



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

Διϋδρυματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Μοριακή - Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία»

<<Μελέτη του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος του καρκινώματος της ουροδόχου κύστης και συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους>>

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΕΥΘΥΜΙΑΔΟΥ

ΙΑΤΡΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

Διϊδρυματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Μοριακή - Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία»

<<Μελέτη του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος του καρκινώματος της ουροδόχου κύστης και συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους>>

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΕΥΘΥΜΙΑΔΟΥ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Γούσια Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Τμήματος Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής/Συνεπιβλέποντες:

Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Φριλίγγος Ευστάθιος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Τμήματος Ιατρικής & Διευθυντής του Δ.Δ.Π.Μ.Σ. «Μοριακή-Κυτταρική Βιολογία & Βιοτεχνολογία», Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Παπαμαρκάκη Θωμαΐς, Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Τμήματος Ιατρικής & Αναπληρώτρια Διευθύντρια του Δ.Δ.Π.Μ.Σ. «Μοριακή-Κυτταρική Βιολογία & Βιοτεχνολογία», Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Παπούδου-Μπάη Αλεξάνδρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της.

Η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη υποστήριξη της Καθηγήτριας Παθολογικής Ανατομίας, Κας **Άννας Γούσια**. Της εκφράζω ένα βαθύ ευχαριστώ για τις υποδείξεις της, την επιμονή της, και το αμείωτο ενδιαφέρον σε όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Θα συνεχίζει να με εμπνέει τόσο ως επιστήμονα όσο και ως άνθρωπος.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Κα Μπατιστάτου για την επιστημονική της καθοδήγηση και για όλα όσα διδάχθηκα από εκείνη καθώς και για την τιμητική για μένα παρουσία της στην Εξεταστική επιτροπή αξιολόγησης της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Διευθυντή του Δ.Δ.Π.Μ.Σ., Κον **Ευστάθιο Φριλίγγο**, για τις ενδιαφέρουσες παραδόσεις κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών αλλά τις χρήσιμες και καθοριστικές του υποδείξεις και για την τιμητική παρουσία του στην Εξεταστική επιτροπή αξιολόγησης της εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ την Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, και Αναπληρώτρια Διευθύντρια του Δ.Δ.Π.Μ.Σ., Κα **Θωμάϊδα Παπαμαρκάκη**, για όλα όσα διδάχθηκα από εκείνη και για την τιμητική για εμένα παρουσία της στην Εξεταστική Επιτροπή αξιολόγησής της.

Ευχαριστώ θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Κα **Αλεξάνδρα Παπούδου-Μπάη**, για τις παραδόσεις και την καθοδήγησή της στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος. Επίσης, είναι ιδιαίτερα τιμητική για εμένα η παρουσία της στην Εξεταστική Επιτροπή αξιολόγησης της εργασίας.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας και Ιστολογίας, Κα **Αντωνία Χαρχαντή**, για τις πολύτιμες συμβουλές της, την προσοχή της και για την καθοριστική συμβολή της στη διαμόρφωση και ολοκλήρωση της εργασίας.

Επιπλέον ευχαριστώ θερμά τον συνάδελφο και ειδικευόμενο Κο Αθανασίο Παλιούρα και την Τεχνολόγο Παρασκευάστρια Κα Ειρήνη Πάτρα για την σημαντική συμβολή τους στην διενέργεια του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας.

Τέλος οφείλω ένα θερμό ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στο σύζυγό μου για την υπομονή, τη στήριξη και τη δύναμη που μου δίνουν σε κάθε επαγγελματική, προσωπική και ακαδημαϊκή μου περιπέτεια.

Περιεχόμενα	
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
Abstract.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Στοιχεία εμβρυολογίας, ανατομίας και ιστολογίας της ουροδόχου κύστης.....	11
1.2 Παθήσεις της ουροδόχου κύστης	16
1.2.1. Φλεγμονώδεις παθήσεις	16
1.2.2. Νεοπλάσματα	16
1.3. Ουροθηλιακό καρκίνωμα ουροδόχου κύστης.....	18
1.3.1 Ορισμός	19
1.3.2 Επιδημιολογία.....	19
1.3.3 Αιτιολογικοί Παράγοντες-Παράγοντες κινδύνου.....	21
1.3.3.1 Κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα	21
1.3.3.2 Κάπνισμα	21
1.3.3.3 Επαγγελματική έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες.....	22
1.3.3.4 Διατροφικοί παράγοντες.....	22
1.3.3.5 Ακτινοβολία.....	23
1.3.3.6 Άλλοι παράγοντες κινδύνου	23
1.3.4 Κλινική εικόνα -απεικονιστικός έλεγχος	24
1.3.5 Μακροσκοπική και μικροσκοπική εικόνα	24
1.3.6 Παθολογοανατομική σταδιοποίηση του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης	26
1.3.7 Προγνωστικοί παράγοντες	27
1.3.8 Θεραπεία	28
1.4 Μοριακή βιολογία του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης	29

1.4.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα 3 του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR3)	29
1.4.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR	30
1.4.3 Σηματοδοτικό μονοπάτι p53/Rb.....	32
1.4.4 Χρωμοσωμική αστάθεια	32
1.5 Μοριακή ταξινόμηση του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Το μικροπεριβάλλον του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.....	38
2.1 Ανοσολογική απάντηση στο νεοπλασματικό ιστό.....	38
2.2 Δενδριτικά κύτταρα	40
2.3 Μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο	40
2.4 Τ λεμφοκύτταρα.....	41
2.5 Τα διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα.....	43
2.6 Κατασταλτικά κύτταρα της μυελικής σειράς	44
2.7 Ο άξονας PD-1/PD-L1	45
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	48
Κεφάλαιο 1: Σκοπός της μελέτης	49
Κεφάλαιο 2 :Υλικό και Μέθοδοι	50
2.1 Υλικό.....	50
2.1.1 Συλλογή ιστικών δειγμάτων	50
2.1.2 Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά	50
2.1.3 Ανοσοϊστοχημική μελέτη	51
2.2 Περιγραφή μεθόδων	52
2.2.1 Ανοσοϊστοχημεία.....	52
2.2.2 Εκτίμηση των TILs.....	53
2.2.3 Εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων	59
2.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	60
2.4 Αποτελέσματα.....	60

2.4.1 Κατανομή των TILS , ανοσοϊστοχημική έκφραση των CD3,CD8 και FOXP3 T- λεμφοκυττάρων και συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.....	61
2.4.2 Συσχέτιση του ποσοστού των TILS και της πυκνότητας των CD3 ,CD8 και FOXP3 με την επιβίωση των ασθενών.	63
2.5 Συζήτηση.....	72
2.6 Συμπεράσματα.....	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

APC,(Antigen Presenting Cell) : Αντιγόνοπαρουσιαστικό κύτταρο

CPI,(Checkpoint Inhibitors) : Αναστολείς ανοσολογικού σημείου ελέγχου

DCs,(Dendritic cells): Δενδριτικό κύτταρο

DFS,(Disease Free survival) : Επιβίωση ελεύθερης νόσου

ECC: (Epithelial Cell Component): Επιθηλιακό στοιχείο του όγκου

FDA,(Food and Drug Administration): Οργανισμός Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων

MDSCs, (Myeloid Derived Suppressor Cells) : Μυελοειδή κατασταλτικά κύτταρα

MIBC,(Muscle Invasive Bladder Cancer): Μυοδιηθητικός καρκίνος της ουροδόχου κύστης

NK,(Natural killer cell):Φυσικά κύτταρα φονείς

NMIBC,(Non Muscle Invasive Bladder Cancer): Μη μυοδιηθητικός καρκίνος της ουροδόχου κύστης

OS (Overall Survival): ολική επιβίωση

SCC, (Stromal Cell Component): στρωματικό στοιχείο του όγκου

TAMS, (Tumor Associated Macrophages): Μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο

TCC: (Tumor Cell Component): Νεοπλασματικό στοιχείο του όγκου

TCGA, (The Cancer Genome Atlas): Άτλας Γονιδιωματικής του Καρκίνου

TILS ,(Tumor Infiltrating Lymphocytes): Διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα

WHO, (World Health Organization): Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι η πιο συχνή κακοήθης νεοπλασία του ουροποιητικού συστήματος. Το ουροθηλιακό καρκίνωμα αποτελεί τον πιο συχνό ιστολογικό τύπο σε Ευρώπη και Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Η βιολογική του συμπεριφορά εξαρτάται εν πολλοίς από τα εγγενή μοριακά του χαρακτηριστικά και από την ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή έναντι του όγκου. Κύρια κύτταρα της ανοσιακής απάντησης αποτελούν τα διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα (tumor infiltrating lymphocytes – TILs).

Σκοπός της παρούσας αναδρομικής μελέτης ήταν να μελετηθεί η ανοσολογική σύσταση του μικροπεριβάλλοντος σε ιστούς από 68 περιπτώσεις ουροθηλιακών καρκινωμάτων και να διερευνηθεί η προγνωστική αξία των TILs και της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης επιμέρους λεμφοκυτταρικών πληθυσμών όπως των CD3, CD8, και FOXP3 Tregs στο νεοπλασματικό στρώμα (stromal TILs, sTILs) και εντός των νεοπλασματικών επιθηλιακών δομών (intratumoral TILs, iTILs), καθώς και η συσχέτιση με την κλινική έκβαση των ασθενών.

Υψηλά ποσοστά TILs ανευρέθηκαν στο 47% (32 /68) των περιπτώσεων και σχετίστηκαν με προχωρημένα στάδια της νόσου ($\geq pT2$), ($p < 0.004$). Διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της υψηλής πυκνότητας των iCD3, iCD8, sCD8 και των συνολικών CD8 και της αγγειακής διήθησης ($p < 0.027$, $p < 0.06$, $p < 0.013$ και $p > 0.028$ αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της πυκνότητας των FOXP3 και των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων. Οι συσχετίσεις του ποσοστού και της πυκνότητας των TILs με την επιβίωση δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές.

Συμπερασματικά, ο προσδιορισμός των TILs και των ανοσοκυττάρων με CD3+/CD8+ ανοσοφαινότυπο μπορεί να συμβάλει στην επιλογή ομάδων ασθενών με διαφορετική πρόγνωση και να καθορίσει κατάλληλες θεραπευτικές στρατηγικές. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί η προγνωστική και / ή προβλεπτική αξία τους.

Abstract

Bladder cancer is the most common malignancy of the urinary system. Urothelial carcinoma is the most predominant histological type in Europe and United States. Its biological behavior depends on tumor molecular characteristics and host reactions directed towards the tumor. Main cell types of immune response include tumor infiltrating lymphocytes (TILs). The aim of the present retrospective study was to analyze the immune contexture of the microenvironment in whole tissue sections of 68 cases of urothelial bladder carcinomas, and to investigate the prognostic significance of TILs and of the immunohistochemical expression of lymphocytic subpopulations such as stromal and intratumoral CD3, CD8, και FOXP3 Tregs as well as their correlations with patient clinical outcome.

High TILs were present in 47% (32 /68) of the cases and were correlated with advanced tumor stages (\leq pT2), ($p<0.004$). A statistically significant inverse correlation of intratumoral CD3, intratumoral CD8, stromal CD8 and total CD8 densities with vessel invasion was observed ($p<0.027$, $p<0.06$, $p<0.013$ and $p<0.028$ respectively). No statistical correlations were observed between FOXP3 density and the clinicopathological parameters. The association of TILs and density with overall survival were not statistically significant.

In conclusion, the identification of TILs and immune cells with CD3+/CD8+ immunophenotype may contribute to the selection of patients with different prognosis and to determine appropriate therapeutic strategies. However, further studies are required in order their prognostic and/or predictive value to be elucidated.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ουροδόχος κύστη είναι ένα κοίλο μυώδες όργανο της αποχετευτικής μοίρας του ουροποιητικού συστήματος το οποίο εντοπίζεται στο έδαφος της ελάσσονος πυέλου, όπισθεν της ηβικής σύμφυσης. Στηρίζεται στο περιτόναιο, στον ομφαλοκυστικό και ηβοκυστικό σύνδεσμο αλλά κυρίως στο περίνεο. Κύρια λειτουργία της ουροδόχου κύστης είναι η υποδοχή των ούρων από τους ουρητήρες, η συλλογή τους και η έξοδος τους μέσω της ουρήθρας. Το επιθήλιο του βλεννογόνου της παράγει ένα βλενώδες έκκριμα με φυσικές αντιμικροβιακές ιδιότητες. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την φυσιολογική πλήρη κένωση της κύστης είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την προστασία από τις λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος

1.1 Στοιχεία εμβρυολογίας, ανατομίας και ιστολογίας της ουροδόχου κύστης

Εμβρυολογία

Η αμάρα διαιρείται με ένα μετωπικό μεσεγγυματικό διάφραγμα, το ουροορθικό διάφραγμα, το οποίο βρίσκεται στη γωνία μεταξύ της αλλαντοΐδας και του οπισθίου εντέρου. Καθώς το ουροορθικό διάφραγμα μεγαλώνει προς την αμαρική μεμβράνη σχηματίζονται πτυχές από τα πλάγια τοιχώματα της αμάρας, οι οποίες ενώνονται και διαιρούν την αμάρα σε δύο μέρη α) το ορθό και τον άνω πρωκτικό σωλήνα ραχιακά και β) τον ουρογεννητικό κόλπο κοιλιακά. Η ουροδόχος κύστη προέρχεται από τον ουρογεννητικό κόλπο και το σπλαχνικό μεσέγγυμα της γειτονικής περιοχής.

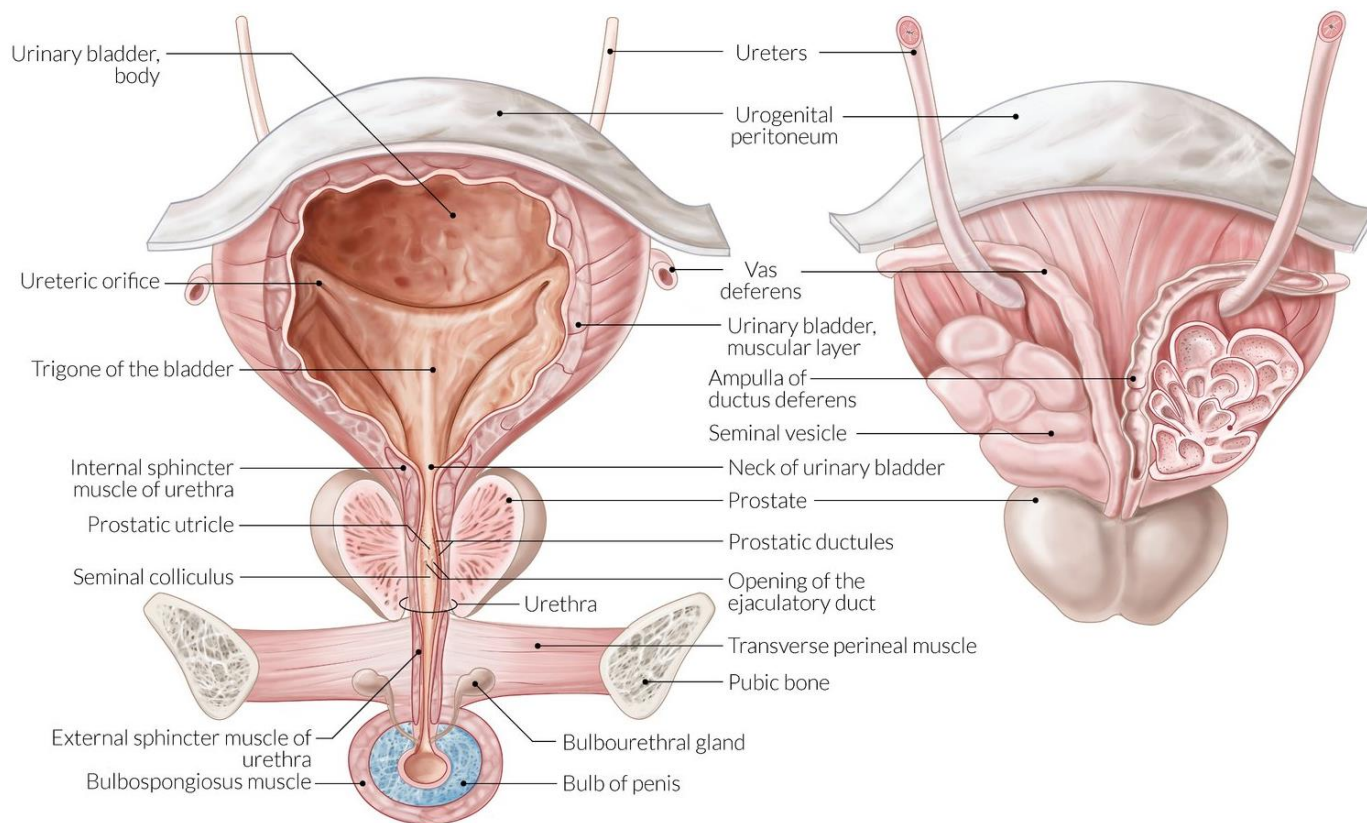
Καθώς η κύστη μεγαλώνει, τα ουραία τμήματα των μεσονεφρικών πόρων εγκλωβίζονται στο ραχιαίο τοίχωμα της ,εν συνεχεία απορροφούνται και κατόπιν οι ουρητήρες έρχονται και εκβάλλουν ξεχωριστά εντός της κύστης.

Ανατομία

Η κενή ουροδόχος κύστη έχει σχήμα τρίπλευρης πυραμίδας με κορυφή, βάση, μία άνω επιφάνεια και δύο πλάγιες κάτω επιφάνειες.(*Εικόνα 1.1*) Η κορυφή της κύστης είναι στραμμένη προς το άνω χείλος της ηβικής σύμφυσης. Η βάση της, σχήματος ανεστραμμένου τριγώνου έχει θέση προς τα πίσω και κάτω. Στις δύο άνω γωνίες της βάσης καταλήγουν οι δύο ουρητήρες και από την κάτω γωνία της ξεκινά και πορεύεται προς τα κάτω η ουρήθρα .

Τα κύρια ανατομικά γνωρίσματα του εσωτερικού τμήματος της ουροδόχου κύστης είναι:

- α) Το κυστικό τρίγωνο : Αποτελεί μία λεία τριγωνική περιοχή, με την κορυφή στο έσω στόμιο της ουρήθρας και την βάση στα στόμια των ουρητήρων
- β) τα ουρητηρικά ογκώματα : Αποτελούν επάρματα τα οποία σχηματίζονται από την πορεία των ουρητήρων κάτω από τον βλεννογόνο της κύστης
- γ) το έσω στόμιο της ουρήθρας: Βρίσκεται στον πυθμένα της κύστης και με την γύρω από αυτό περιοχή αποτελεί τον αυχένα της . Ο αυχέννας αποτελεί το κατώτερο και το πιο καθηλωμένο τμήμα της ουροδόχου κύστης.

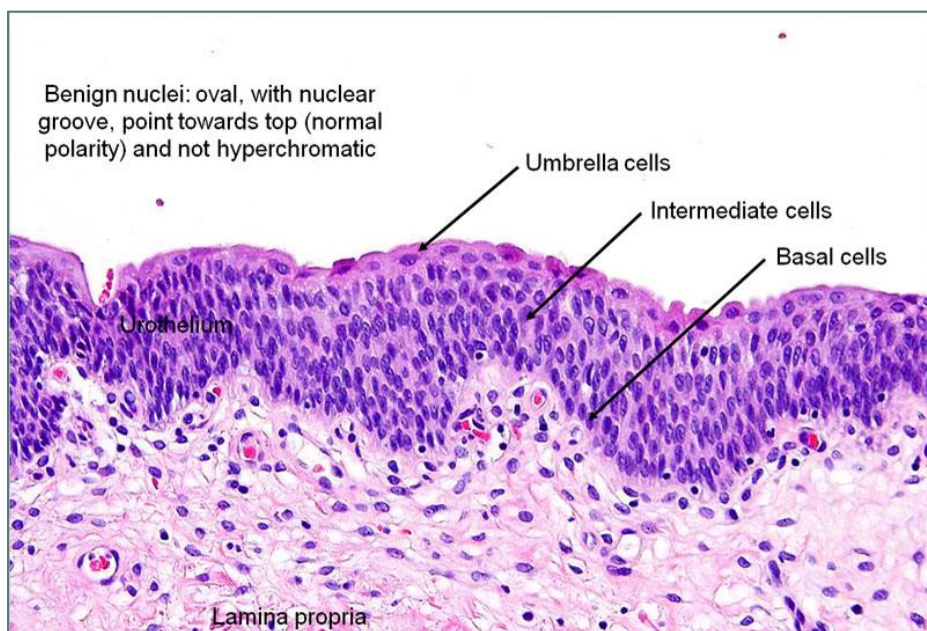


Εικόνα 1.1 :Ανατομία της ουροδόχου κύστης (Πηγή: ιστοσελίδα :www.amboss.com)

Ιστολογία

Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστης αποτελείται από βλεννογόνο, μυϊκό χιτώνα και ορογόνο χιτώνα.

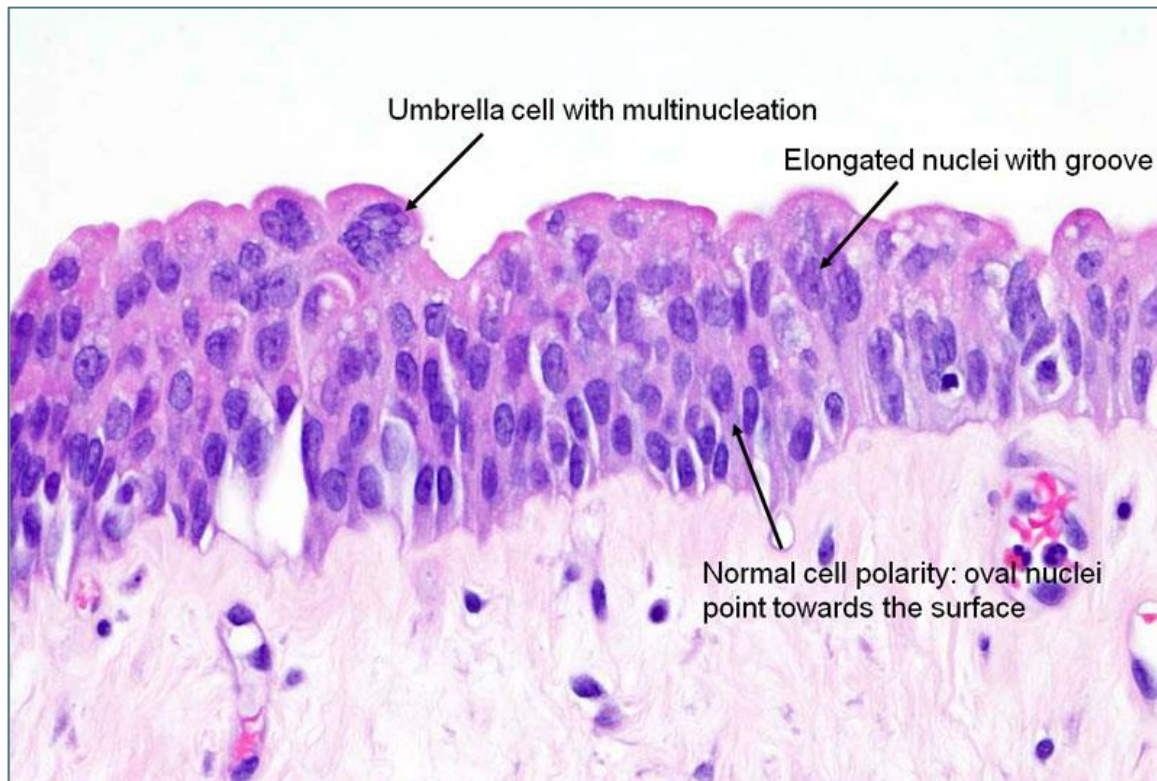
Δεδομένου ότι η βλεννογόνιος μυϊκή στιβάδα απουσιάζει ,ο υποβλεννογόνιος δεν διακρίνεται.



Εικόνα 1.2:φυσιολογικό ουροθήλιο της ουροδόχου κύστης : umbrella cells: κύτταρα ομπρέλα ,Intermediate cells: διάμεσα κύτταρα, basal cells:βασικά κύτταρα (Πηγή : Αναδημοσίευση από την Ιστοσελίδα American Urological Association)

α) Βλεννογόνος: Ο βλεννογόνος αποτελείται από το μεταβατικό επιθήλιο (ουροθήλιο) και το χόριο. Το ουροθήλιο συγκροτείται από τρεις έως επτά κυτταρικούς στοιχείους και επικάθεται σε μία βασική μεμβράνη(Εικόνα 1.2). Τα ουροθηλιακά κύτταρα έχουν αρκετό ανοιχτοχρωματικό κυτταρόπλασμα και ωοειδή πυρήνα χωρίς εμφανές πυρήνιο(Εικόνα1.3). Ο επιφανειακός στοιχείος των κυττάρων ο οποίος εμπεριέχει τα ονομαζόμενα κύτταρα <<ομπρέλα>> (umbrella cells), είναι υπεύθυνος για τον οσμωτικό φραγμό μεταξύ των ούρων και των διάμεσων υγρών των ιστών.

Επίσης είναι διατάσιμος, ιδιότητα η οποία έχει σημαντικό ρόλο κατά την πλήρωση της ουροδόχου κύστης . Το χόριο αποτελείται από χαλαρό ή πυκνό συνδετικό ιστό.



Εικόνα 1.3: φυσιολογική μορφολογία ουροθηλιακών κυττάρων :φυσιολογική πολικότητα των ουροθηλιακών κυττάρων, ωσειδείς πυρήνες με προσανατολισμό προς την επιφάνεια, πολυπύρηννα κύτταρα ομπρέλα. (Αναδημοσίευση από την Ιστοσελίδα American Urological Association)

β) μυϊκός χιτώνας: Οι μυϊκές ίνες του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης, πορεύονται προς κάθε κατεύθυνση και στην περιοχή του αυχένα συγκροτούν τρεις ξεχωριστές στιβάδες : την έσω ή επιμήκη, την μέση κυκλωτερή και την εξωτερική επιμήκη στιβάδα. Ο μυϊκός χιτώνας έχει την δυνατότητα υπερτροφίας, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις αδυναμίας αποβολής των ούρων. Επίσης οι τρεις στιβάδες ,διαπλεκόμενες μεταξύ τους, αποτελούν από λειτουργική άποψη ένα ενιαίο μυ ,τον **εξωστήρα μυ**, ο οποίος ενεργεί για την εξώθηση των ούρων.

γ) ορογόνο χιτώνας : αποτελεί τον εξωτερικό χιτώνα της ουροδόχου κύστης ,είναι λεπτός και δημιουργείται από το περιτόναιο (Εικόνα 1.1).

1.2 Παθήσεις της ουροδόχου κύστης

1.2.1. Φλεγμονώδεις παθήσεις

Οι συχνότερες φλεγμονώδεις παθήσεις της ουροδόχου κύστης είναι η κυστίτιδες. Αυτές διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες. Ιδιαίτερο παθολογοανατομικό ενδιαφέρον έχουν οι χρόνιες κυστίτιδες, οι οποίες με την πάχυνση και εξέλκωση του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης, καθώς και με τις εστίες πλακώδους μετάπλασης εγείρουν μακροσκοπικά και μικροσκοπικά προβλήματα διαφορικής διάγνωσης από τα καρκινώματα. Στην κατηγορία των κυστίτιδων περιλαμβάνονται : η διάμεση κυστίτιδα, ηωσινοφιλική κυστίτιδα, πολυποειδής κυστίτιδα ,η κυστική κυστίτιδα και λοιπές κοινές κυστίτιδες . Χαρακτηριστικά ιστολογικά ευρήματα αποτελούν ,το οίδημα και η φλεγμονώδης κυτταρική διήθηση του χορίου.

