dijagnostičkog postupnika obrade tumorskog tkiva raka mokraćnog mjehura, predloženi projekt je na statistički relevantnom uzorku primarnih i recidivirajućih tumora utvrdio prisutnost imunohistokemijskih biljega za koje se zna da su prediktori ishoda liječenja drugih vrsta karcinoma. Kako se ne radi o testiranju načina liječenja već o definiranju karcinomskog fenotipa primarnog i recidivnog tumora, istraživanje je nastojalo utvrditi čimbenike povezane s pojavom fenomena bitnih za procjenu bioloških značajki tumora. Navedeni pristup, utvrđivanje prediktora biološkog ponašanja tumora, zbog metodološke zahtjevnosti, posebice vezano za statističku obradu, gotovo je napušten i poticanjem industrije lijekova zamijenjen je već opisanim testiranjem prediktora rezultata liječenja.

Tek je razvoj novih statističkih metoda, kao što je multivarijantna adaptivna krivolinijska regresija (engl. *Multivariate Adaptive Regression Splines* - MARS), omogućio adekvatnu procjenu značajnosti prediktora u pojavnosti binarnog događaja (DA/NE), PRISUTAN/ODSUTAN i sl.) ili pak u promjenjivosti kvantitativnog pokazatelja izračunom indeksa determinacije. Navedena metoda primijenjena je u procjeni značajki karcinomskog fenotipa raka mokraćnog mjehura za biologiju tumora.

U razvijenim je državama, zbog porasta životne dobi, sve veća incidencija karcinoma mokraćnog mjehura. Glavna metoda dijagnoze i terapije je cistoskopija kojom se redovno, svakih tri do šest mjeseci prate bolesnici nakon transuretralne resekcije tumora mokraćnog mjehura (TUR). Stopa infekcije nakon cistoskopije je 3% (8), dok su dizurija (50%), učestalo mokrenje (37%) i makrohematurija (19%) relativno učestalije nakon cistoskopije (9).

Postoperativni rutinski pregledi čine tumor mokraćnog mjehura jednim od financijski najskupljih maligniteta od dijagnoze do smrti, s troškom od oko 187000 $ po bolesniku u SAD-u. Godišnji ukupni trošak je blizu 5 milijarda dolara (10,11).

Otkrivanje prediktivnih biomarkera bi u budućnosti moglo poboljšati i pojeftiniti dijagnozu karcinoma mokraćnog mjehura s ciljem smanjenja potrebe za cistoskopijom i ostalim slikovnim metodama dijagnostike te omogućavanja individualne stratifikacije rizika u pogledu terapije i praćenja recidiva, što je bio i primarni razlog našeg istraživanja.

Citologija urina je za sada najtočniji neinvazivni test koji se koristi u rutinskoj praksi za dijagnozu karcinoma mokraćnog mjehura. Citologija urina je najučinkovitija za utvrđivanje karcinoma visokog stupnja. Njena senzitivnost i specifičnost za tumore visokog stupnja i karcinom *in situ* je 80–90% i 98–100% (12). Za detekciju tumora niskog gradusa nije tako učinkovita. Ponekad je i benigna stanja poput upala teško razlikovati od karcinoma, što rezultira s više od 12% lažno pozitivnih nalaza (13).

Površinski karcinom mokraćnog mjehura pokazuje visoku frekvenciju mutacija *HER3* onkogena, što rezultira disregulacijom RAS-MAPK signalnog puta (14,15). HER3 mutacija u urinu pokazuje senzitivnost od 58% te može biti značajna za predviđanje recidiva neinvazivnih karcinoma (16,17).

Razvoj karcinoma mokraćnog mjehura generalno je prihvaćen kao slijed genetičke nestabilnosti tijekom višegodišnjeg razdoblja i uključenje kromosoma 1,7,9, 17 u uroepitelnoj onkogenezi (18,19). Visoka razina amplifikacije nađena je na 17q11-21.3 slijedu kod primarnog i metastatskog tumora i to je pokazalo da je *HER2* protoonkogen (*c-erb2* ili neu), lociran na tom lokusu (20,21). Humani *HER2* protoonkogen kodira transmembranski protein iz porodice protein tirozin kinaza receptora HER2 koji je receptor čimbenika rasta i ima mogućnost stimuliranja rasta stanice. Amplifikacija gena i ekspresija proteina HER2 nađene su u mnogim adenokarcinomima (22,23). Noviji podatci sugeriraju da HER2 ima ulogu u progresiji tumora jer povećava staničnu adheziju, pokretljivost stanice i ekspresije proteolitičkih enzima. Ekspresija HER-2 proteina prisutna je u velikom broju karcinoma, do 74% urotelijalnih karcinoma te u mnogim epitelnim tumorima uključujući nemikrocelularni karcinom pluća, kolorektalni tumor, tumore želuca, pankreasa, jajnika te dojke (24), ali još je nedovoljno poznata njezina povezanost s razvojem i progresijom karcinoma mokraćnog mjehura (25-28). Razlike u incidenciji mogu biti povezane s raznim metodama za određivanje statusa HER2. Koristeći FISH tehniku razne analize pokazuju uključenost kromosoma 7,9 i 17 u karcinogenezu mokraćnog mjehura (29-31).

Obitelj epidermalnog faktora rasta sastoji se od četiri člana: EGFR (HER1), HER2, HER3 i HER4. Ovi receptori su transmembranski proteini koji prenose signale iz okoline u stanicu i utječu na njezin rast. Promjene u njihovoj ekspresiji još nisu dovoljno istražene. Poznato je da patološka ekspresija dva od navedenih proto-onkogena (*HER1 i HER2*) povezana s gubitkom koordinacije staničnog rasta i nekontroliranom staničnom proliferacijom može uzrokovati malignitet (32).

HER porodica je specifična po tome što procesom dimerizacije dolazi do njihove aktivacije (33).

E-cadherin je jedna od najvažnijih molekula u međustaničnoj adheziji u epitelnom tkivu i služi za formiranje i održavanje epitela. Smješten je na površini epitelnih stanica, u području staničnog kontakta poznatog kao adherentni spoj. Osim njegove uloge u normalnim stanicama, on može imati važnu ulogu pri transformaciji malignih stanica posebno kod rasta i progresije tumora. Supresija E-cadherina smatra se jednim od glavnih molekularnih događaja odgovornih za disfunkciju međustanične adhezije. Većina tumora ima abnormalnu staničnu arhitekturu i gubitak integriteta tkiva može uzrokovati lokalnu invaziju. Gubitak funkcije tumor supresijskog E-cadherina korelira s povećanom invazivnošću i metastaziranjem tumora (34).

Lynch sindrom (LS), najčešće poznat kao hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC), uzrokovan je mutacijom jednog od 5 MMR proteina koji sudjeluju u popravljanju krivo sparenih baza DNA (engl. DNA MMR -*Deoxyribonucleic acid mismatch repair*) MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 i EPCAM. Rizik nastanka karcinoma veći je kod mutacija u MLH1 i MSH2 nego kod mutacija u MSH6 i PMS2.

Inaktivacija gena koji kodiraju MMR sustav i posljedični defekti u MMR proteinu MLH1 i MSH2 rezultiraju velikim povećanjem spontanih mutacija koje mogu dovesti do razvoja mikrosatelitske nestabilnosti i maligniteta (35). Povećanje ukupnog broja mutacija kroz genom i početak kaskade daljnjih mutacija rezultira povećanom genetskom nestabilnošću i heterogenošću stanica karcinoma; neki od tih gena povezani su sa sposobnošću tumorske stanice za proliferacijom, invazivnošću i metastaziranjem (36). Karcinom mokraćnog mjehura prate mnoge kromosomske aberacije. Gubitak alela na 3p može ukazivati na uključenje *MLH1* gena u urotelnom karcinomu mjehura (37). Gubitak ili redukcija MMR aktivnosti povezana je s invazivnim karcinomom mjehura (38). Moguća uloga MMR genske ekspresije kao prognostičkog indikatora vidljiva je kod karcinoma mjehura, prostate i kolona (39,40). Nekoliko je studija pokazalo da *MSH2* gen igra glavnu ulogu u popravljanju oštećenja DNA. Analiza pokazuje da je reducirana ekspresija MSH2 proteina češća kod tumora visokog stupnja i da je značajno povezana s povratkom bolesti. Za razliku od MSH2, MLH1 protein nije dovoljno istražen kod urotelnih maligniteta (41).

Billerey C. i sur. u svom su radu promatrali skupinu od 111 bolesnika s karcinomom prijelaznog epitela mokraćnog mjehura, s ciljem analize ekspresije MLH1 i MSH2. Smanjena ekspresija MMR proteina nađena je u 26 od 111 karcinoma (23%) i najviše je prisutna kod

mišić invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura visokog gradusa, a manje u površinskih tumora manjeg gradusa. U petogodišnjem praćenju smanjena ekspresija MMR proteina povezana je s manje recidiva površinskog tumora i manje recidiva svih tumora u usporedbi s tumorima s normalnom ekspresijom. Kod mlađih je bolesnika redukcija ekspresije MMR proteina izraženija nego kod starijih. Ovom studijom je pokazano da reducirana ekspresija MMR proteina može biti povezana s razvojem karcinoma prijelaznog epitela(42).

1.1. Etiologija

Glavni rizični faktor karcinoma mokraćnog mjehura je pušenje cigareta. Pušači imaju četiri puta veću šansu nastanka tumora od nepušača (43). Ostali kancerogeni faktori mogu biti razne kemikalije iz okoline, osobito kod profesionalnih djelatnika u tekstilnoj industriji i industriji guma, liječenje citostatikom ciklofosfamidom, kronična upala mjehura i iradijacija zloćudnih tumora zdjelice (44).

1.2. Epidemiologija

Karcinom mokraćnog mjehura je na devetom mjestu u svijetu po incidenciji, a deseti je uzrok smrti karcinomima (45). U svijetu je 2012. godine dijagnosticirano 430000 novoboljelih i 150000 umrlih, a u Europi iste godine 118000 oboljelih i 52000 umrlih, što je jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta. Više od 90% novooboljelih su ljudi stariji od 55 godina. Trošak liječenja za EU je 2012. iznosio 4,9 milijarda eura. Najčešći histološki tip u razvijenim državama je karcinom prijelaznog epitela koji čini 90% svih karcinoma, dok je pločasti tip najčešći u Africi, gdje su česte infekcije šizostomijazom. Najveća incidencija je u južnoj i zapadnoj Europi te u Sjevernoj Americi. Stopa mortaliteta najveća je u zapadnoj Aziji i sjevernoj Africi. U mnogim europskim zemljama incidencija je u porastu, ali mortalitet je u padu.

1.3. Prognoza

Preživljenje ovisi o mnogo čimbenika, među kojima je najvažniji stadij i stupanj tumora te neki biološki markeri. Petogodišnje preživljenje bolesnika s lokaliziranim karcinomima, stadij 0 (*in situ*) je 88 – 98%, stadij lokaliziran na mokraćni mjehur (stadij I i II)

je 69%. Ukoliko su zahvaćeni regionalni limfni čvorovi (stadij III) petogodišnje preživljenje je 35 %, a kod metastatske bolesti (stadij IV) petogodišnje preživljenje je samo 5%.
Kod metastatskog karcinoma mokraćnog mjehura 50% bolesnika ima smrtni ishod u roku 2-3 godine od dijagnoze.

1.4. Klinička prezentacija

Najčešči i često prvi znak je krv u urinu-hematurija. Ovisno o boji urina, radi se o mikrohematuriji ili makrohematuriji. Krvarenje ne mora biti prisutno svakodnevno, a ukoliko se radi o mikrohematuriji urin se mora dijagnosticirati u laboratoriju citologijom.
Drugi česti znakovi karcinoma prijelaznog epitela mokraćnog mjehura su učestalije mokrenje, promjena boje urina, osjećaj pečenja i boli, nagon na mokrenje iako je mjehur prazan ili otežano mokrenje.

U slučaju uznapredovale bolesti može se pojaviti bol u donjem dijelu leđa, gubitak tjelesne težine, manji osjećaj gladi, umor i slabost.

1.5. Dijagnostička obrada

Ranijim otkrivanjem karcinoma mokraćnog mjehura veća je i vjerojatnost uspješnijega liječenja i oporavka. Još nije dostupan test koji bi omogućio skrining šire populacije, te se većini ljudi bolest dijagnosticira kada dođe do pojave simptoma, dakle u ranom stadiju kada nije zahvaćen mišić. Manji broj bolesnika ima proširenu bolest u trenutku dijagnoze.

Nekoliko važnih dijagnostičkih metoda, bitnih za postavljanje dijagnoze i utvrđivanje stupnja proširenosti bolesti:

- CITOLOGIJA URINA- standardna neinvazivna dijagnostička metoda, s niskom osjetljivošću za karcinome ranog stadija i niskog stupnja. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) može poboljšati točnost citologije.
- CISTOSKOPIJA- primarni modalitet za dijagnozu karcinoma mokraćnog mjehura, omogućuje biopsiju i resekciju papilarnih tumora te prikazuje gornji urinarni trakt. Ovo je jedini način postavljanja točne dijagnoze karcinoma.
- BIOPSIJA TUMORSKOG TKIVA- transuretralna resekcija tumora mokraćnog mjehura (TUR) koristi seza određivanje vrste tumora, dubine prodora u stijenku mjehura i

identifikaciju dodatnih mikroskopskih kancerogenih promjena (CIS). TUR se također koristi kao terapija mišić neinvazivnog karcinoma.

- KOMPJUTORSKA TOMOGRAFIJA ABDOMENA I ZDJELICE- koristi X zrake te stvara trodimenzionalnu sliku koja omogućuje uvid u veličinu tumora i limfnih čvorova, kao i odnos anatomskih struktura, što je potrebno za planiranje liječenja.
- MAGNETNA REZONANCIJA ZDJELICE I ABDOMENA- koristi magnetno polje i na taj način stvara detaljnu sliku struktura zdjelice, prikazuje tumor i limfne čvorove.
- ULTRAZVUK ABDOMENA I ZDJELICE- konvencionalni prikaz kroz abdominalnu stijenku, najčešća je metoda prikaza bubrega i urotrakta, no ima svoja ograničenja. Bolji prikaz tvorbi mokraćnog mjehura, prostate i priležećih organa postiže se sondom visoke rezolucije smještenom u vagini, rektumu ili samom mokraćnom mjehuru.

1.6. Biološke značajke karcinoma mokraćnog mjehura prijelaznog epitela

U današnje vrijeme, zahvaljujući novim tehnologijama analize mutacija i ekspresija gena, omogućen je veliki napredak i uvid u promjene mnogobrojnih gena i načine nastanka raznih karcinoma, pa tako i u promjene onih gena koji dovode do nastanka karcinoma mokraćnog mjehura. Geni uključeni u kontrolu staničnog ciklusa, regulaciju kromatina, receptori tirozin-kinaze i PI 3-kinaze-mTOR često su mutirani kod mišić-invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura.

Analiza usmjerena na ekspresiju gena otkrila je dva različita tipa karcinoma mokraćnog mjehura- bazalni i luminalni tip, slični subtipovima dojke i imaju prognostičku i terapijsku važnost.

Prvi otkriveni onkogen karcinogeneze mokraćnog mjehura je *HRAS* (46), kasnije su nađeni *TP53* (47), *HER3* (48) i *EGFR* (49).

1.7. Prognostički čimbenici

Trenutno poznati prognostički čimbenici recidiva karcinoma mokraćnog mjehura nakon radikalnog operacijskog zahvata su broj tumora, veličina, stupanj i stadij primarnog tumora, kao i razni biološki markeri (50). Pronalaženje tih kliničko-patoloških i biokemijskih faktora omogućilo bi bolju selekciju pacijenata za odgovarajući terapeutski zahvat, agresivniji ili blaži.

Brojne studije su se bavile identifikacijom takvih prediktora, a najviše su u literaturi spominjani Ki-67 kao poznati prediktor maligne bolesti kod više vrsta karcinoma te geni iz

HER i *Lynch* porodice. Ki-67 protein smješten je u jezgri stanice i prisutan za vrijeme cijele aktivne faze staničnog ciklusa (G1,S,G2 i mitoza), dok ga se za vrijeme mirovanja (G0) ne nalazi, što ga čini izvrsnim markerom za određivanje staničnog umnažanja. Ekspresija Ki-67 proteina čvrsto je povezana sa staničnom proliferacijom te se sve više rutinski koristi kao proliferacijski marker. Za vrijeme interfaze, antigen se detektira u jezgri stanice, dok se za vrijeme mitoze većina proteina premješta na površinu kromosoma. Njegova visoka ekspresija povezana je s višim stadijem i stupnjem diferencijacije tumora, kao i lošijom prognozom bolesti (51,52). Pokazano je da njegova blokada antitijelima dovodi do zastoja stanične proliferacije. Ki-67 se koristi kao prognostički i prediktivni marker za dijagnostiku i liječenje karcinoma (53,54).

