



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**Σύγχρονη Ανοσολογική Θεραπεία στον Καρκίνο της Ουροδόχου
Κύστεως**

Φανή Βαξεβανοπούλου

Επιβλέπων καθηγητής: Μαργαρίτης Αυγέρης

Πάτρα, Ιούνιος, 2026

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του/της φοιτητή/φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



Σύγχρονη Ανοσολογική Θεραπεία στον Καρκίνο της Ουροδόχου Κύστεως

Φανή Βαξεβανοπούλου

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Μαργαρίτης Αυγέρης

Αναπληρωτής Καθηγητής

Ιατρική Σχολή

ΕΚΠΑ

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Ανδρέας Σκορίλας

Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας

ΕΚΠΑ

Πάτρα, Ιούνιος, 2026

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας ολοκληρώνεται ένα σημαντικό κεφάλαιο της ακαδημαϊκής μου πορείας, το οποίο ξεκίνησε πριν από περίπου δύο χρόνια με στόχο τη διεύρυνση και εμβάθυνση των γνώσεών μου στον τομέα της Χημικής και Βιομοριακής Ανάλυσης.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, κ.Μαργαρίτη Αυγέρη, Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και κατανόηση, την συνεχή υποστήριξη και τις γνώσεις που μου μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω επίσης στον κ.Ανδρέα Σκορίλα, Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την συμβολή του ως συνεπιβλέποντα και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και συμβουλές του.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου για την άριστη συνεργασία, την αλληλοϋποστήριξη και τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε κατά την διάρκεια των σπουδών μας.

Τέλος, ένα ιδιαίτερο και βαθύ ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου για την αμέριστη αγάπη, την διαρκή στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια. Η συμβολή τους υπήρξε καθοριστική και χωρίς αυτούς η ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών δεν θα ήταν εφικτή.

*Αφιερωμένη στον πατέρα μου,
Δημήτριο*

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζει τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, εστιάζοντας τόσο στη βασική ανατομία και παθοφυσιολογία του οργάνου όσο και στους μοριακούς μηχανισμούς, τους βιοδείκτες και τις σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις της νόσου.

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης αποτελεί μία από τις συχνότερες κακοήθειες του ουροποιητικού, με σημαντική επίπτωση και θνησιμότητα. Η νόσος ταξινομείται κυρίως ως ουροθηλιακό καρκίνωμα, το οποίο διακρίνεται σε μη μυοδιηθητική και μυοδιηθητική μορφή, με διαφορετική πρόγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση. Η διάγνωση βασίζεται στην αιματουρία, την κυστεοσκόπηση, την απεικόνιση και την βιοψία, ενώ η θεραπεία περιλαμβάνει TURBT, ενδοκυστικές θεραπείες, ριζική κυστεκτομή και συστηματικές θεραπείες σε προχωρημένα στάδια.

Σε μοριακό επίπεδο, ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από έντονη ετερογένεια και εμπλέκει κρίσιμα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως τα Ras–MAPK και PI3K–AKT–mTOR, καθώς και μεταλλάξεις σε γονίδια όπως TP53, FGFR3, PIK3CA και RB1. Παράλληλα, αναλύονται μοριακοί υποτύποι που συμβάλλουν στην κατανόηση της βιολογικής συμπεριφοράς της νόσου και στη διαμόρφωση εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών.

Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στους βιοδείκτες (DNA, RNA και πρωτεϊνικούς), καθώς και στα εξωκυτταρικά κυστίδια, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική διαγνωστική και προγνωστική αξία. Τέλος, παρουσιάζονται οι σύγχρονες θεραπευτικές εξελίξεις, με έμφαση στην ανοσοθεραπεία (PD-1/PD-L1 αναστολείς), στις στοχευμένες θεραπείες (FGFR, VEGF, PI3K/mTOR) και στις αναδυόμενες γονιδιακές προσεγγίσεις.

Συνολικά, η εργασία αναδεικνύει τη μετάβαση προς μια εξατομικευμένη ογκολογική προσέγγιση, όπου η μοριακή ανάλυση καθορίζει τη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπευτική στρατηγική του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.

Λέξεις – Κλειδιά

Καρκίνος, ουροδόχος κύστη, γενετικοί μηχανισμοί, μοριακοί βιοδείκτες, ανοσοθεραπεία

Modern Immunotherapy in Bladder Cancer

Fani Vaxevanopoulou

Abstract

This thesis examines bladder cancer, focusing on both the basic anatomy and pathophysiology of the organ as well as the molecular mechanisms, biomarkers, and current therapeutic approaches of the disease.

Bladder cancer is one of the most common malignancies of the urinary tract, with significant incidence and mortality. The disease is mainly classified as urothelial carcinoma, which is divided into non-muscle-invasive and muscle-invasive forms, each with different prognosis and treatment approaches. Diagnosis is based on hematuria, cystoscopy, imaging, and biopsy, while treatment includes TURBT, intravesical therapies, radical cystectomy, and systemic therapies in advanced stages.

At the molecular level, bladder cancer is characterized by marked heterogeneity and involves key signaling pathways such as Ras-MAPK and PI3K-AKT-mTOR, as well as mutations in genes including TP53, FGFR3, PIK3CA, and RB1. In addition, molecular subtypes are analyzed as they contribute to understanding the biological behavior of the disease and to the development of personalized therapeutic strategies.

Special emphasis is placed on biomarkers (DNA, RNA, and protein-based), as well as extracellular vesicles, which have significant diagnostic and prognostic value. Finally, current therapeutic advances are presented, with a focus on immunotherapy (PD-1/PD-L1 inhibitors), targeted therapies (FGFR, VEGF, PI3K/mTOR pathways), and emerging gene-based approaches.

Overall, this work highlights the transition toward a personalized oncological approach, where molecular profiling guides the diagnosis, prognosis, and treatment strategy of bladder cancer.

Keywords

Bladder cancer, genetic mechanisms, molecular biomarkers, immunotherapy

Περιεχόμενα

Περίληψη	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα	viii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	Error! Bookmark not defined.
Κατάλογος Πινάκων	xi
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια	Error! Bookmark not defined.
1. Η ουροδόχος κύστη	Error! Bookmark not defined.
1.1 Ανατομία και φυσιολογία της ουροδόχου κύστεως	Error! Bookmark not defined.
1.2 Ιστολογία της ουροδόχου κύστεως	Error! Bookmark not defined.
1.3 Ευρύτερη παθολογία της ουροδόχου κύστεως	5
2. Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως	Error! Bookmark not defined.
2.1 Επιδημιολογία	7
2.2 Παράγοντες κινδύνου	8
2.3 Ιστολογικοί τύποι καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστεως	10
2.4 Ουροθηλιακό καρκίνωμα	12
2.4.1 Μη μυοδιηθητικοί όγκοι της ουροδόχου κύστεως	12
2.4.2 Μυοδιηθητικοί όγκοι της ουροδόχου κύστεως	14
2.4.3 Σταδιοποίηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως	15
2.4.4 Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως	17
2.5 Διάγνωση	18
2.6 Πρόγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως	20
2.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως	22
3. Μοριακοί και γενετικοί μηχανισμοί στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως	25
3.1 Εισαγωγή	25

3.2 Μοριακή παθογένεση του ουροθηλιακού καρκινώματος	25
3.3 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια Ras-MAPK και PI3-AKT-mTOR	26
3.4 Χρωμοσωμικές μεταβολές στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως	27
3.5 Γονιδιακές μεταλλάξεις στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως	28
3.5.1 Ενεργοποίηση ογκογονιδίων.....	29
3.5.2 Απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων	30
3.6 Μοριακοί υπότυποι στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως	34
3.6.1 Η μελέτη Lund	34
3.6.2 Η μελέτη από το UNC	35
3.6.3 Η μελέτη TCGA	36
3.6.4 Η μελέτη CMC	37
4. Εφαρμογές μοριακής διαγνωστικής στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως	39
4.1 Μοριακοί βιοδείκτες στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως	39
4.1.1 Πρωτεϊνικοί μοριακοί δείκτες στα ούρα	40
4.1.2 Κυτταρολογικοί μοριακοί δείκτες στα ούρα	42
4.2 Μοριακοί δείκτες DNA	44
4.3 Επιγενετικοί μοριακοί δείκτες μεθυλίωσης DNA	47
4.4 Μοριακοί δείκτες RNA	49
4.4.1 Μοριακοί δείκτες mRNA	49
4.4.2 Μοριακοί δείκτες miRNAs	50
4.4.3 Μοριακοί δείκτες lncRNAs	53
4.5 Αλλοιώσεις στο μικροδορυφορικό DNA	53
4.6 Εξωκυτταρικά κυστίδια και εξωσώματα	56
5. Η ανοσοθεραπεία στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως	58
5.1 Αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος	58
5.1.1 Αναστολείς της οδού PD-1/PD-L1	58
5.1.2 Αναστολέας του CTLA-4	60

5.2 Αναστολείς του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras-MAPK	62
5.3 Αναστολείς των υποδοχέων του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα 3	65
5.4 Θεραπευτική στόχευση του μονοπατιού p53	68
5.5 Θεραπευτική στόχευση του μονοπατιού αγγειογένεσης	69
5.6 Αναστολείς DNA μεθυλοτρανσφερασών	71
5.7 Αναστολείς της κινάσης της ραπαμυκίνης (mTOR)	73
5.8 Θεραπευτική στόχευση των miRNAs και lncRNAs	74
5.9 Αντισώματα συζευγμένα με κυτταροτοξικούς παράγοντες.....	77
5.9.1 Μηχανισμός δράσης των ADCs	78
5.9.2 Θεραπευτική εφαρμογή των ADCs στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως ...	80
5.10 Θεραπευτική εφαρμογή των CAR-T λεμφοκυττάρων στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως.....	83
6. Ανακεφαλαίωση - Συζήτηση	86
7. Βιβλιογραφία	89

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1 Ανατομικά χαρακτηριστικά ουροδόχου κύστεως	Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 1.2 Ιστολογικά στοιχεία του τοιχώματος της ουροδόχου κύστεως	Error! Bookmark not defined.
Εικόνα 1.3 Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστεως	4
Εικόνα 1.4 Ιστολογικά στοιχεία ουροθηλίου	5
Εικόνα 2.1 Περιστατικά και θνησιμότητα του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως	7
Εικόνα 2.2 European Cancer Inequalities Registry – OECD 2025.....	8
Εικόνα 2.3 Ιστολογικοί τύποι νεοπλασιών της κύστης	11
Εικόνα 2.4 Καρκίνωμα <i>in situ</i> (CIS)	13
Εικόνα 2.5 Σχηματική αναπαράσταση σταδίων του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως ..	16
Εικόνα 2.6 Κατηγοριοποίηση των μη διηθητικών όγκων της ουροδόχου κύστεως	18
Εικόνα 3.1 Μοριακές οδοί ογκογένεσης	26
Εικόνα 3.2 Σχηματική απεικόνιση σηματοδοτικών μονοπατιών Ras-MAPK, JAK-STAT, PI3K-AKT-mTOR.....	27
Εικόνα 3.3 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονοπατιών Ras-MAPK, p53 και Rb	32
Εικόνα 5.1 Δράση των αναστολέων σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στην θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως	62
Εικόνα 5.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια του FGFR3	66
Εικόνα 5.3 Μηχανισμός δράσης των αντισωμάτων συζευγμένων με κυτταροτοξικούς παράγοντες	79
Εικόνα 5.4 Δομική εξέλιξη των CAR T κυττάρων	84

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1 Ταξινόμηση των νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστεως το 2014.....	14
Πίνακας 2.2 TNM σταδιοποίηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως	15
Πίνακας 2.3 Σύστημα βαθμονόμησης του EORTC	21
Πίνακας 5.1 Κύριες κλινικές μελέτες αναστολέων PD-1/PD-L1 στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως.....	60
Πίνακας 5.2 Θεραπείες έναντι του EGFR στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως	62
Πίνακας 5.3 Στοχευμένες θεραπείες έναντι του VEGF στον ουροθηλιακό καρκίνο	71
Πίνακας 5.4 Θεραπευτική στόχευση των miRNAs και lncRNAs	77
Πίνακας 5.5 Κύρια ADCs για την θεραπεία του ουροθηλιακού καρκίνου, οι μοριακοί στόχοι τους και τα σημαντικότερα κλινικά αποτελέσματα.....	82

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ABL1	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
ADC	Antibody–Drug Conjugate
ADC	Adoptive Cellular Therapy
AKT	Protein Kinase B
ANXA10	Annexin A10
ASO	Antisense Oligonucleotide
ASR	Age-Standardized Rate
ATP	Adenosine Triphosphate
AUA	American Urological Association
Ba/Sq	Basal/Squamous
BCG	Bacillus Calmette–Guérin
BCLA	Bladder Cancer-Associated Antigen
BTA	Bladder Tumor Antigen
CAR	Coxsackie and Adenovirus Receptor
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T-cell
CEA	Carcinoembryonic Antigen
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDKI	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
cfDNA	Cell-Free DNA
CIS	Carcinoma In Situ
CK	Cytokeratin
CMC	Consensus Molecular Classification
CMV	Cisplatin–Methotrexate–Vinblastine
CNVs	Copy Number Variations
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
CT	Computed Tomography
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4
ctDNA	Circulating Tumor DNA
CXCR2	C-X-C Motif Chemokine Receptor 2
DAG	Diacylglycerol
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNMT	DNA Methyltransferase
EAU	European Association of Urology
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eGFR	Estimated Glomerular Filtration Rate
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

EMT	Epithelial–Mesenchymal Transition
ER	Estrogen Receptor
ERBB2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
ERBT	En Bloc Resection of Bladder Tumor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
EVs	Extracellular Vesicles
Fc	Fragment Crystallizable
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FKBP-12	FK506 Binding Protein 12
GAS5	Growth Arrest Specific Transcript 5
GC	Gemcitabine–Cisplatin
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
hCFHrp	Human Complement Factor H Related Protein
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HER3	Human Epidermal Growth Factor Receptor 3
HER4	Human Epidermal Growth Factor Receptor 4
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor-1
HIF1A	Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha
HOXA13	Homeobox A13
HOTAIR	HOX Transcript Antisense RNA
HRAS	Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
HTS	High Throughput Sequencing
IAP	Inhibitor of Apoptosis
ICIs	Immune Checkpoint Inhibitors
IDO	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
IGF2	Insulin-like Growth Factor 2
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IgG	Immunoglobulin G
IP3	Inositol Triphosphate
ISUP	International Society of Urological Pathology
JAK	Janus Associated Kinase
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRT	Keratin
LG	Low Grade

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

lncRNA	Long Non-Coding RNA
LOH	Loss of Heterozygosity
LumNS	Luminal Non-Specified
LumP	Luminal Papillary
LumU	Luminal Unstable
LUTS	Lower Urinary Tract Symptoms
LVI	Lymphovascular Invasion
MALAT1	Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MASO-PCR	Mutated Allele Specific Oligonucleotide PCR
MDM2	Mouse Double Minute 2 Homolog
MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MET	Mesenchymal Epithelial Transition Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	MicroRNA
MIBC	Muscle-Invasive Bladder Cancer
MMC	Mitomycin C
mPGES1	Microsomal Prostaglandin E Synthase-1
MRI	Magnetic Resonance Imaging
mRNA	Messenger RNA
MSI	Microsatellite Instability
MSK1	Mitogen- and Stress-Activated Kinase 1
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MVAC	Methotrexate–Vinblastine–Doxorubicin–Cisplatin
NAC	Neoadjuvant Chemotherapy
NE	Neuroendocrine-like
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NGS	Next Generation Sequencing
NK	Natural Killer Cells
NMIBC	Non-Muscle Invasive Bladder Cancer
NMP22	Nuclear Matrix Protein 22
NOTCH1	Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1
OTX1	Orthodenticle Homeobox 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed Cell Death Protein-1
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIKKs	Phosphatidylinositol Kinase-Related Kinases
PKC	Protein Kinase C
PLC-γ	Phospholipase C-gamma
PPARG	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PUNLMP	Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QM-MSPCR	Quantitative Multiplex Methylation-Specific PCR
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription PCR
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Kinase
RAS	Rat Sarcoma Viral Oncogene
RB1	Retinoblastoma 1
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SCC-like	Squamous Cell Carcinoma-like
SEPTIN9	Septin 9
SLIT2	Slit Guidance Ligand 2
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCC	Transitional Cell Carcinoma
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
TKIs	Tyrosine Kinase Inhibitors
TMT	Trimodal Therapy
TNM	Tumor–Node–Metastasis
Tregs	Regulatory T Cells
TSC1	Tuberous Sclerosis Complex 1
TUR	Transurethral Resection
TURBT	Transurethral Resection of Bladder Tumor
TWIST1	Twist Family BHLH Transcription Factor 1
UBC	Urinary Bladder Cancer
UCA1	Urothelial Carcinoma Associated 1

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

UCC	Urothelial Cell Carcinoma
UICC	Union for International Cancer Control
UNC	University of North Carolina
UPK	Uroplakin
UroVysion	Urinary Fluorescence In Situ Hybridization Assay
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL	Von Hippel–Lindau Tumor Suppressor
WHO	World Health Organization

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΟΥΡΟΔΟΧΟΣ ΚΥΣΤΗ

1.1 Ανατομία και φυσιολογία της ουροδόχου κύστεως

Η ουροδόχος κύστη είναι ένα κοίλο ινομυώδες όργανο του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος που λειτουργεί ως προσωρινός αποθηκευτικός χώρος των ούρων που έρχονται από τα νεφρά μέσω των δυο ουρητήρων, επιτρέποντας τη συγκέντρωση και την ελεγχόμενη αποβολή τους διαμέσου της ουρήθρας. Η αποβολή των ούρων πραγματοποιείται μέσω μιας σύνθετης νευρομυϊκής διαδικασίας, η οποία υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο από το κεντρικό νευρικό σύστημα (1,2).