1.2.2. Νεοπλάσματα

Τα νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστης διακρίνονται σε διηθητικά και εκβλαστικά. Τα τελευταία προβάλλουν προς την κοιλότητα του οργάνου και προσλαμβάνουν συνήθως θηλώδη διαμόρφωση. Τα νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστης μπορεί να είναι **καλοήθη** ή **κακοήθη**. Συχνότερη και μεγαλύτερης σημασίας είναι τα κακοήθη νεοπλάσματα ,τα οποία στην πλειονότητα τους είναι

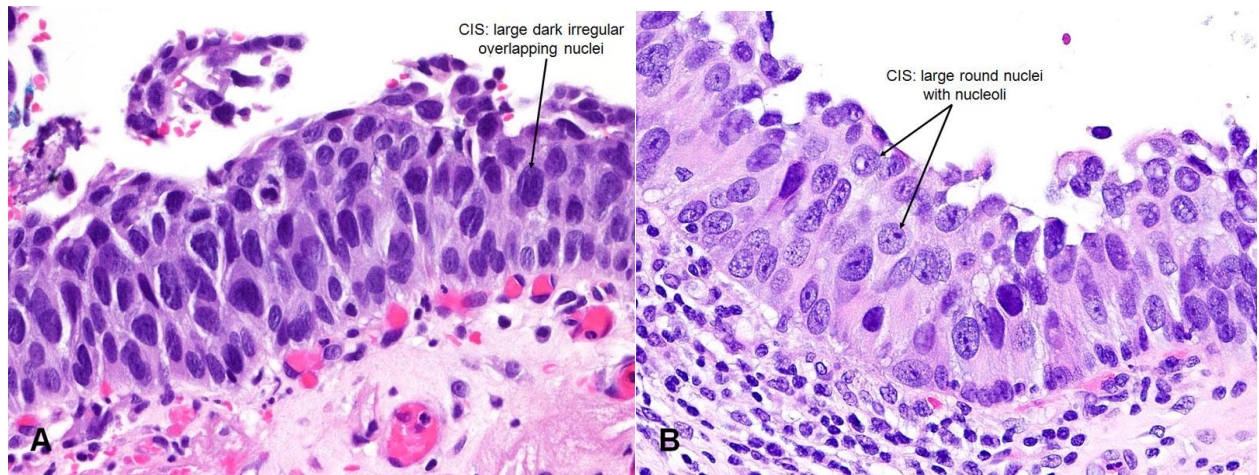
καρκινώματα και ακολουθούν τα σαρκώματα .Τα προερχόμενα από το ουροθήλιο καρκινώματα συνιστούν την μεγαλύτερη κατηγορία διηθητικών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης και αποτελούν το 80 - 90% επί του συνόλου των καρκινωμάτων. Στην Εικόνα 1.4 παρατίθεται η πρόσφατη ταξινόμηση των καλοήθων και κακοήθων νεοπλασμάτων σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό υγείας (ΠΟΥ2016) .

	ICD-O		
Ουροθηλιακοί όγκοι		Νευροενδοκρινείς όγκοι	
διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα με αποκλίνουσα διαφοροποίηση	8120/3	Μικροκυτταρικό νευροενδοκρινές καρκίνωμα	8041/3
Φώλεακό,συμπερλαμβανομένου και του μεγαφώλεακού		Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινές καρκίνωμα	8013/3
Μικροκυστικό		Καλά διαφοροποιημένος νευροενδοκρινής όγκος	8240/3
Μικροθηλώδες	8131/3	Παραγαγγλίωμα	8693/1
Ομοιάζον με λεμφοεπιθηλίωμα	8082/3	Μελανοκυτταρικοί όγκοι	
Διάχυτο/Πλασματοκυτταροειδές/κυττάρων δίκην< <σφραγιστήρος δακτυλίου>>	8122/3	Κακοήθης μελάνωμα	8720/3
Σαρκωμάτομορφο	8031/3	Σπίλος	8720/0
Αποτελούμενο απο γιγαντοκύτταρα	8020/3	Μελάνωση	
Αδιαφοροποίητο		Μεσεγχυματικοί όγκοι	
Πλούσιο σε λιπίδια		Ραβδομυοσάρκωμα	8900/3
Διαυγοκυτταρικό		Λειομυοσάρκωμα	8890/3
		Αγγειοσάρκωμα	9120/3
<i>Μη διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα</i>	8120/2	Φλεγμονώδης μυοϊνοβλαστικός όγκος	8825/1
Ουροθηλιακό καρκίνωμα in situ		Περιογειακός όγκος απο επιθηλιοειδή κύτταρα	
Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας	8130/2	Καλοήθης	8714/0
Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας	8130/3	Κακοήθης	8714/3
Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού	8130/1	Μονήρης ινώδης όγκος	8815/1
Ουροθηλιακό θήλωμα	8120/0	Λειομύωμα	8890/0
Ανάστροφο ουροθηλιακό θήλωμα	8121/0	Αιμαγγείωμα	9120/0
Ουροθηλιακή υπερπλασία		Κοκκιοκυτταρικός όγκος	9580/0
Ουροθηλιακή δυσπλασία/ατυπία		Νευροϊνωμα	9540/0
Πλακώδες καρκίνωμα	8070/3	Όγκοι αιμοποιητικού συστήματος και λεμφοειδείς όγκοι	
Πλακώδες καρκίνωμα	8051/3	Διάφοροι όγκοι	
Ακροχορδονώδες καρκίνωμα	8052/0	Καρκίνωμα αδένων Skene,Cowper και Littre	8140/3
Πλακώδες θήλωμα		Μεταστατικοί όγκοι και όγκοι επεκτεινόμενοι από άλλα όργανα	
Αδενικής προέλευσης νεοπλασματα	8140/3	Όγκοι του ανώτερου ουροποιητικού συστήματος	
Αδενοκαρκίνωμα μη περαιτέρω προσδιοριζόμενο	8144/3	Όγκοι αναπτυσσόμενοι επί εκτροφής της ουροδόχου κύστης	8120/3
Εντερικού τύπου	8480/3	Ουροθηλιακοί όγκοι της ουρήθρας	
Βλενωδους τύπου	8140/3		
Μικτό	8261/0		
Θηλώδες αδένωμα			
Καρκίνωμα του ουραχού	8010/3		
Όγκος μλλεριανής προέλευσης			
Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα	8310/3		
Ενδομητριοειδές καρκίνωμα	8380/3		

Εικόνα 1.4: Ταξινόμηση των νεοπλασμάτων της ουροθηλιακής οδού σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO 2016).

1.3. Ουροθηλιακό καρκίνωμα ουροδόχου κύστης

Το ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης αποτελεί το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα της ουροδόχου κύστης. Το 90% των περιπτώσεων αποτελούν **διηθητικά καρκινώματα ουροδόχου κύστης**. Ωστόσο, θα πρέπει να τονισθεί ότι στην ουροδόχο κύστη αναπτύσσονται και αρκετά μη διηθητικά ουροθηλιακά νεοπλάσματα όπως το **ουροθηλιακό καρκίνωμα in situ**. Στην έννοια του, περιλαμβάνονται οι περιπτώσεις εκείνες στις οποίες τα καρκινωματώδη κύτταρα περιορίζονται στο πάχος του επιθηλίου μόνο. Η κυτταρική ατυπία είναι σαφής αλλά δεν παρατηρείται διηθητική ανάπτυξη(Εικόνα 1.5). Η σημασία του ουροθηλιακού καρκινώματος in situ έγκειται στο γεγονός ότι είναι δυνατόν να μεταπέσει σε διηθητικό καρκίνωμα και είναι πολλές φορές πολυεστιακό. Στην πόλυεστιακότητα αυτού του νεοπλάσματος αποδίδεται η σύγχρονη ή μετάρχρηνη εμφάνιση πολλαπλών διηθητικών καρκινωμάτων στην ουροδόχο κύστη.



Εικόνα 1.5 : Ουροθηλιακό καρκίνωμα in situ A. μεγάλος, βαθυχρωματικός πυρήνας B: μεγάλος πυρήνας με εμφανές πυρήνιο (Αναδημοσίευση από την Ιστοσελίδα American Urological Association)

1.3.1 Ορισμός

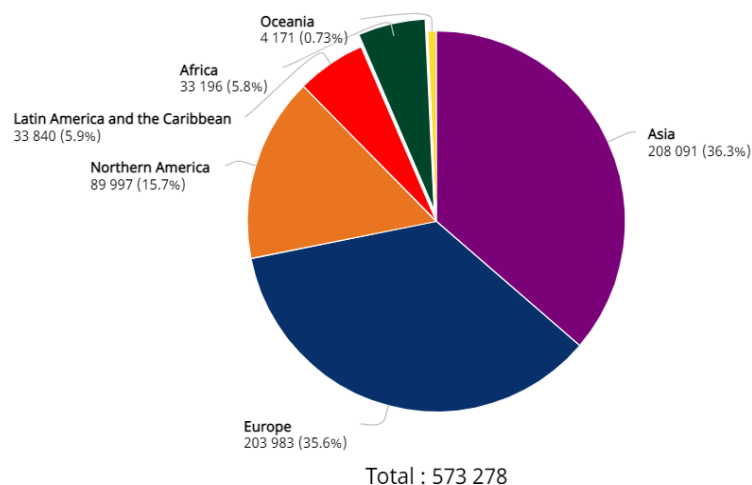
Σύμφωνα με το ΠΟΥ το διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα είναι το πιο συχνό κακόηθες νεόπλασμα το οποίο χαρακτηρίζεται από μία τάση αποκλίνουσας διαφοροποίησης και στο οποίο σημαντικό ιστολογικό κριτήριο για τη διάγνωση αποτελεί η διηθητική ανάπτυξη πέραν της βασικής μεμβράνης.

1.3.2 Επιδημιολογία

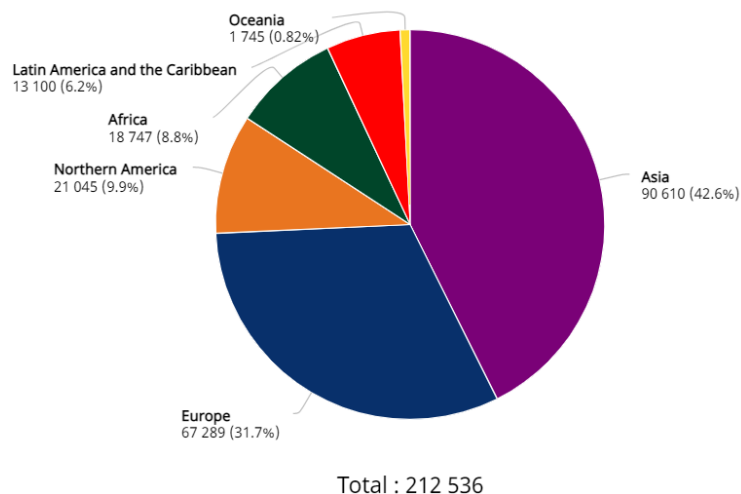
Αποτελεί παγκοσμίως το 7^ο σε συχνότητα καρκίνωμα παγκοσμίως, με συνολικά περίπου 570.000 νέες περιπτώσεις να διαγιγνώσκονται ετησίως και περίπου 200.000 θάνατοι να καταγράφονται ανά έτος (Εικόνα 1.6).

Στις ΗΠΑ, Καναδά και Ευρωπαϊκή Ένωση καταλαμβάνει την 4^η θέση νεοδιαγνωσθέντος καρκίνου στους άνδρες . Διακυμάνσεις στη συχνότητα και θνησιμότητα από τον καρκίνο φαίνεται να σχετίζονται με γεωγραφικούς παράγοντες, με αυξανόμενη αναλογία στις αναπτυγμένες συγκριτικά με τις αναπτυσσόμενες περιοχές. Η νόσος είναι τρεις με τέσσερις φορές συχνότερη στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες (Saginala K.et al ,2020). Η διαφορά συχνότητας μεταξύ των δύο φύλων δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί και οι υποκείμενοι παθογενετικοί μηχανισμοί δεν είναι απόλυτα γνωστοί .Ωστόσο διαφαίνεται ότι το κάπνισμα και η έκθεση σε διάφορους τοξικούς παράγοντες, ενδεχομένως να επηρεάζουν τον σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου στους άνδρες. Η αναλογία των θανάτων δείχνει επίσης μία αυξημένη τάση στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες με 2 έως 10 θανάτους ανά 100.000 άντρες και 0,5 έως 4 θανάτους ανά 100.000 γυναίκες να καταγράφονται ετησίως.

Δεδομένου ότι η εμφάνιση του ουροθηλιακού καρκίνου σχετίζεται ισχυρά με την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων ,η επίπτωση και ο επιπολασμός του αυξάνονται με την ηλικία, με μέσο όρο διάγνωσης τα 69 έτη για τους άνδρες και 71 έτη για τις γυναίκες ενώ επίσης δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον κίνδυνο ανάπτυξης διηθητικού καρκινώματος μεταξύ των δύο φύλων.(Saginala K.et al,2020)



Εικόνα 1.6: Νέα περιστατικά καρκινώματος της ουροδόχου κύστης το 2020 (Επίσημη έκθεση του σχεδίου GLOBOCAN του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ) για το 2020. Αναδημοσίευση από την ιστοσελίδα Global Cancer Observatory. <http://globocan.iarc.fr/>)



Εικόνα 1.7: Ποσοστό θανάτων από καρκίνο της ουροδόχου κύστης για το 2020 παγκοσμίως (Επίσημη έκθεση του σχεδίου GLOBOCAN του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ) για το 2020. Αναδημοσίευση από την ιστοσελίδα Global Cancer Observatory. <http://globocan.iarc.fr/>)

1.3.3 Αιτιολογικοί Παράγοντες-Παράγοντες κινδύνου

Αποτελέσματα επιδημιολογικών και κλινικών μελετών εισηγούνται την παρουσία αρκετών παραγόντων κινδύνου οι οποίοι φαίνεται να ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη του ουροθηλιακού καρκίνου.

1.3.3.1 Κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα

Αυτά περιλαμβάνουν κυρίως το σύνδρομο Lynch και το Οικογένες ρετινοβλάστωμα :

Το σύνδρομο Lynch αποτελεί οικογενές σύνδρομο που μεταβιβάζεται με τον επικρατούντα αυτοσωμικό χαρακτήρα και στην παθογένεια του οποίου εμπλέκονται κληρονομικά ελλείματα σε κάποιο από τα υπεύθυνα γονίδια της επιδιόρθωσης κακής σύζευξης (mismatch repair genes, MMR) του DNA. Οι ασθενείς εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινωμάτων ποικίλων ανατομικών θέσεων όπως ουροδόχο κύστη, λεπτό και παχύ έντερο, στόμαχο ,ήπαρ και χοληφόρο σύστημα ,ενδομήτριο ,ωοθήκες ,εγκέφαλο και δέρμα.(Harper HL.2017,Skeldon SC.2012)

Ασθενείς με οικογενές ρετινοβλάστωμα εμφανίζουν επίσης αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος ιδιαίτερα όταν έχουν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία ή και χημειοθεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη. Τέλος οι εξαιρετικά σπάνια εμφάνιση στην παιδική ηλικία έχει συσχετιστεί με το σύνδρομο Costello (Doddamani S.et al 2015).

1.3.3.2 Κάπνισμα

Το κάπνισμα αποτελεί τον πιο καλά τεκμηριωμένο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη του ουροθηλιακού καρκινώματος. Ο κίνδυνος ανάπτυξης του καρκίνου είναι έως και πέντε φορές

μεγαλύτερος στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Έχει συσχετιστεί με τη διάρκεια και τον αριθμό των τσιγάρων, ενώ η διακοπή του καπνίσματος εξασθενεί σταδιακά τον κίνδυνο με την πάροδο των ετών. Έχει βρεθεί ότι η περιεκτικότητα των τσιγάρων σε χημικές ουσίες όπως αρωματικές αμίνες (2-ναφθυλαμίνη,βενζιδίνη) και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες ενοχοποιούνται για την τοξική δράση στο ουροθήλιο προάγοντας έτσι την καρκινογένεση.(Letasiova S.,2012,van Osch F,2016)

1.3.3.3 Επαγγελματική έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η επαγγελματική έκθεση σε ουσίες όπως αρωματικές αμίνες, πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και διάφορες χρωστικές αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος ουροδόχου κύστης. Ιδιαίτερα οι χρωστικές ανιλίνης μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό δια της εισπνοής ή μέσω της απορρόφησης τους από το δέρμα. Στις ομάδες υψηλού κινδύνου βρίσκονται εργάτες εργοστασίων επεξεργασίας συνθετικού καουτσούκ, αλουμινίου, πλαστικού, ελαστικών και ασφάλτου. Για την ανάπτυξη της νόσου φαίνεται να δρα συνεργιστικά και το κάπνισμα (Colt.J,2011).

1.3.3.4 Διατροφικοί παράγοντες

Τα μεταβολικά προϊόντα κάποιων τροφών όπως το ψημένο στα κάρβουνα κρέας, το χοιρινό το τουρσί καθώς και τροφών υψηλής περιεκτικότητας σε τεχνητές γλυκαντικές ουσίες ,αποβάλλονται δια μέσω των νεφρών και των σχηματιζόμενων ούρων (Balbi JC,2001). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να έρχονται σε παρατεταμένη επαφή με ουροθήλιο της ουροδόχου κύστης όπου και ασκούν την

τοξική τους δράση, προάγοντας έτσι την καρκινογένεση. Σε ορισμένες περιοχές όπως το Μπαγκλαντές, Ινδία, Κίνα και Ουγγαρία όπου η χρόνια κατανάλωση πόσιμου νερού που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις (>300 µg/L) αρσενικού έχει ενοχοποιηθεί ισχυρά για την αυξημένη συχνότητα ουροθηλιακού καρκινώματος(Letasiova S.2012).

1.3.3.5 Ακτινοβολία

Ασθενείς οι οποίοι έχουν ακτινοβοληθεί στην πυελική χώρα για καρκίνωμα του προστάτη αδένου ή του τραχήλου της μήτρας διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης ουροθηλιακού καρκινώματος.(Shah SK,2006,Yee DS 2010 ,Keehn A 2017)

1.3.3.6 Άλλοι παράγοντες κινδύνου

Στην ανάπτυξη του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης ,αιτιολογική σημασία έχουν οι χρόνια κατάχρηση φαινακετίνης (κυρίως στην περιοχή της Ασίας)(Castelao JE,2000) και η μακροχρόνια χορήγηση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου, κυκλοφωσφαμίδη(Travis LB ,1995). Επίσης τοπικοί παράγοντες που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη καρκινώματος είναι η σχιστοσωμίαση(λοίμωξη από το *Schistosoma haematobium*) και η εκτροφή της ουροδόχου κύστης (Zaghloul MS,2012).

1.3.4 Κλινική εικόνα -απεικονιστικός έλεγχος

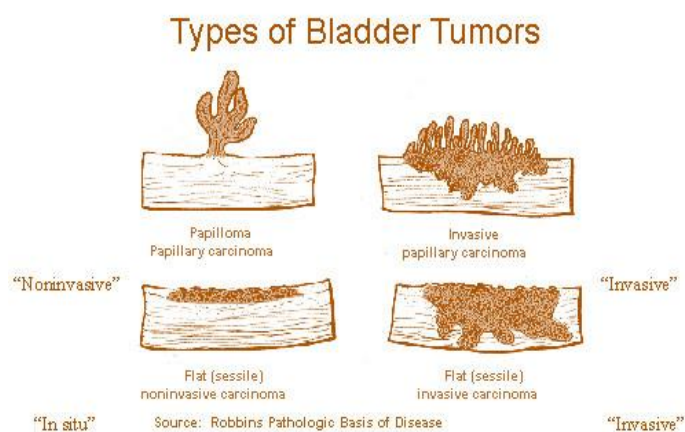
Η πιο συχνή και τυπική κλινική εκδήλωση της νόσου είναι η αιματουρία η οποία μπορεί να έχει χαρακτήρες ανώδυνης, υποτροπιάζουσας, μικροσκοπικής και μακροσκοπικής. Συχνές εκδηλώσεις είναι επίσης οι διαταραχές της ούρησης (δυσουρία, συχνουρία), σημείο ενδεικτικό της φλεγμονής και διήθησης του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης. Σε άλλες περιπτώσεις τα συμπτώματα οφείλονται στην περικυστική διήθηση ή στην απόφραξη της αποχετευτικής μοίρας, ιδιαίτερα σε μεγάλου μεγέθους όγκων που περιλαμβάνουν οίδημα κάτω άκρου, ισχιαλγία, οσφυϊκά άλγη και υποτροπιάζουσες ουρολοιμώξεις.

Η κυστεοσκόπηση αν και αρκετές φορές είναι δυσχερής λόγω της αιματουρίας αποτελεί την καλύτερη τεχνική για τη διάγνωση του καρκινώματος. Χρήσιμη είναι η λήψη βιοπτικού υλικού από αρκετές θέσεις του όγκου συμπεριλαμβανομένης της βάσης του, όχι μόνο της επιφάνειας του, με σκοπό την ιστολογική διάγνωση. Η κυτταρολογική εξέταση των ούρων ιδιαίτερα σε συνδυασμό με την ιστολογική εξέταση έχει σημαντικό ρόλο στη διάγνωση. Οι σύγχρονες απεικονιστικές τεχνικές όπως υπέρηχοι, αξονική και μαγνητική τομογραφία έχουν χαμηλή ευαισθησία(79 - 89%) για την ανάδειξη του καρκινώματος ιδιαίτερα του εντοπισμένου συγκριτικά με του τοπικά προχωρημένου.

1.3.5 Μακροσκοπική και μικροσκοπική εικόνα

Σε ποσοστό 75% των περιπτώσεων τα ουροθηλιακά καρκινώματα της ουροδόχου κύστης εντοπίζονται στην περιοχή του τριγώνου. Μακροσκοπικά μπορεί να έχουν θηλώδη εξωφυτική ή συμπαγή διηθητική εικόνα ανάπτυξης. Η πολυεστιακότητα είναι συχνή. Μικροσκοπικά παρουσιάζουν μεγάλη αρχιτεκτονική και κυτταρολογική ποικιλία. Τα περισσότερα από τα

καρκινώματα με διήθηση του χορίου έχουν θηλώδη μορφολογία και είναι γενικά χαμηλού βαθμού κακοήθειας ενώ εκείνα με διήθηση του μυϊκού χιτώνα ή των περικυστικών ιστών είναι μη θηλώδης όγκοι με συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης και υψηλού βαθμού κακοήθειας. Οι θηλώδεις σχηματισμοί αποτελούνται από αγγειοσυνδετικούς άξονες με άφθονα διευρυσμένα αγγεία και επενδύονται από κακοήγη νεοπλασματικά ουροθηλιακά κύτταρα. Η θηλώδης διαμόρφωση είναι τόσο μικρότερη όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός κακοήθειας.



Εικόνα 1.8 : Τύποι καρκίνου ουροδόχου κύστης: θηλώδης (papilloma) μη διηθητικός (Non invasive) και διηθητικός (Invasive) και επίπεδος όγκος (flat, sessile) ουροδόχου κύστης in situ και διηθητικός (Πηγή: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease 10th edition ,Αναπαράσταση από την ιστοσελίδα National Cancer Institute ,www.cancer.gov)

Ο βαθμός κακοήθειας (Grade) ή ιστολογική διαβάθμιση αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους προγνωστικούς παράγοντες και βασίζεται στη μικροσκοπική εκτίμηση των κάτωθι παραμέτρων:

α) θηλώδης διαμόρφωση

β) αριθμός στοιχείων των νεοπλασματικών κυττάρων

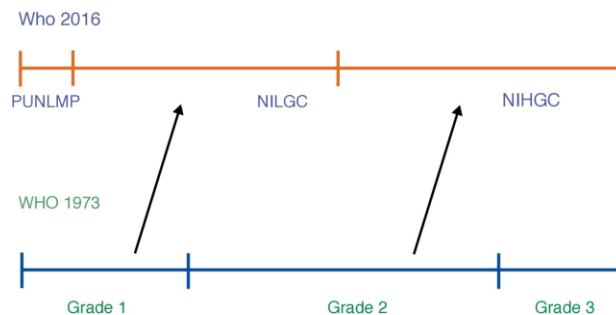
γ) κυτταρικός προσανατολισμός

δ) βαθμός πυρηνικής ατυπίας/ πλειομορφίας

ε) πυρηνοκινησίες

Σύμφωνα με την πρόσφατη αναθεωρημένη ταξινόμηση του ΠΟΥ(2016) τα ουροθηλιακά καρκινώματα διακρίνονται σε χαμηλού και υψηλού βαθμού κακοήθειας (Low and High grade) .Το νέο αυτό σύστημα έχει αντικαταστήσει τα παλαιότερα 4 βάρθμια συστήματα (Grades I-IV, ΠΟΥ 1973)

Comparison WHO 1973–2016



Εικόνα 1.9: Σύγκριση ταξινόμησεων βαθμού κακοήθειας(grade) για τον καρκίνου της ουροδόχου κύστης μεταξύ 1973-2016 (Πηγή : ΠΟΥ 2016)

1.3.6 Παθολογοανατομική σταδιοποίηση του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης

Η πρόσφατη παθολογοανατομική σταδιοποίηση TNM (Tumor,Node, Metastasis) η οποία υιοθετήθηκε από παγκόσμιες επιστημονικές εταιρείες καρκίνου παρατίθεται στον κάτωθι πίνακα.

TNM classification of carcinomas of the urinary bladder

TNM classification ^{a,b}			
T – Primary tumour		N0	No regional lymph node metastasis
TX	Primary tumour cannot be assessed	N1	Metastasis to a single lymph node in the true pelvis (a hypogastric, obturator, external iliac, or presacral lymph node)
T0	No evidence of primary tumour	N2	Metastasis to multiple lymph nodes in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac, or presacral lymph nodes)
Ta	Non-invasive papillary carcinoma	N3	Metastasis to common iliac lymph node(s)
Tis	Carcinoma in situ: "flat tumour"	M – Distant metastasis	
T1	Tumour invades subepithelial connective tissue	M0	No distant metastasis
T2	Tumour invades muscle	M1	Distant metastasis
T2a	Tumour invades superficial muscle (inner half)	Stage grouping	
T2b	Tumour invades deep muscle (outer half)	Stage 0a	Ta N0 M0
T3	Tumour invades perivesical tissue:	Stage 0is	Tis N0 M0
T3a	Microscopically	Stage I	T1 N0 M0
T3b	Macroscopically (extravesical mass)	Stage II	T2a–b N0 M0
T4	Tumour invades any of the following: prostatic stroma, seminal vesicles, uterus, vagina, pelvic wall, abdominal wall	Stage III	T3a–b N0 M0
T4a	Tumour invades the prostatic stroma, seminal vesicles, uterus, or vagina		T4a N0 M0
T4b	Tumour invades the pelvic wall or abdominal wall	Stage IV	T4b N0 M0
N – Regional lymph nodes			Any T N1–3 M0
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed		Any T Any N M1

Εικόνα 1.10 : Σταδιοποίηση κατά TNM, του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. (ΠΟΥ, 2016)

1.3.7 Προγνωστικοί παράγοντες

Οι κύριοι προγνωστικοί παράγοντες του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης είναι το στάδιο (TNM) , ο βαθμός κακοήθειας (grade) ,το μέγεθος του όγκου ,η πολυεστιακότητα, η παρουσία in situ καρκινώματος και η διήθηση των αιμοφόρων αγγείων και λεμφαγγείων. (Wein et al 2011,Kaba 2014)

Οι όγκοι που δεν διηθούν το μυϊκό τοίχωμα (μη μυοδιηθητικός όγκος/Non Muscle Invasive Bladder Cancer-NMIBC) αποτελούν περίπου το 75% των περιπτώσεων και έχουν εξαιρετική πρόγνωση (πενταετής επιβίωση 95%) καθώς σχετίζονται με μικρό ποσοστό εξέλιξης (10-15%) σε μυοδιηθητικούς όγκους. Πρόκειται συνήθως ,για χαμηλού βαθμού κακοήθειας μη διηθητικά θηλώδη

καρκινώματα. Αντίθετα οι μυοδιηθητικοί όγκοι (Muscle Invasive Bladder Cancers, MIBC), οι οποίοι αποτελούν το 15-20% των περιπτώσεων είναι επιθετικοί, χορηγούν γρήγορα μεταστάσεις και έχουν κακή πρόγνωση (πενταετής επιβίωση 69% στο σύνολο των ασθενών και 39% για τους ασθενείς με επιχώριες λεμφαδενικές μεταστάσεις).