U biološke markere pripadaju i EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) receptori tirozin kinaze. EGFR je član porodice četiri EGF tirozin kinazna receptora, koji su svi kodirani sa četiri poznata c-erB onkogena. Tri člana HER porodice receptora tirozin-kinaze pokazuju promjene u ekspresiji kod karcinoma mokraćnog mjehura (55).

HER1 amplifikacija pronađena je u 11%, HER2 mutacija u 5% i amplifikacija u 7%, HER3 mutacija u 11%, a amplifikacija u 2% karcinoma (56,57).

HER2 je receptor faktora rasta, koji ima mogućnost djelovanja na rast stanice vezivanjem liganda za EGFR. Amplifikacija gena i ekspresija HER2 proteina, nađena je u mnogim epitelnim tumorima uključujući nemikrocelularni karcinom pluća, kolorektalni tumor želuca, pankreasa, jajnika te dojke (58), a u karcinoma mokraćnog mjehura je prisutna u 17-76% urotelijalnih karcinoma (59). Noviji podatci sugeriraju da pretjerana ekspresija HER2 ima ulogu u progresiji tumora sudjelujući u regulaciji proteolitičkih enzima, povećavajući staničnu adheziju I pokretljivost stanica. HER3 je receptor tirozin kinaze, membranski protein koji formira aktivne heterodimere s drugim članovima EGFR obitelji koji imaju kinaznu aktivnost. Izražen je u gastrointestinalnom, urinarnom i reproduktivnom sustavu. Nema dokaza da je njegova prekomjerna ekspresija ili mutacija onkogena, ali kao heterodimer s ostalim članovima EGFR, a najviše s HER2, uzrokuje proliferaciju stanica (60).

Postoje novije studije koje pokazuju da ekspresija HER3 i HER4 korelira s boljom prognozom karcinoma (61). HER porodica je specifična po tome što procesom dimerizacije dolazi do njihove aktivacije.

U biološke markere također pripadaju porodica *Lynch* gena.

PMS2 gen kodira protein koji sudjeluje u popravku DNA. Ovaj protein ispravlja greške koje se javljaju prigodom replikacije DNA u S fazi staničnog ciklusa. PMS2 protein formira kompleks s MLH1 proteinom. Ovaj kompleks koordinira aktivnost ostalih proteina koji popravljaju greške nastale za vrijeme DNA replikacije. Popravak se izvodi izrezivanjem slijeda DNA koji sadrži pogreške i ponovnom sintezom DNA. Osobe s mutacijama *PMS2* imaju životni rizik za kolorektalni karcinom od 15% do 20% i životni rizik 6% za druge karcinome povezane s *Lynch* sindromom. Žene imaju 15% rizik za nastanak karcinoma endometrija. Karcinomi povezani s *Lynch* sindromom još uključuju karcinome urinarnog trakta, jajnika, želuca, tankog crijeva, hepatobilijarnog trakta, kože i mozga. Nađeno je nekoliko stotina mutacija u *PMS2* genu koje su povezane s razvojem tih karcinoma. Te mutacije mogu uzrokovati stvaranje abnormalnog PMS2 proteina, koji ne može obavljati svoju normalnu funkciju tako da se broj grešaka koje nastaju diobom stanice stalno povećava. Ako se stanice nastavljaju dijeliti, greške se nakupljaju u DNA, i tako mogu nastati tumorske stanice. Mutacije u PMS2 nasljeđuju se autosomno dominantno, što znači da za bližu rodbinu postoji 50% rizik od nasljeđivanja mutacija (63).

MSH6 gen čini kompleks s proteinom MSH2. Taj kompleks identificira lokaciju na molekuli DNA gdje nastaje greška za vrijeme DNA replikacije. Nakon toga, drugi kompleks proteina, MLH1-PMS2 popravlja greške. Mutacije *MSH6* gena mogu biti povezane s nasljednim nepolipoznim karcinomom kolona i karcinomom endometrija (64).

MLH1 gen daje uputu za sintezu još jednog proteina koji ima važnu ulogu u popravku DNA. MLH1 protein se udružuje s proteinom PMS2. Taj kompleks koordinira aktivnost ostalih proteina koji popravljaju greške DNA. Popravak se odvija tako da se pomiče slijed DNA koje sadrže pogreške i zamjenjuje ispravnim slijedom DNA. Opisano je preko 300 mutacija ovog gena koji uzokuje hereditarni nepolipozni karcinom kolorektuma. Te mutacije uključuju zamjene nukleotida, inserciju ili deleciju. U većini ovih mutacija proteinski produkt ima oštećenu funkciju (65).

MSH2 protein prepoznaje krivo sparene baze. *MSH2* je tumor supresor gen i uključen je u razne oblike popravka DNA. Mutacije u *MSH2* genu povezane su s mikrosatelitskom nestabilnošću i nekimkarcinomima, osobito HNPCC.

Svaki pojedinačni marker sam za sebe nije dovoljno informativan, ali bi praćenje više poznatih markera, kao i moguće otkriće novih, moglo objasniti etiologiju ovih tumora.

2. HIPOTEZA

Agresivnost te pojavnost ranih i kasnih recidiva raka mokraćnog mjehura može se procijeniti određivanjem markera EGFR, HER2, HER3, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 i E-cadherina (te klasifikacijom u određeni imunohistokemijski fenotip) u odnosu na surogat marker Ki-67 u primarnom tumoru i recidivu. Istom imunofenotipskom klasifikacijom može se zaključiti je li pojava svakog narednog tumora mokraćnog mjehura vezana uz progresiju prethodno dijagnosticiranog primarnog tumora ili je to neovisan događaj.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je prepoznati imunohistokemijske fenotipske značajke primarnih i recidivirajućih tumora mokraćnog mjehura povezane s povećanim rizikom ranih ili kasnih recidiva bolesti u mokraćnom mjehuru. Odabrani imunohistokemijski markeri EGFR, HER2, HER3, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 i E-cadherin biti će uspoređeni sa surogat markerom Ki-67 u primarnom tumoru i recidivu, kao prihvaćenom mjerom agresivnosti raznovrsnih tumora. Ovisno o značajkama (dob kod pojave prvog tumora, ukupan broj tumora, redni broj recidiva, brzina recidiviranja) utvrdit će se postoje li razlike u imunohistokemijskom fenotipu tumora u podskupinama koje bi upućivale na razlike u biologiji. Na taj način bi se bolje upoznale biološke značajke ovih tumora, te bi se utvrdilo radi li se o ponovnoj pojavnosti recidiva uklonjene tumorske tvorbe ili se radi o novoj tvorbi sličnog, ali ipak različitog karcinomskog fenotipa.

4. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Ustroj studije

Ovo retrospektivno istraživanje provedeno je na Zavodu za onkologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek uz prikupljanje podataka o provedenom liječenju u drugim ustrojstvenim jedinicama iste ustanove.

4.2. Ispitanici

U studiju su uključeni arhivski uzorci tkiva pacijenata starijih od 18 godina koji imaju najmanje 2 patohistološka nalaza tumora mokraćnog mjehura (primarni tumor i recidiv). Isključni kriterij je tumor nekog drugog organa.

Navedenim kriterijima u arhivi ustanove identificirano je ukupno 33 bolesnika dobi 57-87 godina kojima je ukupno određeno 113 karcinoma prijelaznog epitela. Ukupan broj karcinoma po bolesniku kretao se od 2 (1 recidiv) do 6 (5 recidiva). Prikupljeni su podatci o dobi u vrijeme prvog zahvata, spolu, histokemijskim značajkama tumora.

Osobni podatci su zaštićeni zaporkom. Kombiniranjem značajki operiranog primarnog tumora sa značajkama recidiva, iz promatranih 113 tumora definirano je 80 procesa recidiviranja koji su korišteni za analizu predikcijskog značaja razlika u fenotipu između dva sukcesivna karcinoma.

Svi podatci uzeti su iz povijesti bolesti, a svim bolesnicima koji su više no jednom operirali tumor mokraćnog mjehura dodijeljenja je zaporka. Istovremeno su se šifrirale parafinske kocke uklonjenih tumora iz pohrane kliničkog Zavoda za patologiju za dopunska imunohistokemijska bojenja kojima se definira karcinomski fenotip svakog izvađenog tumora. Pozitivnost nalaza pojedinog imunohistokemijskog pokazatelja kvantitativno ili semikvantitativno procijenila su dva neovisna patologa.

Pod zaporkom pacijenta definirani su sljedeći podatci iz povijesti bolesti: dob bolesnika u trenutku postavljanja prve dijagnoze, spol, za sve operirane tumore mokraćnog mjehura datum zahvata, lokalizacija i veličina primarnog tumora mokraćnog mjehura. Tumorske kocke obrađene su kako je opisano dalje u materijalima i metodama, prikupljeni podatci također su uneseni u tablice i povezani sa zaporkom koja je dodijeljena određenoj

povijesti bolesti. Šifriranje i povezivanje podataka učinjeno je od strane neovisnog istraživača koji nije radio imunohistokemijsku analizu ili statistiku. Svi dobiveni rezultati obrađeni su statistički neparametrijskim metodama detekcije razlike u razmjerno malom setu imunohistokemijskih pokazatelja temeljem kojih su izvedeni zaključci.

Plan rada i metode istraživanja, ukupan broj, odabir, uključivanje, obaviještenost i suglasnost ispitanika su u skladu s etičkim i znanstvenim standardima. Predvidivi rizici i opasnosti u odnosu prema pretpostavljenoj znanstvenoj koristi osmišljeni su uz najmanje moguće izlaganje riziku i opasnosti po zdravlje istraživača, suradnika u istraživanju i opće populacije u skladu s inauguriranim temeljnim principima i ljudskim pravima u biomedicinskim istraživanjima u području medicine i zdravstva, uključujući standarde korištenja i postupka humanim biološkim materijalom u znanstvenim i stručnim biomedicinskim istraživanjima. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Osijek, ur. broj: 25-1:831-6/2015 i Medicinskog fakulteta Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, ur. broj: 2158-61-07-18-123.

4.3. Metode istraživanja

Operacijski materijal za patohistološku analizu prikupljen je rutinskom, standardnom patohistološkom metodom koja se sastoji od fiksacije u puferiranom 10% formalinu, uklapanja istog u parafinske blokove, rezanja preparata na 3-5 mikrometara, te bojenja hemalaun-eozinom. Preparati su se pregledavali svjetlosnim mikroskopom.

Svi tumori analizirani su imunohistokemijski, za to su upotrijebljeni dodatni rezovi tumorskog tkiva. Isti su obrađeni u automatiziranom Ventana BECHMARK ULTRA sustavu imunohistokemijskog bojenja uz uporabu temeljnog AEC sustava vizualizacije rezultata. Ventana temeljni AEC sustav (BASIC AEC *detection kit)* neizravni biotin streptavidin sustav koji se sastoji od mišjih IgG, mišjih IgM i zečjih poliklonskih primarnih antitijela. Interpretacija bojenja uvijek je povezana s evaluacijom odgovarajućih pozitivnih kontrola.

U imunohistokemijskoj analizi korištena su sljedeća primarna protutijela:

- (proizvođač/naziv/klon/kataloški broj):
- CONFIRM anti-EGFR (3C6) kat.br 05278341001
- PATHWAY anti- HER2/ neu (45B) kat.br 05995570001
- DAKO anti- HER3 (DAKH3-IC) kat.br M7927

- VENTANA anti- E-cadherin (36) kat.br 05905290001
- CONFIRM anti- Ki- 67 (30-9) kat.br 05278384001
- VENTANA anti- MLH1 M1 kat.br 06472966001
- VENTANA anti- MSH2 (G219-1129), Ventana kat.br 05269270001
- CONFIRM anti -MSH6 (44) kat br 05929911001
- VENTANA anti PMS2 (EPR 3947) kat br 06419216001

Pretretman deparafiziranih tkivnih rezova debljine do 5 mikrometara provodi se tijekom automatiziranog postupka u aparatu Ventana BenchMark Ultra. Optimalni rezultati dobiveni su uporabom otopina pufera pH 9. Zbog dobrog lijepljenja tkivnih rezova na stakalca koriste se silanizirana stakalca Daco (Silanized Slides Code S3003). Preparati se prekrivaju otopinom Neo- Mount (Merck mounting medium for microscopy kat.br 109106) i pokrovnim stakalcem da bi se postigla trajnost samih preparata.

Rezultati imunohistokemijskog bojenja izraženi su semikvantitativnom metodom kako slijedi:

Negativna reakcija (-): nema obojenja u tumorskim stanicama (Slika 1)

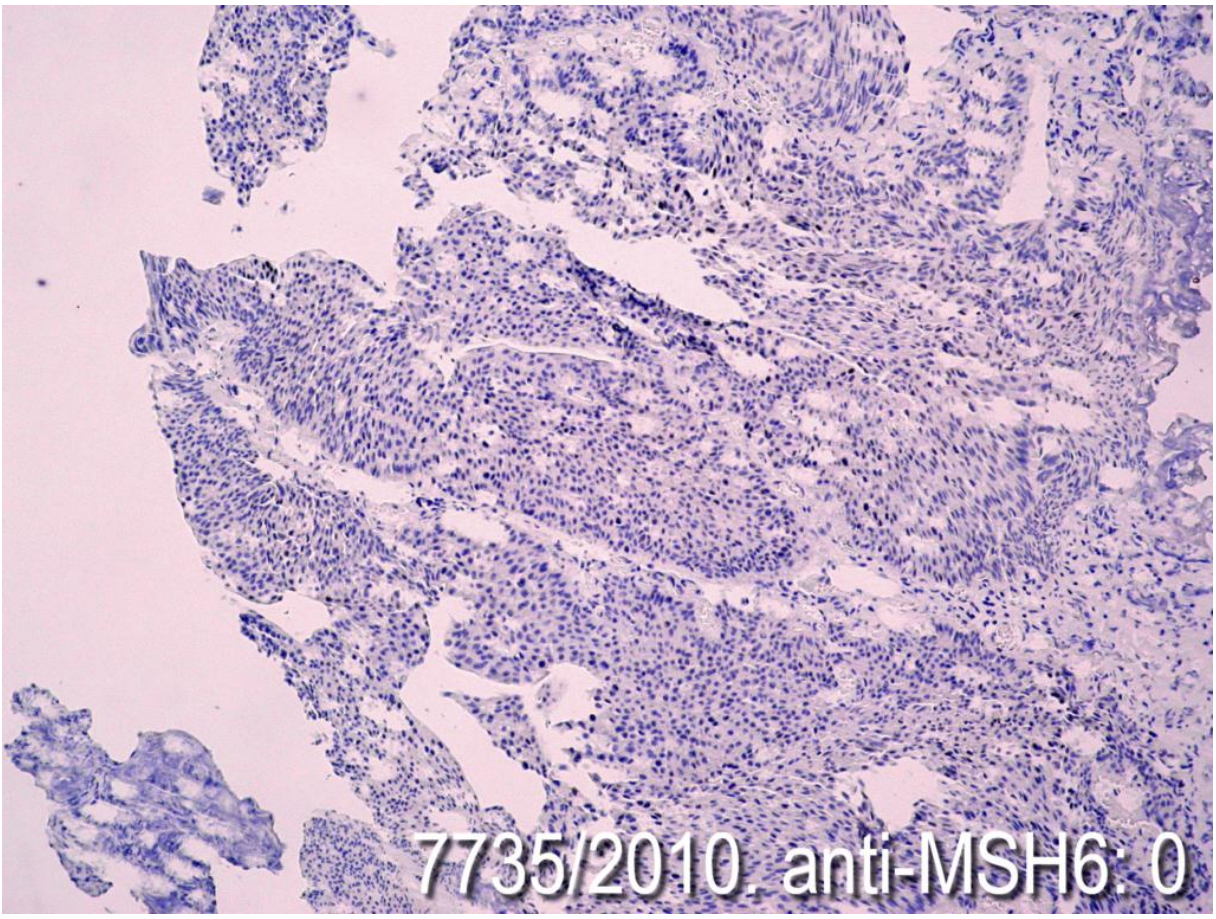
Slabo pozitivna reakcija (+): manje od 10% tumorskih stanica pozitivno (Slika 2)

Umjereno pozitivna reakcija (++): 10-50 % tumorski stanica pozitivno (Slika 3)