Η ουροδόχος κύστη βρίσκεται στον υποπεριτοναϊκό χώρο της ελάσσονος πυέλου πίσω ακριβώς από την ηβική σύμφυση. Η θέση, το σχήμα και οι ανατομικές της σχέσεις ποικίλουν ανάλογα με την ποσότητα των ούρων που περιέχει. Στην κατάσταση πλήρους κένωσης, η κύστη έχει τετραεδρικό σχήμα και παραμένει εξολοκλήρου μέσα στην πυέλο, ενώ διακρίνονται τα εξής τμήματα: ένα άνω τμήμα που καταλήγει στον ουραχό, δύο πλάγιες επιφάνειες και μία οπίσθια επιφάνεια, η οποία αποτελεί τη βάση της κύστης, στις οποίας το κατώτερο σημείο οριοθετείται από τον αυχένα. Ο μέσος ομφαλοκυστικός σύνδεσμος, που εκτείνεται από την κορυφή της ουροδόχου κύστης έως τον ομφαλό, αποτελεί εμβρυϊκό υπόλειμμα του ουραχού και συμβάλλει στη σταθεροποίηση της κύστης προς το πρόσθιο κοιλιακό τοίχωμα. Κατά την προοδευτική πλήρωση με ούρα, η ουροδόχος κύστη διαστέλλεται και μεταβάλλει το σχήμα της σε πιο ωοειδές επεκτεινόμενη προς τα άνω και προς την κοιλιακή χώρα. Στην κατάσταση αυτή, η ουροδόχος κύστη παρουσιάζει μια οπίσθια-άνω επιφάνεια, μια πρόσθια-κάτω επιφάνεια, δύο πλάγιες επιφάνειες, τον πυθμένα και τον θόλο. Το ανώτερο-οπίσθιο τμήμα της κύστης καλύπτεται από περιτόναιο, το οποίο εκτείνεται από την κορυφή της μέχρι τις θέσεις εισόδου των ουρητήρων στο πίσω τμήμα της (Εικ.1.1) (2).

Η ουροδόχος κύστη στον άνδρα διαχωρίζεται οπίσθια από το ορθό μέσω της ορθοκυστικής πτυχής (rectovesical pouch). Αντίθετα, στη γυναίκα, το περιτόναιο που καλύπτει την άνω επιφάνεια της κύστης συνεχίζεται προς τα πίσω και καλύπτει τη μήτρα, σχηματίζοντας την ευθυμητρική πτυχή (vesicouterine pouch). Ως αποτέλεσμα, ο κόλπος και η μήτρα παρεμβάλλονται μεταξύ της ουροδόχου κύστης και του εντέρου.

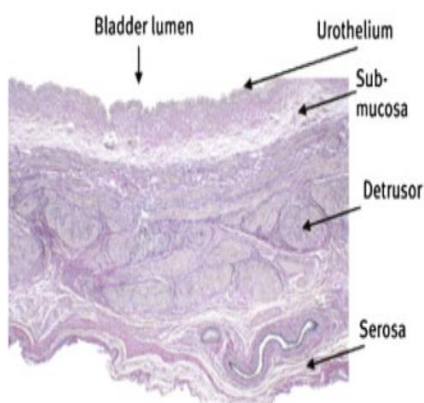
Στην εσωτερική επιφάνεια της κύστης διακρίνεται βλεννογόνος που αποτελείται από μεταβατικό επιθήλιο. Είναι χαλαρά προσδεμένος με το υποκείμενο υποβλεννογόνιο χιτώνα και το μυϊκό τοίχωμα και στην εμφάνιση είναι λείος όταν η κύστη είναι γεμάτη, ενώ δημιουργεί πτυχώσεις όταν η κύστη είναι άδεια. Ο βλεννογόνος συνήθως αποτελείται από 6 στοιβάδες κυττάρων και μακροσκοπικά στην επιφάνεια του διακρίνονται η περιοχή του τριγώνου και η υπόλοιπη έσω επιφάνεια της κύστης (1,2,3).



Εικ. 1.1. Ανατομικά χαρακτηριστικά ουροδόχου κύστεως (44).

1.2 Η ιστολογία της ουροδόχου κύστεως

Η δομή του τοιχώματος της ουροδόχου κύστεως διαρθρώνεται σε τέσσερις διακριτούς χιτώνες, οι οποίοι από τον αυλό προς την περιφέρεια είναι: το ουροθήλιο, ο υποβλεννογόνιος χιτώνας (χόριο), ο μυϊκός χιτώνας και ο εξωτερικός χιτώνας (ορογόνος ή περιτονία) (Εικόνα 1.2) (5).

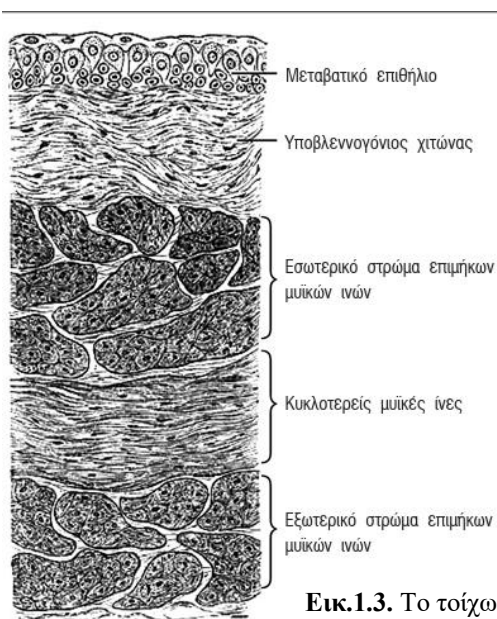


Εικ.1.2. Ιστολογικά στοιχεία του τοιχώματος της ουροδόχου κύστεως. Από τον αυλό προς την περιφέρεια διακρίνονται το ουροθήλιο, ο υποβλεννογόνιος χιτώνας, ο μυϊκός χιτώνας και ο εξωτερικός χιτώνας (39).

Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστεως επενδύεται εσωτερικά από βλεννογόνο που ονομάζεται ουροθήλιο (ή και μεταβατικό επιθήλιο), το οποίο επενδύει και άλλες ιστολογικές δομές του ουροποιητικού συστήματος όπως είναι οι ουρητήρες και η ουρήθρα. Σε κατάσταση κένωσης της κύστης, το ουροθήλιο παρουσιάζει πάχος πέντε έως επτά σειρές κυττάρων. Κατά τη διαστολή της κύστης, όταν δηλαδή γεμίζει με ούρα, το ουροθήλιο μειώνεται σε δυο έως τρεις σειρές κυττάρων χωρίς να υφίσταται δομική βλάβη και διατηρώντας με αυτό τον τρόπο την ακεραιότητα του ουροθηλιακού φραγμού. Το ουροθήλιο διαχωρίζεται σε τρεις ιστολογικά διαφορετικές στοιβάδες. Η ανώτερη επιφανειακή στοιβάδα που αποτελεί το όριο μεταξύ του αυλού της κύστης και των υποκείμενων ιστών, αποτελείται από μια σειρά πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων που έχουν σχήμα «ομπρέλας» και για αυτό ονομάζονται «umbrella cells». Είναι συχνά διπύρρηνα και έχουν προστατευτικό ρόλο καθώς σχηματίζουν έναν πολύ ισχυρό αδιαπέραστο φραγμό που αποτρέπει την διάχυση των συστατικών των ούρων στους υποκείμενους ιστούς. Αυτό επιτυγχάνεται από τις στενές συνδέσεις που υπάρχουν μεταξύ αυτών των κυττάρων καθώς και από την παρουσία ειδικών πρωτεϊνών, των ουροπλακινών που υπάρχουν στην επιφάνεια τους (6). Η ενδιάμεση στοιβάδα αποτελείται από δύο έως τρεις στοιβάδες πολυγωνικών κυττάρων, με τον αριθμό τους να μεταβάλλεται ανάλογα με τον βαθμό διάτασης της ουροδόχου κύστης. Η τελευταία (βασική) στοιβάδα συγκροτείται και αυτή από δυο έως τρεις σειρές μικρών κυβοειδών κυττάρων και χαρακτηρίζεται από υψηλή μιτωτική ικανότητα (5,9) (Εικόνα 1.4).

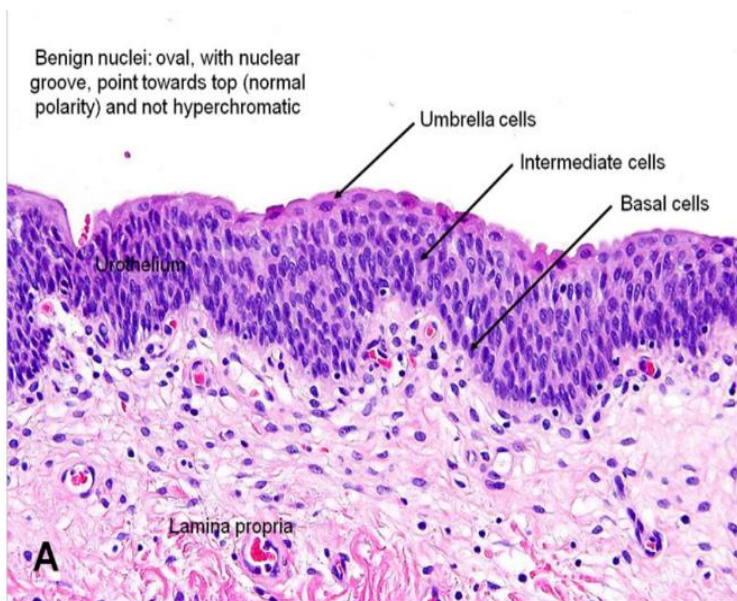
Η δεύτερη στοιβάδα που παρεμβάλλεται μεταξύ του ουροθηλίου και του μυϊκού χιτώνα είναι ο υποβλεννογόνιος χιτώνας ή χόριο. Αποτελείται από μια εξωκυττάρια μήτρα που περιέχει ελαστικές ίνες, ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες, λιποκύτταρα, ανοσοκύτταρα, νευρικές απολήξεις καθώς και τα διάμεσα κύτταρα του Cajal (5,7,8). Ο ρόλος των κυττάρων Cajal είναι η μεταβίβαση νευρικών σημάτων προς τα λεία μυϊκά κύτταρα (8). Το χόριο συμβάλλει στη συμμόρφωση και στην ικανότητα προσαρμογής του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης στις μεταβολές του ενδοκυστικού όγκου. Επίσης, εμπλέκεται στη μεταφορά αισθητικών πληροφοριών (μηχανοαισθητικότητα και αλγεσία) προς το κεντρικό νευρικό σύστημα, ενώ παράλληλα λειτουργεί ως ενδιάμεσος διαβιβαστής σημάτων μεταξύ του ουροθηλίου και των βαθύτερων στοιβάδων της κύστης, συμβάλλοντας στην ενεργοποίηση του μυϊκού τοιχώματος, το οποίο συγκροτεί την τρίτη στοιβάδα του τοιχώματος της κύστης (7). Το μυϊκό τοίχωμα της ουροδόχου κύστεως, δηλαδή ο εξωστήρας μυς σχηματίζεται από λείες μυϊκές ίνες, που σχηματίζουν 3 στοιβάδες κυττάρων. Οι δυο εξωτερικές στοιβάδες έχουν επιμήκεις μυϊκές ίνες ενώ η ενδιάμεση χαρακτηρίζεται από κυκλοτερείς μυϊκές ίνες

(Εικ.1.3). Αυτές οι μυϊκές ίνες περιβάλλονται από συνδετικό ιστό που είναι πλούσιος σε κολλαγόνο (5). Ο εξωστήρας μυς αποτελεί τον κύριο παράγοντα της μηχανικής λειτουργίας της ουροδόχου κύστεως, καθώς ρυθμίζει τόσο τη φάση της πλήρωσης όσο και τη φάση της κένωσης και ελέγχεται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Κατά την πλήρωση παραμένει χαλαρός, εξασφαλίζοντας τη διατήρηση χαμηλής ενδοκυστικής πίεσης, ενώ κατά την ούρηση συσπάται συντονισμένα, παράγοντας την απαραίτητη δύναμη για την αποτελεσματική εξώθηση των ούρων προς την ουρήθρα (4).



Εικ.1.3. Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστεως (1).

Η τέταρτη στοιβάδα του τοιχώματος της κύστης περιβάλλεται είτε από τον ορογόνο είτε από τον ινώδη χιτώνα. Ο ορογόνος χιτώνας είναι ένα λεπτό στρώμα συνδετικού ιστού που καλύπτει το ανώτερο τμήμα της ουροδόχου κύστης και συνεχίζεται προς το περιτόναιο του κοιλιακού τοιχώματος (5). Τα υπόλοιπα τμήματα που δεν καλύπτονται από περιτόναιο, περιβάλλονται από ινώδη χιτώνα που είναι πλούσιος σε αγγεία και ελαστικές ίνες και συνδέει την κύστη με τα παρακείμενα όργανα και τον οπισθοηβικό χώρο. Εξωτερικά της τέταρτης στοιβάδας βρίσκεται το περικυστικό λίπος.



Εικ.1.4. Ιστολογικά στοιχεία ουροθηλίου όπου διακρίνονται τα Umbrella cells: κύτταρα με σχήμα ομπρέλας, Intermediate cells: διάμεσα κύτταρα και Basal cells: βασικά κύτταρα. Διακρίνεται επίσης και ο υποβλεννογόνιος χιτώνας (5).

1.3 Ευρύτερη παθολογία της ουροδόχου κύστεως

Οι παθήσεις της ουροδόχου κύστης περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα νοσημάτων με διαφορετικά αίτια και κλινικές εκδηλώσεις, προσβάλλοντας τόσο άνδρες όσο και γυναίκες. Ένα σημαντικό μέρος αυτών των παθήσεων αποτελούν οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Προκαλούνται τόσο από Gram- και Gram+ βακτήρια (*Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* όσο και από ορισμένους μύκητες (*Candida* spp.). Εκδηλώνονται με συμπτώματα όπως δυσφορία στην ουρήθρα, αυξημένη συχνουρία, αίσθημα πίεσης ή βάρους στην υπερηβική χώρα, πόνο κατά την ούρηση, ακόμα και παρουσία αίματος στα ούρα.

Η συχνότερη λοίμωξη του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος, που εντοπίζεται κυρίως στην ουροδόχο κύστη είναι η κυστίτιδα. Πρόκειται για μια ουρολογική πάθηση, που εμφανίζεται περισσότερο σε γυναίκες και συνήθως προκαλείται από βακτήρια, με την *Escherichia coli* να αποτελεί τον πιο συνηθέστερο αιτιολογικό παράγοντα. Επιπλέον, υπάρχουν και λοιμώξεις που προσβάλλουν το ανώτερο ουροποιητικό σύστημα όπως είναι η πυελονεφρίτιδα (11).

Μια άλλη πάθηση του ουροποιητικού συστήματος είναι η λιθίαση της ουροδόχου κύστης, κατά την οποία εντοπίζονται λίθοι εντός της κύστης. Οι λίθοι, που είναι συνήθως μεγάλοι

μεγέθους, αδυνατούν να αποβληθούν μέσω της ουρήθρας και αυτό προκαλεί διαταραχή στην ούρηση (10).

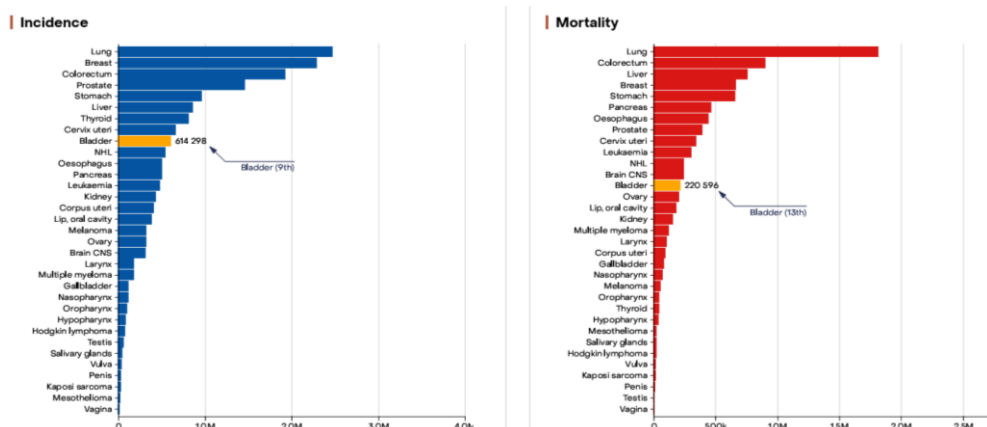
Επίσης, άλλη κατηγορία παθήσεων της ουροδόχου κύστεως είναι οι νεοπλασματικές που διακρίνονται σε καλοήθεις και κακοήθεις όγκους. Οι καλοήθεις όγκοι είναι σπάνιοι, ενώ οι κακοήθεις όγκοι περιλαμβάνουν τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, που θα αναλυθεί διεξοδικά στα επόμενα κεφάλαια (12).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ

2.1 Επιδημιολογία

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως έχει ανέλθει σε παγκόσμιο επίπεδο από την δέκατη στην ένατη θέση ως προς τη συχνότητα διάγνωσης, συνοδευόμενος από αύξηση τόσο στα νέα περιστατικά όσο και στη θνησιμότητα (Εικ.1.5.). Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα στατιστικά δεδομένα της GLOBOCAN, το 2022 καταγράφηκαν 614,298 νέα περιστατικά παγκοσμίως, ενώ ο ASR (Age Standardized Rate) δείκτης ήταν 5,6 ανά 100.000 άτομα, αριθμός που υποδηλώνει μια άνοδο της τάξης του 7,1% σε σύγκριση με τα καταγεγραμμένα στοιχεία του 2020 (14,15). Έχει παρατηρηθεί και άνοδος στην πενταετή επιπολαστικότητα (5-year prevalence), η οποία από 1,72 εκατομμύρια (17) το 2020 ανήλθε σε 1.95 εκατομμύρια άτομα το 2022 (14). Όσον αφορά την θνησιμότητα, 220.596 θάνατοι καταγράφηκαν παγκόσμια, κατατάσσοντας τη νόσο στην 13η θέση μεταξύ των συχνότερων αιτιών θανάτου από κακοήθειες (GLOBOCAN 2022) (15).