1.3.8 Θεραπεία

Για πολλά χρόνια η θεραπευτική διαχείριση του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης παρέμεινε ίδια ενώ τα τελευταία έτη σημειώθηκε εξέλιξη στη διαχείριση της νόσου και της θεραπείας ως αποτέλεσμα της απόκτησης γνώσης σχετικής με τα μοριακά χαρακτηριστικά του καρκινώματος.

Η ενδεικνύομενη θεραπεία μυοδιηθητικής μη μεταστατικής νόσου είναι χειρουργική (ριζική κυστεκτομή) με ταυτόχρονη πυελική λεμφαδενεκτομή . Συστήνεται η εισαγωγική χημειοθεραπεία με βάση την σισπλατίνη (cisplatin) σε ασθενείς που δύνανται να λάβουν τέτοια χημειοθεραπεία (Giridher Kν,Kohli 2017).

Τα τελευταία χρόνια, οι αναστολείς του ανοσολογικού σημείου ελέγχου (checkpoint inhibitors -CPI) οι οποίοι αναστέλλουν τη βασική προγραμματισμένη οδό υποδοχέα κυτταρικού θανάτου (programmed cell death receptor 1-PD-1) έχουν προταθεί ως θεραπεία ικανή να βελτιώσει την επιβίωση των ασθενών με μεταστατική νόσο (Bellmunt ,de WitR Vaughn Dj et al 2017)

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών φάσης II και III, η FDA (Food and Drug Administration, υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής) ενέκρινε 5 αναστολείς PD-1/PD-L1 (pembrolizumab, atezolizumab, nivolumab, durvalumab, avelumab) (Nally C.2017). Το ποσοστό απόκρισης των ασθενών ήταν σχετικά ικανοποιητικό για την θεραπεία του τοπικά εκτεταμένου ή μεταστατικού ουροθηλιακού καρκίνου. Η συμπληρωματική διαγνωστική δοκιμασία (test) για το PD-L1, VENTANA PD-L1, (SP263) Assay, εγκρίθηκε ταυτόχρονα.

1.4 Μοριακή βιολογία του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης

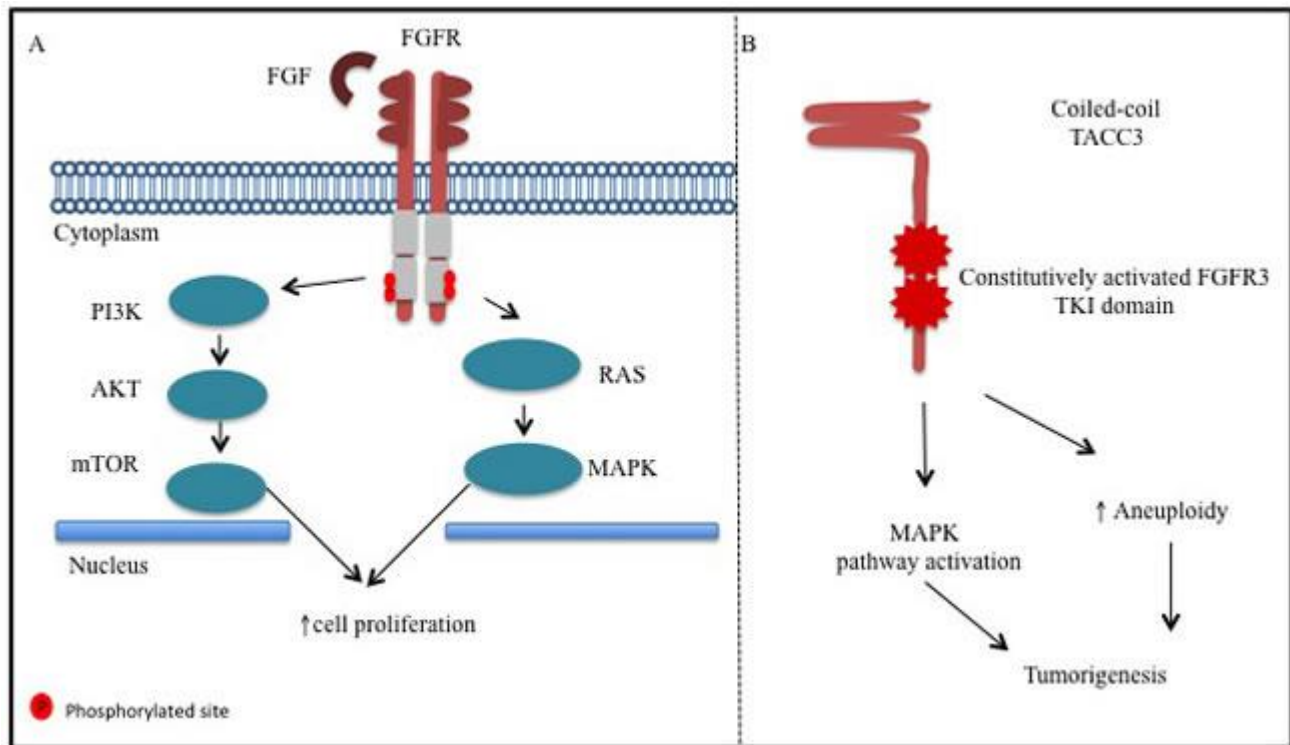
Το ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης αποτελεί μια ομάδα από ετερογενείς όγκους .Αναπτύσσεται μέσω διαφορετικών μοριακών μονοπατιών καρκινογένεσης , καθ' ένα από τα οποία έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά, διαφορετική πρόγνωση και διαφορετικό μοριακό προφίλ (κατανομή).

Τα κυριότερα σηματοδοτικά μονοπάτια του καρκίνου της ουροδόχου κύστης θα αναπτυχθούν παρακάτω.

1.4.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα 3 του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR3)

Το γονίδιο του υποδοχέα 3 του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (*FGFR3*), υποδοχέα τυροσινικής κινάσης ,εντοπίζεται στη θέση 4p16.3 στο χρωμόσωμα 4 και αποτελείται από 19 εξόνια και ένα ογκογονίδιο. Μεταλλάξεις του γονιδίου οδηγούν στη μη φυσιολογική λειτουργία του υποδοχέα του με αποτέλεσμα ο υποδοχέας να ενεργοποιείται συνεχώς οδηγώντας στη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS/MAPK.

Στην πλειονότητα (80%) των μη μυοδιηθητικών καρκινωμάτων παρατηρούνται μεταλλάξεις στο FGFR3.Οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι στο εξόνιο 5 και 10 (Di Martino et al 2012). Σ 'ένα ποσοστό όγκων παρατηρούνται επαναλαμβανόμενες συντήξεις FGFR3-TACC3 .(Inomura 2018)



Εικόνα 1.11 Α.Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα των ινοβλαστικού παράγοντα FGFR Β.Ενεργοποιημένη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα FGFR3/TACC3 (χημειρικός υποδοχέας) (Costa et al2016)

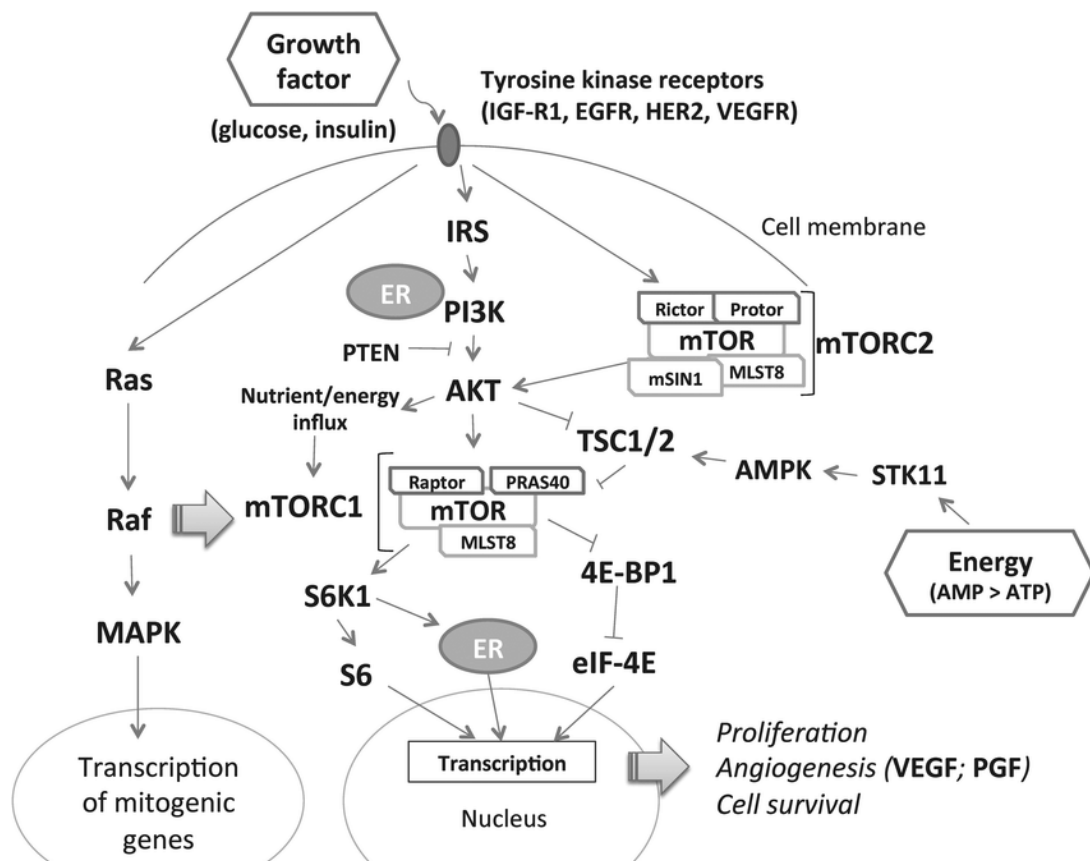
1.4.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR

Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR ενεργοποιείται από υποδοχείς τυροσίνης κινάσης και μέσω αυτού επάγεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η αγγειογένεση ενώ ταυτόχρονα αναστέλλεται η απόπτωση.

Η πρόσδεση αυξητικών παραγόντων σε έναν υποδοχέα τυροσινικής κινάσης ενεργοποιεί τον υποδοχέα. Το ένζυμο PI3K (ένζυμο 3-κινάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτάλης) όταν ενεργοποιηθεί από την αλληλεπίδραση της με υποδοχείς τυροσίνης κινάσης φωσφορυλιώνει την διφωσφορική φωσφοινοσιτόλη (phosphatidylinositol4,5 -bisphosphate 2,PIP₂) της κυτταρικής μεμβράνης προς τριφωσφορική (phosphatidylinositol3,4,5 trisphosphate ,PIP₃), η οποία εν συνεχεία στρατολογεί την κινάση PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1) που ακολούθως ενεργοποιεί την

πρωτεϊνική κινάση B,(Akt). Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η εν γένει μεταφορά σημάτων που επηρεάζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες.

Εν συνεχεία, η Akt φωσφορυλιώνει την TSC2 (Tuberus Sclerosis Complex 2) ενεργοποιώντας έτσι το mTor, δεδομένου ότι η φωσφορυλίωση της TSC2 απενεργοποιεί το ετεροδιμερές TSC1/TSC2 και με αυτόν τον τρόπο εξουδετερώνεται η ανασταλτική δράση του ετεροδιμερούς στο mTORC1(mammalian target of rapamycin complex 1).Το mTOR προάγει την πρωτεϊνοσύνθεση και την κυτταρική αύξηση μέσω ενεργοποίησης δύο μεταγραφικών παραγόντων 4E-BP1 και eIF4E (Inamura,2018).



Εικόνα 1.12: Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT/mTor

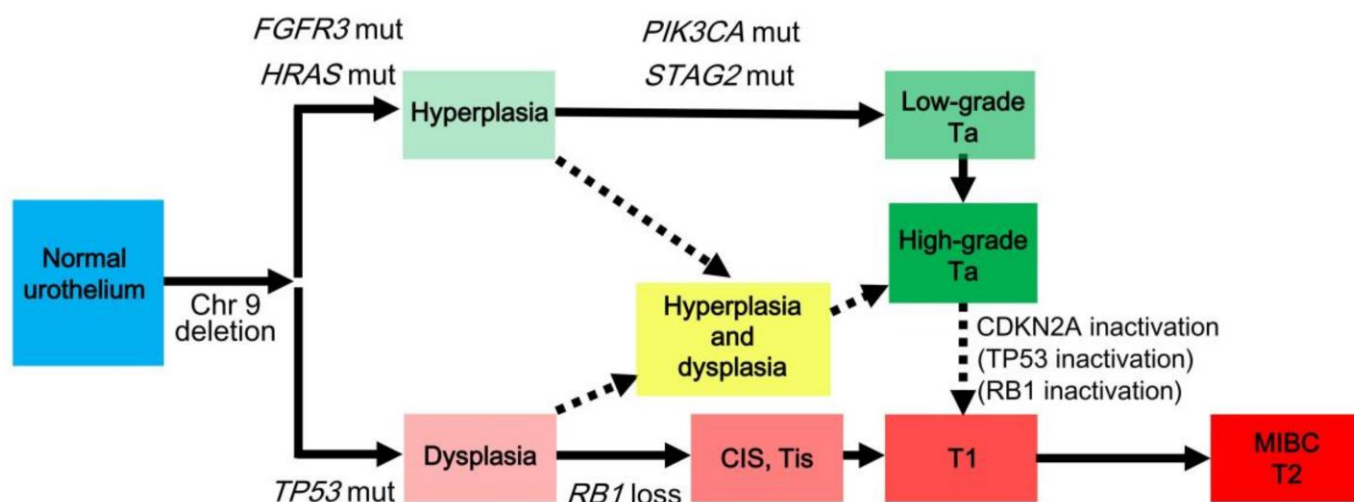
1.4.3 Σηματοδοτικό μονοπάτι p53/Rb

Το ογκογονίδιο *p53* εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 (17p). Η κωδικοποιημένη πρωτεΐνη *p53* εμπλέκεται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας την πρόοδο από την G1 στη S φάση, όταν συμβεί κάποια βλάβη στο DNA του κυττάρου με σκοπό την επιδιόρθωση του. Σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *p53* απαντώνται συχνά στα υψηλού βαθμού κακοήθειας MIBC. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα και μπορεί να προδικάσουν ενδεχόμενη υποτροπή ή εξέλιξη της νόσου, ασχέτως βαθμού κακοήθειας και σταδίου (Inamura 2018).

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb) εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 13 (13q). Η κωδικοποιημένη πρωτεΐνη *pRb*, στην φωσφορυλιωμένη της μορφή (φάσης S και M του κυτταρικού κύκλου) απελευθερώνει τον μεταγραφικό παράγοντα E2F επιτρέποντας την κυτταρική αύξηση. Μεταλλάξεις του γονιδίου *Rb* οδηγούν σε απενεργοποίηση της πρωτεΐνης *pRb* και ακολούθως την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου προς την φάση S επιταχύνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, παρατηρείται η ελλιπής έκφραση ή υπερέκφραση της πρωτεΐνης *pRb*. Και οι δύο περιπτώσεις σχετίζονται με κακή πρόγνωση των ασθενών. (Al Hussain Akhtar 2013, Sher Mc Cormick 2002, Gousia A.C)

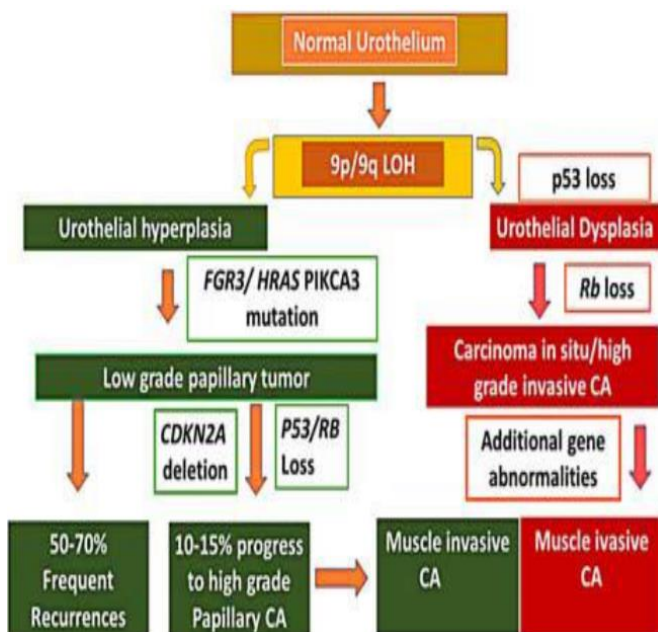
1.4.4 Χρωμοσωμική αστάθεια

Κύριο χαρακτηριστικό στην ανάπτυξη του ουροθηλιακού καρκινώματος είναι η απώλεια ολόκληρου ή τμήματος από το μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 9 (Mhawech-Fauceglia et al 2006). Η απώλεια του χρωμοσώματος 9 απαντάται στα πρώιμα στάδια της ογκογένεσης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Η απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων που βρίσκεται σε αυτή την περιοχή είναι υπεύθυνα για την καρκινογένεση δεδομένου ότι οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των ουροθηλιακών κυττάρων. Σημαντικά τέτοια γονίδια είναι το CDKN2A (Cyclin- dependent kinase inhibitor 2A) και το TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1).



Εικόνα 1.13: Η απώλεια του χρωμοσώματος 9 και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στην εξέλιξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Inamura 2018)

Εν κατακλείδι, η διαδικασία της καρκινογένεσης του ουροθηλιακού καρκινώματος αρχίζει με την απώλεια του χρωμοσώματος 9 στο φυσιολογικό ουροθηλιακά κύτταρα και εξελίσσεται με την μεσολάβηση διαφορετικών οδών σηματοδότησης που περιλαμβάνουν το FGFR3/RAS μονοπάτι ή το p53/Rb μονοπάτι (Akhtar, 2019).



Εικόνα 1.14: Η διαδικασία της νεοπλασίας ξεκινά με απώλεια χρωμοσώματος 9 στο φυσιολογικό βλεννογόνο και μπορεί να εξελιχθεί σε ουροθηλιακό καρκίνωμα μέσω διαφορετικών οδών που περιλαμβάνουν είτε το FGFR3 / RAS μονοπάτι (πράσινο) ή το μονοπάτι TP53 / RB1 (κόκκινο). (Akhtar et al., 2019).

1.5 Μοριακή ταξινόμηση του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης

Ο προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης με αλληλούχιση, μικροσυστοιχίες ή άλλες μεθοδολογίες οδήγησαν στην ταξινόμηση του καρκινώματος της ουροδόχου κύστης σε 4 διαφορετικούς υποτύπους: Urobasal A (uro A), Urobasal B (uro B), γενετικά ασταθείς όγκους (genomically unstable, GU) και όγκους με υψηλή έκφραση δεικτών πλακώδους διαφοροποίησης (SCC-like), με διαφορετική βιολογική συμπεριφορά και πρόγνωση (Sjodahl G 2012, Mc Conkey and Choi 2018, Eriksson P 2015).

Οι όγκοι **Urobasal A** χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση FGFR3, CCND1 (κυκλίνη D1), p63, κερατίνης 5, έχουν θηλώδες πρότυπο ανάπτυξης, είναι μη μυοδιηθητικά και έχουν καλή πρόγνωση.

Οι όγκοι **Urobasal B** χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση των FGFR3, CCND1, p63 και κερατίνη 5 καθώς και από μεταλλάξεις του p53. Κλινικά και βιολογικά είναι πιο επιθετικοί όγκοι και έχουν κακή πρόγνωση.

Οι **γενετικά ασταθείς** όγκοι παρουσιάζουν μεταλλάξεις των p53, έκφραση του ERBB2 χαμηλή έκφραση του PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) και έκφραση της κερατίνης 20. Αντιστοιχούν κυρίως σε υψηλού βαθμού κακοήθεις όγκους.

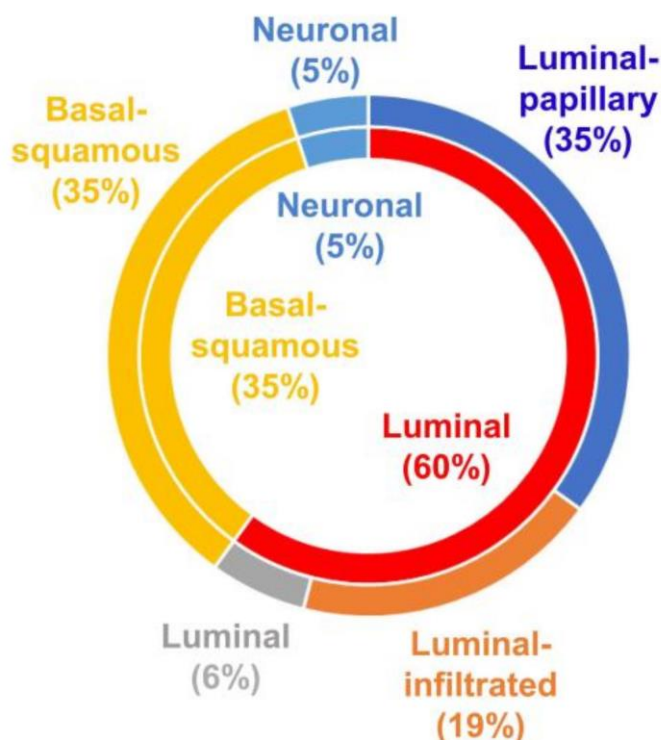
Ο υποτύπος **SCC-like** χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση βασικού τύπου κερατινών που σχετίζονται με πλακώδη διαφοροποίηση και έχει κακή πρόγνωση.

Στην πρώτη και στην δεύτερη μελέτη CANCER GENOME ATLAS (TCGA) που ολοκληρώθηκαν και δημοσιεύθηκαν το 2014 και 2017 αντίστοιχα (Weinstein J 2014, Robertson AG 2017, Rodriguez-Vida 2017) ασθενείς με MIBC κατηγοριοποιήθηκαν σε διαφορετικές μοριακές ομάδες ανάλογα με τις παρατηρούμενες γονιδιακές υπογραφές.

Τα αποτελέσματα της πρώτης μελέτης TCGA έδειξαν ότι οι όγκοι ομάδων 1 και 2 (cluster 1 και cluster 2) είχαν θηλώδη αρχιτεκτονική και αυλικού τύπου φαινότυπο με έκφραση των GATA 3, FOXA1 (Forkhead box protein A1) και E-κατχερίνη. Στην ομάδα cluster 3 οι όγκοι εξέφραζαν δείκτες πλακώδους διαφοροποίησης και δείκτες βλαστικών κυττάρων ενώ στην ομάδα cluster 4 οι

όγκοι χαρακτηρίζονταν από EMT (Epithelial-mesenchymal transition/επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μεταμόρφωση) και χαμηλή έκφραση E-κατχερίνης.

Εν συνεχεία το 2017 η ανάλυση ανέδειξε πέντε μοριακούς τύπους MIBC : αυλικό-θηλώδη (luminal papillary type), αυλικό διηθητικό (luminal-infiltrated type) αυλικό (luminal type), βασικό πλακώδη (basal -squamous type) και νευρικό(neuronal type) ανάλογα με την προβλεπόμενη βιολογική συμπεριφορά και ανταπόκριση στην θεραπεία (Robertson A G, 2017) .



Εικόνα 1.15 : Οι πέντε κατηγορίες MIBC όγκων με βάση την μελέτη του Cancer Genome Atlas (Inamura, 2018)

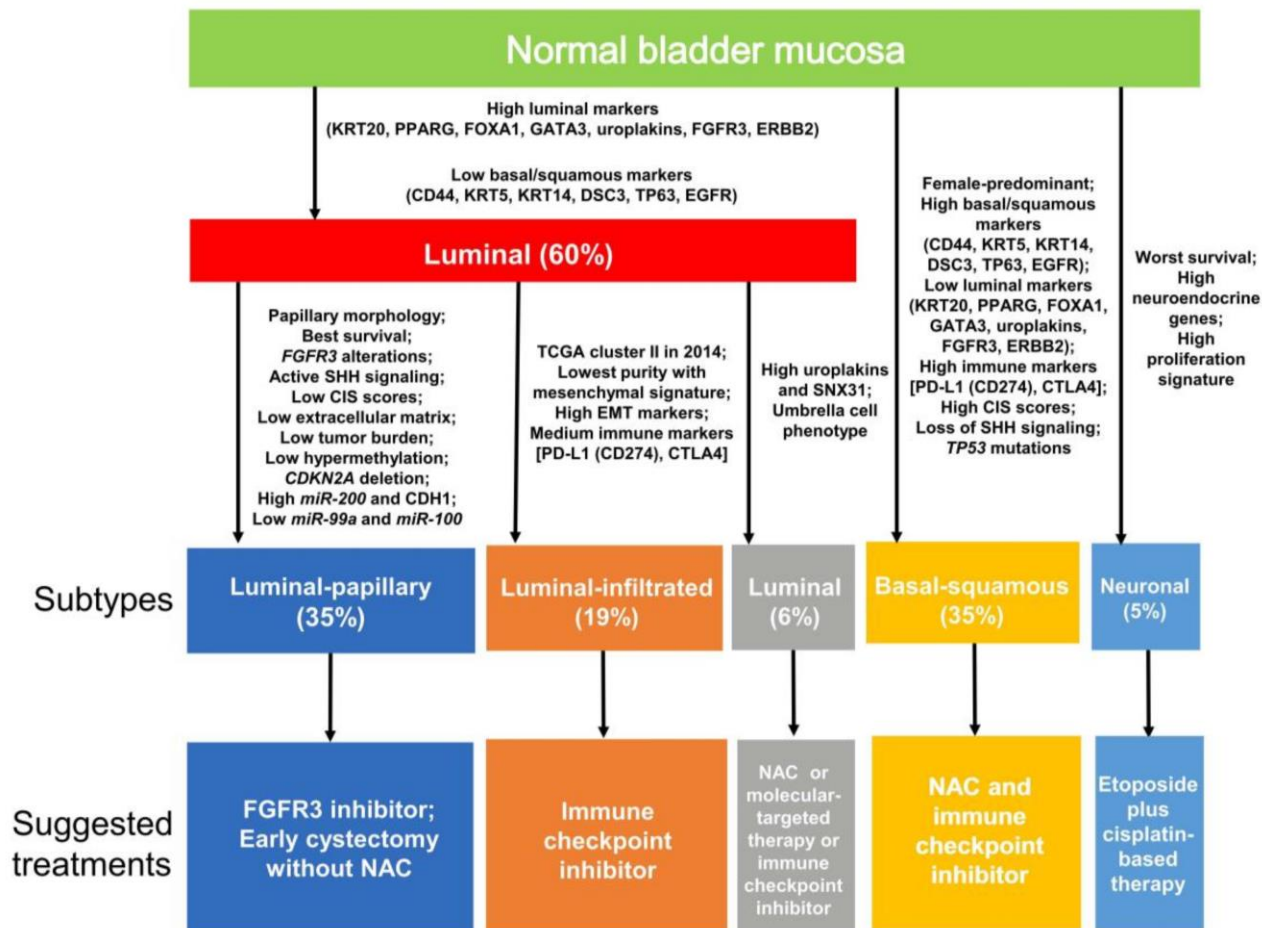
Ειδικότερα ο **αυλικός θηλώδης** τύπος έχει την καλύτερη συνολική επιβίωση και χαμηλό κίνδυνο εξέλιξης, προτείνονται δε ως θεραπεία οι αναστολείς FGFR3, εφόσον χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις FGFR3.

Ο **αυλικός-διηθητικός** τύπος, εμφανίζει μέτρια έκφραση ανοσολογικών δεικτών (PD-L1, CTLA4(Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)) και η προτεινόμενη θεραπεία είναι αυτή με βάση τους αναστολείς σημείων ανοσολογικού ελέγχου.