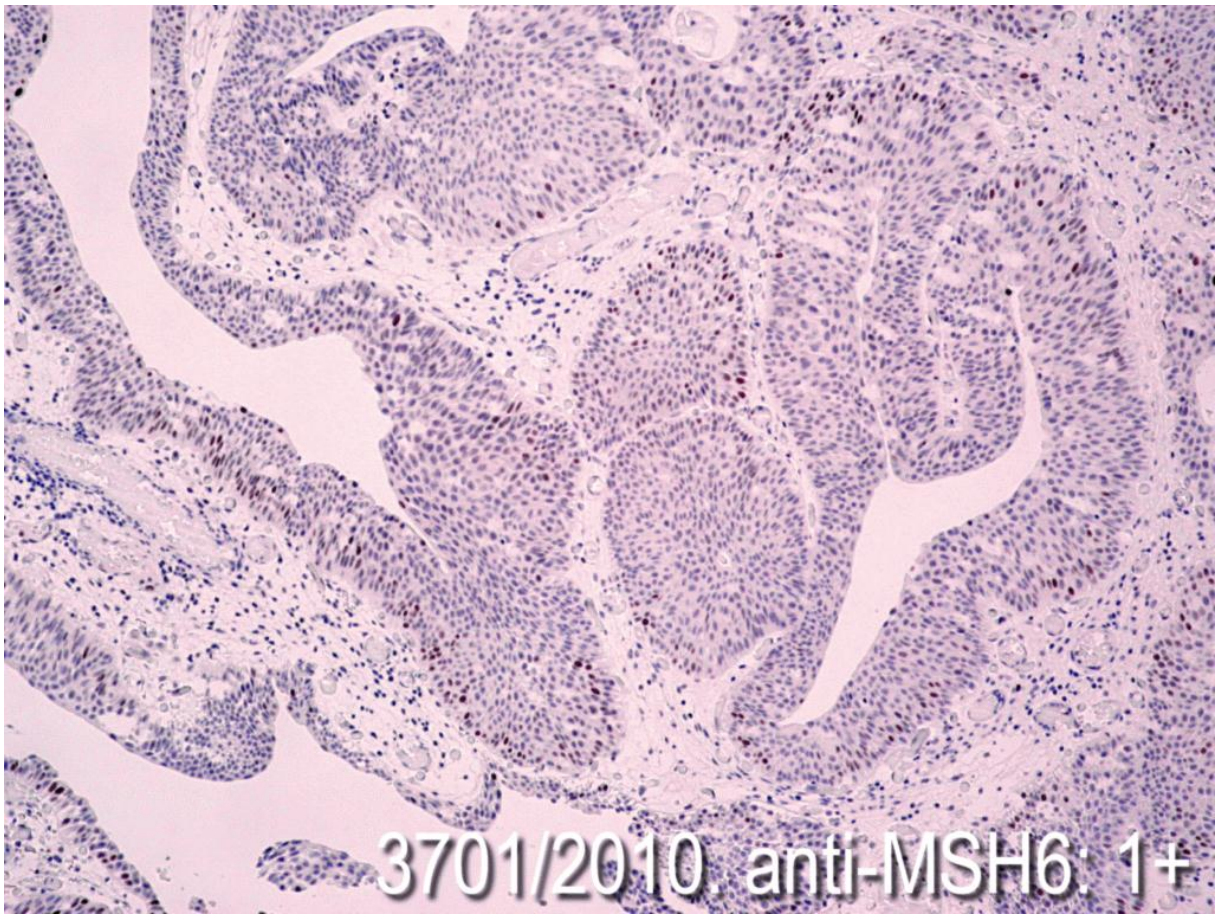
Jako pozitivna reakcija (+++): više od 50% tumorskih stanica pozitivno (Slika 4)

Pozitivnom reakcijom smatra se umjereno pozitivna (++) i jako pozitivna (+++) reakcija, dok će se negativnom smatrati negativna (0) i slabo pozitivna reakcija (+)

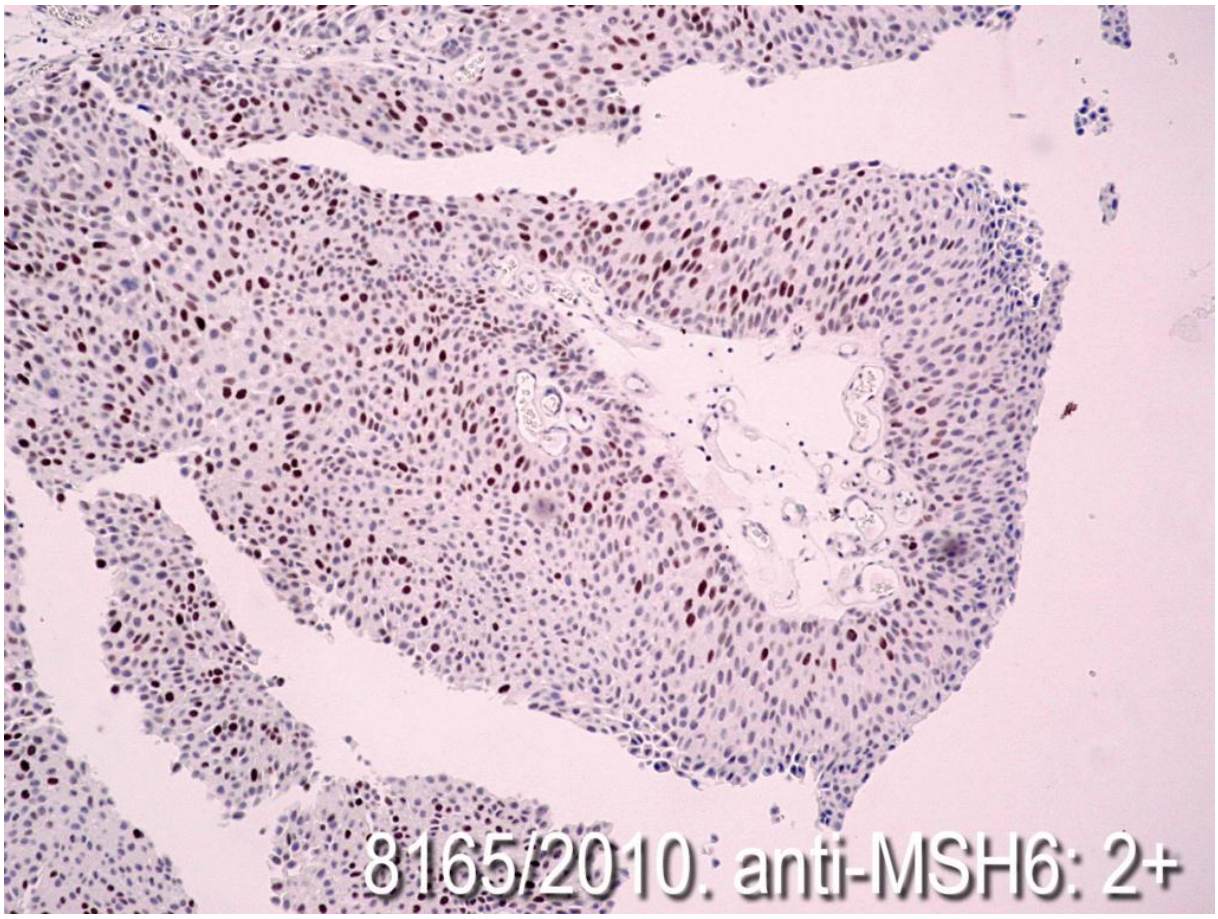
Ki-67 je izražen stvarnim postotkom (određenim na tri mjesta na tumorskom tkivu na 500 susjednih stanica u području tzv.„hot-spots" ili mjesta najizraženijeg bojenja).



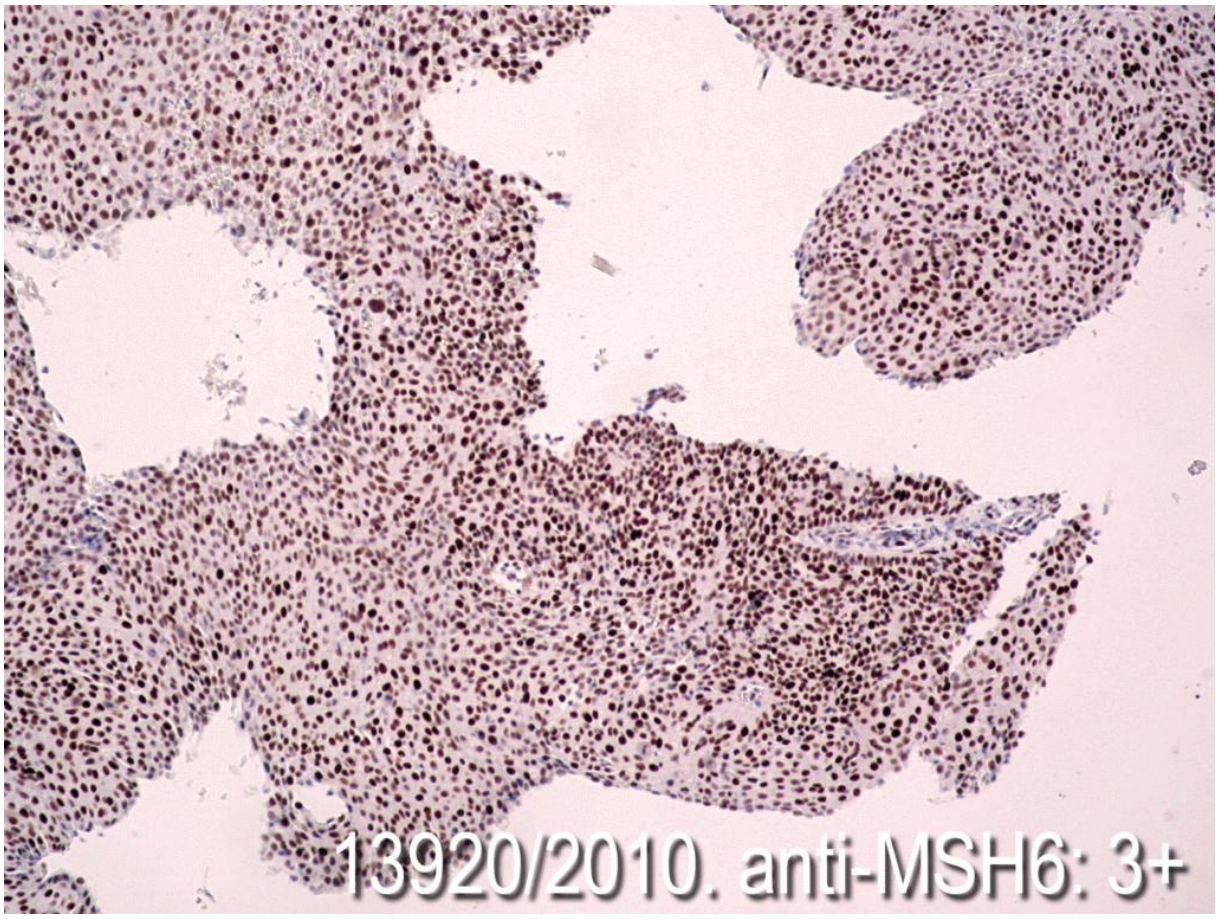
Slika 4.1**.** Negativna reakcija (-): nema obojenja u tumorskim stanicama



Slika 4.2. Slabo pozitivna reakcija (+): manje od 10% tumorskih stanica pozitivno



Slika 4.3. Umjereno pozitivna reakcija (++): 10-50 % tumorski stanica pozitivno



Slika 4.4. Jako pozitivna reakcija (+++): više od 50% tumorskih stanica pozitivno

4.4. Statistička obrada podataka

Podatci su analizirani neparametrijskim statističkim metodama testiranja razlika i povezanosti

Za procjenu prediktivne vrijednosti pojednih pokazatelja u objašnjenju pojavnosti bioloških značajki recidivnih tumora mokraćnog mjehura rabljena je metoda MARS (eng. *multivariate adaptive regression splines*) (66).

Za analizu podataka organiziranih u procese recidiviranja uz tablice kontigencije s $\chi 2$ testovima, primijenjena je analiza klastera primjenom EM (e*xpectation–maximization*) algoritma, metoda prepoznavanja broja podgrupa u složenim kvantitativnim ili kategoričkim podatcima. EM algoritam posebice je pogodna metoda za manje uzorke jer nije sklona lomljenju opažanja na više malih skupina, što ju čini posebno pogodnom za analizu podataka kliničke medicine gdje je broj ispitanika koji udovoljavaju ulaznim kriterijima uvijek ograničen. Po definiranju klastera, razvrstani podatci se testiraju ANOVA metodom za kontinuirane uzorke na značajnost razlika pojedinog pokazatelja i to daje uvid u definirajuće značajke nađenih klastera.

U svim statističkim testiranjima razina značajnosti je $p<0,05$.

U statističkoj obradi korišten je programski paket tvrtke StatSoft, Inc 2011. STATISTICA, verzija 10 www.statsoft.com.

5. REZULTATI

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 33 bolesnika s recidivnim karcinomima prijelaznog epitela mokraćnog mjehura koji su liječeni u našoj ustanovi u razdoblju od 2008.do 2012.godine. Radilo se o 24 muškarca i 9 žena. Aritmetička sredina dobi za ispitanike iznosila je 69 godina.

Iz tablice je vidljivo da je najveći broj bolesnika u vrijeme početka liječenja bio u dobi od 61 do 74 godine, ukupno 16 bolesnika (vidljivo iz tablice 5.1.). Mlađih od 61 godine bilo je 7, a u dobi od 74 i više godina bilo je 10 bolesnika. Broj recidiva je varirao, 13 bolesnika su operirali dvije tvorbe, dakle imali su jedan recidiv, dok je bolesnika koji su imali četiri operacije, odnosno tri recidiva, bilo 11. Najveći broj, ukupno 6 recidiva, imao je samo jedan bolesnik, on je bio mlađi od 60 godina.

Tablica 5.1. Razdioba bolesnika prema ukupnom broju recidiva i dobi bolesnika u vrijeme uklanjanja prvog tumora

Broj bolesnika prema ukupnom broju recidiva pojedinog bolesnika	Dob bolesnika u vrijeme prvog tumora (godine)			Ukupno
	<61	61 to 74	>74	
1 recidiv	1	7	5	13
2 recidiva	2	1	0	3
3 recidiva	2	6	3	11
4 recidiva	1	2	0	3
5 recidiva	0	0	2	2
6 recidiva	1	0	0	1
Ukupno	7	16	10	33

5.1. Traženje razlike u imunohistokemijskim značajkama tumora kao prediktorima ukupnog broja recidiva i vrijednosti Ki-67

Za utvrđivanje razlika u biologiji tumora prijelaznog epitela mokraćnog mjehura korišten je izračun modela MARS krivolinijskom regresijom kojom se značaj testiranih prediktora u promjeni kvantitativne varijable izražava indeksom determinacije (R^2). Ekspresija E-cadherina se u svim MARS modelima pokazala beznačajnom u predviđanju ukupnog broja recidiva, odnosno vrijednosti K-67.

.Vrijednost R^2 je za sve tumore bila 0,423, za početne tumore 0,686, za prvi recidiv tumora 0,700, a za kasnije recidive samo 0,233. Bitno je istaknuti da su glavni prediktori za početne tumore bili HER2 i MSH2, dok je za prve recidive najbitniji prediktor bio EGFR (Tablica 5.2.).

Za rane recidive R^2 je bio 0,474 s EGFR i HER3 kao bitnim prediktorima, dok je za kasne recidive R^2 bio 0,640, pri čemu su bili najbitniji EGFR i PMS2.

Tablica 5.2. Rezultati MARS analize imunohistokemijskih pokazatelja u predviđanju ukupnog broja recidiva tumora

Relativni značaj pokazatelja u MARS modelu		Svi tumori	Slijed uklanjanja tumora			Vrijeme recidiva	
			Početni tumor	Prvi recidiv	Ponovni recidivi	Rani (do 9 mj)	Kasni (>9 mj)
Imunohistokemijski pokazatelji	EGFR	2	1	2	1	2	2
	HER2	1	2	0	0	0	0
	HER3	0	0	0	0	2	0
	MLH1	0	1	0	0	0	0
	MSH2	2	2	1	0	0	0
	MSH6	0	1	0	1	0	1
	PMS2	3	0	1	1	2	3
	E-CAD	0	0	0	0	0	0
R^2		0,423	0,686	0,700	0,233	0,474	0,640

EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta, engl. *epidermal growth factor receptor*
HER2	humani epidermalni čimbenik rasta receptor 2, engl.*human epidermal growth factor receptor 2*
HER3	humani epidermalni čimbenik rasta receptor 3, engl.*human epidermal growth factor receptor 3*
MLH1	engl.*mutL protein homolog 1*
MSH2	engl.*mutS protein homolog 2*
MSH6	engl.*mutS protein homolog 6*
PMS2	engl.*post meiotic segregation 2*
E-cadherin	epitelni kaderin, engl.*epithelial cadherin*
MARS	multivarijabilna adaptivna regresijska krivulja, eng.*multivariate adaptive regression splines*

Opisane su razlike u najvažnijim prediktivnim markerima između početnih tumora i prvih recidiva, kao i između ranih i kasnih recidiva, što pokazuje da se biologija tumora razlikuje među tim podskupinama tumora, i u odnosu na ukupan broj recidiva i za predviđanje vrijednosti Ki-67 (Tablica 5.3.).