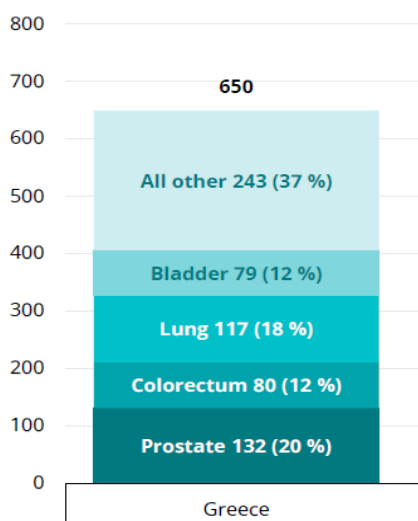


Εικ.2.1. Νέα περιστατικά και θνησιμότητα του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως παγκόσμια το 2022 (Επίσημη έκθεση του σχεδίου GLOBOCAN για το 2022) (15).

Επίσης, η νόσος εμφανίζει έντονη ανισοκατανομή ως προς το φύλο, με την επίπτωση και την θνησιμότητα να είναι περίπου τετραπλάσιες στους άνδρες (9,5 και 3,3 ανά 100.000 άτομα, αντίστοιχα) σε σύγκριση με τις γυναίκες (2,4 και 0,9 ανά 100.000 άτομα, αντίστοιχα) (16). Η υψηλότερη επίπτωση καρκίνου της ουροδόχου κύστης στους άνδρες σε σύγκριση

με τις γυναίκες αποδίδεται, εν μέρει, στη μεγαλύτερη συχνότητα καπνίσματος στον ανδρικό πληθυσμό καθώς και στην μεγαλύτερη έκθεση σε χημικές ουσίες στον χώρο εργασίας (13). Αξιοσημείωτο είναι ότι ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως καθίσταται έκτος σε συχνότητα καρκίνος στους άνδρες, με περίπου 523.674 νέα περιστατικά να εμφανίζονται κάθε έτος (14).

Στην Ελλάδα, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης συγκαταλέγεται μεταξύ των συχνότερων νεοπλασιών, παρουσιάζοντας σημαντικό επιδημιολογικό φορτίο. Ειδικότερα, εκτιμάται ότι το 2022 διαγνώστηκαν περίπου 5.122 νέες περιπτώσεις, αριθμός που αντιστοιχεί στο 7,8% του συνολικού καρκινικού φορτίου (18). Επιπλέον, σύμφωνα με τα δεδομένα του European Cancer Inequalities Registry – OECD (2025), ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης εμφανίζει ιδιαίτερα αυξημένη συχνότητα στον ανδρικό πληθυσμό, όπου εκτιμάται ότι αντιστοιχεί σε περίπου 12% του συνόλου των διαγνωσμένων καρκίνων και κατατάσσεται τέταρτος σε συχνότητα (Εικ.1.6.) (19).



Εικ.2.2. Σύμφωνα με την European Cancer Inequalities Registry – OECD 2025 στον ανδρικό πληθυσμό, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης κατατάσσεται ως ο τέταρτος συχνότερος καρκίνος (19).

2.2 Παράγοντες κινδύνου

Το κάπνισμα αναγνωρίζεται ως ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Πολυάριθμες μελέτες έχουν καταδείξει ότι οι καπνιστές διατρέχουν τετραπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (20,21,22). Επιπλέον, η θνησιμότητα από καρκίνο της ουροδόχου κύστης που αποδίδεται στο κάπνισμα κατατάσσεται δεύτερη σε συχνότητα, μετά τη θνησιμότητα από καρκίνο του πνεύμονα που σχετίζεται με τη χρήση καπνού. Στον καπνό του τσιγάρου περιέχονται καρκινογόνες ουσίες όπως είναι η β-ναφθυλαμίνη και πολυκυκλικοί αρωματικοί

υδρογονάνθρακες, οι οποίες προάγουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις στον οργανισμό και οδηγούν σε μόνιμες γενετικές μεταλλάξεις του DNA (29). Το αποτέλεσμα αυτών των μεταλλάξεων είναι η καρκινογένεση είτε μέσω της ενεργοποίησης ογκογονιδίων είτε μέσω της καταστολής ογκοκατασταλτικών γονιδίων (13). Αξιοσημείωτο είναι ακόμα και το γεγονός ότι η έκθεση σε παθητικό κάπνισμα συνδέεται με 22% αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου (24), ενώ η διακοπή του καπνίσματος, όπως προκύπτει από τις επιστημονικές μελέτες έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης κατά περίπου 40% μέσα σε διάστημα 1–4 ετών (25).

Ο δεύτερος σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου είναι η έκθεση στον χώρο εργασίας σε καρκινογόνες ουσίες όπως είναι οι αρωματικές αμίνες, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες. Οι ενώσεις αυτές συναντώνται συχνά στην βιομηχανική παραγωγή βαφών, χρωμάτων, μετάλλων, ελαστικών ή προϊόντων πετρελαίου (25). Επιπρόσθετα, η υψηλή παρουσία αρσενικού και νιτρικών αλάτων, που υπάρχουν στο πόσιμο νερό σε συνδυασμό με μέταλλα που υπάρχουν στη διατροφή όπως είναι το σελήνιο και ο ψευδάργυρος, έχουν συσχετιστεί με αύξηση του καρκίνου της κύστεως πιθανώς γιατί επιδρούν στους μηχανισμούς που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες και γενετικές βλάβες (26).

Η παχυσαρκία έχει επί μακρόν συσχετιστεί με διάφορες μορφές κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Σύμφωνα με μια μετα-ανάλυση, η παχυσαρκία αυξάνει κατά 10% τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, διότι αυξάνει την παραγωγή ινσουλίνης και ινσουλινοεξααρτώμενων αυξητικών παραγόντων, που τροποποιούν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων, την αγγειογένεση και την απόπτωση. Εκτός από αυτό, πυροδοτεί φλεγμονώδεις αντιδράσεις, επηρεάζοντας τα επίπεδα των κυτοκινών και προάγοντας με αυτό τον τρόπο την καρκινογένεση (28). Επίσης, όσον αφορά τις διατροφικές συνήθειες, η υψηλή κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστεως λόγω της παραγωγής νιτροζαμινών από τα νιτρικά άλατα που περιέχονται σε αυτά τα τρόφιμα (29).

Εκτός από τους καθιερωμένους παράγοντες κινδύνου, σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ουροδόχου κύστεως διαδραματίζουν και χρόνιες λοιμώξεις με κυριότερη την σχιστοσωμίαση, η οποία μεταδίδεται από το πρωτόζωο *Schistosoma haematobium* που υπάρχει σε περιοχές της Αφρικής και την Ανατολικής Ασίας. Η μόλυνση από το εν λόγω παράσιτο, προκαλεί την παραγωγή νιτρικών οξέων και ελεύθερων ριζών οξυγόνου, ενώσεις

που συντελούν κυρίως στην ανάπτυξη του πλακώδους καρκινώματος (Squamous Cell Carcinoma-SCC) (30, 40).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως αυτές που παρατηρούνται σε ασθενείς με μόνιμο καθετήρα, η χρόνια κυστίτιδα, η παρουσία λίθων στην ουροδόχο κύστη, η έκθεση σε ακτινοβολία στο πλαίσιο της θεραπείας προηγούμενων κακοηθειών και η χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης για την αντιμετώπιση άλλων νεοπλασιών έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (10,31,32).

2.3 Ιστολογικοί τύποι καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστεως

Οι καρκίνοι της ουροδόχου κύστεως ανάλογα με τον τύπο και την προέλευση των κυττάρων που υπόκεινται στις νεοπλασματικές αλλοιώσεις διακρίνονται στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, στο πλακώδες καρκίνωμα, στο αδenoκαρκίνωμα και στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα (Εικ.2.3).

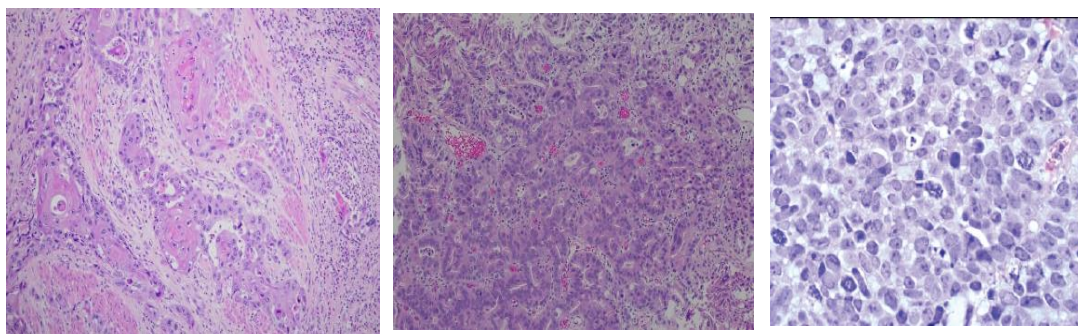
Το ουροθηλιακό καρκίνωμα (Urothelial Cell Carcinoma-UCC), γνωστό και ως καρκίνωμα του μεταβατικού επιθηλίου (Transitional Cell Carcinoma-TCC) αποτελεί την επικρατέστερη ιστολογική μορφή κακοήθειας της κύστης, με συχνότητα που κυμαίνεται μεταξύ 90–95% και θα αναλυθεί εκτενέστερα στην ενότητα 2.4.

Αντιθέτως, οι μη ουροθηλιακοί όγκοι της ουροδόχου κύστης είναι σπάνιοι και παρατηρούνται σε ποσοστό μικρότερο του 5% των περιπτώσεων. Οι συχνότερες μη ουροθηλιακές νεοπλασίες επιθηλιακής προέλευσης της ουροδόχου κύστεως, περιλαμβάνουν το πλακώδες καρκίνωμα, το αδenoκαρκίνωμα και το μικροκυτταρικό καρκίνωμα. Επίσης, σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), περιγράφονται και σπανιότεροι ιστολογικοί τύποι νεοπλασμάτων, οι οποίοι είναι μη ουροθηλιακοί και μη επιθηλιακής προέλευσης, όπως είναι τα σαρκώματα, τα λεμφώματα και τα μελανώματα (41).

Το πλακώδες καρκίνωμα (Squamous Cell Carcinoma-SCC) είναι η συχνότερη μορφή μη ουροθηλιακού καρκίνου και αποτελεί το 5% όλων των καρκίνων της κύστεως στο δυτικό κόσμο. Ωστόσο, στις χώρες όπου το πρωτόζωο *Schistosoma haematobium* είναι ενδημικό, όπως είναι η Αίγυπτος και η Τανζανία, το πλακώδες καρκίνωμα είναι η πιο κοινή ιστολογική μορφή με συχνότητα εμφάνισης μεταξύ 30-70% (40,41). Χαρακτηρίζεται από πλακώδη διαφοροποίηση του ουροθηλίου, ενώ έντονη είναι η παρουσία

κερατινοποιημένων δομών και μεσοκυτταρικών γεφυρών. Άλλες αιτίες που συντελούν στην αυξημένη εμφάνισή του σχετίζονται με την χρόνια χρήση ενδοκυστικών καθετήρων, το κάπνισμα και τις επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις του ουροποιητικού. Τα πλακώδη καρκινώματα συνδέονται με μειωμένη επιβίωση, καθώς συχνά διαγιγνώσκονται σε προχωρημένα στάδια και είναι ανθεκτικά στις συνήθεις θεραπείες (41).

Το αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma-ADC) είναι ένας ακόμα πιο σπάνιος ιστολογικός τύπος καρκίνου της ουροδόχου κύστεως που εμφανίζεται σε ποσοστό μεταξύ 0,5 και 2% και μπορεί να είναι πρωτοπαθής ή μεταστατικός. Το πρωτοπαθές αδενοκαρκίνωμα θεωρείται ότι προκύπτει από αδενική μετάπτωση του ουροθηλίου που συνήθως οφείλεται σε καταστάσεις χρόνιου ερεθισμού της κύστης. Ιστολογικά, χαρακτηρίζεται από την παρουσία διηθητικών αδενικών σχηματισμών, οι οποίοι συχνά εμφανίζουν νεκρωτικές κοιλότητες καθώς και παραγωγή βλέννας. Σε σχέση με το ουροθηλιακό καρκίνωμα, το αδενοκαρκίνωμα έχει χειρότερη πρόγνωση εν μέρει λόγω της μεγαλύτερης ηλικίας των ασθενών και της συχνότερης διάγνωσής τους σε προχωρημένα στάδια της νόσου (41, 42).



Εικ.2.3. Ιστολογικοί Τύποι Νεοπλασιών της κύστης (από αριστερά προς τα δεξιά):
Α. Πλακώδες καρκίνωμα Β. Αδενοκαρκίνωμα Γ. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα (40,41,42)

Το μικροκυτταρικό ή υψηλού βαθμού νευροενδοκρινές καρκίνωμα (small cell adenocarcinoma or high-grade neuroendocrine carcinoma) αντιπροσωπεύει το 0,5-1% όλων των καρκίνων της ουροδόχου κύστεως και πρόκειται για μια ιδιαίτερα επιθετική μορφή όγκου με πολύ κακή πρόγνωση και αυξημένη τάση για μεταστάσεις (46). Ιστολογικά, χαρακτηρίζεται από την παρουσία ομοιόμορφων μικρών κυττάρων με ελάχιστο κυτταρόπλασμα, κοκκώδη χρωματίνη και μη εμφανείς πυρηνίσκους (43). Αναπτύσσεται κυρίως στα πλάγια τοιχώματα, στον θόλο και το οπίσθιο τοίχωμα της κύστης (41). Σχετικά με την προέλευση των κυττάρων του μικροκυτταρικού καρκινώματος εικάζεται ότι ενδέχεται να προέρχονται είτε από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα του ουροποιητικού

συστήματος, τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε διάφορους ιστολογικούς τύπους είτε από νευροενδοκρινικά κύτταρα που προέρχονται από την νευρική ακρολοφία και μπορούν να μετακινηθούν σε διαφορετικές επιθηλιακές θέσεις στο σώμα (41,43).

2.4 Ουροθηλιακό Καρκίνωμα

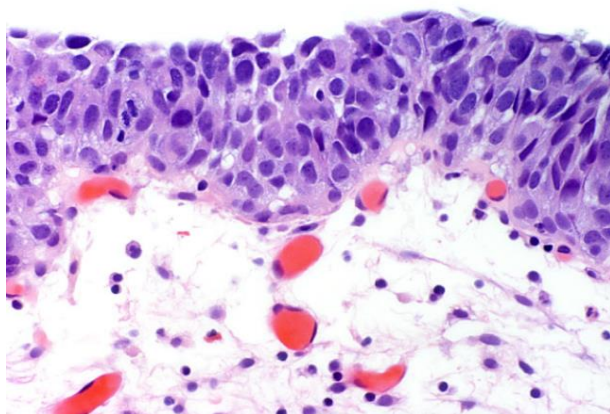
Το ουροθηλιακό καρκίνωμα που όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι η συνηθέστερη κακοήθης νεοπλασία της κύστης που προέρχεται από το ουροθήλιο, που είναι το επιθήλιο που επενδύει το εσωτερικό της ουροδόχου κύστης. Κλινικά είναι μια ετερογενής νόσος που περιλαμβάνει τις μη-μυοδιηθητικές καρκινικές αλλοιώσεις (στο 70% των περιπτώσεων), οι οποίες εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα υποτροπής, αλλά δεν σχετίζονται με αυξημένη θνησιμότητα και τις μυοδιηθητικές καρκινικές αλλοιώσεις (στο 30% των περιπτώσεων) που είναι πιο επιθετικές μορφές και χαρακτηρίζονται με μειωμένη επιβίωση (46).

2.4.1 Μη-μυοδιηθητικοί όγκοι της ουροδόχου κύστεως

Η πλειονότητα (75%) των πρωτοπαθών όγκων της ουροδόχου κύστη είναι μη-μυοδιηθητικοί (Non-Muscle Invasive Bladder Cancer- NMIBC), καθώς τα καρκινικά κύτταρα περιορίζονται στο ουροθήλιο (στάδια Ta, Tis) ή διηθούν τον υποβλεννογόνιο χιτώνα (στάδιο T1) και διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, τους επίπεδους (flat) και τους θηλώδεις (papillary) (35). Οι όγκοι αυτοί χαρακτηρίζονται από ευνοϊκή πρόγνωση με πενταετή επιβίωση που προσεγγίζει το 90% (46,47). Ωστόσο, το 70% των ασθενών με μη-μυοδιηθητικό όγκο θα παρουσιάσει υποτροπή της νόσου και συχνά μεταπίπτει σε πιο επιθετική μυοδιηθητική μορφή (47).