Ο **αυλικός τύπος** χαρακτηρίζεται από την μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων στο p53 και πιθανώς να ανταποκρίνεται σε εισαγωγική χημειοθεραπεία ή/και πιο στοχευμένη θεραπεία ανάλογα με το μοριακό προφίλ.

Ο **βασικός πλακώδης τύπος**, συχνός σε γυναίκες εκφράζει τους ανοσολογικούς δείκτες (PD-L1, CTLA4) και χαρακτηρίζεται από λεμφοκυτταρική διήθηση. Φαίνεται να υπάρχει όφελος με ανοσοθεραπεία για τη μεταστατική νόσο.


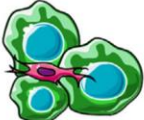

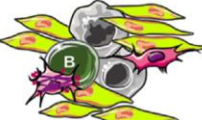


Ο **νευρικός τύπος** ,εμφανίζει μεταλλάξεις στα p53 και Rb, είναι ο πιο επιθετικός τύπος με μικρή επιβίωση των ασθενών οι οποίοι ωφελούνται περισσότερο από την χημειοθεραπεία με βάση την σισπλατίνη ή την ετεποσίδη.



Εικόνα 1.16: Θεραπευτικές προτάσεις με βάση την μελέτη του Cancer Genome Atlas (Inamura, 2018)

Ακολούθησαν και άλλες μοριακές ταξινομήσεις όπως του MD Anderson Cancer (Houston ,Texas USA)με την εφαρμογή ιεραρχικής ομαδοποίησης χωρίς επίβλεψη.(unsupervised hierarchical clustering)(Satyal U, 2019) και του BOLD 2018 (Tan TZ 2019, Zhu S 2020).

Λόγω της αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των μοριακών υποτύπων MIBC στα διάφορα προτεινόμενα συστήματα ταξινόμησης, έγινε επιτακτική η ανάγκη δημιουργίας ενός ενιαίου συστήματος με εφαρμογή και στην κλινική πρακτική. Σε πρόσφατη μελέτη (Kamoun A 2020) στη σύμφωνη μοριακή ταξινόμηση προτάθηκε η ενσωμάτωση έξι υποτύπων: αυλικός/θηλώδης, αυλικός/μη καθοριζόμενος, αυλικός/ασταθής, πλούσιος σε στρώμα , βασικός /πλακώδης και νευροενδοκρινικός με βάση τους παθογενετικούς μηχανισμούς καρκινογένεσης, την διήθηση από κύτταρα του στρώματος και του ανοσολογικού συστήματος, τα ιστολογικά χαρακτηριστικά, τα κλινικά δεδομένα και την επιβίωση των ασθενών (Εικόνα 1.17).

% of MIBC	24%	8%	15%	15%	35%	3%
Class Name	Luminal Papillary (LumP)	Luminal Non-Specified (LumNS)	Luminal Unstable (LumU)	Stroma-rich	Basal/Squamous (Ba/Sq)	Neuroendocrine-like (NE-like)
						
Differentiation	Urothelial / Luminal				Basal	Neuroendocrine
Oncogenic mechanisms	FGFR3 + PPARG + CDKN2A-	PPARG +	PPARG + E2F3 +, ERBB2 + Genomic instability Cell cycle +		EGFR +	TP53 -, RB1 -, Cell cycle +
Mutations	FGFR3 (40%), KDM6A (38%)	ELF3 (35%)	TP53 (76%), ERCC2 (22%) TMB +, APOBEC +		TP53 (61%), RB1 (25%)	TP53 (94%) RB1 (39%)*
Stromal infiltrate		Fibroblasts		Smooth muscle Fibroblasts Myofibroblasts	Fibroblasts Myofibroblasts	
Immune infiltrate				B cells	CD8 T cells NK cells	
Histology	Papillary morphology (59%)	Micropapillary variant (36%)			Squamous differentiation (42%)	Neuroendocrine differentiation (72%)
Clinical	T2 stage +	Older patients + (80+)			Women + T3/T4 stage +	
Median overall survival (years)	4	1.8	2.9	3.8	1.2	1

* 94% of these tumors present either RB1 mutation or deletion

Εικόνα1.17: Σύνοψη των χαρακτηριστικών των έξι υποτύπων που προέκυψαν από την σύμφωνη μοριακή ταξινόμηση των MIBC όγκων (Kamoun et al., 2020)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

Το μικροπεριβάλλον του καρκίνου της ουροδόχου κύστης

Το μικροπεριβάλλον του καρκίνου της ουροδόχου κύστης αποτελείται εκτός από νεοπλασματικά κύτταρα και από κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, κύτταρα που σχετίζονται με τα αγγεία όπως ενδοθηλιακά κύτταρα και περικύτταρα, στρωματικά κύτταρα όπως ινοβλάστες καθώς και από πρωτεϊνικά συστατικά. Όλα αυτά τα κυτταρικά και μη συστατικά αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους μέσω μορίων του ανοσολογικού ελέγχου (checkpoints), κυτταροκινών και χημειοκινών.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων και του ανοσολογικού συστήματος εξαρτάται από την ικανότητα του τελευταίου να αναγνωρίσει τα καρκινικά αντιγόνα. Η αναγνώριση των τελευταίων δύναται να ενεργοποιήσει φυσιολογικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen-presenting cell-APC) όπως δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, λευκοκύτταρα, κύτταρα φονείς (natural killer cells-NK cells) και T/B λεμφοκύτταρα. Τα κυτταρικά στοιχεία της ανοσολογικής απόκρισης δύνανται να ελέγξουν και να περιορίσουν την ανάπτυξη του όγκου ή να συνεισφέρουν στην δημιουργία ενός ανοσοκατασταλτικού περιβάλλοντος που θα επιταχύνει την εξέλιξη του όγκου.

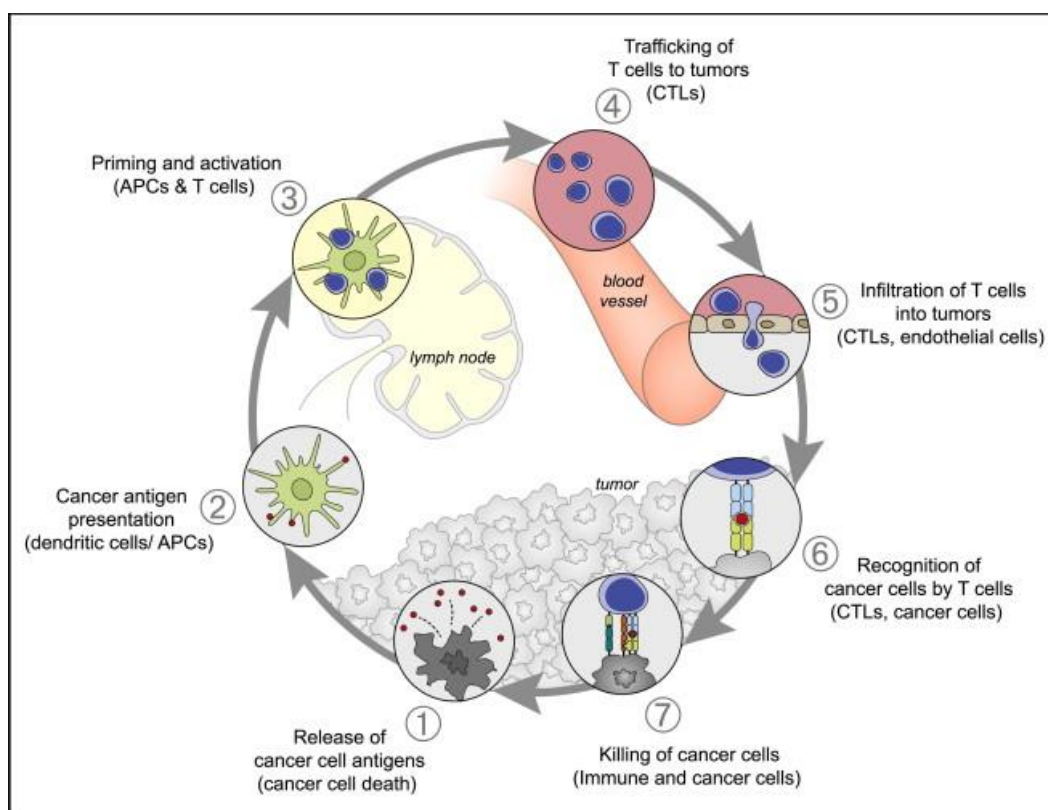
2.1 Ανοσολογική απάντηση στο νεοπλασματικό ιστό

Κατά την καρκινογένεση, αντιγονικά στοιχεία του όγκου απελευθερώνονται στην κυκλοφορία όπου και παγιδεύονται από τα δενδριτικά κύτταρα. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα παρουσιάζουν τα παγιδευμένα αντιγονικά στοιχεία στα T λεμφοκύτταρα. Η παρουσίαση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των εκτελεστικών T λεμφοκυττάρων (T- effector cells) με σκοπό την ανοσιακή απάντηση στα νεοπλασματικά κύτταρα. Τα εκτελεστικά T λεμφοκύτταρα μέσω της κυκλοφορίας κατευθύνονται στο νεοπλασματικό ιστό, διηθούν το στρώμα του, αναγνωρίζουν και προσδένονται στα νεοπλασματικά κύτταρα μέσω ειδικών υποδοχέων και προκαλούν θάνατο/εξάλειψη των κακοηθών κυττάρων. Νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία επιβιώνουν φέρουν συνήθως μεταλλαξογόνο φορτίο, ανθεκτικό προς την ανοσολογική απόκριση και είναι δυνατόν να

διαφύγουν της ανοσολογικής επίβλεψης με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό (στάδιο διαφυγής-escape)(Dunn GP 2002).

Νεοαντιγονικά στοιχεία των καρκινικών κυττάρων ενδέχεται να μην αναγνωρίζονται από τα δενδριτικά κύτταρα ή να αναγνωρίζονται ως αντιγόνα του ίδιου του οργανισμού, με αποτέλεσμα την αναστολή της μετανάστευσης των εκτελεστικών T λεμφοκυττάρων στον νεοπλασματικό ιστό.

Ανάλογα με την παρουσία λεμφοκυτταρικής φλεγμονώδους διήθησης στον νεοπλασματικό ιστό, οι όγκοι ταξινομούνται ως εξής :1) ψυχροί (cold), χαρακτηριζόμενοι από την απουσία λεμφοκυττάρων 2) θερμοί (hot), χαρακτηριζόμενοι από την παρουσία λεμφοκυττάρων με συνοδό υψηλή έκφραση του PD-L1/PD-L2 και 3) όγκοι με τριτογενείς λεμφοειδείς δομές (tertiary lymphoid structures) χαρακτηριζόμενοι από σχηματισμό λεμφοειδών δομών δευτερογενώς στην ικανή φλεγμονώδη κυτταρική διήθηση.



Εικόνα 2.1: Ο κύκλος καρκίνου-ανοσολογικής απάντησης (Chen D. και Mellman I., 2013)

2.2 Δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells, DCs) είναι μια σημαντική ομάδα αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και αποτελούν κεντρικό ρυθμιστή της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης. Η βασική λειτουργία τους είναι η επεξεργασία των αντιγόνων και η παρουσίαση τους στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων. Ένας υποπληθυσμός των DCs τα συμβατικά (conventional DCs ,cDCs) και ειδικότερα τα CD1, είναι ικανά να επάγουν κυτταρική ανοσία έναντι του καρκίνου. Μελέτες έχουν αναδείξει αρκετούς ρυθμιστές που συμβάλλουν στην προσέλευση των DCs στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου όπως τα CCLS και XCL1 τα οποία παράγονται από τα NK κύτταρα (Bottcher JP.2018). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες και μελέτες γονιδιακής έκφρασης έχουν δείξει ότι η παρουσία αυξημένου αριθμού DCs στο καρκινικό μικροπεριβάλλον σχετίζεται με καλύτερη επιβίωση των ασθενών (Bottcher JP), ενώ στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης σχετίζεται με την θεραπευτική ανταπόκριση (Bottcher JP 2018, Ayari C.). Πρόσφατη μελέτη αναδεικνύει την συνεργιστική δράση των DCs και των CD8+ T λεμφοκυττάρων (Hatogai K.2019).

2.3 Μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο

Τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο (tumor associated macrophages, TAMs) αποτελούν κατηγορία ανοσοκυττάρων που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον των συμπαγών όγκων και ευοδώνουν την αύξηση και την εξέλιξη αυτών εκκρίνοντας κυτταροκίνες και χημειοκίνες, προάγουν την γενετική αστάθεια και συμμετέχουν στην μεταστατική διαδικασία. Διακρίνονται σε M1 και M2 μακροφάγα.

Τα M1 μακροφάγα χαρακτηρίζονται από την παραγωγή προφλεγμονωδών και ανοσοδιεγερτικών μορίων, όπως ιντερλευκίνη 12 (IL-12) και ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου α (tumor necrosis factor-α ,TNF-α). Τα M2 μακροφάγα χαρακτηρίζονται από την παραγωγή ανοσοκατασταλτικών μορίων όπως ιντερλευκίνη 10 (IL-10) και τον μεταμορφωτικό παράγοντα β (transforming growth factor beta, TGF-β)

Τα TAMs και κυρίως τα M2 μακροφάγα στρατολογούνται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον με τη μεσολάβηση χημειοτακτικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Στο

καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης σημαντικός χημειοτακτικός παράγοντας για την προσέλευση τους έχει βρεθεί να είναι ο CCL2 (chemokine(C-Cmotif) ligand 2)(Chen C. 2013, Mantovani A.2010). Η διήθηση του όγκου από αυξημένο αριθμό TAMs έχει συσχετισθεί με υψηλό βαθμό κακοήθειας και μικρή επιβίωση ωστόσο τα αποτελέσματα πολλών μελετών είναι αντιφατικά (Atahator G.2016, Gartrell RD.2018, Sorensen MD.2017, Zhang WJ. 2017).

Σε ότι αφορά τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ο αυξημένος αριθμός ενδο-ογκικών TAMs, και κυρίως M2, έχει συσχετισθεί με επιθετική βιολογική συμπεριφορά, μεγάλο μέγεθος όγκου, υψηλό βαθμό κακοήθειας, παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, προχωρημένο στάδιο νόσου και πτωχή επιβίωση (Wang B 2015, Takeuchi H.2016). Επίσης, η υψηλή αναλογία του ποσοστού των TAMs προς το ποσοστό των διηθούντα τον όγκο λεμφοκυττάρων (Tumor Infiltrating Lymphocytes-TILS) έχει σχετιστεί με φτωχή DFS (Disease-Free Survival) μετά την χειρουργική επέμβαση των ασθενών με MIBC (Sjodal G 2014).

2.4 T λεμφοκύτταρα

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εισερχόμενα στον θύμο αδένα ωριμάζουν σε T και B λεμφοκύτταρα. Τα T λεμφοκύτταρα αποτελούν το πιο σημαντικό κυτταρικό πληθυσμό ανοσολογικής απάντησης στο νεόπλασμα είτε μέσω της κυτταροτοξικής τους δράσης, στην περίπτωση των CD8+ T λεμφοκυττάρων, είτε μέσω της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών στην περίπτωση των CD4+ T λεμφοκυττάρων.

Τα CD8+ λεμφοκύτταρα ανήκουν στην ομάδα των εκτελεστικών T λεμφοκυττάρων τα οποία είναι κυτταροτοξικά. Αναγνωρίζουν τα κακοήθη νεοπλασματικά κύτταρα και τα οδηγούν σε απόπτωση είτε με την απελευθέρωση κυτταρολυτικών κοκκίων ή με την έκφραση μορίων που συνδέονται με υποδοχείς θανάτου (death receptors).

Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, η υψηλή συγκέντρωση ενδο-ογκικών CD8+ T λεμφοκυττάρων έχει συσχετισθεί με ευνοϊκή πρόγνωση σε ότι αφορά την συνολική επιβίωση (overall survival, OS) ή την επιβίωση ελεύθερης νόσου (disease free survival,DFS) των ασθενών με MIBC και NMIBC. (Faraj SF 2014, Kripina K.2015).

Τα CD4+ T λεμφοκύτταρα είναι T βοηθητικά κυττάρα (T-helpers ,Th) τα οποία ενεργοποιούν μέσω ειδικών κυτταροκινών τα B λεμφοκύτταρα με σκοπό την παραγωγή αντισωμάτων. Ένα σημαντικό υποσύνολο CD4+ λεμφοκυττάρων (5-10%) αποτελούν τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (Tregs). Τα Tregs χαρακτηρίζονται από έκφραση δεικτών, όπως του CD25 και του κύριου μεταγραφικού παράγοντα πρωτεϊνών, Forkhead Box P3 (FOXP3). Παρουσιάζουν ανοσοκατασταλτική δράση μέσω διάφορων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων, της μεσολαβούμενης δράσης του κυτταροτοξικού T λεμφοκυτταρικού αντιγόνου 4 (Cytotoxic T-lymphocyte Associated protein 4, (CTL4) για την καταστολή των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, των υψηλών επιπέδων της ιντερλευκίνης 2 (Interleukin 2, IL-2) και της παραγωγής ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών και άλλων μορίων (Miyara M.2011, Togashi Y.2019).

Επιπλέον τα Tregs καταστέλλουν την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού και της εκτελεστικής δράσης των CD8+ και CD4+ T λεμφοκυττάρων και συμμετέχουν στην ανοσοδιαφυγή των καρκινικών κυττάρων (Sakagushi S, 2010).

Τα Tregs κύτταρα διηθούν σε μεγάλο βαθμό στον καρκινικό ιστό και απουσιάζουν ή είναι παρόντα σε μικρό αριθμό στην περιφερική κυκλοφορία. Όπως και σε άλλα κακοήγη νεοπλάσματα, έτσι και στο καρκίνωμά της ουροδόχου κύστης παρατηρείται αυξημένη παρουσία Tregs κυττάρων (Loskog A.2007, Winedal ME.2018). Η προγνωστική τους αξία είναι διαφορούμενη και σε μερικές μελέτες έχει συσχετισθεί με μικρή επιβίωση ελεύθερης υποτροπών, ενώ σε άλλες με ευνοϊκή επιβίωση (Miyake M.2017, Murai R 2018, Winedal ME.2018).

Η συσχέτιση της παρουσίας αυξημένου αριθμού Tregs με την ευνοϊκή επιβίωση των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης πιθανώς να οφείλεται στην καταστολή της μεταλλοπρωτεϊνάσης 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP2) στο νεοπλασματικό μικροπεριβάλλον, ενός βοηθητικού προ-διηθητικού παράγοντα που επάγεται από την μεσολαβούμενη από τα Treg φλεγμονώδη διήθηση , ιδιαίτερα στο διηθητικό μέτωπο του καρκίνου (Winedal ME).

Επίσης ,έχει αναφερθεί ότι η αναλογία Tregs προς τον συνολικό αριθμό των T λεμφοκυττάρων και η αναλογία αυξημένου αριθμού Tregs προς τον αριθμό των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CD8+) σχετίζονται με δυσμενή επιβίωση. Αντιθέτως η αναλογία μεγάλου αριθμού κυτταροτοξικών CD8+ λεμφοκυττάρων προς τον αριθμό των Tregs διαπιστώθηκε να σχετίζεται με ανταπόκριση των ασθενών σε εισαγωγική χημειοθεραπεία (Baras AS. 2016, Horn T.2016, Parodi A.2016).

2.5 Τα διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα

Η παρουσία των διηθούντων τον όγκο λεμφοκυττάρων (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILS) υποδεικνύει την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού έναντι των καρκινικών κυττάρων. Η προγνωστική επίδραση των TILS έχει διερευνηθεί σε αρκετούς τύπους καρκινωμάτων συμπεριλαμβανομένων και του καρκινώματος της ουροδόχου κύστης. Σε περίπτωση ασθενών με NIBC, η αυξημένη πυκνότητα των TILS και συγκεκριμένα των T λεμφοκυττάρων με ανοσοφαινότυπο CD3+,CD4+ ή CD8+ εντός του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος βρέθηκε να σχετίζεται με χειρότερη επιβίωση και αυξημένο ρυθμό υποτροπών (Kgrina K.,Babazonic et al 2015) σε αντίθεση με ότι έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με MIBC όπου η υψηλή πυκνότητα των TILS (κυρίως των CD3+,CD8+ T λεμφοκυττάρων) με ευνοϊκή πρόγνωση και ικανοποιητική επιβίωση (YU A2018, Mansare JJ, Solanti S 2018).

Όμως η παρουσία άλλων τύπων ανοσοκυττάρων, όπως η παρουσία των κυττάρων Treg με ανοσοφαινότυπο FOXP3 και μακροφάγων, έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών με MIBC. (YU A.,Horn T.Laus J. Seitz AK 2016). Η θετική συσχέτιση μεταξύ της υψηλής πυκνότητας των TILS και της πρόγνωσης έχει παρατηρηθεί και στις περιπτώσεις ασθενών με μεταστατική νόσο (Huang Hs,Su H Y,Li PH 2018).

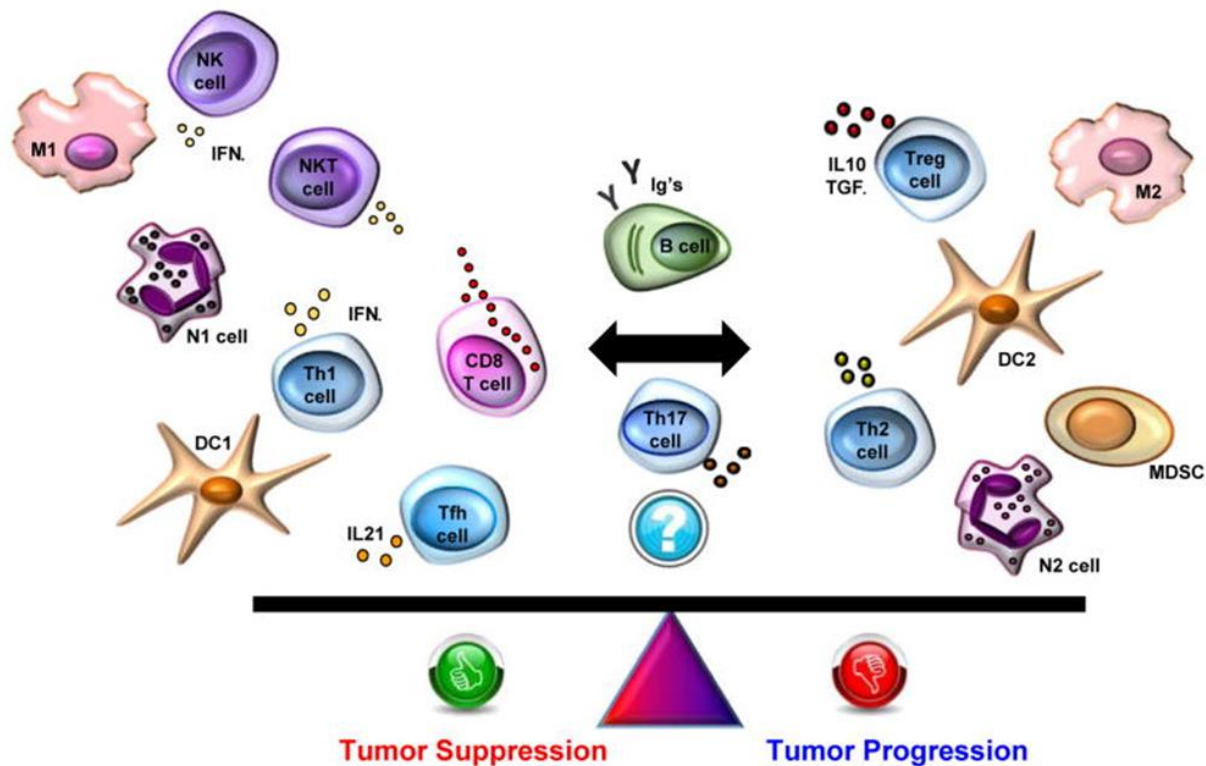
Έχει δειχθεί ότι η προγνωστική αξία των TILS έχει άμεση συσχέτιση με την περιοχή του όγκου όπου αυτά ταυτοποιούνται και καταμετρώνται. Υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν θετική συσχέτιση με την ευνοϊκή πρόγνωση μόνο των ενδο-ογκικών TILS (intratumoral ,iTILS) σε αντίθεση με τα στρωματικά (stromal,sTILS) TILS , η υψηλή πυκνότητα των οποίων φαίνεται να σχετίζεται με κακή πρόγνωση(Faraj SF 2019).

Επιπρόσθετα έχει δειχθεί ότι η προγνωστική επίδραση των TILS εξαρτάται και από τους επιμέρους υποπληθυσμούς αυτών που μπορούν να ταυτοποιηθούν με ειδικούς ανοσοϊστοχημικούς δείκτες (πχ CD3 ,CD4 ,CD8 ,FOXP3). Δεδομένης της περιπλοκότητας που προκύπτει από τα ανωτέρω, δεν υπάρχουν ακόμη αυστηρές οδηγίες για την αξιολόγηση των TILS στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης και ειδικότερα του τρόπου αξιολόγησης της παρουσίας τους (π.χ. ποσοστό ή απόλυτος αριθμός ή πυκνότητα) της επιλογής για εκτίμηση των επιμέρων κυτταρικών υποπληθυσμών καθώς και της επιλογής της υπό μελέτη περιοχής του όγκου (ενδοεπιθηλιακά ή στρωματικά TILS).

2.6 Κατασταλτικά κύτταρα της μυελικής σειράς

Τα κατασταλτικά κύτταρα που προέρχονται από την μυελική σειρά (myeloid derived suppressor cells, MDSCs) είναι ένας ετερογενής πληθυσμός μυελοειδών κυττάρων που αναστέλλουν την αντικαρκινική δράση άλλων ανοσοκυττάρων. Ανάλογα με τον μορφολογικό φαινότυπο τους διακρίνονται σε M-MDSCs τα οποία μορφολογικά είναι παρόμοια με τα μονοκύτταρα και έχουν φαινότυπο CD11b+CD14+HLA+DR-/lowCD135 και στα G-MDSCs τα οποία μορφολογικά είναι παρόμοια με τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα και έχουν φαινότυπο CD11b_{low}CD14⁺CD15⁺ ή CD11b⁺cd14⁺CD66b (Gabrilovich DI. 2017, Yin Z 2019).

Σε διάφορες μελέτες διαφαίνεται η προγνωστική σημασία των MDSCs στα κακοήθη νεοπλάσματα. Στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης, ο αυξημένος αριθμός MDSCs έχει συσχετισθεί αναλογικά με το μέγεθος του όγκου, τον βαθμό κακοήθειας και το στάδιο (Zhang H 2016, Yang G.2018). Ασθενείς με υψηλό αριθμό κυκλοφορούντων στο περιφερικό αίμα MDSCs εμφανίζουν μειωμένη ανταπόκριση στην εισαγωγική χημειοθεραπεία συγκριτικά με τους ασθενείς με χαμηλό αριθμό MDSCs. Επιπλέον έχει αναφερθεί μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των G-MDSCs και του αριθμού των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων (Zhang G.2016, Wu K 2018.).



Εικόνα 2,2 Τα κυτταρικά στοιχεία της ανοσολογικής απάντησης μπορούν να ελέγξουν και να περιορίσουν την ανάπτυξη του όγκου ή να συνεισφέρουν στην δημιουργία ενός ανοσοκατασταλτικού περιβάλλοντος που θα επιτρέψει την πρόοδο και ανάπτυξη του όγκου.