Vrijednost R^2 je za sve tumore bila 0,300; za početne tumore 0,262, za prvi recidiv tumora 0,360, a za kasnije recidive 0,533. Glavni prediktori za početne tumore bio je HER2 i MSH6, dok su za prve recidive najbitniji prediktori EGFR i MSH6. Za rane recidive R^2 je bio 0,266, za kasne recidive R^2 je bio 0,370.

Tablica 5.3. Rezultati MARS analize imunohistokemijskih pokazatelja u predviđanju vrijednosti Ki-67 tumora

Relativni značaj pokazatelja u MARS modelu		Svi tumori	Slijed uklanjanja tumora			Vrijeme recidiva	
			Početni tumor	Prvi recidiv	Ponovni recidivi	Rani (do 9 mj)	Kasni (>9 mj)
Imunohistokemijski pokazatelji	EGFR	1	0	2	1	1	0
	HER2	0	2	0	3	0	0
	HER3	0	0	0	0	0	0
	MLH1	1	0	0	2	0	1
	MSH2	2	1	0	1	0	0
	MSH6	4	1	2	1	1	2
	PMS2	0	0	0	1	1	1
	E-CAD	0	0	0	0	0	0
R^2		0,300	0,262	0,360	0,533	0,266	0,370

EGFR receptor epidermalnog faktora rasta, engl. *epidermal growth factor receptor*

HER2 humani epidermalni čimbenik rasta receptor 2, engl.*human epidermal growth factor receptor 2*

HER3 humani epidermalni čimbenik rasta receptor 3, engl.*human epidermal growth factor receptor 3*

MLH1 engl.*mutLprotein homolog 1*

MSH2 engl.*mutS protein homolog 2*

MSH6 engl.*mutS protein homolog 6*

PMS2 engl.*post meiotic segregation 2*

E-cadherin epitelni kaderin, engl.*epithelial cadherin*

MARS multivarijabilna adaptivna regresijska krivulja, eng.*multivariate adaptive regression splines*

5.2. Traženje razlika u imunohistokemijskim značajkama uklonjenog i recidivnog tumora mokraćnog mjehura

Kako bi se točnije utvrdile značajke recidiviranja tumora mokraćnog mjehura, podaci 113 tumora 33 bolesnika organizirani su u 80 procesa recidiviranja, od kojih svaki sadrži podatke uklonjenog tumora i podatke sljedećeg recidiva, kao i vrijeme između uklanjanja početnog i recidivnog tumora.

Promjena u ekspresiji imunohistokemijskih biljega (bodovana kao 0, +1, +2 ili +3) odvojena je za HER porodicu biljega i *Lynch* porodicu biljega i izražena je kao “bodovanje", zapravo je zbroj apsolutnih razlika (zanemaren je predznak) u ekspresiji pojedinog biljega između prvog i drugog tumora koji čine jedan proces recidiviranja (Tablica 5.4.).

Tablica 5.4. Razdioba vrijednosti bodovanja promjene biljega između tumora koji čine jedan proces recidiviranja

Broj procesa recidiviranja		Bodovanje promjene HER biljega							Ukupno
		0	1	2	3	4	5	6	
Bodovanje promjene *Lynch* biljega	0	1	3	14	3	1	1	1	24
	1	0	1	3	3	2	3	1	13
	2	3	8	4	3	1	2	1	22
	3	1	2	1	2	0	0	0	6
	4	0	0	3	1	0	0	1	5
	5	0	0	1	2	0	0	0	3
	7	0	0	2	1	0	0	0	3
	9	0	1	1	0	0	0	0	2
	10	0	0	1	0	0	1	0	2
Ukupno		5	15	30	15	4	7	4	80

HER humani epidermalni čimbenik rasta receptor, engl.*human epidermal growth factor receptor*

Izračunata je razlika u Ki-67 između recidivnog i prvog tumora, pri čemu je sačuvan predznak, a negativna vrijednost znači da recidivni tumor ima manju mitotske aktivnosti od prethodnika.

Navedeni podatci korišteni su za analizu traženjem EM klastera.

Tablica 5.5. prikazuje razdiobu 80 definiranih procesa recidiviranja karcinoma mokraćnog mjehura prijelaznog epitela, koji su utvrđeni u 33 bolesnika uključenih u studiju. Iz tablice je vidljivo da je 35 procesa recidiviranja nađeno bolesnicima koji su započeli liječenje u dobi između 61 i 74 godine, 21 proces se dogodio bolesnicima koji su započeli liječenje do navršenih 60 godina, a 24 procesa bolesnicima koji su započeli liječenje nakon navršene 74 godine. Od ukupnog broja, 33 procesa recidiviranja su bili prvo recidiviranje, 20 procesa drugo recidiviranje, 17 procesa su bili treće recidiviranje, dok su kasnija recidiviranja nađena samo u 10 bolesnika. Tablica nije pokazala značajne vrijednosti ($\chi 2$ = 6,673; p=0,756).

Tablica 5.5. Razdioba procesa recidiviranja prema rednom broju recidiva i dobi bolesnika u vrijeme uklanjanja prvog tumora

Broj procesa recidiviranja prema rednom broju recidiviranja u pojedinog bolesnika	Dob bolesnika u vrijeme prvog tumora (godine starosti)			Ukupno
	<61	61 to 74	>74	
1. recidiviranje	7	16	10	33
2. recidiviranje	6	9	5	20
3. recidiviranje	4	8	5	17
4. recidiviranje	2	2	2	6
5. recidiviranje	1	0	2	3
6. recidiviranje	1	0	0	1
Ukupno	21	35	24	80

U 32 procesa recidiviranja, koji su podijeljeni u tri skupine, razmak između dva zahvata je bio kraći od 5 mjeseci, dok je 23 procesa bilo u razmaku 5-9 mjeseci, a 25 procesa u razmaku većim od 9 mjeseci ($\chi 2$=8,813, p=0,549) (Tablica 5.6.).

Tablica 5.6. Razdioba procesa recidiviranja prema brzini recidiviranja izraženoj brojem mjeseci između dva zahvata uklanjanja tumora

Broj procesa recidiviranja prema rednom broju recidiviranja u pojedinog bolesnika	Brzina recidiviranja (mjeseci između dva zahvata)			Ukupno
	<5	5 to 9	>9	
1. recidiviranje	14	10	9	33
2. recidiviranje	4	6	10	20
3. recidiviranje	9	4	4	17
4. recidiviranje	2	2	2	6
5. recidiviranje	2	1	0	3
6. recidiviranje	1	0	0	1
Ukupno	32	23	25	80

Iz tablice 5.7. vidljivo je da je za 30 procesa recidiviranja, podijeljenih u tri skupine, povećanje vrijednosti HER biljega veće od dva, za 30 procesa je bilo dva, dok je manji pomak opažen za 20 procesa recidiviranja. Razlika nije statistički značajna ($\chi 2$=5,464; p=0,858).

Tablica 5.7. Razdioba procesa recidiviranja prema razlici u vrijednosti biljega u HER porodici između početnog tumora i recidiva

Broj procesa recidiviranja prema rednom broju recidiviranja u pojedinog bolesnika	Razlika u vrijednosti biljega HER porodica između početnog tumora i recidiva			Ukupno
	<2	2	>2	
1. recidiviranje	8	11	14	33
2. recidiviranje	5	9	6	20
3. recidiviranje	5	7	5	17
4. recidiviranje	1	1	4	6
5. recidiviranje	1	1	1	3
6. recidiviranje	0	1	0	1
Ukupno	20	30	30	80

HER humani epidermalni čimbenik rasta receptor, engl.*human epidermal growth factor receptor*

Tablica 5.8. pokazuje razdiobu tumorskih biljega u tri skupine. Manji porast od dva vidi se u 37 procesa recidiviranja, porast od dva u 22 procesa, a porast veći od dva u 21 procesu recidiviranja. Nije se pokazala razlika ovisno o rednom broju recidiva (χ=3,391, p=0,971).

Tablica 5.8. Razdioba procesa recidiviranja ovisno o razlici u vrijednosti biljega *Lynch* porodice

Broj procesa recidiviranja prema rednom broju recidiviranja u pojedinog bolesnika	Razlika u vrijednosti biljega porodice *Lynch* između početnog tumora i recidiva			Ukupno
	<2	2	>2	
1. recidiviranje	13	10	10	33
2. recidiviranje	11	5	4	20
3. recidiviranje	9	4	4	17
4. recidiviranje	2	2	2	6
5. recidiviranje	1	1	1	3
6. recidiviranje	1	0	0	1
Ukupno	37	22	21	80

U tablici 5.9. prikazane su tri skupine procesa recidiviranja. U prvoj skupini su procesi pri čemu je razlika bila pad postotka veći od 5%, u drugoj skupini je razlika bila od -5 do +5, u trećoj skupini je došlo do porasta vrijednosti Ki-67 za više od 5% u recidivu. Najveći je broj tumora pokazao malu promjenu, unutar -5 do + 5, što je bilo u 42 procesa recidiviranja, 22 procesa su pokazala značajni pad, a 16 značajni porast Ki-67. Razlika nije bila statistički značajna (χ=7,786, p=0,650).

Tablica 5.9. Razdioba procesa recidiviranja ovisno o promjeni postotka Ki-67 između početnog tumora i recidiva

Broj procesa recidiviranja prema rednom broju recidiviranja u pojedinog bolesnika	Razlika u postotku Ki-67 između početnog tumora i recidiva			Ukupno
	<-5%	-5% to +5%	>+5%	
1. recidiviranje	10	15	8	33
2. recidiviranje	7	9	4	20
3. recidiviranje	5	9	3	17
4. recidiviranje	0	5	1	6
5. recidiviranje	0	3	0	3
6. recidiviranje	0	1	0	1
Ukupno	22	42	16	80

5.2.1. Razlika u biologiji procesa recidiviranja ovisno o rednom broju recidiviranja.

U tablici 5.10. prikazani su procesi recidiviranja razmješteni u tri skupine po redoslijedu. Prvu skupinu čine 33 recidiviranja, a radilo se o prvim recidivima bolesnika, drugu skupinu čini 20 procesa recidiviranja koji su bili drugi recidivi u pojedinog bolesnika, a svi kasniji recidivi nakon drugog, kojih je ukupno 27, činili su treću skupinu. Iz tablice je vidljivo da je različit broj klastera detektiran u navedenim skupinama prema rednom broju recidiviranja. Tri klastera su nađena u skupini prvih i drugih recidiva, samo dva klastera su nađena u kasnim recidivima.

Za definiranje klastera u skupini prvih recidiva bila je bitna vrijednost biljega iz porodice HER, pri čemu je $p < 0,001$, a statistički značajna je bila i vrijednost *Lynch* biljega, pri čemu je $p=0,02$. U preostale dvije skupine procesa recidiviranja prema redoslijedu pojave

za skupinu drugih i kasnijih recidiva detektirani klasteri ovisili su o vrijednosti *Lynch* biljega, $p < 0,001$. To upućuje na činjenicu da postoji određena razlika u biologiji pojave prvog recidiva u odnosu na kasnije recidive, što je vjerojatno posljedica činjenice da se u skupini prvih procesa recidiviranja nalaze podatci onih bolesnika koji su imali dva tumora, odnosno jedan recidiv. Oni su drugačijeg biološkog potencijala recidiviranja i pojava recidiva je ovdje dominantno povezana s HER biljezima.

Procesi koji su imali dva ili više recidiva povezani su sa *Lynch* biljezima te kod prvog ili drugog recidiviranja pokazuju drukčije promjene imunohistokemijskih pokazatelja u odnosu na treće ili kasnije recidiviranje. Pri tomu su procesi recidiviranja grupirani prema rednom broju recidiviranja kao prvo recidiviranje, drugo recidiviranje i kao treće do petog recidiviranja.

Tablica 5.10. Rezultati analize klastera očekivane maksimalizacije za tri kategorije procesa recidiviranja

Recidiviranje	Broj procesa recidiviranja	Stupanj slobode	Broj detektiranih EM klastera	Značajnost pokazatelja u razlučivanju klastera (ANOVA: F vrijednost (p))		
				Bodovanje HER biljega	Bodovanje *Lynch* biljega	Razlika Ki-67 uzastopnih tumora
Prvo	33	30	3	31,14 (p <0,001)	4.33 (p =0,022)	1,48 (p =0,243)
Drugo	20	17	3	0,65 (p =0,537)	66,09 (p <0,001)	0,55 (p =0,584)
Nakon drugog	27	25	2	0,47 (p =0,498)	64,47 (p =0,001)	0,25 (p =0,620)

ANOVA analiza varijance, engl.*analysis of variance*

EM očekivana maksimalizacija, engl.*expectation maximization*

HER humani epidermalni čimbenik rasta receptor, engl.*human epidermal growth factor receptor*

p statistički značajno na razini p<0,05

5.2.2. Razlika u biologiji procesa recidiviranja ovisno o brzini pojave recidivnog procesa

U tablici 5.11. pokazano je da je brzina procesa recidiviranja povezana sa značajkama fenotipa tumora odnosno promjene fenotipskih značajki početnog procesa i recidiva. Prvu skupinu čine 32 procesa recidiviranja kod kojih je razmak između dvije operacije bio kraći od 5 mjeseci. Drugu skupinu čine 23 procesa recidiviranja s razmakom između dvije operacije od pet do devet mjeseci. Treću skupinu čini 25 procesa recidiviranja s razmakom većim od devet mjeseci.

U te tri skupine detektirana su dva klastera. Razlike između klastera za procese koji su recidivirali unutar pet mjeseci i za recidive nakon devet mjeseci zavisile su isključivo o vrijednosti *Lynch* biljega. Za recidive koji se javljaju od pet do devet mjeseci postojanje klastera je statistički značajno ovisilo o promjeni Ki-67 u uzastopnim tumorima.

Tablica 5.11. Rezultati analize klastera očekivane maksimalizacije za tri kategorije brzine recidiviranja tumora

Razmak između uklanjanja uzastopnih tumora	Broj procesa recidiviranja	Stupanj slobode	Broj detektiranih EM klastera	Značajnost pokazatelja u razlučivanju klastera (ANOVA: F vrijednost (p))		
				Bodovanje HER biljega	Bodovanje *Lynch* biljega	Razlika Ki-67 uzastopnih tumora
<5 mjeseci	32	30	2	2,57 (p = 0,119)	23,23 (p < 0,001)	0,21 (p =0,647)
5 do 9 mjeseci	23	21	2	1,59 (p = 0,221)	0,58 (p = 0,453)	12,10 (p =0,002)
>9 mjeseci	25	25	2	0,26 (p = 0,617)	83,35 (p < 0,001)	1.32 (p =0,262)

ANOVA	analiza varijance, engl.*analysis of variance*
EM	očekivana maksimalizacija, engl.*expectation maximization*
HER	humani epidermalni čimbenik rasta, engl.*human epidermal growth factor receptor*
p	statistički značajno na razini $p<0,05$

Iz prethodna dva odjeljka vidljiva je, analizom imunohistokemijskih profila tumora mokraćnog mjehura, bitna razlika u predikcijskoj vrijednosti pojedinih imunohistokemijskih pokazatelja kod primarnih tumora, prvog recidiva, kasnijih recidiva ili relativno brzih recidiva u odnosu na kasnije recidive. Primjenom metode klastera u drugom je odjeljku uočeno postojanje posebne razlike u biologiji procesa recidiviranja, ovisno o tome radi li se o promjeni u drugom recidivanju u odnosu na kasnija recidiviranja. Dobiveni su slični rezultati dvjema sasvim različitim statističkim metodama.