Μια ιδιαίτερη μορφή μη-μυοδιηθητικού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως είναι το καρκίνωμα *in situ* (CIS), το οποίο είναι ένα επίπεδο καρκίνωμα με μη θηλώδεις δομές.

Χαρακτηρίζεται από μεγάλα κύτταρα που έχουν απωλέσει τον κυτταρικό τους προσανατολισμό και εμφανίζουν συσσωματώματα χρωματίνης στους πυρήνες τους καθώς και αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα (34,45).



Εικ.2.4. Καρκίνωμα *in situ* (CIS) (38).

Μια άλλη προκαρκινική βλάβη του ουροθηλίου που επίσης εντάσσεται στους επίπεδους όγκους είναι η δυσπλασία. Χαρακτηρίζεται από κυτταρικές αλλοιώσεις όπως η απώλεια του κάθετου προσανατολισμού των κυττάρων, ήπια διόγκωση των πυρήνων και σχετικά σπάνιες μιτώσεις. Δεν πρέπει να συγχέεται με την αντιδραστική ατυπία, η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλους πυρήνες με κανονική χρωματίνη και έναν ή περισσότερους πυρηνίσκους, η οποία μπορεί να προκληθεί ως αντίδραση σε περιπτώσεις φλεγμονής, λοίμωξης ή ερεθισμού (35).

Η δεύτερη κατηγορία μη-μυοδιηθητικών όγκων της ουροδόχου κύστεως περιλαμβάνει τα θηλώδη νεοπλάσματα, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία λεπτών ινοαγγειακών στηριγμάτων που καλύπτονται από ουροθηλιακά κύτταρα. Σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης του WHO (2016) ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες:

- Θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού (papillary urothelial neoplasm of low malignant potential, PUNLMP).
- Μη-μυοδιηθητικό θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα χαμηλού βαθμού.
- Μη-μυοδιηθητικό θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα υψηλού βαθμού.

Ένας νέο όρος που έχει εισαχθεί από σύστημα κατάταξης του ΠΟΥ (2016) και έχει αντικαταστήσει τον όρο υπερπλασία, είναι η ουροθηλιακή υπερπλαστική αλλοίωση αβέβαιου δυναμικού κακοήθειας (urothelial proliferation of uncertain malignant potential). Χαρακτηρίζεται από έντονη πάχυνση του ουροθηλίου, με καθόλου ή ελάχιστη κυτταρολογική ατυπία και συναντάται σε ασθενείς που είχαν εμφανίσει καρκίνωμα στο παρελθόν ή βρίσκεται δίπλα σε θηλώδεις αλλοιώσεις. Σε αντίθεση με τα θηλώδη

νεοπλάσματα, δεν υπάρχουν καλά σχηματισμένες προεκβολές ή δευτερογενείς διακλαδώσεις και η κυτταρολογική ατυπία είναι ελάχιστη (33,34,35).

2.4.2 Μυοδιηθητικοί όγκοι της ουροδόχου κύστεως

Μια σπανιότερη μορφή καρκίνου που εμφανίζεται στο 25% των ασθενών είναι ο μυοδιηθητικός όγκος της ουροδόχου κύστεως (Muscle Invasive Bladder Cancer-MIBC), στον οποίο τα καρκινικά κύτταρα διηθούν τον μυϊκό χιτώνα και μπορεί να φτάσουν μέχρι το περικυστικό λίπος ή τα παρακείμενα όργανα (προστάτης, κοιλιακό τοίχωμα, μυς και οστά πυέλου). Ο μυοδιηθητικός καρκίνος μπορεί να εξαπλωθεί στο σώμα δίνοντας μεταστάσεις και για αυτό αποκαλείται και μεταστατικός (36). Οι παραλλαγές του ουροθηλιακού καρκινώματος σύμφωνα με την ταξινόμηση του ΠΟΥ 2016 παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.1. Ταξινόμηση των νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστεως σύμφωνα με τον ΠΟΥ 2016 (35).

Μυοδιηθητικοί Ουροθηλιακοί Όγκοι
Διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα με αποκλίνουσα συμπεριφορά: πλακώδης, αδενική, τροφοβλαστική
Φωλεώδες
Μικροκυστικό
Μικροθηλώδες
Λεμφοεπιθηλώδες καρκίνωμα
Πλασμακυτταροειδές/Δακτυλιοειδούς τύπου/Διάχυτο
Σαρκοματοειδές
Γιγαντοκυτταρικό
Χαμηλής διαφοροποίησης
Λιποειδές
Διανγοκυτταρικό
Όγκοι Μυλλεριανής προέλευσης
Όγκοι που προέρχονται από ατροφικό τοίχωμα της ουροδόχου κύστεως

2.4.3 Σταδιοποίηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως

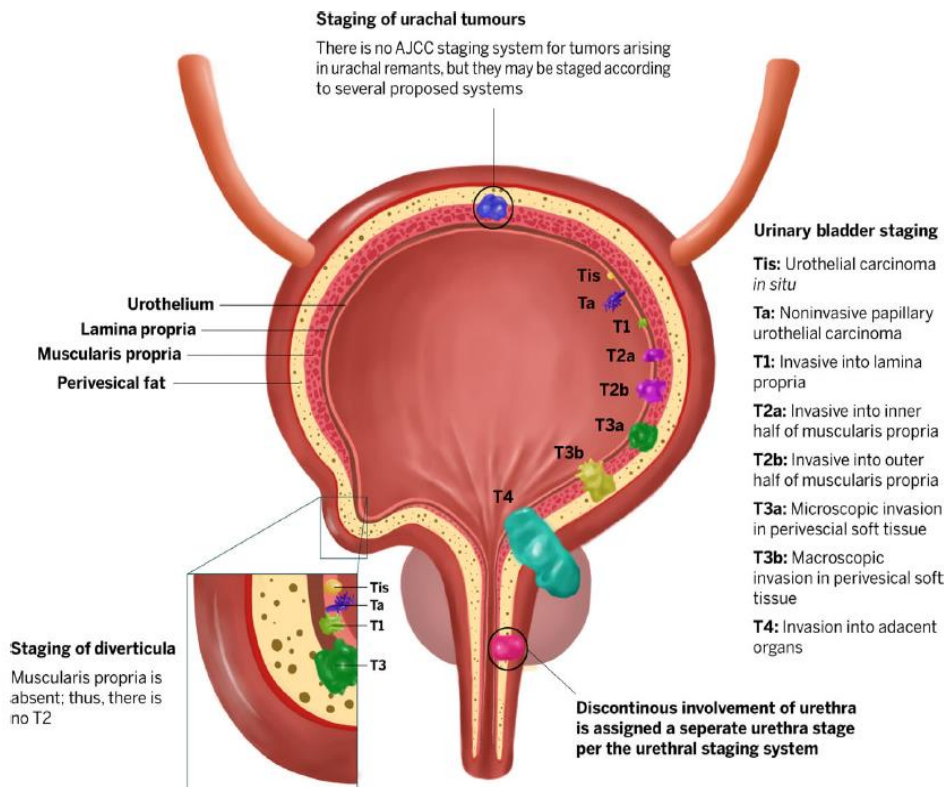
Κατά την τελευταία δεκαετία έχει καταβληθεί ιδιαίτερη προσπάθεια για την καθιέρωση ενός πρότυπου συστήματος αξιολόγησης της σοβαρότητας και της εξέλιξης του ουροθηλιακού καρκινώματος. Ο απώτερος στόχος είναι η βελτίωση της πρόγνωσης της νόσου, η επιλογή της καλύτερης θεραπευτικής αγωγής και η παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας την εκάστοτε θεραπείας. Η σταδιοποίηση αναφέρεται στη συνολική διαδικασία αξιολόγησης της έκτασης της νόσου, η οποία περιλαμβάνει την εκτίμηση τόσο της τοπικής διήθησης του όγκου όσο και της παρουσίας απομακρυσμένης ή λεμφαδενικής διασποράς (33,35).

Το πλέον αποδεκτό και ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως είναι το σύστημα TNM (Tumor-Node-Metastasis classification system), το οποίο βασίζεται στα χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου (**T**-primary tumor), στην παρουσία ή απουσία προσβεβλημένων λεμφαδένων (**N**-regional lymph nodes) και στην παρουσία ή απουσία μεταστάσεων (**M**-distant metastases) (Εικ.2.5). Το τελευταίο σύστημα σταδιοποίησης TNM που έχει εγκριθεί από την Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου (UICC-8th edition) παρουσιάζεται στον πίνακα 2.2 (33,34,35,38).

Πίνακας 2.2. TNM σταδιοποίηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (33).

T		Πρωτοπαθής όγκος
Tx		Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0		Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
Ta		Μη διηθητικός θηλώδης όγκος
Tis		Καρκίνωμα <i>in situ</i>
T1		Όγκος που διηθεί τον υποεπιθηλιακό συνδετικό ιστό (χόριο)
T2		Όγκος που διηθεί τον μυϊκό χιτώνα
	T2a	Όγκος που διηθεί τον επιπολής μυϊκό χιτώνα
	T2b	Όγκος που διηθεί τον εν τω βάθει μυϊκό χιτώνα
T3		Όγκος που διηθεί το περικυστικό λίπος
	T3a	Μικροσκοπική διήθηση
	T3b	Μακροσκοπική διήθηση (εξωκυστική μάζα)
T4		Όγκος που διηθεί σε ένα από τα ακόλουθα: προστάτης, κόλπος, μήτρα, πυελικό ή κοιλιακό τοίχωμα
	T4a	Όγκος που διηθεί τον προστάτη, την μήτρα ή τον κόλπο
	T4b	Όγκος που διηθεί το πυελικό ή κοιλιακό τοίχωμα

N		Περιοχικοί Λεμφαδένες
Nx		Οι περιοχικοί λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N0		Δεν υπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις
N1		Μετάσταση σε μονήρη λεμφαδένα της ελάσσονος πυέλου (υπογάστριοι, θυρεοειδείς, έξω λαγόνιοι και προϊερείς λεμφαδένες)
N2		Μετάσταση σε πολλαπλούς λεμφαδένες της ελάσσονος πυέλου (υπογάστριοι, θυρεοειδείς, έξω λαγόνιοι και προϊερείς λεμφαδένες)
N3		Μετάσταση στους κοινούς λαγόνιους λεμφαδένες
M		Απομακρυσμένες μεταστάσεις
Mx		Δεν έχει γίνει εκτίμηση για απομακρυσμένες μεταστάσεις
M0		Δεν διαπιστώνονται απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1		Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις



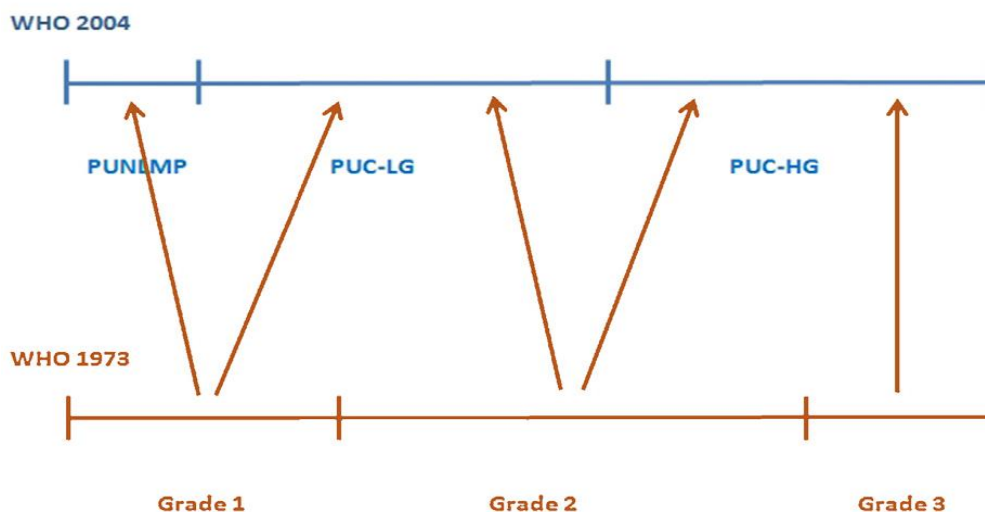
Εικ.2.5. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (38).

2.4.4 Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως

Ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας (grade) των όγκων της ουροδόχου κύστεως αποτελεί βασικό προγνωστικό δείκτη για τον προσδιορισμό του κινδύνου υποτροπής και εξέλιξης της νόσου καθώς επίσης και για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας (35,48). Ωστόσο, η ιστοπαθολογικά βασιζόμενη ταξινόμηση ενέχει στοιχεία υποκειμενικής αξιολόγησης, τα οποία συμβάλλουν στη μεταβλητότητα μεταξύ παρατηρητών (inter-observer variability) (48). Προκειμένου να μειωθεί η παρατηρούμενη μεταβλητότητα μεταξύ παρατηρητών, οι τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες της European Association of Urology (EAU) συνιστούν, για την κατηγοριοποίηση του βαθμού κακοήθειας των μη μυοδιηθητικών όγκων της ουροδόχου κύστεως (NMIBC), τη χρήση τόσο της ταξινόμησης του World Health Organization 1973 (WHO) όσο και του αναθεωρημένου συστήματος WHO/ISUP 2004 (48,50).

Η ταξινόμηση του 1973 κατηγοριοποιούσε τα ουροθηλιακά νεοπλάσματα σε τρεις κατηγορίες (G1, G2, G3), βάσει της εκτίμησης του βαθμού κυτταρικής ατυπίας, της μιτωτικής δραστηριότητας και της αρχιτεκτονικής διαταραχής του επιθηλίου. Πιο συγκεκριμένα, τα καρκινώματα βαθμού 1 (G1) τα οποία χαρακτηρίζονται ως καλά διαφοροποιημένα, εμφανίζουν ήπιο βαθμό κυτταρολογικής ατυπίας και σπάνιες μιτωτικές μορφές. Τα καρκινώματα βαθμού 3 (G3) που είναι χαμηλής διαφοροποίησης, παρουσιάζουν έντονο πυρηνικό πλειομορφισμό, απώλεια πολικότητας και έντονες μιτωτικές διαιρέσεις. Τα καρκινώματα βαθμού 2 (G2) περιλαμβάνουν νεοπλάσματα μέτριας διαφοροποίησης που εμφανίζουν μέτριο βαθμό κυτταρικής ατυπίας και μιτωτικής δραστηριότητας (35,48,49).

Με βάση το αναθεωρημένο σύστημα του 2004, ορισμένες βλάβες που προηγουμένως ταξινομούσαν ως G1 κατηγοριοποιούνται ως θηλώδη ουροθηλιακά νεοπλάσματα χαμηλού κακοήθους δυναμικού (PUNLMP), ενώ άλλες ταξινομούνται ως χαμηλού βαθμού κακοήθειας (low grade, LG). Οι βλάβες G2 ταξινομούνται είτε ως χαμηλού (LG) είτε ως υψηλού βαθμού (high grade, HG) ουροθηλιακά καρκινώματα, ενώ οι βλάβες G3 κατατάσσονται αποκλειστικά στην κατηγορία υψηλού βαθμού (HG) ουροθηλιακού καρκινώματος (Εικ.2.6.). Η ταξινόμηση του βαθμού κακοήθειας του WHO του 2004 επικαιροποιήθηκε το 2016 και αναφέρεται πλέον ως ταξινόμηση WHO 2004/2016 (35,48). Οι αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν την εισαγωγή των κατηγοριών της ουροθηλιακής δυσπλασίας και της ουροθηλιακής ατυπίας αγνώστου κακοήθους δυναμικού που έχει αντικαταστήσει τον όρο υπερπλασία (35,48,51).



Εικ.2.6. Κατηγοριοποίηση των μη διηθητικών όγκων της ουροδόχου κύστεως με βάση το σύστημα ταξινόμησης του 1973 και το αναθεωρημένο το 2004 (48).

2.5 Διάγνωση

Το συχνότερο αρχικό σύμπτωμα που οδηγεί στην εκδήλωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως είναι η ανώδυνη αιματουρία είτε μικροσκοπική είτε μακροσκοπική με την τελευταία να σχετίζεται με υψηλότερο ποσοστό κακοήθειας (36,53). Η αιματουρία εμφανίζεται στην πλειοψηφία των ασθενών, ενώ σε άλλους παρατηρούνται μη ειδικά συμπτώματα του κατώτερου ουροποιητικού (Lower Urinary Tract Symptoms-LUTS), όπως είναι συχνουρία, νυκτουρία και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις (46). Επίσης, σε ασθενείς με μυοδιηθητικούς όγκους ή με CIS μπορεί να εμφανίζονται σε μεγάλη συχνότητα αποφρακτικά συμπτώματα, όπως είναι η επιτακτικότητα, η διακεκομμένη ροή, το αίσθημα ατελούς κένωσης και η δυσουρία (36,54). Στην περίπτωση μεταστατικής νόσου ενδέχεται να παρατηρηθούν κοιλιακό, οσφυϊκό ή πυελικό άλγος, και γενικά συμπτώματα όπως ανορεξία, ωχρότητα, οίδημα των κάτω άκρων, έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας καθώς και παρουσία ψηλαφητής μάζας στην υπερηβική χώρα (55).

Η παρουσία των παραπάνω συμπτωμάτων οδηγεί στην περαιτέρω διαγνωστική διερεύνηση, η οποία περιλαμβάνει απεικονιστικές μεθόδους όπως είναι το υπερηχογράφημα, η αξονική και η μαγνητική τομογραφία. Αρχικά, το διακοιλιακό υπερηχογράφημα αποτελεί ένα αποτελεσματικό, μη επεμβατικό και ευρέως αποδεκτό εργαλείο για την πρόιμη διαγνωστική διερεύνηση της μικροσκοπικής και μακροσκοπικής αιματουρίας (33,36,47).