M: μακροφάγο, DC: δενδριτικό κύτταρο, IFN γ : ιντερφερόνη γ , Ig's: ανοσοσφαιρίνες, IL10: ιντερλευκίνη-10, IL21: ιντερλευκίνη-21, MDSC: ανοσοκατασταλτικό κύτταρο προερχόμενο από τον μυελό, N: πολυμορφοπύρηνικο ουδετερόφιλο λευκοκύτταρο, NK: κύτταρα φονείς, NKT: T-λεμφοκύτταρα φυσικοί φονείς, Tfh: θυλακιάδες βοηθητικό T-λεμφοκύτταρο, Th: Βοηθητικό CD4+ T-λεμφοκύτταρο, TGF β : μετατροπέας παράγοντα ανάπτυξης β , Treg: Ρυθμιστικό T-λεμφοκύτταρο. (Salgado et. al., 2017)

2.7 Ο άξονας PD-1/PD-L1

Η πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου -1 (PD-1) και ο συνδέτης της PD-L1 και PD-L2 αντιπροσωπεύουν ένα πολύ καλά χαρακτηρισμένο σημείο ανοσολογικού ελέγχου στον καρκίνο. Ο άξονας PD-1/PD-L1 ελέγχει την επαγωγή και την διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Robertson AG.2017). Η PD-1 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη MB 50-55 kDa η οποία εκφράζεται στην μεμβρανική επιφάνεια των CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων, των NK κυττάρων, B λεμφοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων.

Ο PD-L1 αποτελεί έναν από τους περισσότερο μελετημένους προσδέτες του PD-1. Εντοπίζεται στη κυτταρική μεμβράνη των ανοσοκυττάρων (T λεμφοκυττάρων, δενδριτικών κυττάρων, μακροφάγων, ενδοθηλιακών αλλά και των καρκινικών κυττάρων). Η σύνδεση της PD-1 με τον PD-L1, η οποία λαμβάνει χώρα κυρίως στο μικροπεριβάλλον του όγκου αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο και περιορίζει την κυτταροτοξική τους δραστηριότητα ενώ παράλληλα αναστέλλει την παραγωγή κυτταροκινών με αποτέλεσμα την καταστολή της ενεργοποίησης και της δραστηρικής λειτουργίας ή της εξάντλησης (exhaustion) των T λεμφοκυττάρων (Blank C2007, Mackensen A.2007).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι και τα μακροφάγα στο μικροπεριβάλλον του όγκου, υπό την επίδραση του PD-L1, οδηγούν σε "ενεργή εκδίωξη" των T λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την παράκαμψη μιας αποτελεσματικής T εξαρτώμενης αντικαρκινικής απάντησης.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα καοήθη νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν PD-L1 είναι δύο: ο ενδογενής (intrinsic) και ο προσαρμοστικός (adaptive). Με τον ενδογενή μηχανισμό, γενετικές μεταλλάξεις ή ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το PI3K/Akt/mTOR και το STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), οδηγούν στην παραγωγή PD-L1 ως απάντηση στα φλεγμονώδη σήματα όπως η ιντερφερόνη γ. Δεδομένου ότι η ιντερφερόνη γ παράγεται κυρίως από τα T λεμφοκύτταρα και τα ενεργοποιημένα CD8 T λεμφοκύτταρα, αυτός ο μηχανισμός εκλαμβάνεται ως "εχθρικός" από τα καρκινικά κύτταρα (Robertson AG.2017).

Η διακοπή της οδού PD-1/PD-L1 αποτελεί τα τελευταία χρόνια ελκυστική θεραπευτική στρατηγική για την επαναδραστηριοποίηση της ειδικής για τον όγκο ανοσίας, μέσω των T λεμφοκυττάρων η οποία όπως έχει αναφερθεί αναχαιτίζεται από την έκφραση του PD-L1 στο νεοπλασματικό μικροπεριβάλλον. Η στόχευση αυτής της οδού με συγκεκριμένα θεραπευτικά σκευάσματα έχει δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα ιδιαίτερα σε καρκινώματα προχωρημένων σταδίων και ποικίλων εντοπίσεων (Herbst RS, 2014).

Σε ότι αφορά το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης, οι αναστολείς του ανοσολογικού σημείου ελέγχου (checkpoint inhibitor, CPI) PD-1/PD-L1, μπλοκάρουν την οδό και έχουν αποδειχθεί ως θεραπεία ικανή να βελτιώσει την επιβίωση των ασθενών με μεταστατική νόσο (Bellmunt J. 2017).

Πρόσφατες κλινικές δοκιμές που διεξήχθησαν σε ομάδες ασθενών με καρκινώματα της ουροδόχου κύστης που εμφανίζουν υψηλή δ μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability H, MSI-H)

έδειξαν τα υψηλότερα ποσοστά απόκρισης στον αποκλεισμό της οδού PD-1/PDL1 (Le DT,Uzam JN,Wang H et al 2015)

Ενδιαφέρον επίσης είναι το γεγονός ότι από τους μοριακούς υποτύπους των καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης, οι **“βασικοί -πλακώδεις”** όγκοι οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το 35% του συνόλου των καρκινωμάτων, χαρακτηρίζονται από ισχυρή έκφραση δεικτών ανοσολογικών σημείων ελέγχου, εύρημα το οποίο υποδηλώνει την αυξημένη πιθανότητα ανταπόκρισης σε ανοσοθεραπείες. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν διατυπωθεί και για τους όγκους του μοριακού υποτύπου **“πλούσιο σε στρώμα”** (Kamoun A.2020).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1

Σκοπός της μελέτης

Η ανοσολογική σύσταση του νεοπλασματικού ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος ,δηλαδή η πυκνότητα , εντόπιση ,οργάνωση και λειτουργία των κυττάρων του συστήματος ανοσίας που διηθούν το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης, αποτέλεσε τα τελευταία χρόνια αντικείμενο εντατικής έρευνας με κύριο στόχο την θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών.

Δεδομένου ότι οι πληροφορίες από την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι περιορισμένες και κάποιες από αυτές αντιφατικές ,σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι να:

1. μελετηθεί το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης προσδιορίζοντας τα διηθούμενα τον όγκο ανοσοκύτταρα(TILS) και διερευνώντας την ανοσοϊστοχημική έκφραση των επιμέρους λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, όπως CD3,CD8 και FOXP3 Tregs
2. διερευνηθεί αν η ανοσολογική σύσταση του μικροπεριβάλλοντος σχετίζεται με κλασικές προγνωστικές παθολογοανατομικές παραμέτρους
3. συσχετισθούν τα ευρήματα με την κλινική πορεία των ασθενών
4. διερευνηθεί αν η ενσωμάτωση του βαθμού ανοσολογικής απόκρισης στο καρκίνωμα θα μπορούσε να οδηγήσει σε καλύτερη διαστρωμάτωση των ασθενών η οποία θα στοχεύει στον προσδιορισμό προγνωστικών ή/και προβλεπτικών βιοδεικτών και στην επιλογή θεραπευτικών ανοσοθεραπευτικών στρατηγικών.

Κεφάλαιο 2

Υλικό και Μέθοδοι

2.1 Υλικό

2.1.1 Συλλογή ιστικών δειγμάτων

Το υλικό αποτέλεσαν εξήντα οκτώ (68) περιπτώσεις ουροθηλιακών καρκινωμάτων ουροδόχου κύστης, οι οποίες συγκεντρώθηκαν από τα αρχεία του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Π.Γ.Ν.Ι) και διεγνώστηκαν μεταξύ των ετών 2014-2019. Η επιλογή έγινε με την προϋπόθεση ότι υπήρχε επαρκής ιστός, ώστε να πραγματοποιηθεί πολυπαραμετρική ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

Όλα τα περιστατικά είχαν μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και είχαν εγκλεισθεί σε κύβους παραφίνης, από τους οποίους παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές πάχους 3 χιλιοστών. Μία ιστολογική τομή χρωματίστηκε με αιματοξυλίνη - ηωσίνη (H/E) η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ιστολογική επανεκτίμηση και οι υπόλοιπες ιστολογικές τομές προωθήθηκαν για ανοσοϊστοχημική μελέτη.

Η καταγραφή των ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών των καρκινωμάτων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνουν η American Joint Committee on Cancer (AJCC) και η International Union against Cancer (IUCC), 8th edition, 2020. (Protocol for the examination of cystectomy specimens from patients with carcinoma of the urinary bladder, 2020)

2.1.2 Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Οι 68 ασθενείς είχαν χειρουργηθεί ή αντιμετωπιστεί και θεραπευτεί στην Ουρολογική και Ογκολογική κλινική του ΠΓΝΙ. Συνεπώς, ήταν διαθέσιμος ο ιατρικός φάκελος για την καταγραφή των κλινικών παραμέτρων και της επιβίωσης. Η παρακολούθηση των ασθενών κυμαινόταν από 1 έως 60 μήνες). Η περίοδος επιβίωσης υπολογίστηκε από τον μήνα της επέμβασης έως το μήνα

θανάτου ή της τελευταίας επιβεβαίωσης ότι ο ασθενής ήταν ζωντανός. Τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρατίθενται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Παράμετρος	N (%)
Ηλικία(χρόνια)	
Μέσος όρος	74
Ελάχιστη-Μέγιστη	44-97
Φύλο	
Άνδρες	54(76.4)
Γυναίκες	14(20.6)
Βαθμός κακοήθειας(Grade)	
Χαμηλός	7(10.3)
Υψηλός	61(89.7)
Στάδιο	
pT1(NMIBC)	20(29.4)
pT2+pT3+pT4(MIBC)	48(70.6)
Νέκρωση	
Αρνητική	47(69.1)
Θετική	21(30.9)
Αγγειακή διήθηση	
Αρνητική	50(73.5)
Θετική	18(26.5)
Περινευρική διήθηση	
Αρνητική	64(94.1)
Θετική	4(5.9)

2.1.3 Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Τα αντισώματα για τους υπό μελέτη λεμφοκυτταρικούς δείκτες CD3, CD8 και FOXP3 εφαρμόστηκαν με την κλασική μέθοδο της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB kit, DAKO

SA,Glostup,Denmark). Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η πηγή, ο κλώνος και η αραίωση τους παρατίθενται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2.: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, πηγή προέλευσης ,κλώνος, μέθοδος ανάκλησης αντιγόνου και αραίωση

Αντίσωμα	Πηγή	Catalog no	Κλώνος	Ανάκληση αντιγόνου	Αραίωση
CD3	Dako, CA,USA	A0452	Polyclonal	EDTA, pH=8.0	1:300
CD8	Dako ,CA,USA	M7103	C8/144B	EDTA, pH=8.0	1:50
FOXP3	Abcam, USA	SP97	Monoclonal	EDTA , pH=8.0	1:50

2.2 Περιγραφή μεθόδων

2.2.1 Ανοσοϊστοχημεία

Για την πραγματοποίηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων εφαρμόστηκε η κλασική μέθοδος LSAB με την χρήση του ημιαυτοποιημένου μηχανήματος DAKO Autostainer Link 48. Σε όλες τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις χρησιμοποιήθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Για τους αρνητικούς μάρτυρες στις ιστολογικές τομές, δεν προστέθηκε το πρωτογενές αντίσωμα. Τα βασικά στάδια της ανοσοϊστοχημικής μεθοδολογίας είναι τα κάτωθι :

1. Θερμική επεξεργασία των ιστολογικών τομών σε κλίβανο
2. Τοποθέτηση στα ιστολογικά πλακίδια αυτοκόλλητης ταινίας με γραμμοκώδικα
3. Θέρμανση και αποπαραφίνωση του ιστού
4. Αποκάλυψη του αντιγονικών επιτόπων με την χρήση κατάλληλου διαλύματος
5. Επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα

6. Ενίσχυση με το σύστημα ενίσχυσης DAKO
7. Χρήση του DAB Detection Kit (DAKO)
8. Χρώση με H/E
9. Επικάλυψη των ιστολογικών τομών με καλυπτρίδες

2.2.2 Εκτίμηση των TILs

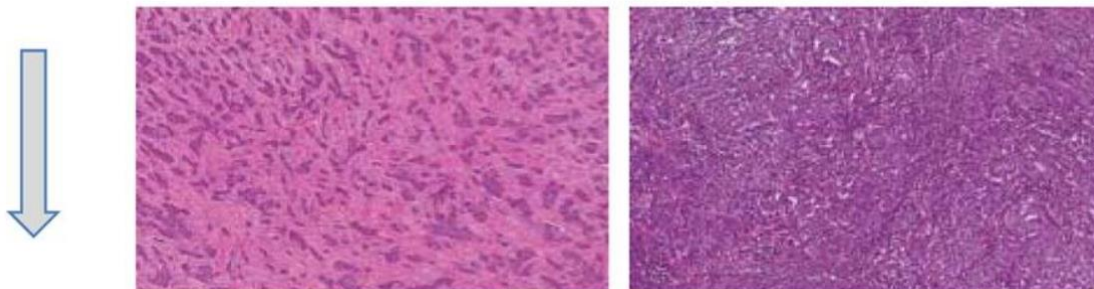
Η εκτίμηση των TILs προσδιορίστηκε στις ιστολογικές τομές H/E και καταμετρήθηκε το ποσοστό όλων των μονοπύρηνων κυττάρων (λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων) ενώ τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα και τα ηωσινόφιλα λευκοκύτταρα αποκλείστηκαν από την καταμέτρηση. Η υπό αξιολόγηση περιοχή επιλέχθηκε με οπτικό φακό μικρής μεγέθυνσης (X100) ενώ η μορφολογία των επιθυμητών προς καταμέτρηση TILs ελέγχθηκε με οπτικό φακό μεγαλύτερης μεγέθυνσης (X400).

Η εκτίμηση των TILs πραγματοποιήθηκε με διοφθάλμιο οπτικό μικροσκόπιο πολλαπλής συμπαράτηρησης από δύο έμπειρους Παθολογοανατόμους (A.C.G, A.Ch) και από την υποψήφια μεταπτυχιακή υπότροφο (Ch.E), η οποία συμμετείχε ενεργά, χωρίς γνώση των κλινικοπαθολογοανατομικών δεδομένων των ασθενών. Ακολουθούν τα βήματα αξιολόγησης των TILs σε σχηματική αναπαράσταση εφαρμόζοντας αυστηρά κριτήρια, σύμφωνα με τις προτεινόμενες συστάσεις: (Gevaert T. Allory Y.)

ΒΗΜΑ 1: Σάρωση του όγκου και επιλογή της υπό μελέτη περιοχής του όγκου (μεγέθυνση X100)

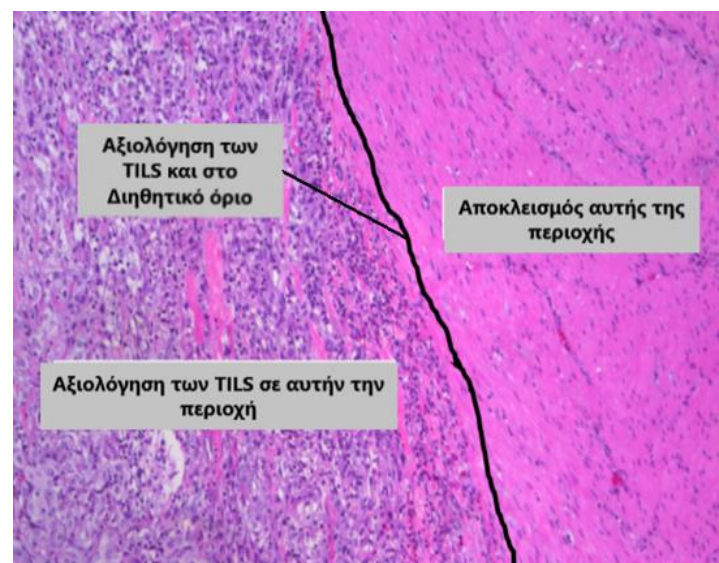


ΒΗΜΑ 2: Επιλογή των υπό μέτρηση κυττάρων με βάση τη μορφολογία τους (μεγέθυνση x100)



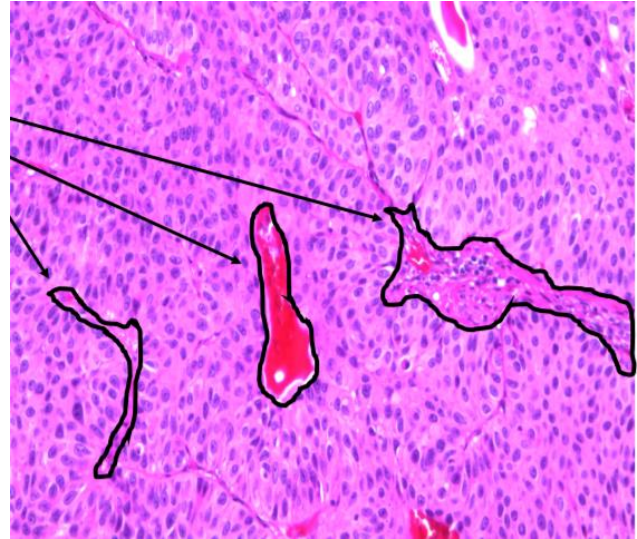
ΒΗΜΑ 3. Ορισμός ορίων περιοχής αξιολόγησης

- Τα TILS αξιολογήθηκαν εντός των ορίων του διηθητικού στοιχείου του όγκου
- Το διηθητικό όριο συμπεριλήφθηκε στην αξιολόγηση και δεν καταγράφηκε ξεχωριστά (ως διηθητικό όριο εκλήφθηκε η περιοχή 1 mm, η οποία διαχωρίζει το νεοπλασματικό στοιχείο από την παρακείμενη περιογκική περιοχή).
- TILS εκτός όγκου δεν καταμετρήθηκαν



Βήμα 4:Αξιολόγηση των TILS

- στην αξιολόγηση συμπεριλαμβάνονται τα TILS του στρώματος των αγγειοσυνδετικών αξόνων, εφόσον υπήρχε διήθηση αυτού.

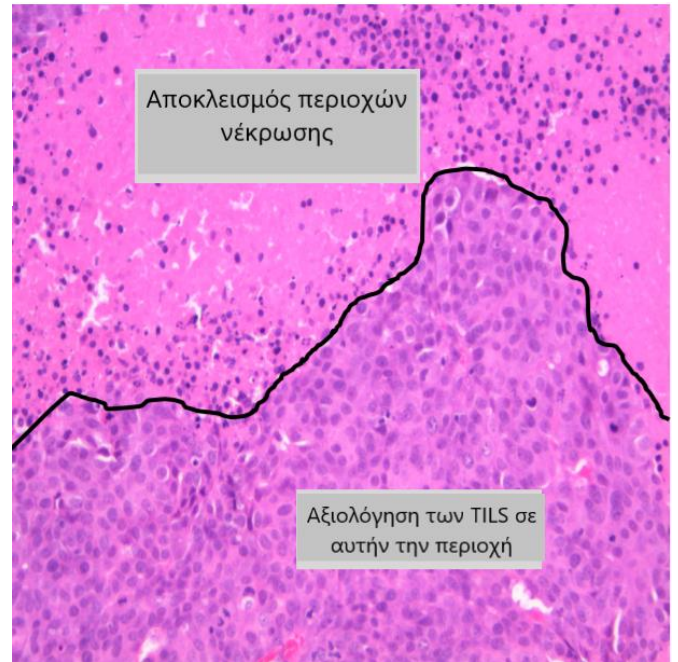


ΒΗΜΑ 5:Αξιολόγηση των TILS

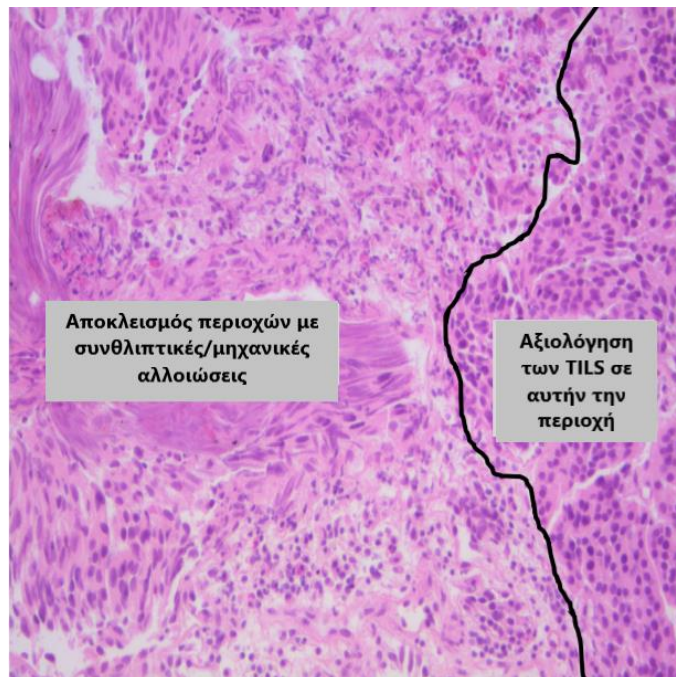
Στην αξιολόγηση ΔEN συμπεριλαμβάνονται τα TILS του στρώματος των αγγειοσυνδετικών αξόνων , εφόσον ΔEN υπήρχε διήθηση αυτού.



ΒΗΜΑ 6: Αξιολόγηση των TILS MONO σε βιώσιμες νεοπλασματικές περιοχές

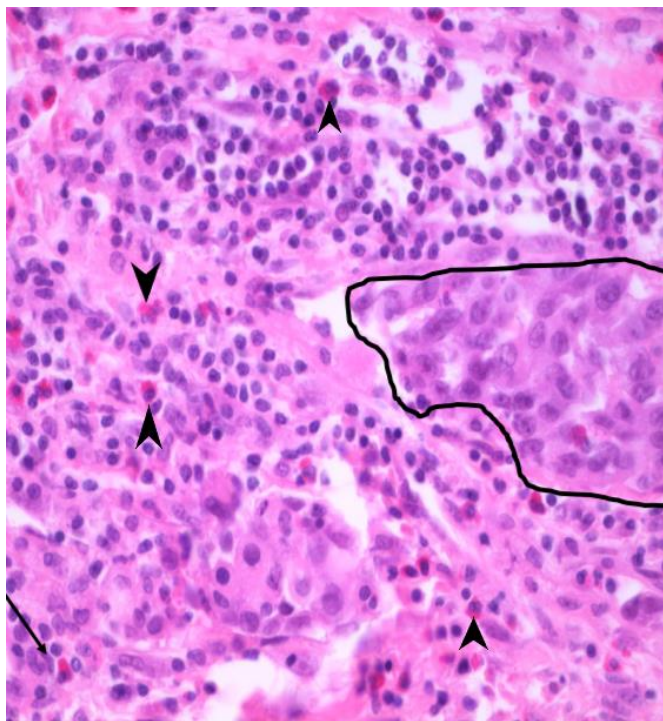


ΒΗΜΑ 7: Αξιολόγηση των TILS MONO στις περιοχές με καλά διατηρημένη μορφολογία των νεοπλασματικών κυττάρων.

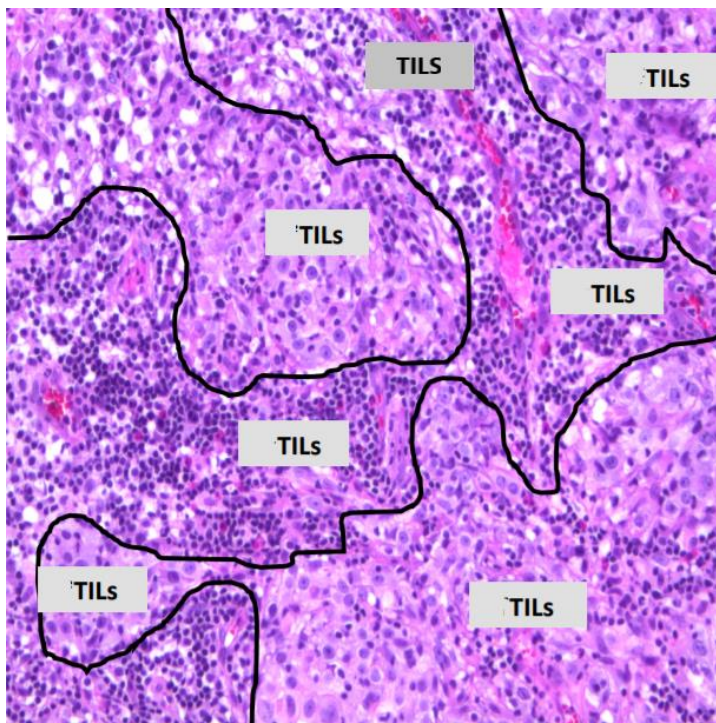


ΒΗΜΑ 8 : Καταμέτρηση ΜΟΝΟ των μονοπύρηνων κυττάρων

- Αποκλεισμός από την καταμέτρηση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων και ηωσινόφιλων λευκοκυττάρων

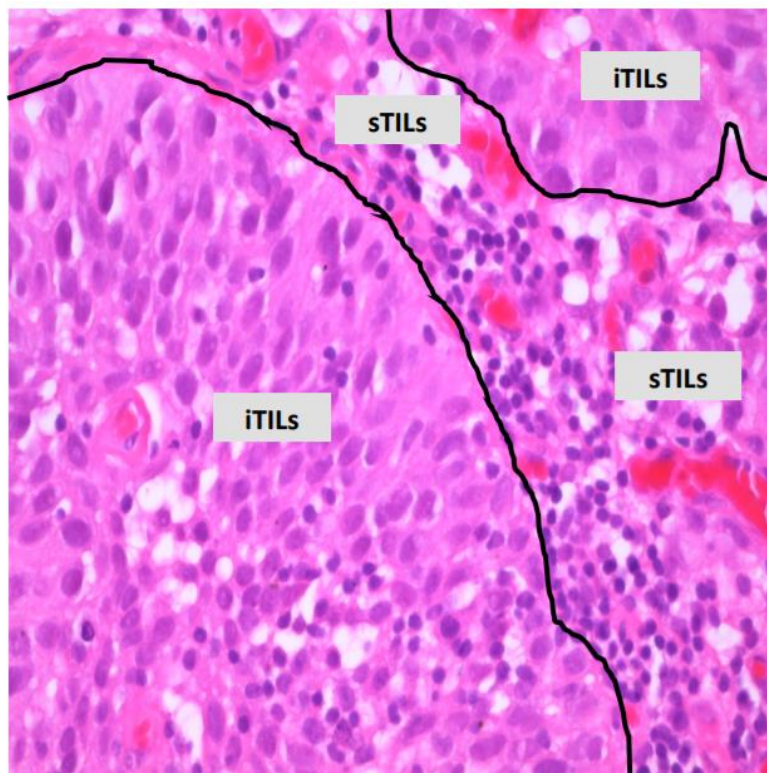


ΒΗΜΑ 9: TILs προς καταμέτρηση



ΒΗΜΑ 10 : Καταμέτρηση των ενδοογκικών (*intratumoral, iTILs*) και των στρωματικών (*stromal, sTILs*) TILs.

- iTILs = TILs που βρίσκονται σε άμεση επαφή με τα νεοπλασματικά κύτταρα ή απέχουν από αυτά απόσταση της τάξης μεγέθους ενός λεμφοκυττάρου.
- sTILs=TILs που βρίσκονται διάσπαρτα στο στρώμα μεταξύ των νεοπλασματικών αθροίσεων.



Αξιολογήθηκαν και καταμετρήθηκαν έως και 10 περιοχές από τον όγκο σε κάθε περίπτωση και καταγράφηκε ξεχωριστά το ποσοστό των iTILs και sTILs ανά περιοχή, αποφεύγοντας την μέτρηση στις θέσεις <<hot spot>>. Επιπλέον, ο μέσος όρος του ποσοστού των TILs καταγράφηκε σε κάθε περίπτωση ως τελικό αποτέλεσμα.