Navedeno se može provjeriti tako da se iz ukupnog broja recidiva formiraju jasno definirane podgrupe i odvojeno testiraju. Tako je od 80 procesa recidiviranja izdvojena skupina od 19 procesa koji pripadaju bolesnicima koji su imali samo jedan ili najviše dva recidiva, a preostali 61 proces recidiviranja je pripadao bolesnicima koji su imali više od dva procesa recidiviranja. Rezultati analize klastera za ove dvije skupine i za svih 80 procesa recidiviranja su prikazani u tablici 5.12.

Iz tablice je vidljivo da su kao ulazni potencijalni prediktori korišteni ukupno bodovanje HER i *Lynch* biljega, razlika u vrijednosti Ki-67 uzastopnih tumora pojedinog procesa recidiviranja te brzina recidiviranja izražena u mjesecima koji su protekli između dva kirurška zahvata. U tablici su navedeni rezultati za 19 procesa recidiviranja koji su pripadali bolesnicima s najviše dva recidiva. Detektirana su dva klastera koje su razlučivali vrijednosti HER biljega u velikoj mjeri ($p<0,001$) i brzina recidiviranja gdje je ($p=0,03$). U preostalih 61 procesa recidiviranja također su detektirana samo dva klastera na temelju *Lynch* biljega koji je bio izuzetno značajan u razlici između ta dva klastera. Ako se promatraju svi procesi recidiviranja kojih je 80, detektiraju se dva klastera koji se temelje na razlici u bodovanju *Lyncha* i vrijednosti Ki-67. Navedeno pokazuje da se definiranjem dvije skupine procesa recidiviranja na temelju ukupnog broja recidiva pojedinog bolesnika, kao surogatni pokazatelj za pravu biologiju tijeka bolesti, koristi ukupan broj recidiva.

Razlika u biologiji procesa recidiviranja između bolesnika s dva i manje od dva recidiva i bolesnika s više od dva recidiva (Tablica 5.12.).

Tablica 5.12. Rezultati analize klastera očekivane maksimalizacije između bolesnika s manjim i onih s većim brojem recidiva

Recidiviranje u bolesnika s:	Broj procesa recidiviranja	Stupanj slobode	Broj detektiranih EM klastera	Značajnost pokazatelja u razlučivanju klastera (ANOVA: F vrijednost (p))			
				Bodovanje HER biljega	Bodovanje *Lynch* biljega	Razlika Ki-67 uzastopnih tumora	Brzina recidiviranja (mjeseci)
jednim ili dva recidiva	19	17	2	31,214 (p<0,001)	0,17 (p=0,681)	1.35 (p=0,261)	5,190 (p=0,029)
više od dva recidiva	61	59	2	0,75 (p=0,389)	51,380 (p<0,001)	0,07 (p=0,796)	2,71 (p=0,105)
svih bolesnika	80	78	2	0,05 (p=0,820)	83,715 (p<0,001)	7,035 (p=0.001)	0,21 (p=0,644)

ANOVA analiza varijance, engl.*analysis of variance*

EM očekivana maksimalizacija, engl.*expectation maximization*

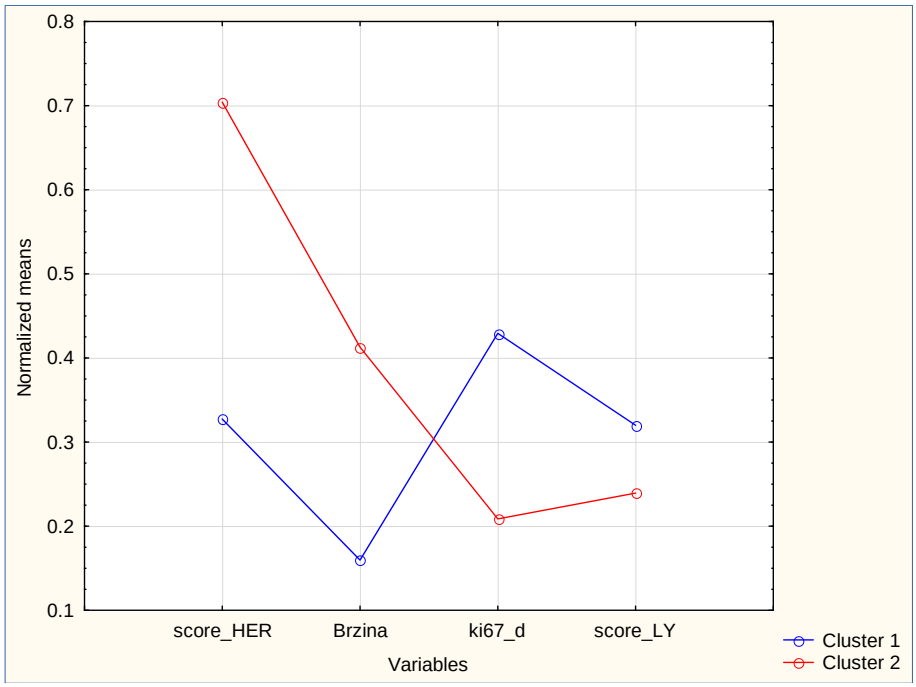
HER humani epidermalni čimbenik rasta, engl.*human epidermal growth factor receptor*

p statistički značajno na razini p<0,05

Slika 5.1. pokazuje normalizirane semiaritmetičke vrijednosti kvantitativnih pokazatelja koji su testirani u modelu klastera za skupinu 19 procesa recidiviranja bolesnika koji su imali najviše dva recidiva.

Iz slike je vidljivo da su bolesnici u prvom klasteru znakoviti po visokim vrijednostima HER biljega, što je dovelo do bitno većih vrijednosti razmaka između dvije operacije odnosno brzina recidiviranja je bila manja, i do manje vrijednosti promjene Ki-67 između dva tumora.

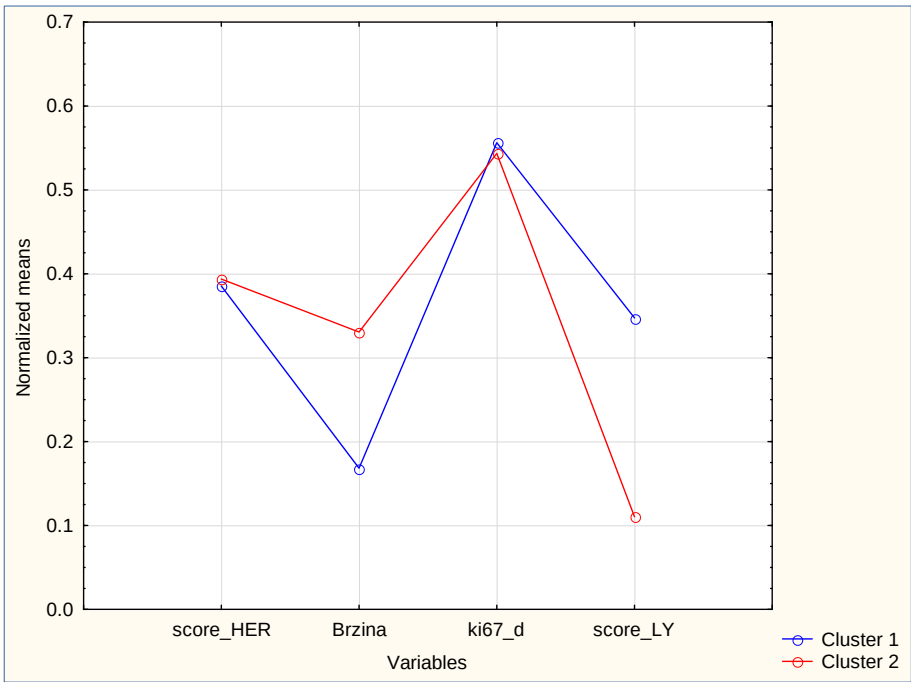
Kod drugog klastera vidljive su male vrijednosti HER biljega, zbog toga procesi brže recidiviraju, promjena Ki-67 je pozitivnija u odnosu na prvi klaster.



Slika 5.1. Prikaz aritmetičkih sredina vrijednosti pokazatelja za klastere očekivane maksimalizacije 19 procesa recidiviranja bolesnika s najviše dva recidiva

Slika5.2. pokazuje jednake pokazatelje za dva klastera nađena u skupini 61 procesa recidiviranja kod osoba koje su imale više od dva recidiva.

Vidljivo je da se u bitnoj mjeri razlikuju samo vrijednosti *Lynch* biljega, u klasteru s većim vrijednostima razlike ekspresije *Lynch* biljega razmak između dva recidiva je bio kraći odnosno recidiviranje je bilo brže.

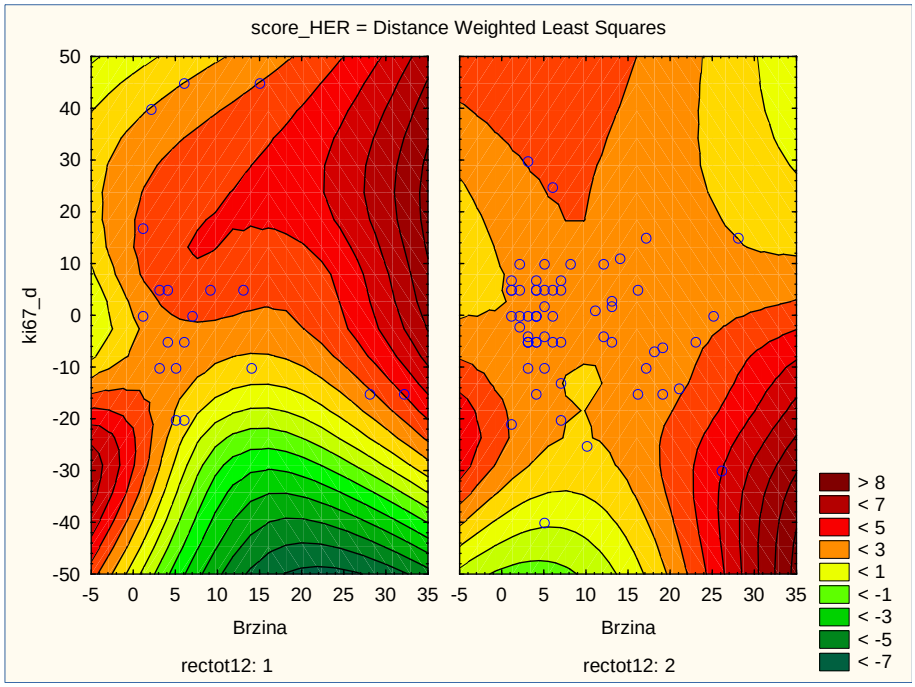


Slika 5.2. Prikaz aritmetičkih sredina vrijednosti pokazatelja za klastere očekivane maksimalizacije 61 procesa recidiviranja bolesnika s više od dva recidiva

Slike 5.3. i 5.4. trodimenzionalnom kartom prikazuju razdiobu pokazatelja duž osi x, y i z

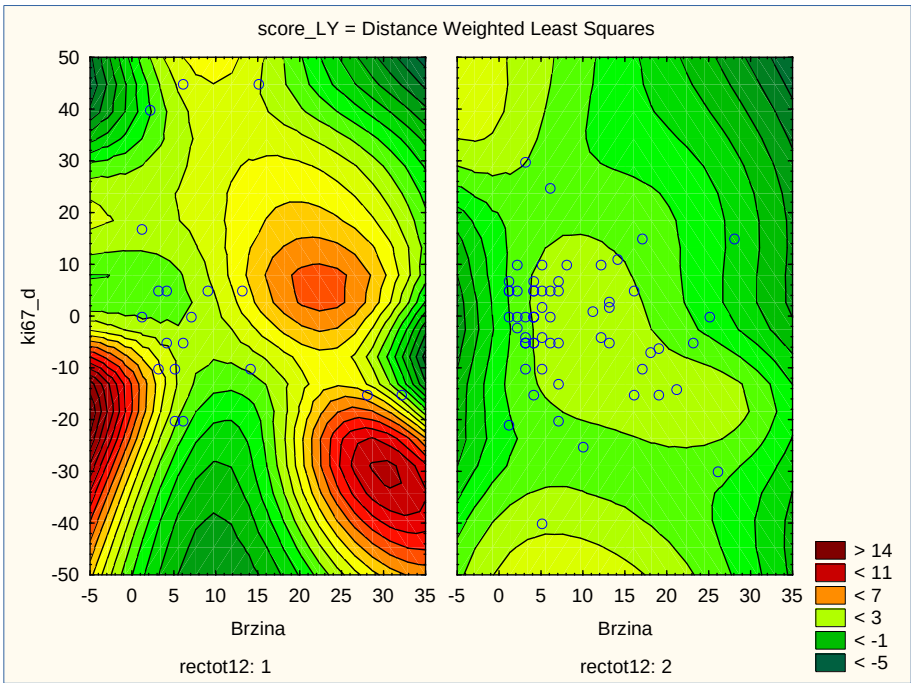
Slika 5.3. pokazuje razdiobu promjene ekspresije HER biljega tijekom procesa recidiviranja ovisno o brzini recidiviranja izraženoj u mjesecima proteklim između dva kirurška zahvata te ovisno o promjeni vrijednosti Ki-67 između 2 sukcesivna tumora. Lijeva strana slike pokazuje skupinu 19 recidiviranja u bolesnika koji su imali mali broj recidiva. Desna strana prikazuje 61 proces recidiviranja u bolesnika s većim brojem recidiva koji nije bio statistički značajan, što je vidljivo i u tablici 5.12.

Iz lijeve strane slike je vidljivo da su oni procesi recidiviranja kod kojih je nađeno povećanje ekspresije HER biljega bili znakoviti po sporijem recidiviranju i po nižim vrijednostima Ki-67.



Slika 5.3. Razdioba vrijednosti promjene ekspresije HER biljega tijekom procesa recidiviranja, ovisno o brzini recidiviranja izraženoj u mjesecima proteklim između dva kirurška zahvata, te ovisno o promjeni vrijednosti Ki-67 između dva sukcesivna tumora.

Na slici 5.4. lijeva polovica pokazuje podatke za 19 procesa recidiviranja bolesnika s malim brojem recidiva i statistički nije važna. Desna polovica se odnosi na 61 proces recidiviranja bolesnika koji imali više od dva recidiva. Vidljivo je da su bolesnici koji su imali veću promjenu ekspresije *Lynch* biljega bili znakoviti po bržem procesu recidiviranja odnosno po manjem broju mjeseci između sukcesivnih tumora. To je vidljivo iz velikog broja recidiva unutar 10 mjeseci koja je neovisna o razdiobi Ki-67.



Slika 5.4. Razdioba vrijednosti promjene ekspresije *Lynch* biljega, ovisno o brzini izraženoj u mjesecima između dva razmaka, te u promjeni vrijednosti Ki-67 između sukcesivnih tumora pojedinih procesa recidiviranja.

Navedeni rezultati sugeriraju postojanje biološkog potencijala mjerljivog ukupnim brojem recidiva i brzinom procesa recidiviranja koji je individualan i ovisi o pojedinom bolesniku. To upućuje na činjenicu da su promatranim bolesnicima recidivni tumori predstavljali recidive osnovne bolesti i da su značajke ranih recidiva u promjeni imunohistokemijskog profila tijekom procesa recidiviranja mogle sadržavati informaciju bitnu za predviđanje daljnjeg tijeka bolesti.

5.2.3. Razdioba pojedinih bolesnika po pripadnosti njihovih procesa recidiviranja klasterima očekivane maksimalizacije

Na temelju dosada prikazanih rezultata smatra se da rezultati sugeriraju postojanje bitnih razlika u biologiji tumora prijelaznog epitela mokraćnog mjehura koji su recidivirali u 33 bolesnika uključena u studiju, kao i u biologiji 80 izdvojenih procesa recidiviranja. Pri tome je u rezultatima pokazano da ta razlika, obzirom na značaj pojedinih

imunohistokemijskih biljega postoji između 19 procesa recidiviranja koji su se dogodili bolesnicima koji su imali najviše dva recidiva u odnosu na 61 proces recidiviranja u bolesnika koji su imali više od dva recidiva.

Iz navedenih razloga te dvije skupine procesa recidiviranja podijeljene su u dvije odvojene skupine i prikazani su tablicama 5.13 i 5.14.pri čemu je prikazano podatcima svakog konkretnog bolesnika koji je identificiran rednim brojem bolesnika u studiji, te je navedeno kako su procesi recidiviranja klasificirani, tj pripadaju li prvom ili drugom klasteru koji su opisani na slici 5.1. i 5.2. Tablica 5.13. prikazuje razdiobu bolesnika ovisno o pripadnosti procesa recidiviranja jednom od dva klastera za prvu skupinu bolesnika koji su imali najviše dva recidiva.