Επιτρέπει την αναγνώριση νεφρικών βλαβών και μεγαλύτερων ενδοαυλικών όγκων της κύστης. Ωστόσο, η ακρίβεια της μεθόδου εξαρτάται από τον χειριστή και από το βαθμό πλήρωσης της κύστεως. Επιπλέον, ένα αρνητικό υπερηχογράφημα δεν αποκλείει την παρουσία όγκου στην κύστη και δεν μπορεί να επιβεβαιώσει αξιόπιστα την ύπαρξη εξωκυστικής ή μεταστατικής επέκτασης της νόσου (33).

Για τον έλεγχο του ανώτερου ουροποιητικού σε περιπτώσεις μακροσκοπικής αιματουρίας, χρησιμοποιείται η αξονική τομογραφία (CT) που έχει μεγαλύτερη διαγνωστική ευαισθησία (95%) και ειδικότητα (92%) και παρέχει πληροφορίες για μεταστάσεις στους λεμφαδένες ή σε απομακρυσμένα όργανα (47,52). Όταν η αξονική τομογραφία αντενδείκνυται όπως για π.χ. στην εγκυμοσύνη, σε ασθενείς με αλλεργία στο σκιαγραφικό μέσο ή με νεφρική ανεπάρκεια, προτιμάται η μαγνητική τομογραφία (MRI). Η μέθοδος αυτή είναι περισσότερο αποτελεσματική στην αξιολόγηση του βάθους διείσδυσης του καρκινώματος και κατ'επέκταση στην διάκριση μεταξύ μη-μυοδιηθητικού και μυοδιηθητικού όγκου (33,46,52).

Η κυτταρολογική εξέταση ούρων αποτελεί μια μη επεμβατική μέθοδο ανίχνευσης κακοήθων ουροθηλιακών κυττάρων και διενεργείται συμπληρωματικά με τις υπόλοιπες μεθόδους. Η εξέταση βασίζεται στην μικροσκοπική εξέταση των υψηλού βαθμού καρκινικών κυττάρων, τα οποία χάνουν τις προσκολλητικές τους ιδιότητες σε σχέση με τα χαμηλού βαθμού καρκινικά κύτταρα (47). Έχει καλή ευαισθησία και ειδικότητα (64%) για την ανίχνευση του καρκινώματος *in situ* (CIS) καθώς και για την ανίχνευση όγκων υψηλού βαθμού κακοήθειας (46,52). Παρόλα αυτά, δεν συνιστάται ως μέρος του τακτικού ελέγχου σε ασθενείς με ασυμπτωματική μικροσκοπική αιματουρία, καθώς η παρουσία ουρολιθίας ή λοιμώξεων του ουροποιητικού μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (52). Τέλος, για τον έλεγχο του κατώτερου ουροποιητικού διενεργείται η κυστεοσκόπηση, η οποία αποτελεί την μέθοδο εκλογής για την άμεση επισκόπηση του βλεννογόνου της κύστης και την διάγνωση των ενδοκυστικών βλαβών (47,52). Η εξέταση πραγματοποιείται με τη χρήση εύκαμπτου κυστεοσκοπίου υπό τοπική αναισθησία ή με γενική αναισθησία με μεγαλύτερης διαμέτρου κυστεοσκόπιο (33). Σε περίπτωση εντοπισμού όγκου, οι ασθενείς πρέπει να υποβάλλονται σε διουρηθρική εκτομή όγκου της ουροδόχου κύστεως (TURBT) (33,52). Αυτή η διαδικασία στοχεύει στην αφαίρεση του ορατού όγκου, ενώ παράλληλα παρέχει τις απαραίτητες ιστοπαθολογικές πληροφορίες για την διάγνωση, τον καθορισμό του σταδίου και του βαθμού κακοήθειας, καθώς και για την εκτίμηση του βάθους διήθησης του όγκου στον περιβάλλοντα μυϊκό ιστό (33,54).

2.6 Πρόγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα εκδηλώσεων. Στο ένα άκρο του φάσματος βρίσκονται οι μη μυοδιηθητικές αλλοιώσεις χαμηλού βαθμού κακοήθειας που έχουν μικρότερο κίνδυνο εξέλιξης, αλλά υψηλά ποσοστά υποτροπής (15–70%) και εξέλιξης σε μυοδιηθητική νόσο (7–40%), καθιστώντας απαραίτητη την μακροχρόνια παρακολούθησή τους (56,58).

Στο άλλο άκρο βρίσκονται οι νεοπλασίες υψηλού βαθμού κακοήθειας, οι οποίες διακρίνονται σε μη μυοδιηθητικές και μυοδιηθητικές μορφές που χρήζουν άμεσης θεραπευτικής αντιμετώπισης. Όσον αφορά τις μυοδιηθητικές μορφές, το 25% των όγκων σταδίου T2, το 50% των όγκων σταδίου T3 και το 80% των όγκων σταδίου T4 θα εξελιχθούν τελικά σε μεταστατική νόσο, ενώ η 5-ετής επιβίωση στη μυοδιηθητική νόσο ανέρχεται σε ποσοστό 67% για τους όγκους σταδίου T2, 35% για τους T3 και 27% για τους T4 (46,59).

Το ουροθηλιακό καρκίνωμα της κύστεως εμφανίζει, όπως έχει προαναφερθεί, μεγάλη ετερογένεια ακόμα και σε όγκους που ταξινομούνται στο ίδιο στάδιο και για αυτό παρατηρείται δυσκολία στο να προβλεφεί η εξέλιξη και η πορεία του. Εκτιμάται ότι το ποσοστό υποτροπής των T1 όγκων σε μυοδιηθητικούς κυμαίνεται μεταξύ 15-50%. Συνεπώς, για την πρόγνωση της νόσου θα πρέπει να ληφθούν υπόψη, εκτός από το στάδιο και τον βαθμό κακοήθειας της νόσου, ο ρυθμός υποτροπών, η πολυεστιακότητα, η διάμετρος του όγκου και η παρουσία ή μη *in situ* καρκινώματος (CIS). Με βάση αυτούς τους παράγοντες μπορεί να εκτιμηθεί η πρόγνωση της εξέλιξης και της υποτροπής των μη μυοδιηθητικών όγκων της ουροδόχου κύστεως, μέσω του συστήματος βαθμονόμησης του Ευρωπαϊκού Όργανισμού Έρευνας και Θεραπείας Καρκίνου (European Organisation for Research and Treatment of Cancer-EORTC) (Πίνακας 2.3.). Αυτό το σύστημα βαθμονόμησης κατατάσσει τους όγκους στις κατηγορίες χαμηλού, μέσου και υψηλού κινδύνου (36,50).

Πίνακας 2.3. Σύστημα βαθμονόμησης του EORTC για την πρόγνωση και την υποτροπή των μη μυοδιηθητικών όγκων της ουροδόχου κύστεως (36,50).

Ομάδα Κινδύνου	Παθολογικά Χαρακτηριστικά
Χαμηλού Κινδύνου	• Μονήρης • Στάδιο Ta • Χαμηλού βαθμού κακοήθειας • Μέγεθος < 3cm • Απουσία <i>in situ</i> καρκινώματος (CIS)
Μέσου Κινδύνου	• Μονήρης χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκος σταδίου Ta με μέγεθος > 3cm • Πολυεστιακοί χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκοι σταδίου Ta • Υποτροπή χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκου σταδίου Ta εντός 1 έτους από την αρχική διουρηθρική εκτομή όγκου κύστης (TURBT) • Υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκου σταδίου Ta με μέγεθος < 3cm
Υψηλού Κινδύνου	• Υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκοι σταδίου Ta με μέγεθος > 3cm ή πολυεστιακοί • Όγκοι σταδίου T1 • Πολυεστιακοί, υποτροπιάζοντες και μεγάλου μεγέθους > 3cm όγκοι χαμηλού βαθμού κακοήθειας • Παρουσία <i>in situ</i> καρκινώματος (CIS) • Αποτυχία ενδοκυστεικής θεραπείας με BCG σε όγκο υψηλού βαθμού κακοήθειας • Παρουσία λεμφαγγειακής διήθησης (LVI) • Επέκταση στην προστατική ουρήθρα

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η προγνωστική αξία του *in situ* καρκινώματος (CIS) είναι δύσκολο να διαχωριστεί από εκείνη του ιστολογικού βαθμού κακοήθειας (grade), επειδή το CIS αποτελεί εξ ορισμού βλάβη υψηλού βαθμού και συνεπώς συσχετίζεται με κακή πρόγνωση και αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας (46). Σε ασθενείς με T1 υψηλού βαθμού ουροθηλιακού καρκίνου της κύστεως και παρουσία CIS που έχουν υποβληθεί σε πρώιμη ριζική κυστεκτομή, παρατηρείται αυξημένη πιθανότητα ανεύρεσης μυϊκής διήθησης στο χειρουργικό δείγμα (60).

2.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως

Η θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως καθορίζεται κυρίως από το στάδιο και τον βαθμό κακοήθειας του όγκου, αν πρόκειται για μη μυοδιηθητικό ή μυοδιηθητικό καρκίνο, από την ύπαρξη υποτροπών, την πολυεστιακότητα, το μέγεθος του όγκου, καθώς και το ιστορικό του ασθενούς (36,46,47).

Για την αντιμετώπιση των μη μυοδιηθητικών όγκων της ουροδόχου κύστεως εφαρμόζεται ως θεραπεία πρώτης γραμμής η διουρηθρική εκτομή όγκου ουροδόχου κύστεως (Transurethral Resection of Bladder Tumor, TURBT) και κατόπιν πραγματοποιείται επικουρική ενδοκυστική θεραπεία (36). Η TURBT περιλαμβάνει την εξονυχιστική επισκόπηση της κύστης μέσω του ρεζεκτοσκοπίου, με σκοπό τον εντοπισμό των νεοπλασματικών βλαβών και την επακόλουθη εκτίμηση της σταδιοποίησής τους. Η ακριβής σταδιοποίηση του όγκου είναι πολύ σημαντική, για τον καθορισμό του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος και προϋποθέτει να συμπεριληφθεί επαρκές τμήμα μυϊκού χιτώνα κατά την εκτομή (36, 37). Για την επίτευξη καλύτερου αποτελέσματος, την ελαχιστοποίηση των επιπλοκών και τον περιορισμό της συχνότητας υποτροπής της νόσου, εφαρμόζεται η *en bloc* εκτομή (ERBT). Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατή η αφαίρεση του όγκου στο σύνολο του ως ενιαίο τμήμα (33, 36,54). Σε ασθενείς με υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκο, που έχουν υποβληθεί σε μερική TURBT, συνιστάται επαναληπτική TURBT εντός 2-6 εβδομάδων, με σκοπό να εξασφαλιστεί η πλήρης αφαίρεση τόσο των ορατών όσο και των μικροσκοπικών εστιών της νόσου, βελτιώνοντας σε μεγάλο ποσοστό την επιβίωση των ασθενών σε διάστημα 5-ετίας (61).

Μετά την TURBT πραγματοποιείται μια εφάπαξ ενδοκυστική έγχυση ενός χημειοθεραπευτικού παράγοντα, που μπορεί να είναι μιτομυκίνη C (MMC), επιρουβικίνη, δοξορουβικίνη ή γεμισιταβίνη (36,52,63). Η μιτομυκίνη C (MMC) αναστέλλει την σύνθεση του DNA, οδηγώντας σε θάνατο των καρκινικών κυττάρων και συστήνεται ως επικουρική θεραπεία σε όγκους χαμηλού και μέσου κινδύνου (33). Ως μέσο ενίσχυσης της αποτελεσματικότητας της MMC ή των ενδοκυστικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων χρησιμοποιείται η υπερθερμία της ουροδόχου κύστεως με μικροκύματα, η οποία θεωρείται ότι βελτιώνει την απορρόφηση των φαρμάκων στα τοιχώματά της (33).

Σε ασθενείς με μέσου ή υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκο συμπεριλαμβανομένου και CIS, συστήνεται η ενδοκυστική έγχυση του ανοσοτροποποιητή BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*). Ο BCG είναι το εμβόλιο κατά της φυματίωσης, το οποίο περιέχει εξασθενημένα

στελέχη του *Mycobacterium bovis*. Μετά την έγχυση του στην κύστη, επάγει μηχανισμούς κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας, που πυροδοτούν μια τοπική φλεγμονώδη αντίδραση, συμβάλλοντας έτσι στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων (33,62). Εμφανίζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και όφελος σε σύγκριση με την χημειοθεραπεία. Σε ορισμένους ασθενείς με όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας, που δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία με BCG (BCG unresponsive), δεν την ανέχονται λόγω των έντονων παρενεργειών (BCG intolerant) ή υποτροπιάζουν μετά από αυτή (BCG relapsing), προτείνεται πρόωμη ριζική κυστεκτομή με εκτροπή ούρων (46,47).

Ο μυοδιηθητικός όγκος της ουροδόχου κύστεως (MIBC) χρειάζεται πιο επιθετική θεραπευτική προσέγγιση λόγω της αυξημένης πιθανότητας μεταστάσεων. Η καθιερωμένη θεραπευτική προσέγγιση για τον MIBC περιλαμβάνει νεοεπικουρική θεραπεία και στην συνέχεια ριζική κυστεκτομή με ταυτόχρονη πυελική λεμφαδενεκτομή και εκτροπή ούρων (47). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Αμερικανικής (AUA) και Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας (EAU) συστήνεται ως θεραπεία πρώτης γραμμής η νεοεπικουρική χημειοθεραπεία (neoadjuvant chemotherapy) πριν την ριζική κυστεκτομή (66). Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που έχουν αποδείξει αυξημένη αποτελεσματικότητα περιλαμβάνουν τον συνδυασμό σισπλατίνης, μεθοτρεξάτης και βινβλαστίνης (CMV), ενώ επιπλέον χρησιμοποιείται και ο συνδυασμός μεθοτρεξάτης, βινβλαστίνης, δοξορουβικίνης και σισπλατίνης (MVAC) (33,46,47). Ο συνδυασμός γεμισιταβίνης-σισπλατίνης (Gemcitabine-Cisplatin, GC) είναι γενικά ο λιγότερο τοξικός και ανεκτός από τους ασθενείς (67). Η νεοεπικουρική χημειοθεραπεία δεν ενδείκνυται σε ασθενείς με μειωμένη νεφρική λειτουργία (eGFR<60 ml/min), σε όσους έχουν αμφοτερόπλευρη απόφραξη του ανώτερου ουροποιητικού, πάσχουν από ανθεκτική αιματοουρία ή εμφανίζουν σοβαρά συμπτώματα του κατώτερου ουροποιητικού (33).

Όπως προαναφέρθηκε η ριζική κυστεκτομή με ταυτόχρονη *en bloc* αφαίρεση του προστάτη, της μήτρας, του τραχήλου και των ωοθηκών σε συνδυασμό με αμφοτερόπλευρη πυελική λεμφαδενεκτομή αποτελεί την θεραπεία εκλογής στους ασθενείς με MIBC, αλλά και σε ασθενείς με NMIBC που έχουν εμφανίσει επιπλοκές και αναποτελεσματικότητα με την ενδοκυστική θεραπεία (46).

Σε επιλεγμένους ασθενείς (T2N0M0 και απουσία CIS), που επιθυμούν την διατήρηση της κύστης ή σε ασθενείς που δεν είναι κατάλληλοι για ριζική κυστεκτομή, εφαρμόζεται η πολυτροπική θεραπεία διάσωσης της κύστης (Trimodal Therapy-TMT). Η TMT περιλαμβάνει TURBT, εξωτερική ακτινοθεραπεία της κύστης και των επιχώριων

λεμφαδένων καθώς και ταυτόχρονη συστηματική χημειοθεραπεία (33,36). Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν συνδυασμούς με βάση την πλατίνα μαζί με 5-φθοριοουρακίλη ή μιτομυκίνη C με 5-φθοριοουρακίλη ή χαμηλή δόση γεμισιταβίνης (33).

Στις περιπτώσεις ασθενών με μεταστατική και υποτροπιάζουσα νόσο επιλέγεται η χημειοθεραπεία με συνδυασμό σισπλατίνης-γεμισιταβίνης, ενώ μπορεί να χορηγηθεί και ανοσοθεραπεία (36).