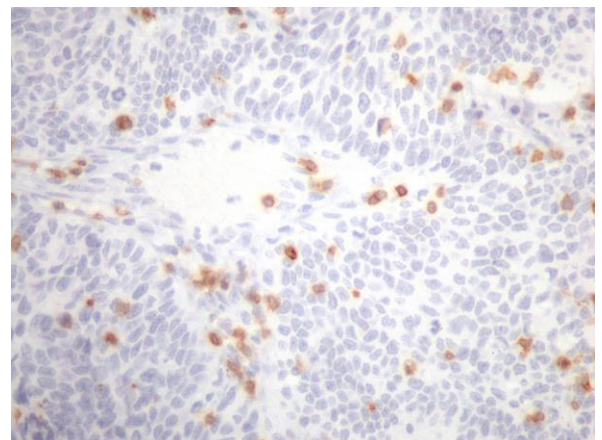
2.2.3 Εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των CD3,CD8 και FOXP3 κυττάρων έγινε από τους έμπειρους παθολογοανατόμους με την ενεργό συμμετοχή της υποψηφίας. Ως θετικότητα, ορίστηκε η σαφής μεμβρανική κυτταροπλασματική ανοσοχρώση για τα CD3 και CD8 λεμφοκύτταρα και η πυρηνική ανοσοχρώση για τα FOXP3 λεμφοκύτταρα. Καταμετρήθηκε ξεχωριστά ο αριθμός των στρωματικών (sCD3, sCD8,sFOXP3) και των ενδοογκικών (iCD3,iCD8,iFOXP3) λεμφοκυττάρων. Δεδομένου ότι σε κάποιες περιπτώσεις δεν ήταν ευχερής η διάκριση των στρωματικών και των ενδοογκικών λεμφοκυττάρων (π.χ. όγκοι με ελάχιστο στρώμα), καταγράφηκε και ο συνολικός αριθμός των θετικών λεμφοκυττάρων ανά περίπτωση (total CD3,CD8 και FOXP3).

Ο αριθμός των θετικών ανοσοκυττάρων καταμετρήθηκε σε τουλάχιστον 10 (εύρος 10-20) οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης (x400). Σε κάθε οπτικό πεδίο αξιολογήθηκαν: το ποσοστό του νεοπλασματικού στοιχείου που ήταν παρόν, (Tumor Cell Component, TCC), το ποσοστό του στρωματικού στοιχείου (Stromal Cell Component, SCC) και το ποσοστό του επιθηλιακού νεοπλασματικού στοιχείου (Epithelial Cell Component, EC). Η πυκνότητα (density) των θετικών ανοσοκυττάρων σε κάθε νεοπλαστικό στοιχείο (στρωματικό ή επιθηλιακό) υπολογίστηκε ως αναλογία του αριθμού των θετικών κυττάρων προς την εκτιμώμενη επιφάνεια του όγκου (mm²). Η επιφάνεια του κάθε νεοπλασματικού στοιχείου (στρωματικού ή επιθηλιακού) σε mm² υπολογίστηκε με βάση το ποσοστό του κάθε νεοπλασματικού στοιχείου επί της ολικής επιφάνειας του οπτικού πεδίου μεγάλης μεγέθυνσης (0,2374625mm² για την μεγέθυνση x400). Ενδεικτικά, αν υποθέσουμε ότι το TCC ήταν 100% ,το SC ήταν 20 % , το EC ήταν 80% , ο αριθμός των θετικών iCD3 ήταν 15 και ο αριθμός των sCD3 ήταν 60% τότε:

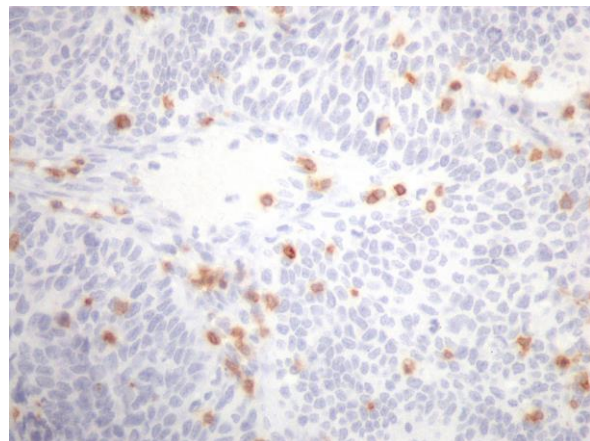
η πυκνότητα των iCD3 προσδιορίστηκε ως εξής:

$$\text{Density} = \frac{\text{Count (15)}}{\text{TCC}(100\%) \times \text{EC}(80\%) \times 0.2374625}$$



Και η πυκνότητα των sCD3 ως εξής:

$$\text{Density} = \frac{\text{Count (60)}}{\text{TCC(100\%) x SC(20\%) x 0.2374625}$$



Ο μέσος όρος των πυκνοτήτων (mean value) καταγράφηκε ως τελική πυκνότητα των θετικών ανοσοκυττάρων ανά περίπτωση, για κάθε λεμφοκυτταρικό πληθυσμό.

2.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

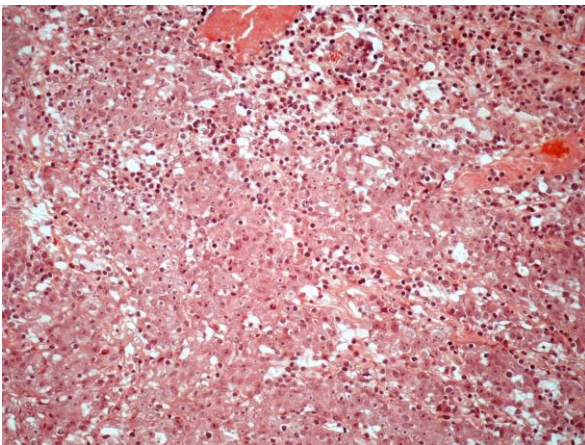
Η διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων των μελετηθέντων δεικτών μεταξύ τους πραγματοποιήθηκε με έλεγχο Spearman (μη παραμετρική μέθοδος) και με έλεγχο Pearson (παραμετρική μέθοδος). Ενδεχόμενες συσχετίσεις των μελετηθέντων δεικτών με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους ελέγχθηκαν με μη παραμετρική μέθοδο, για δύο ή περισσότερα δείγματα κατά Mann-Whitney και με χ^2 (chi-square) επί κατηγορικών μεταβλητών (Group comparisons of categorical data).

Οι καμπύλες επιβίωσης υπολογίσθηκαν με τον έλεγχο Kaplan-Meier και οι διαφορές ανάμεσα στις καμπύλες επιβίωσης εξετάσθηκαν με έλεγχο log-rank. Η στατιστική σημαντικότητα (p) ορίστηκε <0.05.

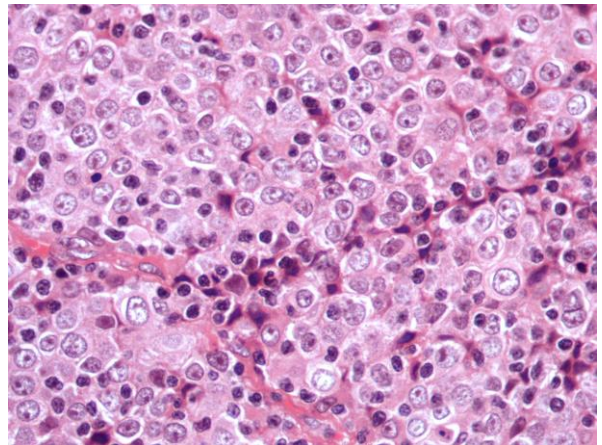
2.4 Αποτελέσματα

2.4.1 Κατανομή των TILS , ανοσοϊστοχημική έκφραση των CD3,CD8 και FOXP3 T-λεμφοκυττάρων και συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους

Η μέση τιμή του ποσοστού των συνολικών TILS (στρωματικών και ενδοεπιθηλιακών) ήταν 13,72 (ελάχιστη τιμή 1% , μέγιστη τιμή 60%). Υψηλότερα ποσοστά TILS παρατηρήθηκαν σε 32 περιπτώσεις (47%) ενώ χαμηλότερα ποσοστά σε 36 περιπτώσεις (53%). Όγκοι με υψηλά ποσοστά TILS ήταν προχωρημένων σταδίων ($\geq pT2$) συγκριτικά με όγκους αρχόμενου σταδίου ($pT1$) ($p < 0.004$). Επιπλέον ,σε όγκους με υψηλά ποσοστά TILS παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την απουσία νέκρωσης ($p < 0.030$). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των συνολικών TILS με τον βαθμό κακοήθειας και την παρουσία περινευρικής διήθησης. Οι συσχετίσεις των επιμέρους τιμών των στρωματικών και ενδοεπιθηλιακών TILS δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές.



Εικόνα 2.3: Περίπτωση ουροθηλιακού καρκινώματος με υψηλό ποσοστό TILs(H/E X200)



Εικόνα 2.4: Περίπτωση ουροθηλιακού καρκινώματος με υψηλό ποσοστό TILs(H/E X400)

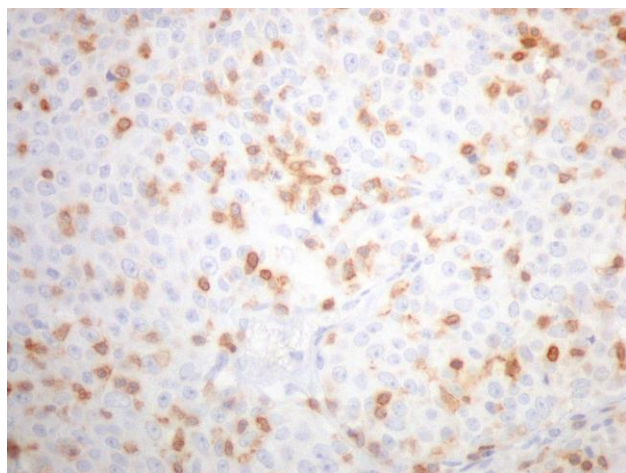
Οι μέσες και διάμεσες τιμές της πυκνότητας των στρωματικών CD3 , CD8 και FOXP3 ήταν υψηλότερες από εκείνες των ενδοεπιθηλιακών CD3 , CD8 και FOXP3. Συγκεκριμένα , η μέση τιμή για τα sCD3 ήταν 548,5 , για τα sCD8 521,9 και για τα sFOXP3 ήταν 213,2 , ενώ η μέση τιμή για

τα iCD3 ήταν 112,4 για τα iCD8 138.1 και για τα iFOXP3 11.6. Η διάμεση τιμή για τα sCD3 ήταν 492,3, για τα sCD8 455.8 και για τα sFOXP3 184.6, ενώ η διάμεση τιμή για τα iCD3 ήταν 85,1 , για τα iCD8 59.0 και για τα iFOXP3 ήταν 3,5.

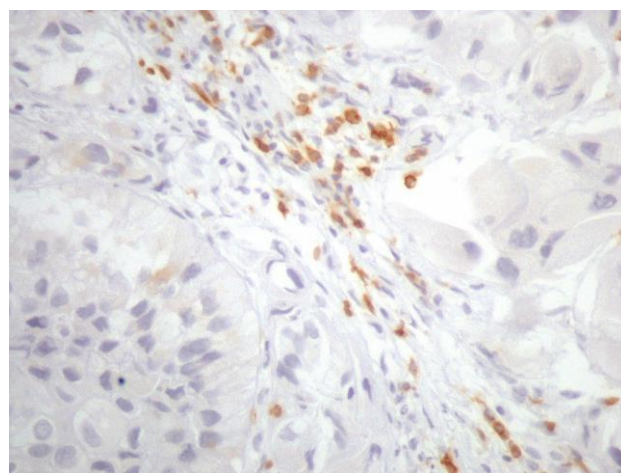
Στο σύνολο των επιμέρους λεμφοκυτταρικών πληθυσμών , η μέση τιμή για τα συνολικά CD3 (total CD3) ήταν 660,9, για τα CD8 (total CD8) 646.1 και για τα FOXP3 (total FOXP3) ήταν 224,8 , ενώ η διάμεση τιμή για τα CD3 (total CD3) ήταν 561,1 για τα CD8 (total CD8) 505.6 και για τα FOXP3 (total FOXP3) ήταν 192.6.

Σε ότι αφορά τις συσχετίσεις μεταξύ των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών CD3, CD8 και FOXP3 και των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων που μελετήθηκαν διαπιστώθηκε θετικά στατιστικώς σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της υψηλής πυκνότητας των iCD3, sCD8, iCD8, των συνολικών CD8 και της αγγειακής διήθησης ($p < 0.027$, $p < 0.013$, $p < 0.006$ και $p < 0.028$ αντίστοιχα).

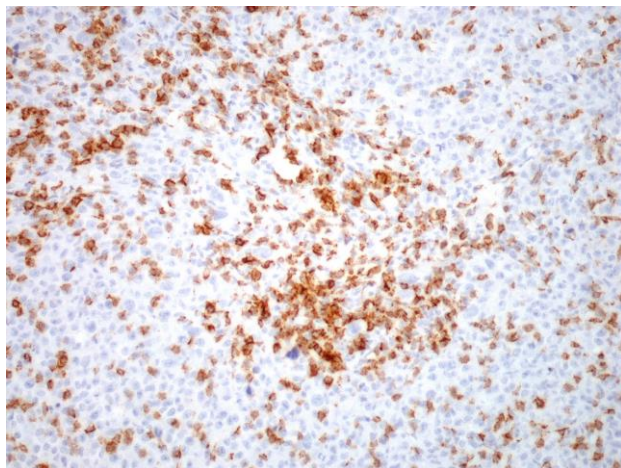
Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των πυκνοτήτων των sCD3, συνολικών CD3, sFOXP3, iFOXP3, και συνολικών FOXP3 με τις μελετηθείσες παθολογοανατομικές παραμέτρους. (Πίνακες 2.11, 2.12, 2.13, 2.14, 2.15)



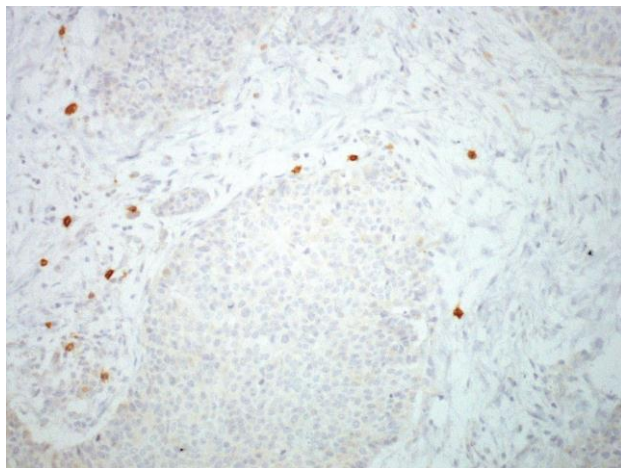
Εικόνα 2.5 :Περίπτωση ουροθηλιακού καρκινώματος με υψηλή πυκνότητα iCD3 (X400)



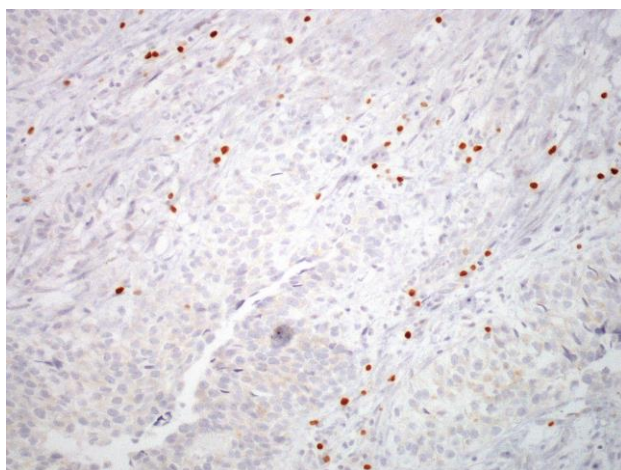
Εικόνα 2.6 :Περίπτωση ουροθηλιακού καρκινώματος με χαμηλή πυκνότητα iCD3 (X400)



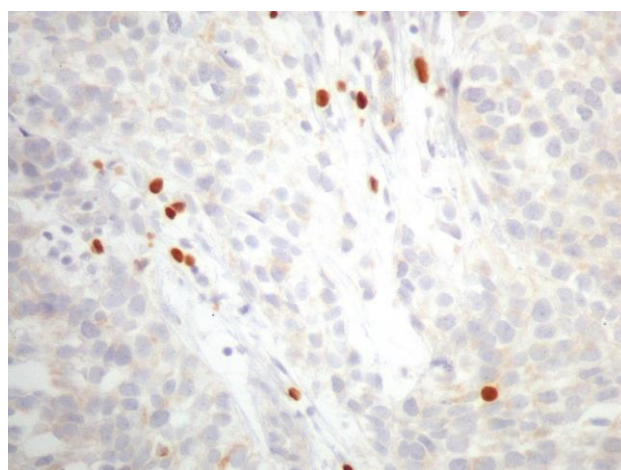
Εικόνα 2.7 :Περίπτωση ουροθηλιακού καρκινώματος με υψηλή πυκνότητα iCD8 και sCD8 λεμφοκυττάρων (X200)



Εικόνα 2.8 :Περίπτωση ουροθηλιακού καρκινώματος με χαμηλή πυκνότητα iCD8 και sCD8 λεμφοκυττάρων (X200)



Εικόνα 2.9 :Περίπτωση ουροθηλιακού καρκινώματος με υψηλή πυκνότητα sFOXP3 λεμφοκυττάρων (X200)



Εικόνα 2.10 :Περίπτωση ουροθηλιακού καρκινώματος με χαμηλή πυκνότητα sFOXP3 λεμφοκυττάρων (X400)

2.4.2 Συσχέτιση του ποσοστού των TILS και της πυκνότητας των CD3 ,CD8 και FOXP3 με την επιβίωση των ασθενών.

Στο χρονικό διάστημα παρακολούθησης των ασθενών (εύρος 1 μήνας -60 μήνες) σημειώθηκαν 47 θάνατοι (69,1 %). Στην πληθυσμιακή μας ομάδα , δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις της ολικής επιβίωσης με το ποσοστό των TILS και της πυκνότητας των CD3 ,CD8 και των FOXP3 λεμφοκυττάρων (Πίνακας 2,7).

Πίνακας 2.11: Συσχέτιση των TILs με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους

	TILs		p-value
	Χαμηλή	Υψηλή	
Βαθμός κακοήθειας			<0.067
χαμηλός	6(16.7)	1(3.1)	
υψηλός	30(83.3)	31(96.9)	
Στάδιο			<0.004
pT1(NMIBC)	16(44.4)	4(12.5)	
pT2+pT3+pT4(MIBC)	20(55.6)	28(87.5)	
Νέκρωση			<0.030
Αρνητική	29(80.6)	18(56.3)	
Θετική	7(19.4)	14(43.8)	
Αγγειακή διήθηση			0.400
Αρνητική	28(77.8)	22(68.8)	
Θετική	8(22.2)	10(31.3)	
Περινευρική διήθηση			0.248
Αρνητική	35(97.2)	29(90.6)	
Θετική	1(2.8)	3(9.4)	

Πίνακας 2.12: Συσχέτιση της πυκνότητας των CD3 λεμφοκυττάρων με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους

	sCD3			iCD3			Total CD3		
	Χαμηλό	Υψηλό	p-value	Χαμηλό	Υψηλό	p-value	Χαμηλό	Υψηλό	p-value
Βαθμός κακοήθειας			0.230			0.230			0.046
χαμηλός	5(15.2)	2(6.1)		5(15.2)	2(6.1)		6(18.2)	1(3.0)	
υψηλός	28(84.8)	31(93.6)		28(84.8)	31(93.9)		2(81.8)	32(97.0)	
Στάδιο			0.284			0.592			0.595
pT1(NMIBC)	12(36.4)	8(24.2)		9(27.3)	11(33.3)		11(33.3)	9(27.3)	
pT2+pT3+pT4(MIBC)	21(63.6)	25(75.8)		24(72.7)	22(66.7)		22(66.7)	24(72.7)	
Νέκρωση			0.792			0.792			0.792
Αρνητική	22(66.7)	23(69.7)		22(66.7)	23(69.7)		22(66.7)	23(69.7)	
Θετική	11(33.3)	10(30.3)		11(33.3)	10(30.3)		11(33.3)	10(30.3)	
Αγγειακή διήθηση			0.269			<0.027			0.269
Αρνητική	22(66.7)	26(78.8)		20(60.6)	28(84.8)		22(66.7)	26(78.8)	
Θετική	11(33.3)	7(21.2)		13(39.4)	5(15.2)		11(33.3)	7(21.2)	
Περινευρική διήθηση			0.076			0.555			0.076
Αρνητική	30(90.9)	33(100.0)		31(93.9)	32(97.0)		30(90.9)	33(100.0)	
Θετική	3(9.1)	0(0.0)		2(6.1)	1(3.0)		3(9.1)	0(0.0)	

Πίνακας 2.13: Συσχέτιση της πυκνότητας των CD8 λεμφοκυττάρων με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους

	sCD8			iCD8			Total CD8		
	Low	High	p-value	Low	High	p-value	Low	High	p-value
Βαθμός κακοήθειας			0.573			0.690			0.690
χαμηλός	4(12.5)	3(8.3)		4(11.8)	3(8.8)		4(11.8)	3(8.8)	
υψηλός	28(87.5)	33(91.7)		30(88.2)	31(91.2)		30(88.2)	31(91.2)	
Στάδιο			0.168			1			0.595
pT1(NMIBC)	12(37.5)	8(22.8)		10(29.4)	10(29.4)		11(32.4)	9(26.5)	
pT2+pT3+pT4(MIBC)	20(62.5)	28(77.8)		24(70.6)	24(70.6)		23(67.6)	25(73.5)	
Νέκρωση			0.643			0.431			0.793
Αρνητική	23(71.9)	24(66.7)		22(64.7)	25(73.5)		24(70.6)	23(67.6)	
Θετική	9(28.1)	12(33.3)		12(35.3)	9(26.5)		10(29.4)	11(32.4)	
Αγγειακή διήθηση			<0.013			<0.006			<0.028
Αρνητική	19(59.4)	31(86.1)		20(58.8)	30(88.2)		21(61.8)	29(85.3)	
Θετική	13(40.6)	5(13.9)		14(41.2)	4(11.8)		13(38.2)	5(14.7)	
Περινευρική διήθηση			0.362			1			1
Αρνητική	31(96.9)	33(91.7)		32(94.1)	32(94.1)		32(94.1)	32(94.1)	
Θετική	1(3.1)	3(8.3)		2(5.9)	2(5.9)		2(5.9)	2(5.9)	

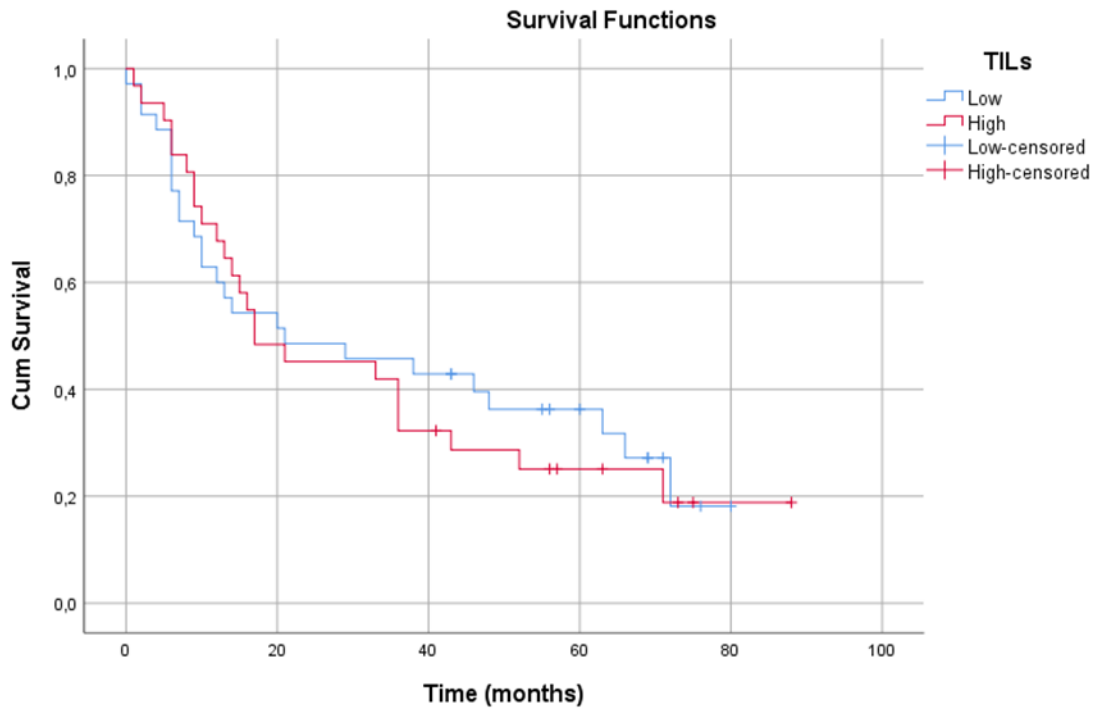
Πίνακας 2,14: Συσχέτιση της πυκνότητας των FOXP3 λεμφοκυττάρων με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους

	s FOXP3			i FOXP3			Total FOXP3		
	Χαμηλό	Υψηλό	p-value	Χαμηλό	Υψηλό	p-value	Χαμηλό	Υψηλό	p-value
Βαθμός κακοήθειας			0.325			0.383			0.325
χαμηλός	1(5.9)	0(0.0)		1(5.3)	0(0.0)		1(5.9)	0(0.0)	
υψηλός	16(94.1)	16(100.0)		18(94.7)	14(100.0)		16(94.1)	16(100.0)	
Στάδιο			0.922			0.618			0.922
pT1(NMIBC)	4(23.5)	4(25.0)		4(21.1)	4(28.6)		4(23.5)	4(25.0)	
pT2+pT3+pT4(MIBC)	13(76.5)	12(75.0)		15(78.9)	10(71.4)		13(76.5)	12(75.0)	
Νέκρωση			0.520			0.853			0.520
Αρνητική	11(64.7)	12(75.0)		13(68.4)	10(71.4)		11(64.7)	12(75.0)	
Θετική	6(35.3)	4(25.0)		6(31.6)	4(28.6)		6(35.3)	4(25.0)	
Αγγειακή διήθηση			0.805			0.803			0.805
Αρνητική	11(64.7)	11(68.8)		13(68.4)	9(64.3)		11(64.7)	11(68.8)	
Θετική	6(35.3)	5(31.3)		6(31.6)	5(35.7)		6(35.3)	5(31.3)	
Περινευρική διήθηση			0.325			0.383			0.325
Αρνητική	16(94.1)	16(100.0)		18(94.7)	14(100.0)		16(94.1)	16(100.0)	
Θετική	1(5.9)	0(0.0)		1(5.3)	0(0.0)		1(5.9)	0(0.0)	

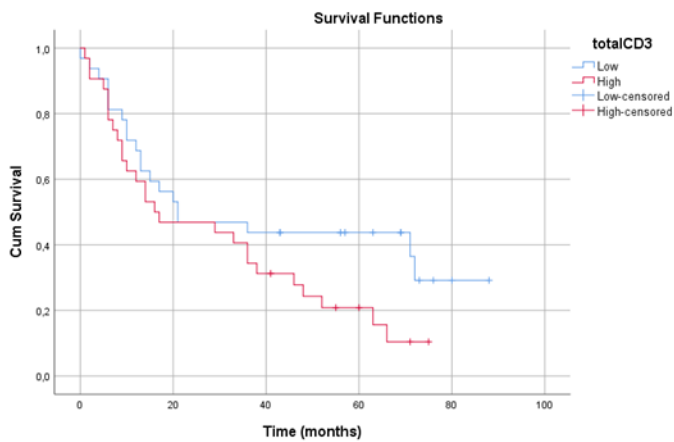
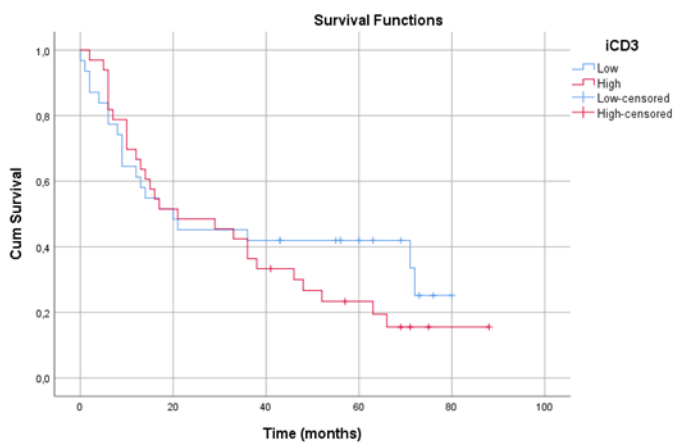
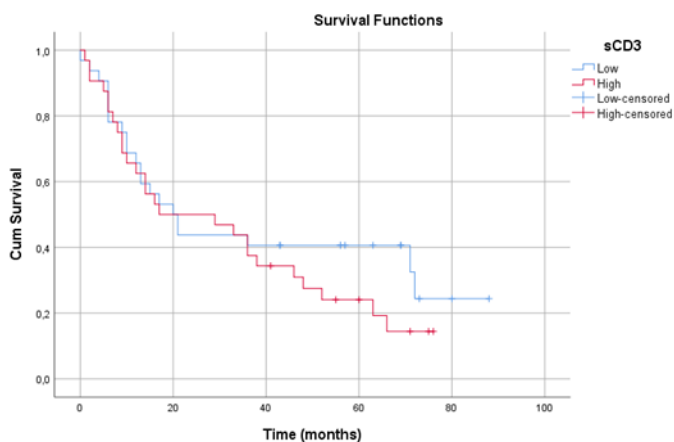
Πίνακας 2.15: *Ανάλυση επιβίωσης (Kaplan-Meier): μέσος όρος επιβίωσης όλων των ασθενών σε συσχέτιση με χαμηλή ή υψηλή έκφραση των TILs, totalCD3, sCD3, iCD3, total CD8, sCD8, iCD8, total FOXP3, sFOXP3 και iFOXP3*

ΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ			
	ΠΟΣΑ/ΣΥΝΟΛΟ	Μέσος όρος επιβίωσης (μήνες)	Log-rank P
Entire cohort			0.085
TILs			0.743
Χαμηλό	25/35	2.000±14.784	
Υψηλό	24/31	17.000±10.017	
Total CD3			
Χαμηλό	20/32	21.000±13.409	
Υψηλό	27/32	21.000±13.409	
sCD3			0.314
Χαμηλό	21/32	20.000±4.243	
Υψηλό	26/32	17.000±13435	
iCD3			0.409
Χαμηλό	20/31	20.000±12.799	
Υψηλό	26/32	21.000±10.335	
Total CD8			0.855
Χαμηλό	25/33	21.000±8.581	
Υψηλό	24/33	16.000±14.929	
sCD8			0.314
Χαμηλό	21/32	20.000±4.243	
Υψηλό	26/32	17.000±13.435	
iCD8			0.358
Χαμηλό	22/32	21.000±13.435	
Υψηλό	27/34	16.000±5.102	
Total FOXP3			0.100
Χαμηλό	13/17	36.000±12.852	
Υψηλό	12/14	14.000±0.926	
sFOXP3			0.411
Χαμηλό	14/17	20.000±10.804	
Υψηλό	11/14	14.000±3.742	
i FOXP3			0.858
Χαμηλό	15/19	17.000±5.078	
Υψηλό	26/32	17.000±6.062	

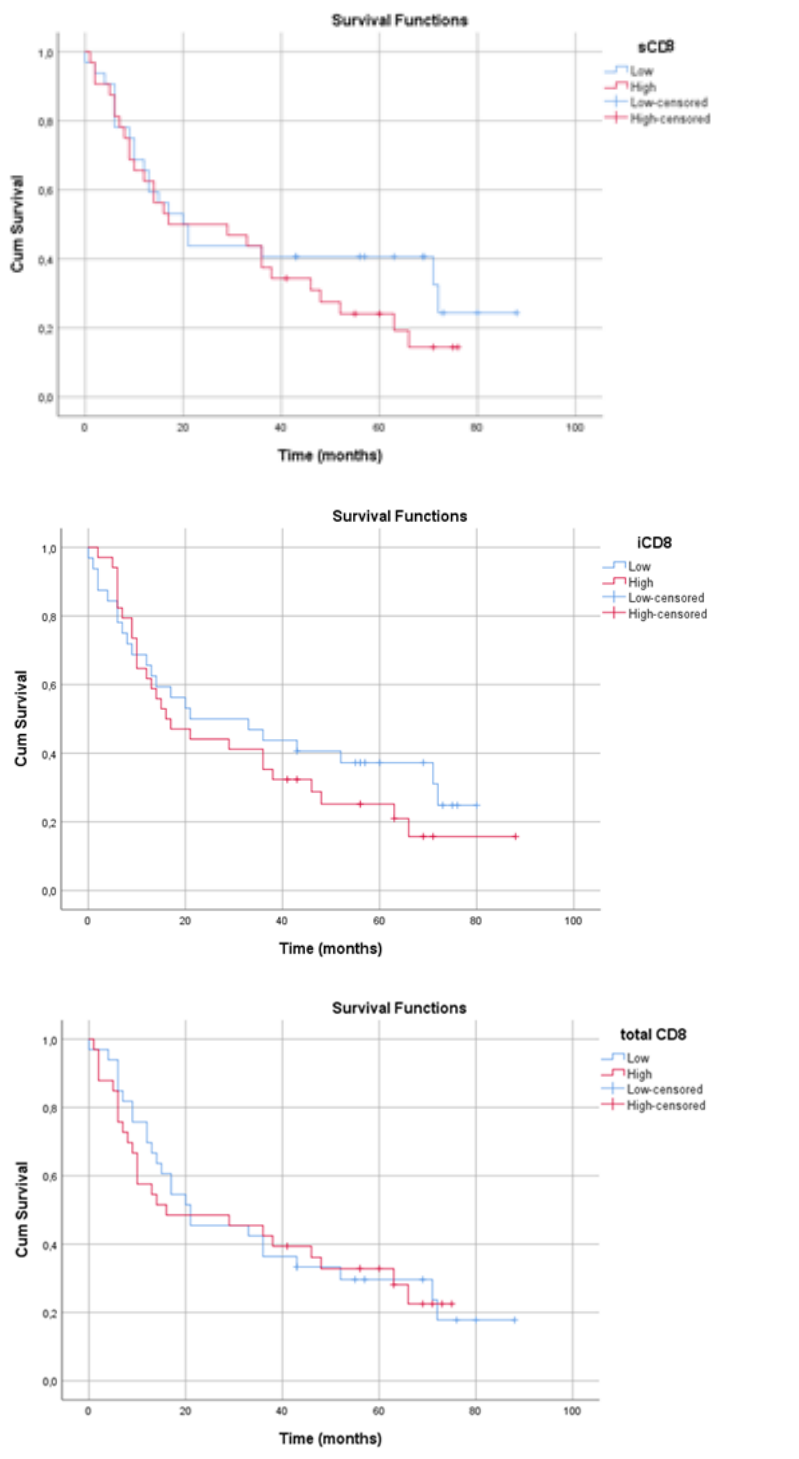
Εικόνα 2,16: Γραφήμα ολικής επιβίωσης των ασθενών σε συνάρτηση με τα TILs



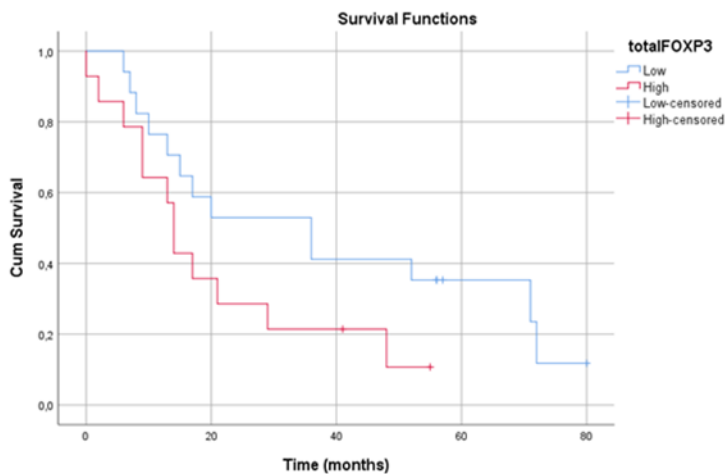
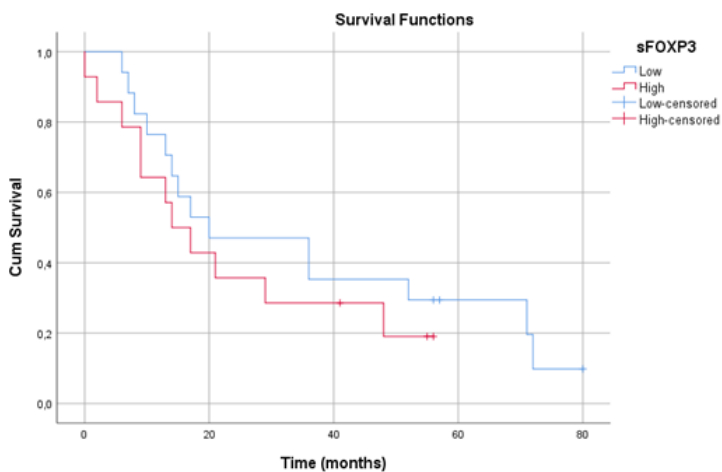
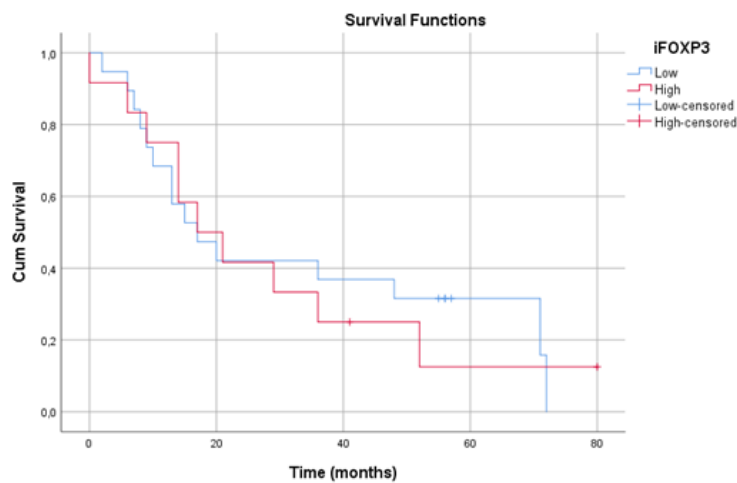
Εικόνα 2,17: Γραφήματα ολικής επιβίωσης των ασθενών σε συνάρτηση με τα sCD3 ,iCD3 και totalCD3



Εικόνα 2,18: Γραφήματα ολικής επιβίωσης των ασθενών σε συνάρτηση με τα *sCD8* ,*iCD8* και *totalCD8*



Εικόνα 2,19: Γραφήματα ολικής επιβίωσης των ασθενών σε συνάρτηση με τα sFOXP3 ,iFOXP3 και totalFOXP3



2.5 Συζήτηση

Στην παρούσα αναδρομική μελέτη αξιολογήθηκε το ποσοστό των TILs και η ανοσοϊστοχημική έκφραση των CD3, CD8 και FOXP3 σε καρκινώματα της ουροδόχου κύστης.

Τα κυριότερα ευρήματα της μελέτης περιλαμβάνουν: τα διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα(TILs) στο σύνολό τους καθώς και οι λεμφοκυτταρικοί υποπληθυσμοί με ανοσοφαινότυπο CD3+ και CD8+ φαίνεται να έχουν σημαντική συμβολή στην ανοσολογική απόκριση έναντι του καρκίνου, τα υψηλά ποσοστά των TILs σχετίζονται με προχωρημένα στάδια της νόσου και η υψηλή πυκνότητα των θετικών iCD3, iCD8, sCD8 και των total CD8 λεμφοκυττάρων εμφανίζει αντίστροφη συσχέτιση με την αγγειακή διήθηση.

Αν και το δείγμα των περιστατικών, που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη είναι περιορισμένο (n=68), ωστόσο η παρούσα μελέτη αποτελεί μια σχετικά ικανοποιητική αναλυτική προσέγγιση διερεύνηση του ρόλου του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος του καρκινώματος της ουροδόχου κύστης, τα αποτελέσματα της οποίας υποδηλώνουν ότι σε επιλεγμένους ίσως ασθενείς, η ανοσοθεραπεία θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπεία εκλογής ιδιαίτερα επί προόδου της νόσου.

Το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Διακρίνεται σε μη μυοδιηθητικό και μυοδιηθητικό με την ολική επιβίωση των ασθενών να είναι καλύτερη στον μη μυοδιηθητικό καρκίνο σε σχέση με την επιβίωση των ασθενών που έχουν κακοήθειες άλλων εντοπίσεων. Επίσης, το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης είναι ένα πλούσιο "ανοσολογικά" κακόηθες νεόπλασμα με μεγαλύτερη πιθανότητα ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού στα αντιγονικά του συστατικά. Επιπρόσθετα, η παρουσία των διηθούντων τον όγκο λεμφοκυττάρων (TILs) υποδεικνύει σαφώς την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού έναντι των καρκινικών κυττάρων.

Η προγνωστική αξία των TILs έχει διερευνηθεί σε αρκετές μελέτες και έχει αναφερθεί ότι το υψηλό TILs status στο καρκινικό μικροπεριβάλλον της ουροδόχου κύστης σχετίζεται με δυσμενή επιβίωση και αυξημένο ρυθμό υποτροπών σε ασθενείς με NMIBC, σε αντίθεση με τους ασθενείς με MIBC, όπου τα υψηλά ποσοστά των ανοσοκυττάρων σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση (Krpina 2015, Yu A et al 2018, Hui-Shan H 2018). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η επιθετική συμπεριφορά του όγκου σχετίζεται στενά με μία αυξημένη προσαρμοστική ανοσολογική απάντηση. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι ασθενείς με μεταστατικά καρκινώματα έχουν εξαιρετικά

αυξημένα ποσοστά TILS συγκριτικά με ασθενείς με μη μεταστατική νόσο (Hui-Shan H 2018). Το υψηλότερο φορτίο μεταλλάξεων θεωρητικά θα μπορούσε να συνοδεύεται από αύξηση των νεοαντιγόνων του όγκου που ενδεχομένως να αναγνωρίζονται καλύτερα από το ανοσοποιητικό σύστημα. Η θεωρητική αυτή προσέγγιση ενδεχομένως να εξηγεί το γεγονός ότι ο μεταστατικός όγκος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλό μεταλλακτικό φορτίο είναι πλούσιος σε TILS. Σε συμφωνία με τις πιο πάνω παρατηρήσεις, στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι όγκοι με υψηλά ποσοστά TILS ήταν προχωρημένων σταδίων, με διήθηση του μυϊκού χιτώνα αλλά και διήθηση παρακείμενων ανατομικών δομών.

Το αν η προγνωστική αξία των TILS σχετίζεται με την τοπογραφική τους εντόπιση στον όγκο δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί στην διεθνή βιβλιογραφία (Huang, HS.2018, Mathieu R.2018, Perez E.A et al 2016, Lois, S. et al 2013). Υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν θετική συσχέτιση των iTILS με ευνοϊκότερη πρόγνωση και των sTILS με δυσμενέστερη πρόγνωση. Στην μελέτη των Huang και συνεργατών, η ανάλυση των TILS σε 259 περιπτώσεις μεταστατικού ουροθηλιακού καρκίνου έδειξε ότι τα sTILS σχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με την επιβίωση. Στην μελέτη των Rouanne και συνεργατών το υψηλό sTILS status σχετίστηκε με αυξημένο βάθος διήθησης στους pT1 όγκους ωστόσο δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση με την επιβίωση. Στην παρούσα μελέτη οι επιμέρους τοπογραφικές αναλύσεις των sTILs και iTILs δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τις κλασικές προγνωστικές παθολογοανατομικές παραμέτρους και την ολική επιβίωση. Φαίνεται ότι η προγνωστική αξία των TILs εξαρτάται κατά πολύ και από την σημαντικότητα που προκύπτει κατόπιν της ταυτοποίησης των επιμέρους λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών, με ανοσοϊστοχημεία ή άλλες μεθοδολογίες. Τα TILs, όπως γνωρίζουμε συνίστανται από διαφορετικούς τύπους λεμφοκυτταρων με διαφορετικές βιολογικές δράσεις. Τα CD3+, CD4+(Th1) και CD8+ T λεμφοκύτταρα τα NK κύτταρα και μερικοί οι υπότυποι μακροφάγων αποτελούν μονοκυτταρικά φλεγμονώδη στοιχεία που ελέγχουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη ενός καρκινώματος. Αντίθετα η παρουσία των CD4+/Th2 κυττάρων, των M2 μακροφάγων, των MDSCs και των FOXP3+ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs) σχετίζεται με λιγότερο ευνοϊκά αποτελέσματα ως προς την ανοσολογική επίβλεψη του καρκινώματος και ενδεχομένως να συνεισφέρει στην δημιουργία ενός ανοσοκατασταλτικού περιβάλλοντος που θα επιτρέψει την περαιτέρω ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των CD3, CD8 και FOXP3 T λεμφοκυττάρων για δύο λόγους. Πρώτον διότι υπάρχουν δημοσιευμένα δεδομένα για τον πλεον

αξιόπιστο τρόπο αξιολόγησης της έκφρασης των εν λόγω λεμφοκυτταρικών πληθυσμών με ανοσοϊστοχημεία (Salgado, Galon J.2012). Δεύτερον ,διότι παρά τα όσα αντιφατικά αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας , οι περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι μάλλον αυτοί οι υποπληθυσμοί των T λεμφοκυττάρων έχουν ενδεχομένως προγνωστική αξία (Sabine H.2020 , Sharma P. 2007,Otto W.2012, Ingels A. 2014,Lipponen P.K 1992,Phannstiel C.2019,Wang B.2018).

Στην πρώτη σχετική μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2007, διαπιστώθηκε ότι τα ενδοογκικά CD8+ T λεμφοκύτταρα σχετίστηκαν με καλύτερη ολική και ελεύθερης νόσου επιβίωση των ασθενών με MIBC (Sharma P. 2007). Ακολούθως, στην άλλη μελέτη οι Otto και συνεργάτες παρατήρησαν ότι τα ενδοογκικά CD3+ T λεμφοκύτταρα έχουν θετική προγνωστική αξία στα NMIBC (Otto W.2012). Οι Ingels και συνεργάτες καθώς και οι Phannstiel και συνεργάτες βρήκαν ότι ο αυξημένος αριθμός των ενδο-ογκικών CD3+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων σχετίζεται με ευνοϊκή επιβίωση των MIBC (Phannstiel C.2019, Ingels A. 2014). Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών, οι Lipponen και συνεργάτες και Wang και συνεργάτες έδειξαν ότι ο αυξημένος αριθμός των CD8+ λεμφοκυττάρων σχετίζεται με δυσμενή ολική επιβίωση(Lipponen P.K 1992, Wang B. 2018). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι ο υψηλή πυκνότητα των CD3+ και CD8+ ανοσοκυττάρων φαίνεται να έχει θετική προγνωστική αξία. Παρά το γεγονός ότι δεν διαπιστώθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις της υψηλής έκφρασης των CD3+ και CD8+ λεμφοκυττάρων με το βαθμό κακοήθειας και το βάθος διήθησης των καρκινωμάτων (NMIBC vs MIBC), εν τούτοις η αντίστροφη αναλογική συσχέτιση της έκφρασης με την αγγειακή διήθηση είναι ιδιαίτερης σημαντικότητας. Η διήθηση των αγγείων αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα στους ασθενείς με κακοήθη νεοπλάσματα. Όγκοι με επιθετική εν γένει βιολογική συμπεριφορά συνοδεύονται συχνότερα με αγγειακή διήθηση, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η νεοαγγειογένεση συμβάλλει σημαντικά στην διασπορά των νεοπλασματικών κυττάρων. Η ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων να επάγουν την αγγειογένεση σχετίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις με αυξημένο κακοήθη δυναμικό του όγκου, αν και δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινισθεί, κατά πόσον η αύξηση του όγκου, οι μεταστάσεις και η κλινική πορεία των ασθενών εξαρτώνται αποκλειστικά από την αγγειογένεση.

Αναλύοντας την έκφραση των CD3 και CD8 λεμφοκυττάρων ανάλογα με την τοπογραφική κατανομή στον όγκο, διαπιστώθηκε ότι σε αντίθεση με τα CD3+ κύτταρα, η παρουσία όχι μόνο του συνολικού αριθμού των CD8+ λεμφοκυττάρων αλλά και η επιμέρους στρωματική και ενδοογκική

εντόπιση τους, είναι ιδιαίτερα σημαντική. Εξάλλου τα CD8+ λεμφοκύτταρα είναι λειτουργικά τα κύρια κυτταροτοξικά ανοσοκύτταρα, που συμβάλλουν καθοριστικά στην προσαρμοστική ανοσολογική απάντηση εναντίον του καρκίνου μέσω της ικανότητας τους να έρχονται σε άμεση επαφή με τα καρκινικά κύτταρα και να ασκούν την καταστροφική τους δράση (παπερ20/56). Είναι κατανοητό συνεπώς ότι η αυξημένη παρουσία των CD8 λεμφοκυττάρων στον όγκο αποτελεί σημαντική ευνοϊκή παράμετρο για τον ξενιστή οργανισμό.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε επιπρόσθετα ο προγνωστικός ρόλος των FOXP3 + T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs). Τα Tregs θεωρούνται αποτελεσματικοί καταστολείς της αντικαρκινικής ανοσοαπόκρισης και ως εκ τούτου σχετίζονται με κακή έκβαση των ασθενών. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις στη βιβλιογραφία για μια παράδοξη θετική προγνωστική επίδραση των Tregs σε ορισμένες κακοήθειες. Έτσι στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η παρουσία των Tregs σχετίστηκε με καλή πρόγνωση ενώ αντίθετα σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα ή καρκίνο των ωοθηκών, σχετίστηκε με κακή πρόγνωση (Salama P.2009, Curiel TJ 2004, Woo EY 2001).

Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, τα αποτελέσματα σε ότι αφορά την προγνωστική αξία των Tregs είναι αντιφατικά. Σε άλλες μελέτες η αυξημένη παρουσία τους σχετίζεται με φτωχή επιβίωση ελεύθερης υποτροπών, σε άλλες με ευνοϊκή επιβίωση ενώ σε άλλες δεν διαφαίνεται καμία προγνωστική αξία(Miyake M 2017, Murai R. 2018, Winerdal ME 2011). Στη μελέτη μας δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις των FOXP3 λεμφοκυττάρων με καμία από τις παθολογοανατομικές παραμέτρους που μελετήθηκαν καθώς και με την επιβίωση των ασθενών. Η ασυμφωνία γενικά στη βιβλιογραφία πιθανώς να οφείλεται στην εσφαλμένη ταυτοποίηση των Tregs του όγκου, στο προφίλ του φλεγμονώδους διηθήματος αλλά και το στάδιο του εκάστοτε όγκου (Winerdal ME ,2018).

Τα τελευταία χρόνια, που προωθούνται κλινικές εφαρμογές της ανοσοθεραπείας, κάθε ερευνητική μελέτη η οποία προσφέρει δεδομένα ικανά να συμβάλουν στην κατανόηση του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος ενός όγκου και των μηχανισμών που διέπουν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού έναντι των καρκινικών κυττάρων είναι πολύτιμη, όχι μόνο για την διαχείριση αλλά και την θεραπεία του καρκίνου. Υπάρχει πλέον η πεποίθηση, ότι η ανοσοθεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα ουροδόχου κύστης μπορεί να αποδώσει σημαντικό όφελος. Η αποκάλυψη του άξονα PD-1/PD-L1 έχει ήδη ανοίξει νέους ορίζοντες ως προς την ενίσχυση της ανοσιακής απάντησης του οργανισμού έναντι του

καρκίνου. Ο προσδιορισμός των TILS και η ανίχνευση της έκφρασης των CD3 και CD8 λεμφοκυττάρων καθώς επίσης και της έκφρασης του PD-1 μπορούν να αποτελέσουν πολλά υποσχόμενες προγνωστικούς βιοδείκτες για τους ασθενείς με καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης.

2.6 Συμπεράσματα

Στην παρούσα αναδρομική μελέτη :

1. Αναδείχθηκαν υψηλά ποσοστά TILS στο 47% των περιπτώσεων ουροθηλιακών καρκινωμάτων, εύρημα το οποίο υποδεικνύει ότι ο εν λόγω καρκίνος αποτελεί έναν πλούσιο ‘‘ανοσολογικά’’ κακόηθες νεόπλασμα με μεγάλη πιθανότητα πρόκλησης ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού στα αντιγονικά του στοιχεία.
2. Διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των υψηλών ποσοστών TILS και των προχωρημένων σταδίων της νόσου. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι: i) όγκοι με επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά προκαλούν εντονότερη ανοσολογική απόκριση μέσω της στρατολόγησης ποικίλων τύπων ανοσοκυττάρων, ii) ο προσδιορισμός των TILS μπορεί δυνητικά να επιβοηθήσει τον σχεδιασμό στον σχεδιασμό θεραπευτικών σχημάτων και να προβλέψει αποτελεσματικά την θεραπευτική ανταπόκριση των ασθενών με τοπικά προχωρημένη ή και μεταστατική νόσο.
3. Βρέθηκε στατιστικώς σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της υψηλής πυκνότητας των iCD3+ sCD8+, iCD8+ ολικών (total) CD8+ και της αγγειακής διήθησης. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι τα CD8 + λεμφοκύτταρα, ασχέτως τοπογραφικής εντόπισης, είναι τα κύριως επικρατούντα στον όγκο ανοσοκύτταρα, τα οποία συμβάλλουν αποτελεσματικά στην προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση έναντι των καρκινικών κυττάρων μειώνοντας σημαντικά την ανάγκη συμμετοχής και άλλων ανοσοκυττάρων και τα οποία αναχαιτίζουν την οποιαδήποτε διασπορά νεοπλασματικών κυττάρων μέσω των αγγείων.
4. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της πυκνότητας των FOXP3+ Tregs και των παθολογοανατομικών παραμέτρων που μελετήθηκαν. Τα Tregs αποτελούν έναν αμφιλεγόμενο σε προγνωστική αξία υποπληθυσμό T λεμφοκυττάρων με εξαιρετική ενδοογκική ετερογένεια. Η βελτίωση των μεθοδολογιών για την ακριβέστερη ταυτοποίηση τους στον ιστό ενδεχομένως να συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου τους, στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

5. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις, μεταξύ της παρουσίας των ανοσοκυττάρων στο νεοπλασματικό ιστό και της επιβίωσης. Παρά το γεγονός ότι τα δεδομένα επιβίωσης κατά την κλινική παρακολούθηση (follow-up) των ασθενών ήταν επαρκή, το σχετικά μικρό δείγμα ($n=68$) των περιστατικών που εντάχθηκαν στην μελέτη ενδεχομένως να αποτελεί σοβαρό περιοριστικό παράγοντα για τη διεξαγωγή αποτελεσμάτων με επίπτωση στην επιβίωση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Akhtar M, Al-Bozom IA, Ben Gashir M, Taha NM. Intrinsic Molecular Subclassification of Urothelial Carcinoma of the Bladder: Are We Finally there? *Adv Anat Pathol*. 2019 Jul;26(4):251-256. doi: 10.1097/PAP.000000000000235. PMID: 31188799.

Al Hussain TO, Akhtar M. Molecular basis of urinary bladder cancer. *Adv Anat Pathol*. 2013 Jan;20(1):53-60. doi: 10.1097/PAP.0b013e31827bd0ec. PMID: 23232572.