Kao što je vidljivo iz tablice, radi se o ukupno 16 bolesnika s 19 recidiva. Na vrhu tablice je grupirano 13 bolesnika koji su imali samo jedan proces recidiviranja i u većini slučajeva se radilo o procesu recidiviranja koji je klasificiran u drugi klaster. U šest bolesnika se radilo o procesu koji je klasificiran u prvi klaster što znači da su procesi recidiviranja bolesnika koji su imali samo jedan recidiv mogli po značajkama biti klasificirani u oba klastera.

Bolesnici rednog broja 7 i 23 imali su oba procesa recidiviranja klasificirani u drugi klaster što znači da kod tih bolesnika nije došlo do promjene pripadnosti, a jedan bolesnik pod brojem 8 imao je dva procesa recidiviranja od kojih je jedan bio klasificiran kao prvi klaster, a drugi kao drugi klaster.

Od ukupno 16 bolesnika samo kod jednog se primijetilo da su klasificirana dva procesa recidiviranja u različite klastere. On je jedini kod koga bi se moglo sumnjati o bitnoj razlici u profiliranju promatranih imunohistokemijskih biljega, te bi se moglo postaviti pitanje radi li se o recidivu ili o tumorima nastalim iz dva bliska sijela koji su imali neovisnu epigenetsku evoluciju.

Tablica 5.13. Razdioba bolesnika s najviše dva procesa recidiviranja ovisno o pripadnosti procesa jednom od dva klastera očekivane maksimalizacije

Redni broj bolesnika	Pripadnost procesa recidiviranja EM klasteru		Ukupno procesa recidiviranja
	Prvi klaster	Drugi klaster	
1	0	1	1
3	0	1	1
6	0	1	1
11	0	1	1
12	0	1	1
15	0	1	1
16	0	1	1
18	0	1	1
9	1	0	1
13	1	0	1
14	1	0	1
17	1	0	1
24	1	0	1
7	0	2	2
23	0	2	2
8	1	1	2
Ukupno	6	13	19

EM očekivana maksimalizacija, engl. *expectation maximization*

Tablicom 5.14. prikazan je 61 proces recidiviranja koji se dogodio u 17 bolesnika koji su također razvrstani po pripadnosti jednom ili drugom klasteru koji su nađeni u tim skupinama bolesnika.

Velika je većina bolesnika sve procese recidiviranja imala u drugom klasteru. Radi se o 11 bolesnika koji su imali tri ili četiri procesa recidiviranja, a svi su pripadali drugom klasteru. Šest bolesnika su imali proces recidiviranja svrstanih u oba klastera, neki su imali samo po jedan proces u prvom klasteru, a ostalo u drugom klasteru. To su bolesnici s brojevima 10, 28 i 33. Bolesnik s brojem 27 imao je dva procesa u prvom, tri u drugom klasteru, broj 22 imao je tri u prvome, dva u drugom klasteru, bolesnik broj 32 imao je tri u prvome i tri u drugome klasteru. Dakle, radi se o šest bolesnika koji su po miješanoj pripadnosti klasteru mogli dolaziti u obzir za tijek bolesti gdje su recidivni tumori imali složenije podrijetlo. Kod 11 bolesnika koji su imali proces recidiviranja isključivo u drugom klasteru ova analiza bi upućivala da se radilo o recidiviranju procesa koji nije bitnije mijenjao svoje imunohistokemijske značajke.

Tablica 5.14. Razdioba bolesnika s više od dva procesa recidiviranja ovisno o pripadnosti procesa jednom od dva klastera očekivane maksimalizacije

Redni broj bolesnika	Pripadnost procesa recidiviranja EM klasteru		Ukupno procesa recidiviranja
	Prvi klaster	Drugi klaster	
2	0	3	3
4	0	3	3
5	0	4	4
19	0	3	3
20	0	3	3
21	0	3	3
25	0	4	4
26	0	3	3
29	0	3	3
30	0	3	3
31	0	3	3
10	1	2	3
28	1	2	3
33	1	3	4
27	2	3	5
22	3	2	5
32	3	3	6
Ukupno	11	50	61

EM očekivana maksimalizacija, engl. *expectation maximization*

6. RASPRAVA

U ovoj studiji se analizirala agresivnost raka mokraćnog mjehura, te pojavnost ranih ili kasnih recidiva raka određivanjem markera HER i *Lynch* porodice (EGFR, HER2, HER3, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) te E-cadherina. Oni su klasificirani u određeni imunohistokemijski fenotip u odnosu na surogat marker Ki-67 u primarnom tumoru i recidivu. Analiza je temeljena na pitanju je li pojavnost svakog sljedećeg recidiva vezana uz početni uklonjeni tumor ili je neovisan događaj.

Zbog toga se nastojalo identificirati fenotipske značajke početnih i recidivirajućih tumora u četiri podskupine bolesnika povezanih s povećanim rizikom recidiva bolesti te analizirati postojanje razlika u fenotipu ranih i kasnih recidiva. Ovisno o definiranim značajkama, usporediti upućuju li te razlike na razlike u biologiji tumora.

Navedeni markeri odabrani su zbog postojanja određenih studija koje opisuju njihovu ulogu u nastanku recidiva i progresiji tumora.

Promjene ekspresije *Lynch* gena dovode do pojave mikrosatelitske nestabilnosti stanica. Thibodeaui sur. utvrdili su da je u 19 od 29 slučajeva HNPCC nađena mutacija MSH2 i MLH1 proteina što znači da su oni znakoviti čimbenici predviđanja recidiva (67).

Van der Postova studija rađena na 95 obitelji pokazala je da nosioci mutacija MLH1, MSH2 i MSH6 i njihova rodbina u prvome koljenu imaju povećanu sklonost recidiviranju i rastu karcinoma mokraćnog mjehura. Dva bolesnika su imala mutaciju MLH1, petnaest MSH2 i četiri MSH6. Najveći rizik su pokazali nosioci MSH2 mutacija, uspoređujući s ukupnom populacijom kumulativni rizik je 7% za muškarce i 5,8 % za žene (68).

U promatranim skupinama analizirano je ukupno 33 pacijenta dobi između 57 i 82 godina, 113 tumora u 80 procesa recidiviranja. Muškaraca je bilo 28, a žena 5.

U predviđanju ukupnog broja recidiva glavnim prediktorima za početne tumore pokazali su se HER2 i MSH2, dok je za prve recidive najbitniji prediktor EGFR. Za rane recidive bitnim su se pokazali EGFR i HER3, za kasne EGFR i PMS2.

A. Garcia-Tello i sur. utvrdili su da je inaktivacija gena *PMS2* i *MLH1* neovisni marker dobre prognoze i zajedno s histološkim stupnjem može definirati prognozu bolesti (69,70).

U ovoj doktorskoj disertaciji analizom ukupnog broja recidiva tumora pojedinog bolesnika na temelju imunohistokemijskih pokazatelja rezultati su pokazali da su tumori koji su jednom recidivirali biološki bitno drukčiji od tumora koji su imali više od jednog recidiva,

a većina bolesnika za vrijeme uklanjanja prvog tumora bila je u dobi 61 do 74 godine (49%). MARS model najbolje predviđa Ki-67 za drugi i kasnije recidive, pri čemu je objašnjeno 53% vrijednosti Ki-67, a uključeni su EGFR, HER2 i *Lynch* biljezi, među najbitnijima MLH1. U ovome testiranju, gdje se Ki-67 koristi kao surogatni biljeg biologije tumora, pokazano je da postoji biološka razlika između tumora koji su u stanju više nego jedan puta recidivirati.

Ki-67 je poznati prediktivni čimbenik rasta stanica karcinoma. Njegova ekspresija je prisutna u raznim tumorima i povezana je s lošijom prognozom. Uloga Ki-67 kao prognostičkog čimbenika za karcinom mokraćnog mjehura nije sasvim jasna. Tian i sur. su u metaanalizi na 52 uzorka tumorskog tkiva pokazali da je povećana ekspresija Ki-67 povezana s povećanim brojem recidiva samo za bijelce (71).

Makboul i sur. su pokazali povezanost Ki-67 s progresijom, ali ne sa sposobnošću recidiviranja karcinoma mokraćnog mjehura (72).

Studija koju je proveo Acikalin i sur. na 68 bolesnika s mišić invazivnim karcinomom kojima je napravljen TUR, pokazala je da ekspresija Ki-67 nije statistički značajno povezana s recidivima, progresijom i mortalitetom (73).

Ova doktorska disertacija ukazala je na razlike za vrijednosti Ki-67 između početnih tumora i prvih recidiva, kao i između ranih i kasnih recidiva, što pokazuje da se biologija tumora razlikuje obzirom na ukupan broj recidiva i kod predviđanja vrijednosti Ki-67.

Obradom nekoliko velikih studija na ukupno 5147 bolesnika oboljelih od karcinoma mokraćnog mjehura uočeno je da je ekspresija Ki-67 značajno povezana s kraćim razdobljem do recidiva bolesti, do progresije, kraćim ukupnim i karcinom specifičnim preživljenjem (74).

Obzirom na prediktivnu vrijednost HER2, postoje studije s vrlo oprečnim rezultatima. Nekoliko studija tvrdi da je prekomjerna ekspresija HER2 značajan prediktor recidiva, odnosno razdoblja do povrata bolesti (engl. *disease-free survival*-DFS) i razdoblja do progresije bolesti (engl. *progression-free survival*-PFS) (75).
Druge studije su pokazale vrlo malu ili nikakvu prognostičku vrijednost HER2 ekspresije u razvoju karcinoma mokraćnog mjehura (76-81).

Kassouf i sur. tvrde da nema povezanosti između HER2 ekspresije i kliničkog ishoda u skupini od 184 pacijenta koji su imali primarni karcinom mokraćnog mjehura (82).

U ovom istraživanju, analizom dobivenih rezultata, može se zaključiti da su oni procesi recidiviranja kojima je nađeno povećanje ekspresije HER biljega pokazali sporije recidiviranje i niže vrijednosti Ki-67, što je u skladu s rezultatima studije koju je proveo Cormio i sur. (83). Bolesnici s najviše dva recidiva u prvom klasteru imali su visoke

vrijednosti HER-a što je dovelo do bitno većih vrijednosti razmaka između dvije operacije i do manje vrijednosti promjene Ki-67 između dva tumora.

U drugom klasteru vidljive su male vrijednosti HER biljega, zbog čega procesi brže recidiviraju, a promjena Ki-67 pozitivnija je u odnosu na prvi klaster.

U studiji Corrmio L. i sur. praćeno je 67 pacijenata mišić invazivnog karcinoma visokog stupnja, od kojih je polovici učinjena samo transuretralna resekcija mokraćnog mjehura (TUR), a polovici se dodatno instalira BCG. Medijan praćenja tih pacijenata je bio 75,7 mjeseci. DFS i PFS bili su 35,8% i 73,0%. Kaplan-Meierova analiza preživljenja pokazala je da tradicionalni prognostički faktori kao što su spol, veličina tumora, broj recidiva, nisu predvidjeli DFS i PFS. BCG tretman se pokazao kao znakoviti prediktor DFS, ali ne PFS. Prekomjerna ekspresija HER2 pokazala se kao značajan prediktor DFS i PFS (83).

Ove razlike u podatcima mogu se objasniti razlikama populacije bolesnika i tehnikama HER2 analize, ali su svakako potrebni dodatni podatci iz prospektivnih studija koje koriste standarizirane tehnike analize HER2 ekspresije.

Uz poznate činjenice dokazane u brojnim studijama o povezanosti prekomjerne ekspresije i amplifikacije HER2, Sanguedolce F. i sur. prvi su puta pokazali da mutacije MMR gena *MLH1* i *MSH2* mogu povećati negativnu predikcijsku vrijednost ekpresije HER2 (84).

Kako bi se odredio prognostički značaj HER porodice gena, ekpresija njihovih receptora uspoređivana je s razvojem recidiva bolesti i ukupnim preživljenjem, a uspoređena je s poznatim biološkim indikatorima. Dokazano je da su čimbenici koji predviđaju prvi recidiv multipli tumori, HER2 i HER3 dok tumori koji pokazuju ekspresiju EGFR, HER2 i HER3 ili samog HER2 imaju značajno viši rizik razvoja drugog recidiva. Čimbenici povezani s kraćim preživljenjem su stadij tumora, HER2, EGFR-HER2 i HER2-HER3 (85).

U ovoj doktorskoj disertaciji dodatnom analizom rednog broja recidiva, uočena je razlika između prvog recidiva koji je povezan s HER biljegom, dok su drugi i kasniji recidivi ovisili o biljezima *Lynch* porodice. U skupini prvih recidiva statistički značajna je vrijednost biljega iz obitelji HER i vrijednost *Lynch* biljega. U preostale dvije skupine procesa recidiviranja prema redoslijedu pojave za skupinu drugih i kasnijih recidiva pokazana je vrijednost *Lynch* biljega ($p<0,0001$), što upućuje na razliku u biologiji pojave prvog recidiva u odnosu na kasnije recidive te prvog ili drugog u odnosu na treće ili još kasnije recidive.

Može se zaključiti da bolesnici koji imaju veću promjenu ekspresije *Lynch* biljega, a male vrijednosti HER, imaju brže procese recidiviranja. To je vidljivo iz velikog broja recidiva unutar 10 mjeseci koja je neovisna o razdiobi Ki-67.

Lindgren i sur. su analizirali profil ekspresije i mutacije za molekularnu kategorizaciju skupine od 75 karcinoma mokraćnog mjehura. Potvrdili su glavnu ulogu HER3 u razvoju mišić neinvazivnog karcinoma mokraćnog mjehura niskog gradusa (86).

Najmanje podataka postoji o ekspresiji HER3 i HER4. Memon i sur. su u studiji na 88 pacijenata u medijanu praćenja od 23 mjeseca utvrdili da je pojačana ekspresija HER3 i HER4 povezana s boljom prognozom. Kod zajedničke ekspresije oba čimbenika pokazano je bolje preživljenje nego kod pojedinačne ekspresije (87).

Kako je spomenuto u uvodu, E-cadherin je najvažnija međustanična molekula koja stabilizira epitelne stanice, poznato je da promjena njene ekspresije može dovesti do poremećenog odnosa među stanicama i razvoja karcinoma. Nekoliko udruženih studija koje uključuju 2089 bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura pokazale su da smanjena ekspresija E-cadherina značajno predviđa lošije ukupno preživljenje (88). Suprotno tome, neke studije pokazuju da nema povezanosti između promjene ekspresije E-cadherina i prognoze (89).

Tijekom provođenja ovog istraživanja dobiveni rezultati pokazuju da od svih testiranih imunohistokemijskih pokazatelja jedino E-cadherin nesumnjivo nema nikakvu bitnu ulogu u procesu recidiviranja, što je u skladu sa poznatom studijom Liang W i sur. u kojoj je opisana povezanost gubitka ekspresije E-cadherina s invazijom i metastazama, ali ne i s recidivima (90).

U studiji Dalesio i sur. uočeno je da kod mišić neinvazivnog karcinoma mokraćnog mjehura prognostički faktori mogu imati važniju ulogu u razvoju bolesti nakon transuretralne resekcije nego izbor adjuvantne kemoterapije ili imunoterapije. Od posebne važnosti je bilo otkriće da bolesnici s manje od jednim recidivom godišnje imaju prognozu sličnu onima samo s primarnim tumorom, dok bolesnici s više recidiva imaju lošu prognozu. Ovi rezultati pokazuju da bolesnici s mišić neinvazivnim karcinomom čine heterogenu grupu i da se kod podgrupe češćih recidiva može razmotriti agresivnija terapija (91).

U studiji Kurth i sur. analizirano je 576 bolesnika i pokazalo se da je tumor recidivirao u 54% bolesnika, a u 17% recidiv je vidljiv već na prvoj cistoskopiji nakon šest tjedana. Srednje vrijeme prvog recidiva promatranih u razdoblju od 6 tjedana nakon prve operacije do 5 godina praćenja je 1,8 godina. Analiza je pokazala da su čimbenici povezani s prvim recidivom bili stupanj, veličina i broj tumora (92).

Analizirajući dobivene rezultate u našem istraživanju pokazano je da su razlike između klastera za procese koji su recidivirali unutar pet mjeseci i za recidive nakon devet

mjeseci zavisile isključivo o vrijednosti *Lynch* biljega, a za recidive koji se javljaju od pet do devet mjeseci o promjeni Ki-67 u uzastopnim tumorima.

Rezultati dobiveni analizom imunohistokemijskih profila tumora mokraćnog mjehura pokazali su da postoji bitna razlika u predikcijskoj vrijednosti pojedinih imunohistokemijskih pokazatelja primarnih tumora, prvog recidiva, kasnijih recidiva ili relativno brzih recidiva u odnosu na kasnije recidive.