Τέλος, για τον μη ουροθηλιακό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως εφαρμόζεται κυρίως η κυστεκτομή (ριζική ή μερική) και ακτινοβολία, ενώ η χημειοθεραπεία δεν ενδείκνυται στις περισσότερες περιπτώσεις (65).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ

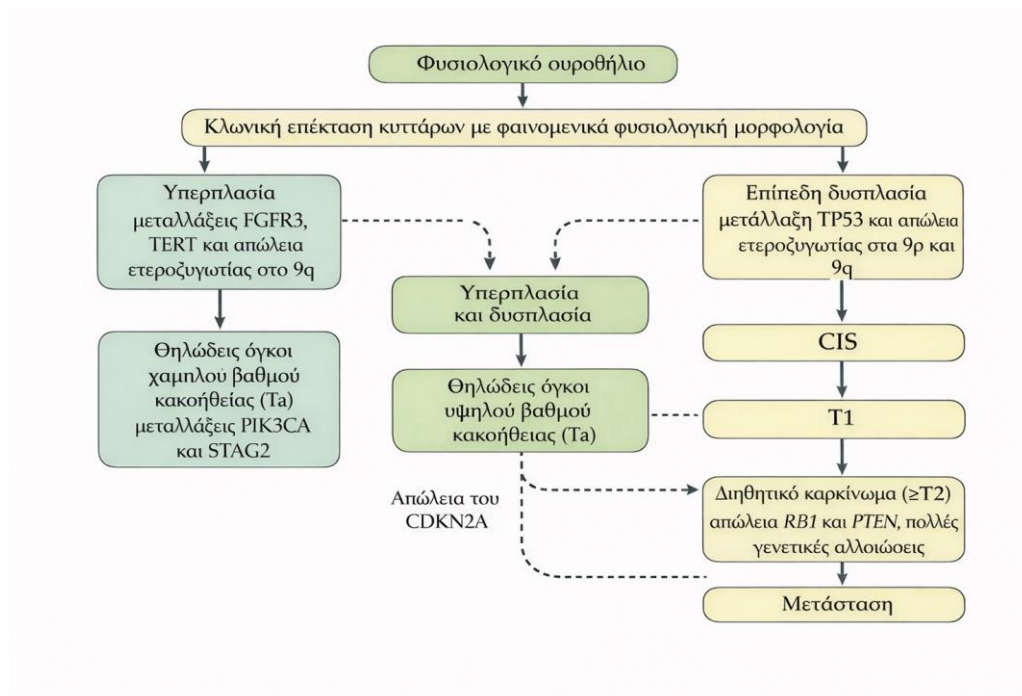
3.1 Εισαγωγή

Η σημαντική πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην μοριακή βιολογία και την γονιδιωματική, έχει συμβάλει καθοριστικά στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Κατά την καρκινογένεση συμβαίνουν γενετικές και μοριακές αλλαγές, στις οποίες περιλαμβάνονται απώλεια χρωμοσωμικών τμημάτων, γονιδιακές και επιγενετικές μεταλλάξεις, καθώς και διαταραχές στην έκφραση των miRNAs. Τα αποτελέσματα αυτών των γενετικών μεταβολών είναι αφενός η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και αφετέρου η αποφυγή της απόπτωσης και η μειωμένη ανταπόκριση στα ανασταλτικά σήματα, με αποτέλεσμα την καρκινογένεση. Η κατανόηση τόσο των βασικών μοριακών γεγονότων που εμπλέκονται στην διαταραχή των σηματοδοτικών μονοπατιών όσο και των γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων είναι σημαντική για την ανάπτυξη νέων μεθόδων στην διάγνωση, στην πρόγνωση και στην εξατομικευμένη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (79).

3.2 Μοριακή παθογένεση του ουροθηλιακού καρκινώματος

Η διεύρυνση των γενετικών και μοριακών δεδομένων τα τελευταία χρόνια έχει συμβάλει στην κατανόηση της παθογένεσης του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, αποκαλύπτοντας, ότι οι μη μυοδιηθητικοί όγκοι χαμηλού βαθμού κακοήθειας (NMIBC) και οι μυοδιηθητικοί όγκοι υψηλού βαθμού κακοήθειας (MIBC) αναπτύσσονται μέσω δύο διαφορετικών παθογενετικών οδών με διακριτά μοριακά και γενετικά χαρακτηριστικά (78,79). Η πλειονότητα των μυοδιηθητικών ουροθηλιακών καρκινωμάτων θεωρείται ότι αναπτύσσεται μέσω της επίπεδης οδού καρκινογένεσης, η οποία περιλαμβάνει την εξέλιξη ουροθηλιακής δυσπλασίας και καρκινώματος *in situ* (CIS) και χαρακτηρίζεται από αυξημένη γενετική αστάθεια. Αντίθετα, οι περισσότεροι μη μυοδιηθητικοί όγκοι αναπτύσσονται μέσω της θηλώδους οδού, συχνά σε έδαφος ουροθηλιακής υπερπλασίας. Παρότι οι περισσότεροι μη μυοδιηθητικοί όγκοι ακολουθούν σχετικά καλοήγη πορεία, ένα

ποσοστό περίπου 10–15% δύναται να εξελιχθεί σε μυοδιηθητική νόσο, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για υψηλού βαθμού νεοπλάσματα. (70)

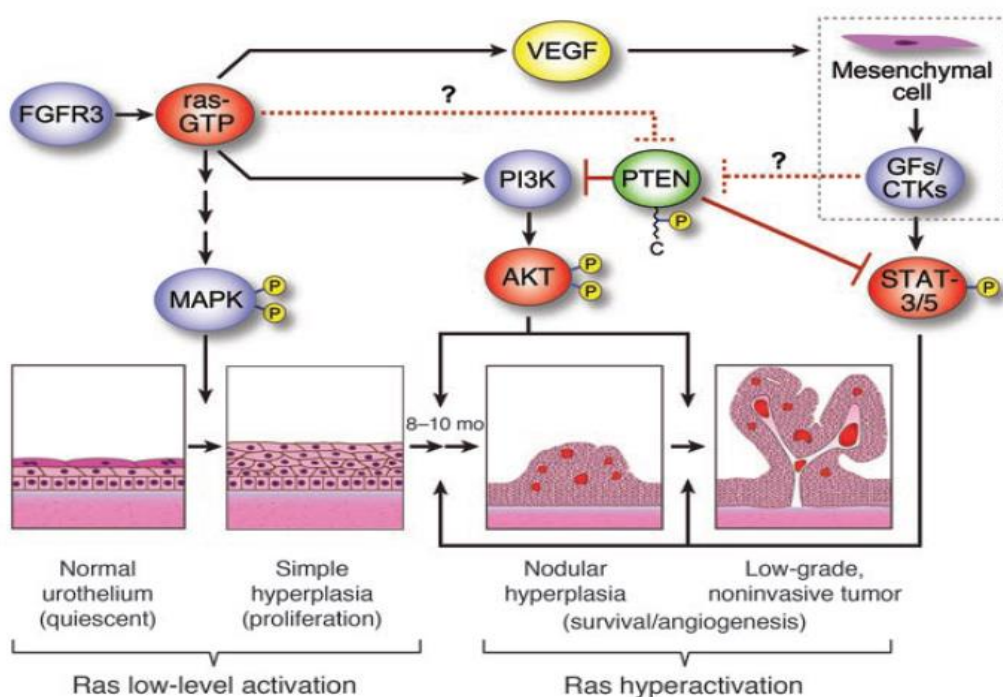


Εικ.3.1. Οι διακριτές μοριακές οδοί ογκογένεσης στους μη μυοδιηθητικούς και μυοδιηθητικούς όγκους της ουροδόχου κύστεως (70).

3.3 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια Ras–MAPK και PI3K–AKT–mTOR

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια Ras– MAPK και PI3K–AKT–mTOR αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των κυττάρων (78). Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *HRAS* και *FGFR3* συντελούν στην μόνιμη ενεργοποίηση των μονοπατιών MAPK και PI3K (ανεξάρτητα από την ύπαρξη ερεθίσματος), τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην πρώιμη ογκογένεση και την εξέλιξη μη μυοδιηθητικών ουροθηλιακών νεοπλασιών (70). Πιο συγκεκριμένα, η μόνιμα ενεργοποιημένη έκφραση του ras-GTP ενεργοποιεί το μονοπάτι MAPK, μέσω του οποίου το φυσιολογικό ουροθήλιο μετατρέπεται σε υπερπλασία, μια κατάσταση που μπορεί να παραμείνει στάσιμη για 8-10 μήνες πριν εξελιχθεί σε όγκο. Επιπλέον, η υπερενεργοποίηση της έκφρασης του ras-GTP πυροδοτεί την ενεργοποίηση σημάτων αγγειογένεσης και επιβίωσης μέσω των μονοπατιών PI3K/AKT και JAK-STAT, συντελώντας στον σχηματισμό οξώδους υπερπλασίας, η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε μη μυοδιηθητικό όγκο χαμηλού βαθμού κακοήθειας.

Ένας εναλλακτικός τρόπος ενεργοποίησης αυτών των μονοπατιών είναι μέσω φωσφορυλίωσης του C-άκρου του γονιδίου *PTEN*, το οποίο αδρανοποιείται λόγω μετάλλαξης, χάνοντας έτσι την ογκοκατασταλτική ρυθμιστική του δράση. Τέλος, η ενεργοποίηση του μονοπατιού STAT, που παρατηρείται σε ουροθηλιακούς όγκους που διακρίνονται από έντονη παρουσία μεσεγχυματικών στοιχείων, ίσως οφείλεται σε σήματα αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών που προέρχονται από το στρώμα του όγκου (Εικ.3.2) (70,78).



Εικ.3.2. Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών Ras-MAPK, JAK-STAT, PI3K-AKT-mTOR που οδηγούν στην πρόωμη ογκογένεση των μη μυοδιηθητικών ουροθηλιακών νεοπλασιών (70,78).

3.4 Χρωμοσωμικές μεταβολές στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη χρωμοσωμική αστάθεια και πληθώρα γενετικών αλλοιώσεων, οι οποίες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου. Ένα από τα πρώιμα και συχνότερα γεγονότα που παρατηρείται στην υπερπλασία και την επίπεδη δυσπλασία είναι η απώλεια γενετικού υλικού στο χρωμόσωμα 9. Η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) ή/και οι ομόζυγες διαγραφές

στις περιοχές αυτές οδηγούν σε απενεργοποίηση κρίσιμων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής ανάπτυξης (68).

Αυτές οι χρωμοσωμικές απαλοιφές έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως είναι το *CDKN2A* και το *TSC1*. Πιο συγκεκριμένα, στον γενετικό τόπο 9p21 εδράζεται το γονίδιο *CDKN2A*, το οποίο κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες p14ARF, p15 και p16. Αυτές οι πρωτεΐνες αναστέλλουν τα διμερή cdk-κυκλίνης, έχοντας ογκοκατασταλτική δράση, επειδή εμποδίζουν τα κύτταρα να εισέλθουν από την φάση G1 στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η ομόζυγη απαλοιφή της περιοχής 9p21 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την καρκινογένεση (75).

Καθώς η νόσος εξελίσσεται, ιδίως σε όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας και σε μυοδιηθητικά ουροθηλιακά καρκινώματα, παρατηρούνται επιπρόσθετες χρωμοσωμικές απώλειες σε περιοχές όπως οι 10q (*PTEN*), 13q (*RB1*) και 17p (*TP53*). Οι γενετικές αυτές αλλοιώσεις σχετίζονται με διαταραχή βασικών μηχανισμών ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης και της γονιδιωματικής σταθερότητας. Παράλληλα, καταγράφονται αυξήσεις του αριθμού αντιγράφων ή γονιδιακές ενισχύσεις στις περιοχές 1q, 3q, 5p, 7p και 8q (όπου εντοπίζεται το ογκογονίδιο *MYC*), καθώς και στις περιοχές 10p, 11q, 12p και 19q, οι οποίες συμβάλλουν στην ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης και του μεταστατικού δυναμικού των καρκινικών κυττάρων (36,76).

3.5 Γονιδιακές μεταλλάξεις στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως

Οι γονιδιακές μεταλλάξεις αποτελούν θεμελιώδη μηχανισμό στην παθογένεση και εξέλιξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, συμβάλλοντας στη διαταραχή βασικών κυτταρικών λειτουργιών όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η επιδιόρθωση του DNA και η κυτταρική διαφοροποίηση. Μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια ανευρίσκονται συχνά στα ουροθηλιακά καρκινώματα και σχετίζονται με διαφορετικούς μοριακούς υποτύπους και κλινικές εκβάσεις (68,70).

3.5.1 Ενεργοποίηση ογκογονιδίων στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως

Τα ογκογονίδια προκύπτουν από μεταλλάξεις ή υπερέκφραση φυσιολογικών γονιδίων (πρωτο-ογκογονιδίων) και οδηγούν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κατά συνέπεια σε καρκινογένεση. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, χαρακτηριστικά

παραδείγματα ογκογονιδίων αποτελούν τα εξής: *FGFR3*, *PIK3CA*, *MYC* και *HRAS*, των οποίων η ενεργοποίηση συμβάλλει στην έναρξη και εξέλιξη της κακοήθειας (70).

FGFR3

Το γονίδιο *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) ενεργοποιείται από την πρόσδεση του αντίστοιχου αυξητικού παράγοντα οδηγώντας στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού καταρράκτη μεταγωγής σημάτων RAS-MAPK, το οποίο προάγει την κυτταρική ανάπτυξη, την αγγειογένεση και την διαφοροποίηση. Σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *FGFR3* σχετίζονται με γενετική αστάθεια και συντελούν στην πρόιμη εμφάνιση ουροθηλιακής υπερπλασίας, καθώς οδηγούν σε μόνιμη ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού (68,71,72). Οι υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, όπως ο EGFR και ο ERBB2 (γνωστός και ως HER2) παρουσιάζουν υπερέκφραση στους μυοδιηθητικούς όγκους της ουροδόχου κύστεως και έχουν συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων από την πρόσδεση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) καταλήγει στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras, η οποία πυροδοτεί έναν καταρράκτη ενδοκυττάρων σηματοδοτικών σημάτων του μονοπατιού Ras-MAPK, καθώς δρα μέσω του συστήματος MAPK/ERK (Εικ.3.3) (85).

MYC

Στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS-MAPK, η ενεργοποίηση του ERK αποτελεί κρίσιμο βήμα για τη μεταφορά του σήματος στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση MSK1, οδηγώντας σε τροποποίηση της χρωματίνης καθιστώντας την μεταγραφικά ενεργή (79). Αυτή η αλλαγή ενεργοποιεί το γονίδιο *MYC*, που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα c-Myc. Ο c-Myc επάγει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο μέσω των συμπλόκων κυκλινών και κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (Cyclin D1-CDK4, Cyclin E-CDK2). Ωστόσο, η προγνωστική σημασία του *MYC* στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης παραμένει ασαφής, καθώς δεν έχει τεκμηριωθεί σαφής συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης του *MYC* και του κλινικού στάδιου του ουροθηλιακού καρκινώματος (Εικ.3.3) (87).

PIK3CA

Το γονίδιο *PIK3CA* κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110α της φωσφατιδυλνινοσιτόλης-3-κινάσης (PI3K) και αποτελεί βασικό ρυθμιστή του

σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT, το οποίο εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη και την επιβίωση των κυττάρων. Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *PIK3CA* οδηγούν σε αυξημένη δραστηριότητα της κινάσης PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) και συνεπακόλουθη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT, προάγοντας την καρκινογένεση. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, μεταλλάξεις του *PIK3CA* παρατηρούνται κυρίως σε μη μυοδιηθητικούς όγκους και συχνά συνυπάρχουν με μεταλλάξεις του FGFR3, υποδηλώνοντας τον ρόλο τους σε πρώιμα στάδια της νόσου (36,70).

HRAS

Το γονίδιο *HRAS* ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων *RAS* και κωδικοποιεί μία μικρή GTPάση που συμμετέχει στην μεταγωγή σημάτων από τους κυτταρικούς υποδοχείς προς ενδοκυττάριας οδούς οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την επιβίωση. Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *HRAS* έχουν ανιχνευθεί σε ποσοστό περίπου 5–10% των ουροθηλιακών καρκίνων και οδηγούν σε μόνιμη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης, ανεξάρτητα από εξωκυττάρια ερεθίσματα. Ως αποτέλεσμα, ενεργοποιούνται οι σηματοδοτικές οδοί MAPK/ERK και PI3K/AKT, οι οποίες προάγουν την καρκινογένεση και την ανάπτυξη του όγκου. Οι μεταλλάξεις του *HRAS* εμφανίζονται συχνότερα σε μη μυοδιηθητικούς όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας και συχνά συνυπάρχουν με άλλες μοριακές διαταραχές που επηρεάζουν τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου. Η μελέτη του *HRAS* έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο για την ανάπτυξη νέων στοχευμένων αντικαρκινικών θεραπειών (78,85).