Atanasov G, Potner C, Aust G, Schierle K, Dietel C, Benzing C, Krenzien F, Bartels M, Eichfeld U, Schmelzle M, Bahra M, Pascher A, Wiltberger G (2018) TIE2-expressing monocytes and M2-polarized macrophages impact survival and correlate with angiogenesis in adenocarcinoma of the pancreas. *Oncotarget* 9(51):29715–29726. 10.18632/oncotarget.25690. [PubMed: 30038715]

Ayari C, LaRue H, Hovington H, Decobert M, Harel F, Bergeron A, Tetu B, Lacombe L, Fradet Y (2009) Bladder tumor infiltrating mature dendritic cells and macrophages as predictors of response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Eur Urol* 55(6):1386–1395. Epub 2009/02/06. 10.1016/j.eururo.2009.01.040 [PubMed: 19193487]

Balbi JC, Larrinaga MT, De Stefani E, Mendilaharsu M, Ronco AL, Boffetta P, Brennan P. Foods and risk of bladder cancer: a case-control study in Uruguay. *Eur J Cancer Prev* 2001;10(5):453-8

Baras AS, Drake C, Liu JJ, Gandhi N, Kates M, Hoque MO, Meeker A, Hahn N, Taube JM, Schoenberg MP, Netto G, Bivalacqua TJ (2016) The ratio of CD8 to Treg tumor-infiltrating lymphocytes is associated with response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in patients with muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Oncoimmunology* 5(5):e1134412. 10.1080/2162402x.2015.1134412. [PubMed: 27467953]

Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, Vogelzang NJ, Climent MA, Petrylak DP, Choueiri TK, Necchi A, Gerritsen W, Gurney H, Quinn DI, Culine S, Sternberg CN, Mai Y, Poehlein CH, Perini RF, Bajorin DF; KEYNOTE-045 Investigators. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 2017 Mar 16;376(11):1015-1026. doi: 10.1056/NEJMoa1613683. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28212060; PMCID: PMC5635424.

Bottcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Blees H, Cabeza-Cabrerizo M, Sammiceli S, Rogers NC, Sahai E, Zelenay S, Reis e Sousa C (2018) NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor

Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* 172(5):1022–1037.e14. 10.1016/j.cell.2018.01.004. [PubMed: 29429633]

Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 May;56(5):739-45. doi: 10.1007/s00262-006-0272-1. Epub 2006 Dec 29. PMID: 17195077.

Castelao, J., Yuan, JM., Gago-Dominguez, M. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention. *Br J Cancer* 82, 1364–1369 (2000). <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.1106>

Chen C, He W, Huang J, Wang B, Li H, Cai Q, Su F, Bi J, Liu H, Zhang B, Jiang N, Zhong G, Zhao Y, Dong W, Lin T (2018) LNMAT1 promotes lymphatic metastasis of bladder cancer via CCL2 dependent macrophage recruitment. *Nat Commun* 9(1):3826. 10.1038/s41467-018-06152-x. [PubMed: 30237493]

Chemoimmunomodulating strategy. *Clin Immunol* 193:60–69. Epub 2018/02/08. 10.1016/j.clim.2018.01.012 [PubMed: 29410331]

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013 Jul 25;39(1):1-10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012. PMID: 23890059.

Costa R, Carneiro BA, Taxter T, Tavora FA, Kalyan A, Pai SA, Chae YK, Giles FJ. FGFR3-TACC3 fusion in solid tumors: mini review. *Oncotarget.* 2016 Aug 23;7(34):55924-55938. doi: 10.18632/oncotarget.10482. PMID: 27409839; PMCID: PMC5342462.

Colt, J., Karagas, M., Schwenn, M., Baris, D., Johnson, A., Stewart, P., Verrill, C., Moore, L., Lubin, J., Ward, M., Samanic, C., Rothman, N., Cantor, K., Beane Freeman, L., Schned, A., Cherala, S. and Silverman, D., 2010. Occupation and bladder cancer in a population-based case-control study in Northern New England. *Occupational and Environmental Medicine*, 68(4), pp.239-249.

Cumberbatch, M., Rota, M., Catto, J. and La Vecchia, C., 2016. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *European Urology*, 70(3), pp.458-466.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine.* 2004;10(9):942-9.

Di Martino E, Tomlinson DC, Knowles MA. A Decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present, and Future Challenges. *Adv Urol.* 2012;2012:429213. doi: 10.1155/2012/429213. Epub 2012 Jul 31. PMID: 22899908; PMCID: PMC3415141.

Doddamani, S. C., Bhat, S., & Jacob, A. (2015). Urinary bladder leiomyosarcoma following radiotherapy in a patient with bilateral retinoblastoma: A case report. *Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India*, 31(4), 366–368. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.166471>

Doddamani, S. C., Bhat, S., & Jacob, A. (2015). Urinary bladder leiomyosarcoma following radiotherapy in a patient with bilateral retinoblastoma: A case report. *Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India*, 31(4), 366–368. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.166471>

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):991-8. doi: 10.1038/ni1102-991. PMID: 12407406.

Eriksson P, Aine M, Veerla S, Liedberg F, Sjö Dahl G, Höglund M. Molecular subtypes of urothelial carcinoma are defined by specific gene regulatory systems. *BMC Med Genomics.* 2015 May 26;8:25. doi: 10.1186/s12920-015-0101-5. PMID: 26008846; PMCID: PMC4446831.

Faraj SF, Munari E, Guner G, Taube J, Anders R, Hicks J, Meeker A, Schoenberg M, Bivalacqua T, Drake C, Netto GJ (2015) Assessment of tumoral PD-L1 expression and intratumoral CD8+ T cells in urothelial carcinoma. *Urology* 85(3):703 e1–703 e6. 10.1016/j.urology.2014.10.020.

Faraj SF, Munari E, Guner G, Taube J, Anders R, Hicks J, Meeker A, Schoenberg M, Bivalacqua T, Drake C, Netto GJ. Assessment of tumoral PD-L1 expression and intratumoral CD8+ T cells in urothelial carcinoma. *Urology.* 2015 Mar;85(3):703.e1-6. doi: 10.1016/j.urology.2014.10.020. PMID: 25733301; PMCID: PMC4695997.

“FDA approves first cancer treatment for any solid tumor with specific biomarker. *Oncol Times* 2017.39:52-53

Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters

BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med.* 2012 Oct 3;10:205. doi: 10.1186/1479-5876-10-205. PMID: 23034130; PMCID: PMC3554496.

Giridhar, Karthik V and Manish Kohli. "Management of Muscle-Invasive Urothelial Cancer and the Emerging Role of Immunotherapy in Advanced Urothelial Cancer." *Mayo Clinic Proceedings* 92 (2017): 1564–1582.

Gartrell RD, Marks DK, Hart TD, Li G, Davari DR, Wu A, Blake Z, Lu Y, Askin KN, Monod A, Esancy CL, Stack EC, Jia DT, Armenta PM, Fu Y, Izaki D, Taback B, Rabadan R, Kaufman HL, Drake CG, Horst BA, Saenger YM (2018) Quantitative analysis of immune infiltrates in primary melanoma. *Cancer Immunol Res* 6(4):481–493. 10.1158/2326-6066.CIR-17-0360. [PubMed: 29467127]

Gabrilovich DI (2017) Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res* 5(1):3–8. 10.1158/2326-6066.Cir-16-0297. [PubMed: 28052991]

Harper HL, McKenney JK, Heald B, Stephenson A, Campbell SC, Plesec T, Magi-Galluzzi C. Upper tract urothelial carcinomas: frequency of association with mismatch repair protein loss and lynch syndrome. *Mod Pathol.* 2017 Jan;30(1):146-156. doi: 10.1038/modpathol.2016.171. Epub 2016 Oct 7. PMID: 27713421. D

Hatogai K, Kim D, Zha Y, Steinberg GD, Pearson AT, Gajewski TF, Sweis RF (2019) Multichannel immunofluorescence imaging to assess the immune composition of tumor microenvironment in bladder cancer. *Cancer Res* 79(13 Suppl) Abstract number 1093

Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrin A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014 Nov 27;515(7528):563-7. doi: 10.1038/nature14011. PMID: 25428504; PMCID: PMC4836193.

Horn T, Laus J, Seitz AK, Maurer T, Schmid SC, Wolf P, Haller B, Winkler M, Retz M, Nawroth R, Gschwend JE, Kubler HR, Slotta-Huspenina J (2016) The prognostic effect of tumour-infiltrating lymphocytic subpopulations in bladder cancer. *World J Urol* 34(2):181–187. Epub 2015/06/10. 10.1007/s00345-015-1615-3 [PubMed: 26055646]

Horn T, Laus J, Seitz AK, Maurer T, Schmid SC, Wolf P, Haller B, Winkler M, Retz M, Nawroth R, Gschwend JE, Kübler HR, Slotta-Huspenina J. The prognostic effect of tumour-infiltrating lymphocytic subpopulations in bladder cancer. *World J Urol*. 2016 Feb;34(2):181-7. doi: 10.1007/s00345-015-1615-3. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26055646.

Huang HS, Su HY, Li PH, Chiang PH, Huang CH, Chen CH, Hsieh MC. Prognostic impact of tumor infiltrating lymphocytes on patients with metastatic urothelial carcinoma receiving platinum based chemotherapy. *Sci Rep*. 2018 May 10;8(1):7485. doi: 10.1038/s41598-018-25944-1. PMID: 29748589; PMCID: PMC5945658.

Huang, HS., Su, H.Y.L., Li, PH. et al. Prognostic impact of tumor infiltrating lymphocytes on patients with metastatic urothelial carcinoma receiving platinum based chemotherapy. *Sci Rep* 8, 7485 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25944-1>

Inamura K. Bladder Cancer: New Insights into Its Molecular Pathology. *Cancers (Basel)*. 2018 Apr 1;10(4):100. doi: 10.3390/cancers10040100. PMID: 29614760; PMCID: PMC5923355.

Ingels, A.; Salas, R.E.S.; Ravery, V.; Fromont-Hankard, G.; Validire, P.; Patard, J.-J.; Pignot, G.; Prapotnich, D.; Olivier, F.; Galiano, M.; et al. T-helper 1 immunoreaction influences survival in muscle-invasive bladder cancer: Proof of concept. *Ecancermedicalscience* 2014, 8. [CrossRef]

Kamoun, A., de Reyniès, A., Allory, Y., Sjö Dahl, G., Robertson, A.G., Seiler, R., Hoadley, K.A., Groeneveld, C.S., Al-Ahmadie, H., Choi, W., Castro, M.A.A., Fontugne, J., Eriksson, P., Mo, Q., Kardos, J., Zlotta, A., Hartmann, A., Dinney, C.P., Bellmunt, J., Powles, T., Malats, N., Chan, K.S., Kim, W.Y., McConkey, D.J., Black, P.C., Dyrskjöt, L., Höglund, M., Lerner, S.P., Real, F.X., Radvanyi, F., Bladder Cancer Molecular Taxonomy Group, 2020. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur. Urol.* 77, 420–433. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.09.006>

Keehn A, Ludmir E, Taylor J, Rabbani F. Incidence of bladder cancer after radiation for prostate cancer as a function of time and radiation modality. *World J Urol* 2017; 35:713.

KM, Lichtenberg TM, Wu CJ, Schultz N, Getz G, Meyerson M, Mills GB, McConkey DJ; TCGA Research Network, Weinstein JN, Kwiatkowski DJ, Lerner SP. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*. 2017 Oct 19;171(3):540-556.e25. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.007. Epub 2017 Oct 5. Erratum in: *Cell*. 2018 Aug 9;174(4):1033. PMID: 28988769; PMCID: PMC5687509.

Krpina K, Babarovic E, Jonjic N (2015) Correlation of tumor-infiltrating lymphocytes with bladder cancer recurrence in patients with solitary low-grade urothelial carcinoma. *Virchows Arch* 467(4):443–448. Epub 2015/07/29. 10.1007/s00428-015-1808-6 [PubMed: 26215559]

Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhaijee F, Hübner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA Jr. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2509-20. doi: 10.1056/NEJMoa1500596. Epub 2015 May 30. PMID: 26028255; PMCID: PMC4481136.

Letašiová S, Medve'ová A, Šovčíková A, Dušinská M, Volkovová K, Mosoiu C, Bartonová A. Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environ Health*. 2012 Jun 28;11 Suppl 1(Suppl 1):S11. doi: 10.1186/1476-069X-11-S1-S11. PMID: 22759493; PMCID: PMC3388449.

Lipponen, P.K.; Eskelinen, M.J.; Jauhiainen, K.; Harju, E.; Terho, R. Tumor infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur. J. Cancer* 1992, 29A, 69–75.

Loi, S. et al. Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *Journal of Clinical Oncology*. 31, 860–7 (2013)

Loskog A, Ninalga C, Paul-Wetterberg G, de la Torre M, Malmstrom PU, Totterman TH (2007) Human bladder carcinoma is dominated by T-regulatory cells and Th1 inhibitory cytokines. *J Urol* 177(1):353–358. Epub 2006/12/13. 10.1016/j.juro.2006.08.078 [PubMed: 17162090]

Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P (2017) Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 14(7):399–416. 10.1038/nrclinonc.2016.217. [PubMed: 28117416]

McConkey DJ, Choi W. Molecular Subtypes of Bladder Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2018 Aug 20;20(10):77. doi: 10.1007/s11912-018-0727-5. PMID: 30128829.

Mhaweche-Fauceglia P, Cheney RT, Fischer G, Beck A, Herrmann FR. FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2006 Mar;32(2):231-7. doi: 10.1016/j.ejso.2005.11.018. Epub 2006 Jan 18. PMID: 16412606.

Miyake M, Tatsumi Y, Gotoh D, Ohnishi S, Owari T, Iida K, Ohnishi K, Hori S, Morizawa Y, Itami Y, Nakai Y, Inoue T, Anai S, Torimoto K, Aoki K, Shimada K, Konishi N, Tanaka N, Fujimoto K (2017) Regulatory T cells and tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment in Hatogai and Sweis Page 12 non-muscle invasive bladder cancer treated with intravesical bacille calmette-guerin: a long-term follow-up study of a Japanese cohort. *Int J Mol Sci* 18(10). 10.3390/ijms18102186.

Miyara M, Sakaguchi S (2011) Human FoxP3(+) CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* 89(3):346–351. Epub 2011/02/09. 10.1038/icb.2010.137 [PubMed: 21301480]

Murai R, Itoh Y, Kageyama S, Nakayama M, Ishigaki H, Teramoto K, Narita M, Yoshida T, Tomita K, Kobayashi KI, Wada A, Nagasawa M, Kubota S, Ogasawara K, Kawauchi A (2018) Prediction of intravesical recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer by evaluation of intratumoral Foxp3+ T cells in the primary transurethral resection of bladder tumor specimens. *PLoS One* 13(9):e0204745. 10.1371/journal.pone.0204745. [PubMed: 30261082]

Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015 May-Jun;4(3):215-66. doi: 10.1002/wdev.176. Epub 2015 Mar 13. PMID: 25772309; PMCID: PMC4393358.

O'Keane JC. Carcinoma of the urinary bladder after treatment with cyclophosphamide. *N Engl J Med* 1988; 319:871.

Otto, W.; Denzinger, S.; Wieland, W.F.; Hartmann, A. First analysis of immune cell infiltration in stage pT1 urothelial bladder carcinoma: CD3 positivity as a prognostic marker for cancer-specific survival. *World J. Urol*. 2012, 30, 875–877. [CrossRef]

Parodi A, Traverso P, Kalli F, Conteduca G, Tardito S, Curto M, Grillo F, Mastracci L, Bernardi C, Nasi G, Minaglia F, Simonato A, Carmignani G, Ferrera F, Fenoglio D, Filaci G (2016) Residual tumor micro-foci and overwhelming regulatory T lymphocyte infiltration are the causes of bladder cancer recurrence. *Oncotarget* 7(6):6424–6235. 10.18632/oncotarget.7024. [PubMed: 26824503]

Perez, E. A. et al. Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 2, 56–64 (2016).

Pfannstiel, C.; Strissel, P.L.; Chiappinelli, K.B.; Sikic, D.; Wach, S.; Wirtz, R.M.; Wullweber, A.; Taubert, H.; Breyer, J.; Otto, W.; et al. The Tumor Immune Microenvironment Drives a Prognostic Relevance That Correlates with Bladder Cancer Subtypes. *Cancer Immunol. Res.* 2019, 7, 923–938. [CrossRef] [PubMed]

Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, Hinoue T, Laird PW, Hoadley KA, Akbani R, Castro MAA, Gibb EA, Kanchi RS, Gordenin DA, Shukla SA, Sanchez-Vega F, Hansel DE, Czerniak BA, Reuter VE, Su X, de Sa Carvalho B, Chagas VS, Mungall KL, Sadeghi S, Pedamallu CS, Lu Y, Klimczak LJ, Zhang J, Choo C, Ojesina AI, Bullman S, Leraas

Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, Hinoue T, Laird PW, Hoadley KA, Akbani R, MAA C, Gibb EA, Kanchi RS, Gordenin DA, Shukla SA, Sanchez-Vega F, Hansel DE, Czerniak BA, Reuter VE, Su X, de Sa Carvalho B, Chagas VS, Mungall KL, Sadeghi S, Pedamallu CS, Lu Y, Klimczak LJ, Zhang J, Choo C, Ojesina AI, Bullman S, Leraas KM, Lichtenberg TM, Wu CJ, Schultz N, Getz G, Meyerson M, Mills GB, McConkey DJ, Weinstein JN, Kwiakowski DJ, Lerner SP (2017) Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer. *Cell* 171(3):540–56.e25. 10.1016/j.cell.2017.09.007. [PubMed: 28988769]

Rodriguez-Vida A, Lerner SP, Bellmunt J. The Cancer Genome Atlas Project in Bladder Cancer. *Cancer Treat Res.* 2018;175:259-271. doi: 10.1007/978-3-319-93339-9_12. PMID: 30168126.

Rouanne M, Betari R, Radulescu C, Goubar A, Signolle N, Neuzillet Y, Allory Y, Marabelle A, Adam J, Lebreton T. Stromal lymphocyte infiltration is associated with tumour invasion depth but is not prognostic in high-grade T1 bladder cancer. *Eur J Cancer.* 2019 Feb;108:111-119. doi:

Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. Epidemiology of Bladder Cancer. *Med Sci (Basel).* 2020;8(1):15. Published 2020 Mar 13. doi:10.3390/medsci8010015

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jul;10(7):490-500. doi: 10.1038/nri2785. Epub 2010 Jun 18. PMID: 20559327.

Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2009;27(2):186-92.

Satyal, U., Sikder, R.K., McConkey, D., Plimack, E.R., Abbosh, P.H., 2019. Clinical implications of molecular subtyping in bladder cancer. *Curr. Opin. Urol.* 29, 350– 356. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000641>

Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. Epidemiology of Bladder Cancer. *Med Sci (Basel).* 2020 Mar 13;8(1):15. doi: 10.3390/medsci8010015. PMID: 32183076; PMCID: PMC7151633.

Shah SK, Lui PD, Baldwin DD, Ruckle HC. Urothelial carcinoma after external beam radiation therapy for prostate cancer. *J Urol* 2006; 175:2063.

Sharma, P.; Shen, Y.; Wen, S.; Yamada, S.; Jungbluth, A.A.; Gnjatic, S.; Bajorin, D.F.; Reuter, V.E.; Herr, H.; Old, L.J.; et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 3967–3972. [CrossRef]

Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002 Aug;2(2):103-12. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00102-2. PMID: 12204530.

Sjödahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, Patschan O, Aine M, Fernö M, Ringnér M, Månsson W, Liedberg F, Lindgren D, Höglund M. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012 Jun 15;18(12):3377-86. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T. Epub 2012 May 2. PMID: 22553347.

Sjodahl G, Lovgren K, Lauss M, Chebil G, Patschan O, Gudjonsson S, Mansson W, Ferno M, Leandersson K, Lindgren D, Liedberg F, Hoglund M (2014) Infiltration of CD3(+) and CD68(+) cells in bladder cancer is subtype specific and affects the outcome of patients with muscle-invasive tumors. *Urol Oncol* 32(6):791–797. Epub 2014/05/06. 10.1016/j.urolonc.2014.02.007 [PubMed: 24794251]

Skeldon SC, Semotiuk K, Aronson M, Holter S, Gallinger S, Pollett A, Kuk C, van Rhijn B, Bostrom P, Cohen Z, Fleshner NE, Jewett MA, Hanna S, Shariat SF, Van Der Kwast TH, Evans A, Catto J, Bapat B, Zlotta AR. Patients with Lynch syndrome mismatch repair gene mutations are at higher

risk for not only upper tract urothelial cancer but also bladder cancer. *Eur Urol.* 2013 Feb;63(2):379-85. doi: 10.1016/j.eururo.2012.07.047. Epub 2012 Aug 2. PMID: 22883484.

Sorensen MD, Dahlrot RH, Boldt HB, Hansen S, Kristensen BW (2018) Tumour-associated microglia/macrophages predict poor prognosis in high-grade gliomas and correlate with an aggressive tumour subtype. *Neuropathol Appl Neurobiol* 44(2):185–206. Epub 2017/08/03. 10.1111/nan.12428 [PubMed: 28767130]

Takeuchi H, Tanaka M, Tanaka A, Tsunemi A, Yamamoto H (2016) Predominance of M2- polarized macrophages in bladder cancer affects angiogenesis, tumor grade and invasiveness. *Oncol Lett* 11(5):3403–3408. 10.3892/ol.2016.4392. [PubMed: 27123124]

Tan, T.Z., Rouanne, M., Tan, K.T., Huang, R.Y.-J., Thiery, J.-P., 2019. Molecular Subtypes of Urothelial Bladder Cancer: Results from a Meta-cohort Analysis of 2411 Tumors. *Eur. Urol.* 75, 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.08.027>

Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H (2019) Regulatory T cells in cancer immunosuppression – implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 16(6):356–371. Epub 2019/02/02. 10.1038/s41571-019-0175-7 [PubMed: 30705439]

van Osch, F., Jochems, S., van Schooten, F., Bryan, R. and Zeegers, M., 2016. Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies. *International Journal of Epidemiology*, 45(3), pp.857-870.

Wang, B.; Pan, W.; Yang, M.; Yang, W.; He, W.; Chen, X.; Bi, J.; Jiang, N.; Huang, J.; Lin, T. Programmed death ligand-1 is associated with tumor infiltrating lymphocytes and poorer survival in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Sci.* 2018, 110, 489–498.

Wang B, Pan W, Yang M, Yang W, He W, Chen X, Bi J, Jiang N, Huang J, Lin T. Programmed death ligand-1 is associated with tumor infiltrating lymphocytes and poorer survival in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Sci.* 2019 Feb;110(2):489-498. doi: 10.1111/cas.13887. Epub 2018 Dec 12. PMID: 30548363; PMCID: PMC6361576.

Wang B, Liu H, Dong X, Wu S, Zeng H, Liu Z, Wan D, Dong W, He W, Chen X, Zheng L, Huang J, Lin T (2015) High CD204+ tumor-infiltrating macrophage density predicts a poor prognosis in patients with urothelial cell carcinoma of the bladder. *Oncotarget* 6(24):20204–20214. 10.18632/onco-target.3887. [PubMed: 26001293]

Weinstein, John & Akbani, Rehan & Broom, Bradley & Wang, Wenyi & Verhaak, Roeland & Mcconkey, David & Lerner, Seth & Morgan, Margaret & Creighton, Chad & Smith, Carolyn &

Kwiatkowski, David & Cherniack, Andrew & Kim, Jaegil & Pedamallu, Chandra Sekhar & Noble, Michael & Al-Ahmadie, Hikmat & Reuter, Victor & Rosenberg, Jonathan & Bajorin, Dean & Eley, Greg. (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 507. 10.1038/nature12965.

Winerdal ME, Krantz D, Hartana CA, Zirakzadeh AA, Linton L, Bergman EA, Rosenblatt R, Vasko J, Alamdari F, Hansson J, Holmstrom B, Johansson M, Winerdal M, Marits P, Sherif A, Winqvist O (2018) Urinary bladder cancer tregs suppress MMP2 and potentially regulate invasiveness. *Cancer Immunol Res* 6(5):528–538. Epub 2018/03/29. 10.1158/2326-6066.Cir-17-0466 [PubMed: 29588320]

Winerdal ME, Marits P, Winerdal M, Hasan M, Rosenblatt R, Tolf A, Selling K, Sherif A, Winqvist O (2011) FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int* 108(10):1672–1678. Epub 2011/01/20. 10.1111/j.1464-410X.2010.10020.x [PubMed: 21244603]

Winerdal ME, Krantz D, Hartana CA, Zirakzadeh AA, Linton L, Bergman EA, Rosenblatt R, Vasko J, Alamdari F, Hansson J, Holmstrom B, Johansson M, Winerdal M, Marits P, Sherif A, Winqvist O (2018) Urinary bladder cancer tregs suppress MMP2 and potentially regulate invasiveness. *Cancer Immunol Res* 6(5):528–538. Epub 2018/03/29. 10.1158/2326-6066.Cir-17-0466 [PubMed: 29588320]

Winerdal ME, Krantz D, Hartana CA, Zirakzadeh AA, Linton L, Bergman EA, Rosenblatt R, Vasko J, Alamdari F, Hansson J, Holmström B, Johansson M, Winerdal M, Marits P, Sherif A, Winqvist O. Urinary Bladder Cancer Tregs Suppress MMP2 and Potentially Regulate Invasiveness. *Cancer Immunol Res*. 2018 May;6(5):528-538. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0466. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29588320.

Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer research*. 2001;61(12):4766-72.

Wu K, Tan MY, Jiang JT, Mu XY, Wang JR, Zhou WJ, Wang X, Li MQ, He YY, Liu ZH (2018) Cisplatin inhibits the progression of bladder cancer by selectively depleting G-MDSCs: a novel

Yang G, Shen W, Zhang Y, Liu M, Zhang L, Liu Q, Lu HH, Bo J (2017) Accumulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) induced by low levels of IL-6 correlates with poor prognosis in bladder cancer. *Oncotarget* 8(24):38378–38388. 10.18632/oncotarget.16386. [PubMed: 28418913] Yee DS, Shariat SF, Lowrance WT, et al. Impact of previous radiotherapy for prostate cancer on clinical outcomes of patients with bladder cancer. *J Urol* 2010; 183:1751.

Yin Z, Li C, Wang J, Xue L (2019) Myeloid-derived suppressor cells: roles in the tumor microenvironment and tumor radiotherapy. *Int J Cancer* 144(5):933–946. Epub 2018/07/12. 10.1002/ijc.31744 [PubMed: 29992569]

Yu A, Mansure JJ, Solanki S, Siemens DR, Koti M, Dias ABT, Burnier MM, Brimo F, Kassouf W. Presence of lymphocytic infiltrate cytotoxic T lymphocyte CD3+, CD8+, and immunoscore as prognostic marker in patients after radical cystectomy. *PLoS One*. 2018 Oct 11;13(10):e0205746. doi: 10.1371/journal.pone.0205746. PMID: 30308033; PMCID: PMC6181418.

Zhang H, Ye YL, Li MX, Ye SB, Huang WR, Cai TT, He J, Peng JY, Duan TH, Cui J, Zhang XS, Zhou FJ, Wang RF, Li J (2017) CXCL2/MIF-CXCR2 signaling promotes the recruitment of myeloid-derived suppressor cells and is correlated with prognosis in bladder cancer. *Oncogene* 36(15):2095–2104. Epub 2016/10/11. 10.1038/onc.2016.367 [PubMed: 27721403]

Zaghloul MS (December 2012). "Bladder cancer and schistosomiasis". *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*.

Zhang WJ, Wang XH, Gao ST, Chen C, Xu XY, Sun Q, Zhou ZH, Wu GZ, Yu Q, Xu G, Yao YZ, Guan WX (2018) Tumor-associated macrophages correlate with phenomenon of epithelial-mesenchymal transition and contribute to poor prognosis in triple-negative breast cancer patients. *J Surg Res* 222:93–101. Epub 2017/12/24. 10.1016/j.jss.2017.09.035 [PubMed: 29273380]

Zhu, S., Yu, W., Yang, X., Wu, C., Cheng, F., 2020. Traditional Classification and Novel Subtyping Systems for Bladder Cancer. *Front. Oncol.* 10, 102. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00102>

BIBLIA

Alan, P. Craig, P. Louis, K. (2020). *Campel – Walsh Urology*

Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease 10th edition

"Bladder Cancer Factsheet" (PDF). Global Cancer Observatory. WHO2019.

Gco.iarc.fr. 2020. Cancer Today. [online] Available at: <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>

American Urology Association

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

Amboss (2020). <https://www.amboss.com/us>

American Urological Association (2020). <https://www.auanet.org/>

National Cancer Institute (NCI) (2020), <https://www.cancer.gov/about-website>

University of Texas, MD Anderson (2020) <https://www.mdanderson.org/>

World Health Organization, Global Cancer Observatory, (2020), <http://globocan.iarc.fr/>