Navedeni rezultati pokazuju da je ukupan broj recidiva i brzina procesa recidiviranja važan biološki potencijal koji ovisi o pojedinom bolesniku. Recidivni tumori predstavljali su recidive osnovne bolesti, a značajke ranih recidiva u promjeni imunohistokemijskog profila tijekom procesa recidiviranja mogle su sadržavati informaciju bitnu za predviđanje daljnjeg tijeka bolesti.

Zbog složenih mehanizama karcinogeneze mokraćnog mjehura teško je pronaći idealan prediktor recidiva, jer zahtijeva mnoge značajke kao što su visoka senzitivnost i specifičnost, sposobnost predviđanja stupnja maligniteta, nedostatak ljudske greške te korištenje neinvazivnih i cjenovno pristupačnih metoda. Idealan marker trebao bi identificirati bolest prije njene kliničke manifestacije i omogućiti prognostičku informaciju.

Metode primijenjene u ovoj disertaciji nisu nigdje objašnjene ni opisane u studijama te se smatraju važnima u analizi biologije ponašanja tumora mokraćnog mjehura.

Do sada u literaturi ne postoje istraživanja koja bi analizirala način recidiviranja karcinoma mokraćnog mjehura opisanih ovim istraživanjem.

Svakako bi trebalo osmisliti i provesti dodatna slična istraživanja s većim brojem ispitanika kako bi se dobile detaljnjije informacije o biologiji recidiva. Proširenim istraživanjem na adekvatno velikoj seriji moglo bi se utvrditi postojanje i drugih razlika između različitih skupina bolesnika. To bi govorilo u prilog tvrdnji da se ipak radi o jednoj heterogenoj bolesti s mogućim definiranjem podtipova tumora.

To bi omogućilo razvoj optimalne strategije rane detekcije tumora mokraćnog mjehura, uzimajući u obzir povoljni interval, metode i skupinu pacijenata koja bi bila uključena. Do tada se preporuča kombinacija ultrazvuka i citologija urina i sedimenta urina svake 1-2 godine i program praćenja svih nositelja MSH2 mutacije počevši s navršenih 40 godina jer se u toj dobi javio najmlađi bolesnik s *Lynchovim* sindromom (93).

7. ZAKLJUČCI

- Krivolinijski regresijski model (MARS analiza) predviđa s uspješnošću od 70% pojavu prvog recidiva tumora mokraćnog mjehura za kombinaciju markera EGFR, a 69% je uspješan ako se uključe i markeri MSH2 i PMS2. Isti model uspješan je 23% kod predviđanja drugih recidiva s istim markerima, a predviđanje ranog recidiva je manje uspješno (47%) od predviđanja kasnog recidiva (64%)

- Marker Ki-67 u MARS modelu ima prediktivnu vrijednost od 53 % za drugi i naredne recidivne tumore ako se u model uključe HER2 i MLH1 biljezi.

- Analiza klastera pokazala je klastere koji ovise o HER obitelji tumorskih biljega u slučaju prvih recidiva, dok drugi i kasniji recidivi ovise o biljezima Lynch obitelji

- Recidivi koji su se pojavili unutar 5 mjeseci od primarne bolesti pripadaju klasteru koji ovisi o Lynch biljezima, oni koji se pojavljuju u razmaku od 5 do 9 mjeseci ovise o razlici vrijednosti biljega Ki-67 između početnog i recidivirajućeg tumora, a oni koji se pojavljuju nakon 9 mjeseci unutar su klastera koji ovisi o Lynch biljezima.

- Svi testirani markeri, osim E-cadherina – imaju prediktivnu vrijednost za povratni karcinom mokraćnog mjehura.

8. SAŽETAK

Usporedba imunohistokemijskih značajki sukscesivno uklanjanih tumora u bolesnika s opetovanom pojavnošću raka mokraćnog mjehura

Cilj istraživanja: Cilj istraživanja bio prepoznati fenotipske značajke primarnih i recidivirajućih karcinoma prijelaznog epitela mokraćnog mjehura povezane s povećanim rizikom ranih ili kasnih recidiva bolesti**.** Imunohistokemijski markeri EGFR, HER2, HER3, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 i E-cadherin uspoređivani su sa surogat markerom Ki-67 u primarnom karcinomu i recidivu. Cilj je bio utvrditi razlike u imunohistokemijskom fenotipu karcinoma u podskupinama koje bi upućivale na razlike u biologiji, te utvrditi potiču li recidivi od primarnog karcinoma ili se radi o novoj tvorbi sličnog, ali ipak različitog karcinomskog fenotipa.

Nacrt studije: Imunohistokemijski prediktori recidiva karcinoma analizirani su u svim podskupinama bolesnika, te je utvrđen njihov utjecaj na brzinu recidiviranja, redni broj recidiva, vrijeme između pojave sljedećih recidiva i utvrđena je starosna dob za vrijeme pojave prvog karcinoma.

Bolesnici i metode: U studiju su uključeni arhivski uzorci tkiva 33 bolesnika s recidivirajućim prijelaznim karcinomom mokraćnog mjehura obrađeni na Zavodu za patologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Svi karcinomi su analizirani imunohistokemijski na šest značajki, rezultati imunohistokemijskog bojenja su izraženi semikvantitativnom metodom izraženom od – do +++.
Pozitivnom reakcijom se smatrala umjereno pozitivna (++) i jako pozitivna reakcija (+++). Negativnom reakcijom se smatrala negativna (-) i slabo pozitivna reakcija (+). Za procjenu prediktivne vrijednosti pojednih pokazatelja rabljena je metoda MARS.

Rezultati: Od svih testiranih pokazatelja sa sigurnošću je utvrđeno da su biljezi iz porodice HER i *Lynch* od velikog značaja za određene podskupine ovih karcinoma, dok E-cadherin nije imao bitnu ulogu u procesu recidiviranja. Broj recidiva ovisio je o dobi bolesnika u vrijeme pojave prvog karcinoma. Za početni karcinom glavni prediktori bili su HER2 i MSH2, za rane

recidive EGFR i HER3, a za kasne EGFR. U predviđanju vrijednosti Ki-67, prediktor ranih recidiva, bio je MSH2 i MSH6, a za prvi recidiv MSH6.

Zaključak: Karcinom prijelaznog epitela mokraćnog mjehura jedinstven je klinički entitet po dostupnosti recidiva. Imunohistokemijsko profiliranje markerima za *Lynch* i HER porodicu pokazuje složene razlike između ranih i kasnih recidiva.

Ključne riječi: *HER* geni, *Lynch* geni, imunohistokemijske fenotipske značajke, recidivni karcinomi prijelaznog epitela mokraćnog mjehura

.

9. SUMMARY

Comparison of immunohistochemical characteristics of successively removed tumors in patients with recurrent occurrence of urinary bladder

Objectives:

The aim of the study was to recognize phenothype features of primary and recurrent transitional cell urinary bladder carcinoma associated with an increased risk of early or late disease reccurence. Immunohistochemical markers EGFR, HER2, HER3, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 and E-cadherin were compared with the surrogate marker Ki-67 in the primary and recurrence carcinoma. The aim of the study was to identify differences in the immunohistochemical carcinoma phenotype in subgroups that would indicate differences in their biology, and to determine whether carcinoma relapsing originates from the primary carcinoma or a new formation of similar but different carcinomic phenotype.

Study design:

Immunohistochemical predictors of cancer recurrence were analysed in all subgroups of patients and their effects on recurrence rate, recurrence sequence, time between occurrence of subsequent recurrences were determined as well as the age of the patient at the time of first carcinoma appearance.

Patients and methods:

The study included archic tissue samples of 33 patients with recurrent transitional cell urinary bladder carcinoma and processing on Deparment of Pathology, University Hospital Osijek.
All tumors were analyzed immunohistochemically on six characteristics, the results of immunohistochemical staining were expressed by semiquantitative method ranging from (-) to (+ + +). A positive reaction was taken to range between moderately positive (+ +) and a very positive response (+ + +) and negative reaction between negative (-) and poorly positive reaction (+). The MARS method was used to evaluate the predictive value of the indicators.

Results:

Of all the tested indicators, it was conclusively found that the markers from the HER and Lynch family were of great importance for certain subgroups of these cancers, while E-cadherin did not have an essential role in the cancer recidivation process. The number of recurrences depended on the age of the patient at the time of the onset of first cancer. In the initial carcinoma, the main predictors were HER2 and MSH2, in the early recurrence EGFR and HER3, and in late recurrences EGFR. In the prediction of Ki-67 values, the predictor of early recurrence was MSH2 and MSH6, and for the first relapse MSH6.

Conclusion:

Urinary bladder transitional cell carcinoma is a unique clinical entity for its recurrence availability. Immunohistochemical profiling of markers for Lynch and HER family showed complex differences between early and late recurrent carcinoma.

Key words:

HER genes, Lynch genes, immunohistochemical phenotype characteristics, recurrent urinary bladder transitional cell carcinoma

10. LITERATURA

1. Muto S, Horie S, Takahashi S, Tomita K, Kitamura T. Genetic and epigenetic alterations in normal bladder epithelium in patients with metachronous bladder cancer. Cancer Research. 2000;60(15):4021-5.
2. Sidransky D, Frost P, Von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger A C, Vogelstein B. Clonal origin of bladder cancer. N Engl J Med.1992;326(11):737–740.doi:10.1056/nejm199203123261104.
3. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, i sur. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. Cell. 2017;171:54–556.e25.doi:10.1016/j.cell.2017.09.007.
4. Van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, i sur. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. Eur Urol. 2009;56(3):430-42.
5. Ro JY, Staerkel GA, Ayala AG. Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. Urol Clin North Am. 1992;19(3):435-453.
6. Sylvester RJ, van der Meijden A, Witjes JA, i sur. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. Urology 2005;66(Suppl.1):90-107.
7. Jakse G, Loidl V, Seeber G, Hofstadter F. Stage T1, grade 3 transitionall cell carcinoma of the bladder : an unfavourable tumor ?. J Urol. 1987;137(1):39-43.
8. Johnson MI, Merrilees D, Robson WA,Lennon T, Masters J, Orr KE, i sur. Oral ciprofloxacin or trimethoprim reduces bacteriuria after flexible cystoscopy. BJU Int. 2007;100(4):826–829.doi:10.1111/j.1464-410X.2007.07093.x.
9. Burke DM, Shackley DC, O'Reilly PH. The community-based morbidity of flexible cystoscopy. BJU Int. 2002;89:347–349.doi:10.1046/j.1464-4096.2001.01899x.
10. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. Pharmacoeconomics. 2003;21:1315–30.
11. 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.
12. Gregoire M, Fradet Y, Meyer F, i sur. Diagnostic accuracy of urinary cytology, and deoxyribonucleic acid flow cytometry and cytology on bladder washings during followup for bladder tumors. J Urol. 1997;157:1660–1664.doi:10.1016/S0022-5347(01)6482-4.

13. Burchardt M, Burchardt T, Shabsigh A, De La Taille A, Benson MC, Sawczuk I. Current concepts in biomarker technology for bladder cancers. Clin Chem. 2000;46:595–605.
14. van Rhijn BW, Vis AN, van der Kwast TH, i sur. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. J Clin Oncol. 2003;21:1912–1921.Doi:10.1200/JCO.200305.073.
15. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, i sur. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. Am J Pathol. 2001;158:1955–1959.doi:10.1016/S0002–9440(10)64665-2.
16. Zuiverloon TC, van der Aa MN, van der Kwast TH, i sur. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation analysis on voided urine for surveillance of patients with low-grade non-muscle-invasive bladder cancer. Clin Cancer Res. 2010;16(11):3011–3018.doi:10.1158/1078-0432.CCR–09-3013.
17. van der Aa MN, Zwarthoff EC, Steyerberg EW, i sur. Microsatellite analysis of voided-urine samples for surveillance of low-grade non-muscle-invasive urothelial carcinoma: feasibility and clinical utility in a prospective multicenter study (cost-effectiveness of follow-up of urinary bladder cancer trial [CEFUB]) Eur Urol. 2009;55:659–667.doi:10.1016/j.eururo.2008.05.001.
18. Ding W, Gou Y, Sun C, Xia G, Wang H, Chen Z, i sur. Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC. Urol Oncol.2014;32:42:13-9.
19. Li B, Kanamaru H, Noriki S, Fukuda M, Okada. Numeric aberration of chromosome 17 is strongly correlated with p53 overexpression, tumor proliferation and histopathology in human bladder cancer. Int.J. Urol. 1998;5(4):317-23.
20. Hovey RM, Chu L, Balasz M, DeVries S, Moore D, i sur. Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. Cancer Res. 1998;58(16):3555-3560.
21. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, i sur. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor share chromosomal location with neu oncogene. Science. 1985;230(4730):1132-1139.
22. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, i sur. Her 2/neu gene amplification characterised by fluoroscence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. J Clin Oncol. 1997;15(8):2894-904.

23. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, i sur. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science.1989;244(4905):707-712.
24. Fukushinge SI, Matsubara KI, Yoshida M, i sur. Localization ofa novel v-erbB-related gene,c-erB-2,on human chromosome 17and its amplification in a gastric cancer cell line. Mol Cell Biol.1986;6(3):955-8.
25. Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T, Kawamoto T, Kato T, Sato K, Watanuki T, Hikage T, Katsut, Mori S. Exspression of cerb2 gene product in urinary bladder cancer. J.Urol.1991;145:423-427.
26. Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CHW, Kelly P, Neal D. CERB 2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. J.Urol.1996;155:321-326.
27. Tetu B, Fradet Y, Allrd P, Veileux C, Roberge N, Bernard P. Prevalence and clinical significance of HER2/ neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. J Urol.1996;155:1784-1788.
28. Ohta J, Miyosh J, Uemura H, Fujinami K, i sur. Fluorescence in situ hybridization evaluation of cerb2 gene amplification and chromosomal anomalies in bladder cancer. Clin. Cancer Res.2001;7:2463-2467.
29. Waldman M, Carrol PR, Kerschmann R, Cohen MB, Field FG, Mayal BH. Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. Cancer Res.1991;51:3807-3813.
30. Spruck CH III, Ohne Seit OF, Gonzales Zulueta M. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. Cancer Res.1994;54:784-788.
31. Li B, Kanamaru H, Noriki S, Fukuda M, Okada K. Numeric aberration of chromosome 17 is strongly correlated with p53 overexpression, tumor proliferation and histopathology in human bladder cancer. Int.J. Urol.1998;5:317.
32. Knowles MA. The genetic of transitiocellular carcinoma: progress and potential clinical application. BJU Int.2003;84:412-427.
33. Prigent SA, Lemoine NR, Hughes CM, Plowman GD, Selden C, Gullick WJ. Expression of the c-erbB-3 protein in normal human adult and fetal tissues. Oncogene.1992;7(7):1273–8.
34. Vleminckx K, Vakaet L, Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion supressor role. Cell. 1991;66:107–119.

35. Bonnal Ch, Ravery V, Toublanc M, Bertrand G, Boccon-Gibod L, Henin D,i sur . Absence of microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the bladder. Urology.2000;55:287-290.
36. Jin T-X, Furihata M, Yamasaki I, Kamada M, Liang S-B, Ohtsukiku i sur. Human mismatch repair gene (hMSH2) product expression in relation to recurrence of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Cancer.1999;85:478-484.
37. Kassem HS, Varley JM, Hamam SM, Margison GP. Immunohistochemical analysis of expression and allelotype of mismatch repair genes (hMLH1 and hMSH2) in bladder cancer. Br J Cancer.2001;84:321-328.
38. Thykjaer T, Christensen M, Clark AB, Hansen LRT, Kunkel TA, Orntoft TF. Functional analysis of the mismatch repair system in bladder cancer. Br J Cancer.2001;85:568-575.
39. Catto J, Xinarianos G, Burton J, Meuth M, Hamdy F. Differential expression of hMLH1 and hMSH2 is related to bladder cancer, stage and prognosis but not microsatellite instabiilty. Int J Cancer.2003;105:484-490.
40. Leach F. Molecular genetics of urothelial malignancies: mismatch repair genes as markers for detection and prognosis. Urol Oncol.2001;6:211-219.
41. Lindor NM, Burgardt LJ, Leontovich O, i sur. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. J Clin Oncol.2002.20:1043-8.
42. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, i sur. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. Am J Pathol.2001;158(6):1955–1959.doi:10.1016/s0002–9440(10)64665-2.
43. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. JAMA. 2011;306:737–745.
44. Li S, Pan D, Wang G. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes. Arch Environ Health. 1994;49:119-122.
45. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics,2001. CA Cancer. J Clin.2001;51(1):15-36.
46. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. Nature.1982;297:474–8.
47. Esrig D, Spruck CH, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, Groshen S, i sur. p53 nuclear-protein accumulation correlates with mutations in the P53 gene, tumor grade, and stage in bladder-cancer. Am J Pathol.1993;143:1389–1397.

48. Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, Kogevinas M, Lloreta J, Carrato A, i sur. PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. Cancer Res.2006;66(15):740-4.
49. Greulich H, Kaplan B, Mertins P, Chen TH, Tanaka KE, Yun CH, i sur. Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(36):14476-81.doi:10.1073/pnas.1203201109.
50. Cianciulli AM, Leonardo C, Colleta AM, Marzano R, Iori F, De Nunio C, i sur. Genetic instability in superficial bladder cancer and adjacent mucosa: an interphase cytogenetic study. Human Pathol.2003;34(3):214-221.
51. Klöppel G, Perren A and Heitz PU: The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. Ann N Y Acad Sci. 2004;1014:13–27.
52. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? Histopathology.2002;40(1):2-11.
53. Dalesio O, Schulman CC, Sylvester R, i sur. Prognostic factors in superficial bladder tumors. A study of the European Organisation for Research on Treatment of Cancer: Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. J Urol. 1983;129:730-3.
54. Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. Chembiochem. 2001;2:239-245.
55. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. Nature. 2014;507:315-22.
56. Greulich H, Kaplan B, Mertins P, Chen TH, Tanaka KE, Yun CH, i sur. Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109:14476–14481.
57. Jaiswal BS, Kljavin NM, Stawiski EW, Chan E, Parikh C, Durinck S, i sur. Oncogenic ERBB3 Mutations in Human Cancers. Cancer Cell. 2014;25:543-544.
58. Nardi V, Sadow PM, Juric D, Zhao D, Cosper AK, Bergethon K,i sur. Detection of novel actionable genetic changes in salivary duct carcinoma helps direct patient treatment. Clin Cancer Res. 2013;19(2),480–490.Doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1842.
59. Lonn U, Lonn S, Friberg S, Nilsson B, Silfverswärd C, Stenkvist B. Prognostic value of amplification of c-erb-B2 in bladder carcinoma. Clin Cancer Res. 1995;1:1189-94.

60. Ross S, Wang K, Gay LM, Al-Rohil RN, Nazeer T, Sheehan CE, i sur.A high frequency of activating extracellular domain ERBB2 (HER2) mutation in micropapillary urothelial carcinoma. Clin Cancer Res. 2014;20:68-75.
61. Chakravarti A, Winter K, Wu CL, Kaufman D, Hammond E, Parliament M, i sur. Expression of the epidermal growth factor receptor and HER2 are predictors of favorable outcome and reduced complete response rates,respecitively, in patient with muscle-invading bladder cancers treated by concurrent radiation and cisplatina-based chemotherapy; a report from the Radiation Therapy Oncology Group. Int J.Radiat Oncol Biol Phys. 2005;62:309-317.
62. Green RC, Parfrey PS,Woods MO, Younghusband HB. Prediction of Lynch syndrome in consecutive patients with colorectal cancer. J Natl Cancer Inst. 2009;101(5):331-40.doi: 10.1093/jnci/djn499.
63. Senter L,Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD, i sur. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. Gastroenterology. 2008;135(2):419-28.
64. Baglietto L, i sur. Risks of Lynch Syndrome Cancers for MSH6 Mutation Carriers. Journal of the National Cancer Institute. 2010;102(3):193-2010
65. Montazer Haghighi M, Radpour R, Aghajani K, Zali N, Molaei M, Zali. Four novel germline mutations in the MLH1 and PMS2 mismatch repair genes in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Int J Colorectal Dis. 2009;24(8)-885-93.
66. Jerome H. Friedman, The Annals of Statistics. Vol. 19, No. 1 (Mar., 1991), pp. 1-67
67. Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, i sur. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumor with microsatellite instability and genetic alteration in mismatch repair genes. Cancer Res. 1996;56:4836-40.
68. van der Post RS, Kiemeney LA, Ligtenberg MJL, Witjes JA, Hulsbergen-van de Kaa CA, Bodmer D, i sur. J Med Genet. 2010 47(7):464-70.doi: 10.1136/jmg.2010.076992.
69. García-Tello A, Ramón de Fata F, Andrés G, Ropero S, López JI, Angulo JC. Genes reparadores del ADN y pronóstico en formas esporádicas de carcinoma urotelial del tracto urinario superior. Actas Urol Esp. 2014;38:600–607.
70. Quintero A, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ, Gonzales-Campora R, Requena MJ, Montironi R, i sur. Ki-67 MIB 1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder. J Clin Pathol. 2006;59:83-8.

71. Tian Y, Ma Z, Chen Z, Li M, Wu Z, Hong M, i sur. Clinicopathological and prognostic value of Ki-67 expression in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2016;11(7):e0158891.doi.org/10.1371/journal.pone.0158891.
72. Makboul R, Refaiy AE, Badary FA, Abdelkawi IF, Merseburger AS, Mohammed RA. Expression of survivin in squamous cell carcinoma and transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a comparative immunohistochemical study. Korean J Urol. 2015;56:31-40.
73. Acikalin D, Oner U, Can C, Acikalin MF, Colak E. Predictive value of maspin and Ki-67 expression in transurethral resection specimens in patients with T1 bladder cancer. Tumori. 2012;98:344–50.
74. Chen JX, Deng N, Chen X, Chen LW, Qiu SP, Li XF, i sur. A novel molecular grading model: combination of Ki67 and VEGF in predicting tumor recurrence and progression in non-invasive urothelial bladder cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13:2229-34.
75. Bolentz C, Shariat SF, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Ho R, Sagalowsky AI, i sur. Human epidermal growth factor receptor 2 expression status provides independent prognostic information in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. BJU Int. 2010;106:1216-1222.
76. Kassouf W, Black PC, Tuziak T. i sur. Distinctive expression pattern of ErbB family receptors signifies an aggressive variant of bladder cancer. J Urol. 2008;179:353-8.
77. Jimenez RE, Hussain, Bianco M, i sur. Her-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. Clin Cancer Res. 2001;7:2440-7.
78. Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CH, Kelly P, Neal DE. C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. J. Urol.1996;155(1):321-6.
79. Chow NH,Chan SH,Tzai TS, Ho CL, Liu HS. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Clin. Cancer Res. 2001;7:1957-62.
80. Liedberg F, Anderson H, Chebil G, i sur. Tissue microarray based analysis of prognostic markers in invasive bladder cancer: much effort to no avail?. Urol Oncol. 2008;26:17-24.
81. Gandour-Edwards, R, Lara PN, Folkins AK, i sur. Does HER2/neu expression provide prognostic information in patients with advanced urothelial carcinoma?.Cancer. 2002;95:1009-15.

82. Bolenz C, Shariat SF, Karakiewicz PI, i sur. Human epidermal growth factor receptor 2 expression status provides independent prognostic information in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. BJU Int. 2010;106:1216-22.
83. Cormio L, Sanguedolce F, Cormio A, Massenio P, Pedicillo MC, Cagiano S, i sur. Human epidermal growth factor receptor 2 expression is more important than Bacillus Calmette Guerin treatment in predicting the outcome of T1 G3 bladder cancer. Oncotarget. 2017;11;8(15):25433-25441. doi: 10.18632/oncotarget.15989.
84. Sanguedolce F, Cormio A, Massenio P, Pedicillo MC, Cagiano S, i sur. (2018) Altered expression of HER-2 and the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 predicts the outcome of T1 high-grade bladder cancer. J Cancer Res Clin Oncol 144: 637-644.
85. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, i sur. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. Clin. Cancer Res. 1999;5:4164-4174.
86. Lindgren D, Liedberg F, Andersson A, i sur. Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. Oncogene. 2006;25(18):2685-96.
87. Memon AA, Sorensen BS, Melgard P, Fokdal l, Thykjaer T, Nexo E. Expression of HER3, HER4 and theirligand heregulin-4 is associated with better survival in bladder cancer patients. British Journal of Cancer 2004:91(12):2034-2041.doi:10.1038/sj.bjc.6602251.
88. Breyer J, Gierth M, Shalekenov S, Aziz A, Schafer J, Burger M, i sur. Epithelial-mesenchymal transformation markers E-cadherin and survivin predict progression of stage pTa urothelial bladder carcinoma. World J Urol. 2016;34:709-716.
89. Zhao J, Dong D, Sun L, Zhang G, Sun L. Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers E-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer. Int Braz J Urol. 2014; 40:179-189.
90. Liang W, Hao Z, Han JL, Zhu DJ, Jin ZF, Xie WL. CAV-1 contributes to bladder cancer progression by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. Urol Oncol 2014;32:855-63.
91. Dalesio O, Schulman CC, Sylvester R, i sur. Prognostic factors in superficial bladder tumors. A study of the European Organisation for Research on Treatment of Cancer: Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. J Urol.1983;129:730-3.

92. Kurth KH, Denis L, Bouffioux C, i sur. Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder tumours. Eur J Cancer. 1995;31A(11):1840-6.
93. Hirata K, Kanemitsu S, Nakayama Y, Nagata N, Itoh H, Ohnishi H, i sur. Germline mutation of MSH2 in a hereditary nonpolyposis colorectal cancer patient with liposarcoma. Am J Gastroenterol. 2006;101:193–6.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

- Ime i prezime: Mate Matić
- Datum i mjesto rođenja: 25. kolovoza 1971., Sinj
- Adresa: Novogradiška 58, Osijek 31000
- E-mail: matematic99@gmail.com

EDUKACIJA

1. Srednja škola: Matematičko informatička gimnazija, maturirao 1989.
2. Fakultet: Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu, diplomirao 1998.g
3. Pripravnički staž: 1999.-2000. OB Josip Benčević S.Brod
4. Specijalizant pedijatrije: 2000.-2002. KBC Osijek
5. Specijalizant Radioterapije i Onkologije 2002.-2006. KBC Osijek
6. Stručni poslijediplomski studij iz Onkologije i Radioterapije, Medicinski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2000. - 2002.g.
7. Znanstveni poslijediplomski studij (magistarski) iz biomedicinskih znanosti, završen 2004.g.
8. Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, upisan 2009.

RADNO MJESTO

Klinička bolnica Osijek – Zavod za Onkologiju
J.Huttera 4, 31000 Osijek, Hrvatska
Telefon: 031 511 490
Fax: 031 512 219

NASTAVNO ISKUSTVO

Školske godine 2011/2012. izabran za asistenta na Katedri za nuklearnu medicinu i onkologiju za područje Onkologije na Medicinskom fakultetu Sveučičišta J.J. Strossmayera u Osijeku. Uključen u nastavu iz znanstvenog područja Biomedicina i zdravstvo, iz predmeta Onkologije za studente IV. godine Medicinskog fakulteta (seminarski rad, vođenje vježbi na odjelu).

ZNANSTVENI PROJEKTI

Projekt MZOS 219-2192382-2426 (voditelj: S. Kurbel)

Stratifikacija bolesnica s rakom dojke temeljena na imunohistokemiji tumora:
Prepoznavanje fenotipskih podgrupa povezanih s preživljenjem bolesnica s određenim fenotipom raka koji prof. dr. sc. Sven Kurbel s Medicinskog fakulteta Osijek prijavljuje na natječaj HRZZ.

STRUČNO USAVRŠAVANJE

2003. u Dublinu završio tečaj planiranja 3D iradijacije
2004. u KBC Osijek tečaj Edukacija edukatora u dijagnostici i liječenju karcinoma dojke
2005. tečaj UZV dojki u Poliklinici Drinković
2011. GCT web tečaj Quintiles Transanationals online education program
Aktivni sudionik većeg broja domaćih i međunarodnih kongresa i simpozija..

ČLANSTVO U STRUČNIM DRUŠTVIMA

Hrvatsko onkološko društvo
Hrvatski liječnički zbor
Hrvatska liječnička komora

POPIS RADOVA

1. ČASOPISI INDEKSIRANI U CURRENT CONTENTSU:

1. Tomaš I, Kotromanović Z, Belaj N, Margaretić, Ivezić Z, Katić M, Zibar L, Faj D, Štimac D, Matić M. Computer aided evaluation of radiologists reproducibility and subjectivity in mammographic density asessment. Coll Antropoll. 2013. Dec: 37(4):1121-6

2. Matić S, Suić SP, Biuk D, Matić M, Barać J, Vinković M. Influence of silicone oil tamponade after vitrectomy on intraocular presurre. Coll Antropoll. 2013 Apr; 37 Suppl 1:227-35

3. Biuk D, Matić S, Barać J, Vinković M, Biuk E, Matić M. Chalazion managment- surgical treatment versus triamcinolon aplication. Coll Antropoll. 2013 Apr; 37 Suppl 1:247-50

3. RADOVI U NEINDEKSIRANIM PUBLIKACIJAMA

4. Clinical recommendations for diagnosing, treatment and monitoring of patients with uterine cervical cancer- Croatian Oncology Society and Croatian Society for Gynecology and Obstetrics as Croatian Medical Association units and Croatian Society of Gynecological Oncology; Lijec Vjesn 2013 Sept-Nov;135(9-10):225-9

5. Clinical recommendations for diagnosing, treatment and monitoring of patients with ovarian cancer- Croatian Oncology Society and Croatian Society for Gynecology and Obstetrics as Croatian Medical Association units and Croatian Society of Gynecological Oncology; Lijec Vjesn 2013 Sep-Nov;135(9-10):235-41

6. Clinical guidelines for diagnosing, treatment and monitoring patients with bladder cancer- Croatian Oncology Society and Croatian Urology Society, Croatian Medical Association; Lijecn vjesn. 2013. Nov-Dec;135(11-12):292-7

7. Matić S, Popović Suić S, Biuk D, Matić M, Barać J, Vinković M. Influence of silicone oil tamponade after vitrectomy on intraocular pressure. 1st Optometry conference of Central and South- Eastern Europe, Opatija 2012, Croatia.

8. Biuk D, Matić S, Barać J, Jelić Vuković M, Biuk E, Matić M. Chalazion managment-surgical treatment versus triamcinolon application. 1st Optometry conference of Central and South- Eastern Europe, Opatija 2012, Croatia.

9. Matić S, Hocenski D, Bosnar D, Rošić M, Biuk D, Matić M, Barać J. Kirurgija katarakte i utjecaj na šarenicom temeljenu identifikaciju osoba. 14. Kongres Hrvatskog oftalmološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem/ Hrvatsko oftalmološko društvo, 7.simpozij mladih oftalmologa Hrvatske, 33.simpozij oftalmologa Hrvatske i Slovenije, 35 Kongres oftalmologa Alpe Adria regije, HLZ. Dubrovnik, 22-25. svibnja 2014. Hrvatska.

10. Matić S, Biuk D, Benašić T, Matić M, Vinković M, Biuk E. Otvorene očne ozljede u Osječko-baranjskoj županiji. 6. Hrvatski kirurški kongres s međunarodnim sudjelovanjem, 15-18 listopada 2014, Zagreb, Hrvatska

11. Matić M, Gugić D, Tomaš I, Matić S, Biuk D, Biuk E. Usporedba kvalitete života i učetalosti nuspojava kod pacijenata sa lokaliziranim karcinomom prostate nakon prostatektomije i iradijacije. 6. Hrvatski kirurški kongres s međunarodnim sudjelovanjem, 15-18 listopada 2014, Zagreb, Hrvatska

4. KONGRESNA PRIOPĆENJA - SAŽETCI

1. Terapija metastatskog karcinoma prostate; Prikaz slučaja,
   5. Znanstveni sastanak Tumori prostate, HAZU, Zagreb, 24. studenog 2017
2. Liječenje karcinoma prostate u KBC Osijek; Prikaz slučaja,
   6. Znanstveni sastanak Tumori prostate, HAZU, Zagreb, 16.studenog 2018
3. Kemoterapija raka maternice
   1. Hrvatski onkološko urogenitalni simpozij 05-06.04.2013 Hotel Westin, Zagreb
4. Prikaz slučaja : Terapija karcinoma bubrega
   9. Hrvatski onkološki kongres, Poreč, 7-10.4.2016

5. Matić S, Hocenski Ž, Bosnar D, Rošić M, Matić M, Rošić, M, Influence of extracapsular and phacoemulsification cataract surgery on iris pattern recognition system; 7th October, 2017, ESCRS, Lisabon, Portugal.
6. Matić M, Tomaš I, Zibar L ;Tolerance of Sunitinib in haemodialysed patients with metastatic renall cell carcinoma; Poster presentation; Pfizer Oncology Forum,18-20 October 2013, Westin, Zagreb, Croatia.