3.5.2 Απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αποτελούν μια κατηγορία γονιδίων που φυσιολογικά δρουν προστατευτικά έναντι της καρκινογένεσης, ρυθμίζοντας κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός κύκλος, η επιδιόρθωση του DNA, η απόπτωση και η διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας. Η απώλεια της λειτουργίας τους, λόγω μεταλλάξεων, διαγραφών ή επιγενετικών μεταβολών, οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συσσώρευση γενετικών βλαβών που ευνοούν την ανάπτυξη νεοπλασιών. Στον καρκίνο

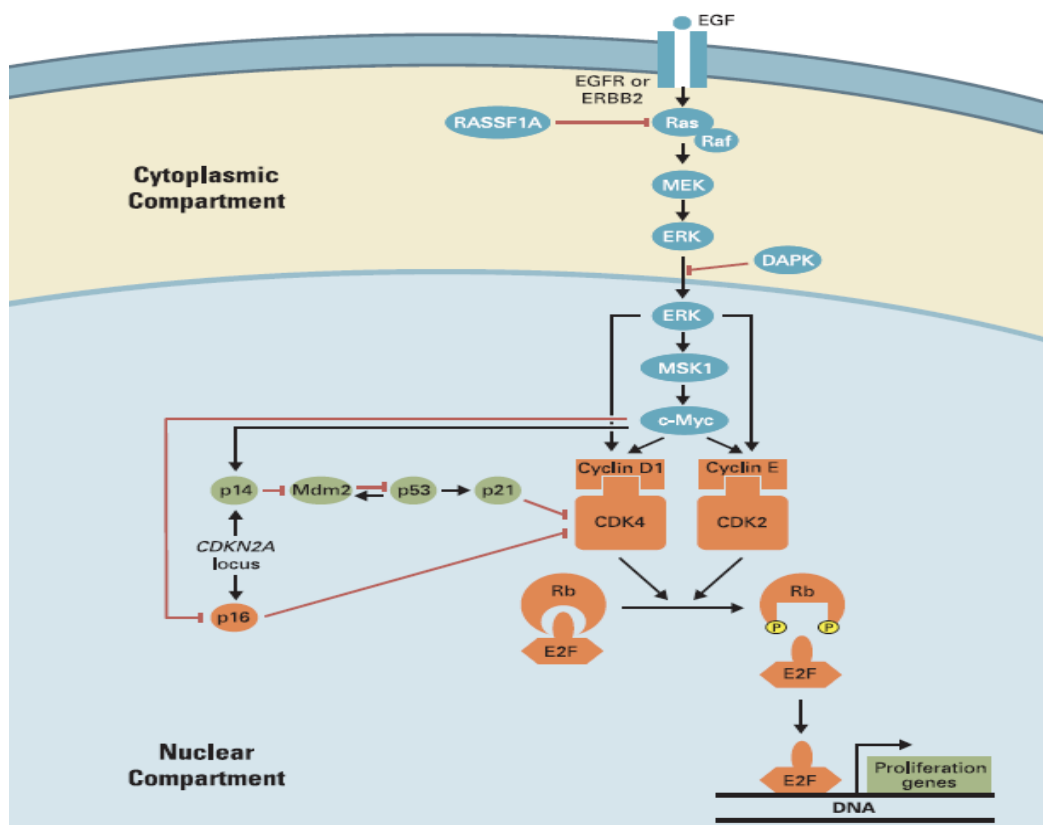
της ουροδόχου κύστεως, συχνές αλλοιώσεις παρατηρούνται στα ογκοκατασταλτικά γονίδια *TP53*, *RB*, *CDKN2A*, *RASSF1A* και *PTEN*, τα οποία αναλύονται παρακάτω (36,79).

TP53

Το γονίδιο *TP53* εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53, που έχει ογκοκατασταλτική δράση και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την πρόοδο του ουροθηλιακού καρκίνου (79). Συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η αγγειογένεση, η απόπτωση και η επιδιόρθωση του DNA. Η πρωτεΐνη p53 αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στην μετάβαση μεταξύ των φάσεων G1-S μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου *p21^{WAF1/CIP1}* (80). Σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο *TP53*, που είναι κυρίως ανινοχημικές, οδηγούν στην παραγωγή μιας πιο σταθερής πρωτεΐνης που δεν αποικοδομείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα με αποτέλεσμα την απώλεια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή της καρκινογένεσης. Σε πολλές μελέτες έχει επιβεβαιωθεί ότι τόσο οι μεταλλαγές στο γονίδιο όσο και η συσσώρευση της p53 στον πυρήνα αποτελούν προγνωστικό δείκτη για την έκβαση των μυοδιηθητικών καρκίνων της κύστεως συμπεριλαμβανομένου και του CIS (81).

Το γονίδιο *p21^{WAF1/CIP1}* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21, που είναι ένας αναστολέας των εξαρτώμενων από κυκλίνες κινασών (CDKI) και αποτελεί βασικό μεσολαβητή της δράσης της p53. Η απώλεια της έκφρασής της έχει συσχετιστεί με δυσμενέστερη εξέλιξη του ουροθηλιακού καρκίνου και χειρότερη πρόγνωση, ενώ η διατήρηση της έκφρασης φαίνεται ότι μετριάξει τις αρνητικές μεταβολές της p53 (79).

Ένα επιπλέον μονοπάτι ρύθμισης της p53 είναι ο άξονας p14/MDM2. Τα αυξημένα επίπεδα της p53 ενεργοποιούν την μεταγραφή του γονιδίου *MDM2*, η πρωτεΐνη του οποίου δεσμεύει την p53 και την μεταφέρει στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Το γονίδιο *MDM2* αναστέλλεται μεταγραφικά από την p14. Το γονίδιο *p14^{ARF}* μπορεί να απενεργοποιηθεί είτε μέσω ομόζυγης διαγραφής ή μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή της. Αυξημένα επίπεδα της p14 έχουν συνδεθεί με δυσμενή πρόγνωση του ουροθηλιακού καρκινώματος (Εικ.3.3) (79,80,81).



Εικ.3.3. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονοπατιών Ras-MAPK (μπλε), p53 (πράσινο) και Rb (πορτοκαλί) (79).

RB

Το γονίδιο *RB* (ρετινοβλάστωμα) εδράζεται στο χρωμόσωμα 13 και κωδικοποιεί την πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη Rb που συμμετέχει στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (12,79). Η πρωτεΐνη Rb είναι ενεργή όταν είναι αποφωσφορυλιωμένη στην φάση G0/G1 και δεσμεύεται εξειδικευμένα με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F. Κατά το τέλος της φάσης G1, η φωσφορυλίωσή της από τα σύμπλοκα CDK4/6 (cyclin-dependent kinase) οδηγεί στην αποδέσμευση των παραγόντων E2F και στην ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων που προάγουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *RB* έχουν εντοπιστεί στο 25-30% των καρκίνων της ουροδόχου κύστεως, ενώ η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) στον γενετικό τόπο 13q έχει συσχετιστεί με απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης Rb στους μυοδιηθητικούς όγκους της ουροδόχου κύστεως (84). Σε κάποιους άλλους τύπους ουροθηλιακών όγκων υπάρχει έντονη συσσώρευση της υπερφωσφορυλιωμένης και ανενεργής Rb, που μπορεί να προκύψει είτε από μειωμένη έκφραση της p16 είτε από υπερέκφραση της κυκλίνης D1, γεγονός που διαταράσσει τον

κυτταρικό κύκλο και συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (Εικ.3.3) (83).

CDKN2A

Το γονίδιο *CDKN2A* (το οποίο είναι αναστολέας κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 2A) εδράζεται στο χρωμόσωμα 9, το οποίο εμφανίζει συχνά μεταλλάξεις και ελλείψεις γονιδίων όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω (71). Το *CDKN2A* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p16, η οποία προσδένεται στις CDK4 και CDK6 εμποδίζοντας την σύνδεση με την κυκλίνη D (16,36). Η αναστολή της ενεργότητας του διμερούς CDK4,6-κυκλίνης D αποτρέπει την φωσφορυλίωση της RB και προάγει την μετάβαση του κυττάρου από την φάση G1 στην φάση S. Οι αλλοιώσεις του *CDKN2A* που αφορούν είτε την διαγραφή είτε την υπερμεθυλίωση του, συντελούν στην μειωμένη έκφραση της p16. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπερφωσφορυλίωση της Rb και την ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Συνεπώς, στους μη μυοδιηθητικούς και μυοδιηθητικούς όγκους η απώλεια *CDKN2A* έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση. Ωστόσο, σε ορισμένους μυοδιηθητικούς όγκους έχει παρατηρηθεί ότι η αυξημένη έκφραση του *CDKN2A* όταν συνυπάρχει με απώλεια του γονιδίου *RB1* οδηγεί σε αδυναμία αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και σχετίζεται με αυξημένη επιθετικότητα (74).

RASSF1A

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *RASSF1A* συμβάλλει φυσιολογικά στην αναστολή της δραστηριότητας της ενεργοποιημένης Ras. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έχει αποδειχθεί ότι η υπερμεθυλίωση του, αναστέλλει την λειτουργία του, με αποτέλεσμα να συνεχίζεται ανεξέλεγκτα η μεταβίβαση σημάτων. Η μεταβολή αυτή έχει συσχετιστεί με πιο προχωρημένα στάδια της νόσου (86).

PTEN

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN* εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3 και η απενεργοποίησή του έχει καταγραφεί σε σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Κωδικοποιεί μία λιπιδική και πρωτεϊνική φωσφατάση, η οποία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αρνητική ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR. Η απώλεια της λειτουργίας του PTEN μπορεί να προκύψει μέσω γενετικών μεταλλάξεων, μεθυλίωσης του υποκινητή, μετα-μεταγραφικής ρύθμισης από

miRNAs ή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της πρωτεΐνης, όπως η φωσφορυλίωση. Οι μεταβολές αυτές οδηγούν σε υπερενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR, προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και την εξέλιξη της νόσου (36,70,79).

3.6 Μοριακοί υπότυποι στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως

Παρά το γεγονός ότι η παραδοσιακή ταξινόμηση βασίζεται στο στάδιο και τον βαθμό κακοήθειας (TNM), παρατηρήθηκε ότι ασθενείς με παρόμοια κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά εμφάνιζαν σημαντικές διαφορές ως προς την πορεία της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Ο συνδυασμός γονιδιωματικών τεχνολογιών, όπως οι μικροσυστοιχίες DNA και η αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) με τις μεθόδους βιοπληροφορικής, οι οποίες επιτρέπουν την ανάλυση μεγάλου όγκου δεδομένων, κατέστησαν εφικτό μια σύγχρονη μοριακή ταξινόμηση στους όγκους της ουροδόχου κύστεως.

Η μελέτη των προτύπων γονιδιακής έκφρασης και των μοριακών μεταβολών οδήγησε στην αναγνώριση διακριτών μοριακών υποτύπων, οι οποίοι αντανakλούν διαφορετικούς βιολογικούς μηχανισμούς καρκινογένεσης. Οι υπότυποι αυτοί συμβάλλουν τόσο στην καλύτερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου όσο και στον διαχωρισμό των όγκων σε κατηγορίες με διαφορετική πρόγνωση. Επιπλέον, η μοριακή ταξινόμηση έχει σημαντικές κλινικές προεκτάσεις, καθώς υποστηρίζει την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων (36,77,88).

3.6.1 Η μελέτη Lund

Η αρχική μοριακή ταξινόμηση του ουροθηλιακού καρκινώματος σε υποτύπους πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του πανεπιστημίου Lund, η οποία συνδυάζοντας δεδομένα γονιδιακής έκφρασης, μεταλλάξεων και ιστολογικών χαρακτήρων, προσδιόρισε πέντε υποκατηγορίες: Urobasal A, Urobasal B, Infiltrated, Genomically Unstable (γενετικά ασταθείς), SCC-like όγκοι (μοιάζουν με πλακώδες καρκίνωμα).

Οι όγκοι Urobasal A χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα δεικτών ουροθηλιακής διαφοροποίησης, γονιδίων κυτταρικής προσκόλλησης και πρώιμων γονιδίων του κυτταρικού κύκλου. Ειδικότερα, σε αυτούς τους όγκους παρατηρείται αυξημένη έκφραση των γονιδίων *FGFR3*, *CCND1*, *TP63*, *KRT5*, *KRT13*, *KRT15*, *KRT17*, *RBL2* και *ID2*.

Επιπλέον, η πλειοψηφία των Urobasal A είναι μη μυοδιηθητικοί όγκοι χαμηλού βαθμού κακοήθειας με πολύ καλή πρόγνωση (89).

Οι Genomically Unstable (γενετικά ασταθείς) όγκοι χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό κακοήθειας και αυξημένη επιθετικότητα. Παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο *TP53* καθώς και αυξημένη έκφραση των γονιδίων *CCNE*, *ERBB2*, *KPNA2*, *HMOX1*, *CTSL1*, *CTSL2*, ενώ εμφανίζουν μειωμένη έκφραση κερατινών και του *PTEN*.

Οι SCC-like παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση κερατινών, που δεν εκφράζονται φυσιολογικά στο ουροθήλιο και σχετίζονται με κακή πρόγνωση. Τα γονίδια των κερατινών είναι τα εξής: *KRT4*, *KRT6A*, *KRT6B*, *KRT6C*, *KRT14*, *KRT16*.

Οι Urobasal B έχουν ομοιότητες με τους Urobasal A ως προς την αυξημένη έκφραση των γονιδίων *FGFR3*, *CCND1* και *TP63*. Ωστόσο, αυτός ο υπότυπος διακρίνεται από συχνότερες μεταλλάξεις του *TP53* και αυξημένη έκφραση κερατινών που είναι χαρακτηριστικές του όγκου SCC-like. Επιπλέον, περίπου το 50% των Urobasal B είναι μυοδιηθητικοί και χαρακτηρίζονται από μια πιο επιθετική συμπεριφορά έναντι των Urobasal A.

Οι infiltrated χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια και έντονη παρουσία ανοσοκυττάρων και μυοϊνοβλαστών, ενώ όσον αφορά το πρότυπο πρωτεϊνικής έκφρασης παρουσιάζουν ομοιότητες με τους όγκους Urobasal B, SCC-like και Genomically Unstable (89).

3.6.2 Η μελέτη από το UNC

Στο πλαίσιο της περαιτέρω διερεύνησης της μοριακής ετερογένειας του μυοδιηθητικού καρκινώματος, η ομάδα του University of North Carolina (UNC) χρησιμοποιώντας δεδομένα γονιδιακής έκφρασης από μυοδιηθητικούς όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας, κατέληξε στην ταυτοποίηση δύο μοριακών υποτύπων, τον luminal και τον basal. Οι luminal όγκοι χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις των γονιδίων *FGFR3* και *TSC1* και εκφράζουν δείκτες ουροθηλιακής διαφοροποίησης, όπως ουροπλακίνες (*UPK1B*, *UPK2*, *UPK3A*), το γονίδιο *KRT20*, τον μεταγραφικό παράγοντα *GATA3* και τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER). Οι basal όγκοι χαρακτηρίζονται από μεταβολές στο σηματοδοτικό μονοπάτι RB και υψηλή έκφραση των γονιδίων *CD44*, *CCND1*, *CCNE1*, *E2F3*, *KRT5*, *KRT6B*, *KRT14*. Τέλος παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συχνότητα του basal υποτύπου στις γυναίκες, ο οποίος συνδέεται και με δυσμενέστερη πρόγνωση (90).

Την ίδια χρονική περίοδο, η επιστημονική ομάδα από το MD Anderson Cancer Center πραγματοποίησε ανάλυση γονιδιακής έκφρασης mRNA από τους μυοδιηθητικούς όγκους της ουροδόχου κύστεως και προσδιόρισε τρεις υποτύπους: basal, luminal και p-53. Οι υπότυποι basal και luminal παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες ως προς το μοριακό τους προφίλ με τους αντίστοιχους υποτύπους της ταξινόμησης του UNC. Ειδικότερα, οι basal όγκοι διακρίνονται από αυξημένη ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων p63, stat-3, NFκB, Hif1a και των κερατινών KRT5/6 και KRT14 (88). Αντίθετα, οι luminal όγκοι εμφανίζουν υψηλή ενεργοποίηση του μονοπατιού ER/TRIM24, του επιθηλιακού βιοδείκτη E-καντερίνη (*CDH1*) και μέλη της οικογένειας miR-200. Επιπρόσθετα, παρατηρούνται τόσο μεταλλάξεις στο γονίδιο *FGFR3* όσο και ενισχυμένη έκφραση των γονιδίων *KRT20*, *ERBB2*, *CCND1*, *FOXA1*, *GATA3* και *PPARG* (36,88,91). Ο υπότυπος p53 χαρακτηρίζεται από αυξημένη ενεργοποίηση του φυσιολογικού γονιδίου *TP53* και παρότι εκφράζει παρόμοιους δείκτες με τους luminal όγκους, διαφοροποιείται από αυτούς λόγω της ανθεκτικότητάς του στην νεοεπικουρική χημειοθεραπεία με βάση την σισπλατίνη (NAC) (91).

3.6.3 Η μελέτη TCGA

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε από το Αμερικανικό ερευνητικό πρόγραμμα The Cancer Genome Atlas (TCGA) αποτέλεσε καθοριστικό σταθμό στην κατανόηση της μοριακής ετερογένειας των μυοδιηθητικών όγκων της κύστεως. Σε αντίθεση με προηγούμενες ταξινομήσεις, που βασίζονταν κυρίως σε δεδομένα γονιδιακής έκφρασης, η μελέτη TCGA ενσωμάτωσε δεδομένα μεταλλάξεων, επιγενετικών τροποποιήσεων και αριθμητικών αλλοιώσεων DNA, οδηγώντας στον προσδιορισμό πέντε υποτύπων: luminal, luminal-infiltrated, luminal-papillary, basal/squamous και neuronal. Επιγραμματικά, ο luminal υπότυπος χαρακτηρίζεται από υψηλή έκφραση γονιδίων των ουροπλακινών και των γονιδίων *KRT20* και *SNX31*. Ο υπότυπος luminal-infiltrated διακρίνεται από ενισχυμένη έκφραση δεικτών της οικογένειας miR-200, μυοϊνοβλαστών και δεικτών επιθηλιακής-μεσεγγυματικής μετάβασης (*TWIST1*, *ZEB1*), παρουσιάζοντας ανθεκτικότητα στην χημειοθεραπεία με βάση την σισπλατίνη. Ο υπότυπος luminal-papillary έχει χαμηλό κίνδυνο εξέλιξης και εμφανίζει μεταλλάξεις στο γονίδιο *FGFR3* ή σε άλλες περιπτώσεις παρατηρείται γονιδιακή συγχώνευση με το *TACC3*. Συμπληρωματικά, παρουσιάζει θηλώδες ιστολογικό πρότυπο και ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Sonic Hedgehog, ενώ και αυτός φαίνεται να εμφανίζει μειωμένη ανταπόκριση στη

χημειοθεραπεία με βάση την σισπλατίνη. Ο υπότυπος basal-squamous χαρακτηρίζεται από υψηλή έκφραση γονιδίων όπως τα *CD44*, *KRT5*, *KRT6A*, *KRT14*, *TGM1*, *DSC3* και *PI3* όπως επίσης και από αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο *TP53*, ενώ εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες. Επιπλέον, παρουσιάζει αυξημένη έκφραση ανοσολογικών δεικτών όπως τα *CD274 (PD-L1)* και *CTLA4*, γεγονός που υποδηλώνει έντονη ανοσοκυτταρική διήθηση. Τέλος, ο υπότυπος neuronal, στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν παρουσιάζει σαφή ιστοπαθολογική διάκριση από τους υπόλοιπους τύπους μυοδιηθητικού καρκίνου. Ωστόσο, χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα μεταλλάξεων στα γονίδια *TP53* και *RB1*, παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στα μικροκυτταρικά καρκινώματα άλλων ιστών (92).

3.6.4 Η μελέτη CMC

Παρά το γεγονός ότι οι προτεινόμενες μοριακές ταξινομήσεις εμφάνιζαν σημαντικές ομοιότητες, η ετερογένεια στην ονοματολογία και η διαφοροποίηση όσον αφορά τα μοριακά χαρακτηριστικά περιόριζαν την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη. Στο πλαίσιο αυτό, κατέστη αναγκαίο η ανάπτυξη μιας ενοποιημένης μοριακής ταξινόμησης (Consensus Molecular Classification). Στην CMC αναλύθηκαν δεδομένα από προϋπάρχοντα συστήματα μοριακής ταξινόμησης των μυοδιηθητικών όγκων, καταλήγοντας στον προσδιορισμό έξι μοριακά διακριτών υποτύπων: LumP (luminal-papillary), LumNS (luminal-nonspecified), LumU (luminal unstable), stroma-rich, Ba/Sq (basal/squamous) και NE (neuroendocrine-like). Παρακάτω αναφέρονται επιγραμματικά τα χαρακτηριστικά του κάθε υποτύπου.

Ο υπότυπος LumP (luminal- papillary) διακρίνεται από ενεργοποίηση του μονοπατιού FGFR3 και παρουσιάζονται επίσης μεταλλάξεις στα γονίδια *FGFR3* και *KDM6A*, ενώ το γονίδιο *CDKN2A* εμφανίζει ομόζυγη διαγραφή. Ο υπότυπος LumU (luminal unstable) χαρακτηρίζεται από έντονη γενετική αστάθεια, υψηλό φορτίο μεταλλάξεων και μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων DNA, καθώς και ενισχύσεις στα γονίδια *ERBB2*, *E2F3* και *SOX4*. Επίσης, παρατηρούνται μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53* και *ERCC2*. Ο LumNS (luminal-nonspecified) χαρακτηρίζεται κυρίως από μεταλλάξεις στο γονίδιο *ELF3*. Γενικά, όλοι οι luminal όγκοι παρουσιάζουν αυξημένη ενεργοποίηση των ρυθμιστικών δικτύων PPARG, ERBB2 και GATA3.

Ο υπότυπος stroma rich διακρίνεται από την έντονη παρουσία στρωματικών κυττάρων, όπως ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες καθώς και από την παρουσία B λεμφοκυττάρων, ενώ

χαρακτηρίζεται από την χειρότερη πρόγνωση της νόσου συγκριτικά με τους υπόλοιπους υποτύπους.

Ο υπότυπος Ba/Sq χαρακτηρίζεται από πλακώδη διαφοροποίηση και δυσμενή πρόγνωση. Το μικροπεριβάλλον του όγκου χαρακτηρίζεται από την παρουσία μυοϊνοβλαστών και ινοβλαστών, ενώ παρατηρείται έντονη ανοσολογική διήθηση, κυρίως από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (CD8⁺) και κύτταρα NK. Επιπλέον, εμφανίζει αυξημένη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών δικτύων STAT3, HIF1A και EGFR, υποδηλώνοντας την ύπαρξη φλεγμονώδους και υποξικού μικροπεριβάλλοντος. Τέλος, ο υπότυπος αυτός χαρακτηρίζεται από υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στα γονίδια *TP53* και *RB1*.

Ο υπότυπος NE εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του μικροκυτταρικού καρκινώματος, ενώ παρατηρούνται συχνές μεταβολές στα γονίδια *TP53* και *RB1*. Από όλους τους υποτύπους παρουσιάζει τη δυσμενέστερη πρόγνωση.

Τόσο η ταξινόμηση TCGA όσο και η Consensus Molecular Classification συνέβαλαν περαιτέρω στη σύνδεση των μοριακών προφίλ με στοχευμένες και ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις, ενισχύοντας τη σημασία της εξατομικευμένης θεραπείας στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την CMC ταξινόμηση οι όγκοι του υποτύπου LumP, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις του *FGFR3*, ενδέχεται να ανταποκρίνονται σε μόρια αναστολές έναντι του συγκεκριμένου υποδοχέα. Αντίστοιχα, ο υπότυπος Ba/Sq, λόγω της αυξημένης έκφρασης των ανοσολογικών δεικτών PD-L1 και CTLA4, καθώς επίσης και του EGFR, φαίνεται να αποτελεί κατάλληλο υποψήφιο για ανοσοθεραπεία με αναστολές των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος και αναστολές του EGFR αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, οι Ba/Sq και οι LumNS όγκοι φαίνεται να ωφελούνται από την θεραπεία NAC, σε αντίθεση με τους stroma-rich όγκους που δεν ανταποκρίνονται σε αυτή την θεραπεία.

Ο υπότυπος LumU, που σχετίζεται με αυξημένη γενετική αστάθεια και επιθετική βιολογική συμπεριφορά, ενδέχεται να ωφελείται περισσότερο από θεραπεία με ακτινοβολία. Τέλος, υπότυπος NE-like χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα επιθετική πορεία και απαιτεί εξειδικευμένες θεραπευτικές στρατηγικές, όπως είναι το μονοκλωνικό αντίσωμα Atezolizumab (36,93).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ

4.1 Μοριακοί βιοδείκτες στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως αποτελεί μια ιδιαίτερα ετερογενή νόσο, η οποία συνοδεύεται από σημαντικές προκλήσεις στη διάγνωση, την θεραπευτική αντιμετώπιση και την εκτίμηση της πρόγνωσης. Οι διαθέσιμες διαγνωστικές μέθοδοι, όπως η κυστεοσκόπηση, η βιοψία και οι απεικονιστικές τεχνικές (αξονική και μαγνητική τομογραφία), είναι κατά κανόνα επεμβατικές και δεν διαθέτουν πάντα την απαιτούμενη ευαισθησία. Ως αποτέλεσμα, είναι δυνατόν να προκύψει ανακριβής εκτίμηση της έκτασης και της βιολογικής συμπεριφοράς του όγκου, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μη βέλτιστη θεραπευτική διαχείριση (95).

Για αυτό τον λόγο είναι αναγκαίο να προσδιοριστούν κατάλληλοι μοριακοί δείκτες στο αίμα, στα ούρα και στους ιστούς των ασθενών με κύριο στόχο την έγκαιρη διάγνωση, την βελτίωση της πρόγνωσης καθώς και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στην φαρμακευτική αγωγή. Παρά το γεγονός ότι οι ουρολογικοί βιοδείκτες έχουν μελετηθεί εκτενώς, οι τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες δεν έχουν ακόμη ενσωματώσει πλήρως την χρήση τους στην κλινική πράξη.

Ως μοριακός βιοδείκτης ορίζεται κάθε διακριτό και μετρήσιμο μόριο, το οποίο παράγεται είτε από τα καρκινικά κύτταρα είτε ως απάντηση του οργανισμού στην παρουσία του όγκου και ανιχνεύεται σε δείγματα ιστού (κυτταρικοί δείκτες) ή σε βιολογικά υγρά των ασθενών (διαλυτοί ή κυκλοφορούντες δείκτες). Για να είναι ιδανικός και αξιόπιστος θα πρέπει να συνδυάζει μια σειρά κριτηρίων (96):

- Υψηλή αναλυτική και διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα.
- Υψηλή προγνωστική αξία και αποτελεσματικότητα.
- Αντιστοιχία των μεταβολών του στα βιολογικά υγρά με το μέγεθος του όγκου, τον βαθμό κακοήθειας, την πορεία της νόσου και την παρουσία μεταστάσεων.
- Ικανότητα διαφορικής διάγνωσης του καρκίνου με άλλες παθολογικές καταστάσεις και ιδιαίτερα καλοήθεις υπερπλασίες.
- Σταθερότητα των επιπέδων του στα βιολογικά υγρά.

- Φθηνός και εύκολος προσδιορισμός στα βιολογικά υγρά και τους ιστούς από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους (ELISA, RIA, PCR).

4.1.1 Πρωτεϊνικοί μοριακοί δείκτες στα ούρα

BTA test (Bladder Tumor Antigen)

Δύο δοκιμασίες που έχουν εγκριθεί από τον FDA για την αρχική διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως είναι η ποιοτική BTA stat και η ποσοτική BTA TRAK. Και οι δύο ανιχνεύουν την παρουσία της πρωτεΐνης που σχετίζεται με τον ανθρώπινο παράγοντα H του συμπληρώματος (hCFHrp), καθώς και του ίδιου του παράγοντα H. Η πρωτεΐνη hCFHrp εκτιμάται ότι παρεμβαίνει στον καταρράκτη του συμπληρώματος, επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να διαφύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα (97,100).

Η BTA stat είναι μια απλή, γρήγορη και οικονομική ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία που περιλαμβάνει την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης hCFHrp. Η BTA TRAK είναι πιο περίπλοκη δοκιμασία που εκτελείται σε εργαστηριακό χώρο και βασίζεται στην ανοσοενζυμική τεχνική sandwich ELISA για την μέτρηση της ποσότητας του αντιγόνου (hCFHrp) στα ούρα. Έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα σε σχέση με την BTA stat για όγκους υψηλού βαθμού και προχωρημένου σταδίου (100).

Ωστόσο, δεδομένου ότι η πρωτεΐνη hCFHrp εκφράζεται και σε άλλους καρκίνους του ουρογεννητικού συστήματος, καθώς και σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, η χρήση των δοκιμασιών BTA ενδέχεται να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, παρουσιάζουν χαμηλότερη ειδικότητα σε σύγκριση με την κυτταρολογική εξέταση των ούρων, αλλά υψηλότερη ευαισθησία. Παράλληλα, η ευαισθησία τους είναι περιορισμένη για όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας (36%), ενώ είναι σημαντικά αυξημένη σε όγκους υψηλού βαθμού (91%) (97,100). Για τους παραπάνω λόγους συστήνεται και η συνδυαστική χρήση της κυστεοσκόπησης για την παρακολούθηση του ουροθηλιακού καρκινώματος. (99).

UBC Tests

Οι κυτταροκερατίνες (CKs) είναι δομικές πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων του κυτταροσκελετού, οι οποίες εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα. Στον άνθρωπο έχουν αναγνωριστεί συνολικά 20 τύποι κυτταροκερατινών, εκ των οποίων οι CK8, CK18, CK19 και CK20 έχουν μελετηθεί ως πιθανοί βιοδείκτες του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.

Δεδομένου ότι αποτελούν ενδοκυττάρια πρωτεΐνες, η παρουσία τους στα ούρα σχετίζεται με την απελευθέρωσή τους κατόπιν κυτταρικής λύσης ή θανάτου. Δύο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση κυτταροκερατινών, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, είναι η UBC-Rapid Test και η UBC-ELISA Test αντίστοιχα. Και οι δύο βασίζονται στον εντοπισμό θραυσμάτων των κυτταροκερατινών CK8 και CK18. Όσον αφορά την ευαισθησία και την ειδικότητα, παρατηρούνται υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων καθώς και περιορισμένη ικανότητα ανίχνευσης όγκων χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Γενικά αυτές οι δοκιμασίες είναι κατώτερες σε σύγκριση με την κυτταρολογική εξέταση (98,99,100).

NMP22 (Nuclear Matrix Protein-22)

Οι πυρηνικές πρωτεΐνες (NMPs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της μίτωσης, συμμετέχοντας στην κατανομή της χρωματίνης στα θυγατρικά κύτταρα. Ένα μέλος αυτής της οικογένειας, η NMP-22 βρίσκεται σε σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις στα κακοήγη ουροθηλιακά κύτταρα και ελευθερώνεται στα ούρα με την απόπτωση των κυττάρων (98,100). Δύο δοκιμασίες που είναι έχουν πάρει έγκριση από τον FDA για την ανίχνευση της NMP-22 στα ούρα είναι η ποιοτική NMP22 Elisa (Alere NMP22) και η ποσοτική NMP22 BladderChek (98). Και οι δυο δοκιμασίες εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία από την κυτταρολογική εξέταση, αλλά η ειδικότητά τους παραμένει χαμηλότερη (αυξημένη εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων). Λόγω της αυξημένης ευαισθησίας της δοκιμασίας NMP22 στους όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας, δεν ενδείκνυται για την αρχική διάγνωση της νόσου, αλλά κυρίως για την παρακολούθηση της πορείας της (98).

BCLA (Bladder Cancer Antigen)

Οι BCLA-1 και BCLA-4 είναι μεταγραφικοί παράγοντες που εντοπίζονται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (99). Αυτές οι πρωτεΐνες σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την αγγειογένεση των καρκινικών κυττάρων (98).

Ειδικότερα, η BLCA-4 έχει ανιχνευθεί σε ολόκληρη την ουροδόχο κύστη, τόσο στην περιοχή του όγκου όσο και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ενώ η έκφρασή της δεν φαίνεται να επηρεάζεται ούτε από τον βαθμό κακοήθειας ούτε από καλοήθεις ουρολογικές παθήσεις. Αντίστοιχα, η BLCA-1 εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, χωρίς όμως

να παρουσιάζει συσχέτιση με τον βαθμό του όγκου. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευσή τους είναι η ELISA.

Οι τρέχουσες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι BLCA-1 και BLCA-4 αποτελούν υποσχόμενους βιοδείκτες για τη διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία τους ως κατάλληλων δεικτών ανίχνευσης της νόσου (98).

Σουρβιβίνη

Η σουρβιβίνη είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων της απόπτωσης (Inhibitor of Apoptosis-IAP) και συμμετέχει στην αναστολή του απόπτωσης και στην ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης. Η survivin εκφράζεται φυσιολογικά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ενώ στους φυσιολογικούς ιστούς της ενήλικης ζωής απουσιάζει. Αντίθετα, η ανίχνευση της σουρβιβίνης στα ούρα, τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο mRNA, σχετίζεται με την παρουσία καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (98,101). Το mRNA της σουρβιβίνης μπορεί να ανιχνευθεί στα ούρα με τη μέθοδο της bio-dot ανοσοδοκιμασίας, η οποία βασίζεται στη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος, ενώ τα αυξημένα επίπεδά του έχουν συσχετισθεί με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας και πιο προχωρημένο παθολογοανατομικό στάδιο (102). Η σουρβιβίνη αποτελεί έναν δυνητικά χρήσιμο μοριακό βιοδείκτη για την διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, καθώς η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου είναι πολύ υψηλή στους υψηλούς βαθμούς κακοήθειας ουροθηλιακού όγκου. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω κλινικές μελέτες πριν την ευρεία κλινική εφαρμογή της (98,99,102).

4.1.2 Κυτταρολογικοί μοριακοί δείκτες στα ούρα

ImmunoCyt™

Η ImmunoCyt™ πρόκειται για μια εγκεκριμένη από τον FDA δοκιμασία ανοσοφθορισμού στην οποία γίνεται χρήση τριών μονοκλωνικών αντισωμάτων (M344, LDQ10, 19A211) για την ανίχνευση αντιγόνων σε ουροθηλιακά καρκινικά κύτταρα που αποβάλλονται με τα ούρα. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει ικανοποιητικά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας τόσο σε όγκους χαμηλού βαθμού όσο και σε όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας. Ωστόσο, πρόκειται για μια δαπανηρή μέθοδο που απαιτεί επαρκή αριθμό κυττάρων στο δείγμα καθώς και εξειδικευμένο προσωπικό για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Για τον λόγο

αυτό, προτείνεται για την παρακολούθηση των ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνωμα, ως συμπληρωματική εξέταση της κυστεοσκόπησης (97,98).

UroVysion

Η UroVysion αποτελεί μια μοριακή διαγνωστική τεχνική που βασίζεται στην μέθοδο FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) και εγκρίθηκε από τον FDA το 2001. Σε αυτή την δοκιμασία χρησιμοποιούνται φθορίζοντες ανιχνευτές DNA για τον εντοπισμό χρωμοσωμικών ανωμαλιών που παρατηρούνται σε αποπίπτοντα ουροθηλιακά κύτταρα που αποβάλλονται στα ούρα. Πιο συγκεκριμένα, με τους ειδικά σχεδιασμένους φθορίζοντες ανιχνευτές γίνεται η ανίχνευση ανευπλοειδίας στα χρωμοσώματα 3, 7, 17 καθώς και η έλλειψη στον γενετικό τόπο 9p21. Το προς εξέταση δείγμα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 25 κύτταρα. Εφόσον τουλάχιστον 4 από αυτά εμφανίζουν πολυσωμία στα χρωμοσώματα 3, 7 ή 17, ή εάν τουλάχιστον 12 κύτταρα παρουσιάζουν απώλεια της περιοχής 9p21, το δείγμα χαρακτηρίζεται θετικό για παρουσία όγκου (99). Σε σύγκριση με την κυτταρολογική εξέταση, η UroVysion φαίνεται να υπερτερεί, κυρίως ως προς την ευαισθησία, ιδιαίτερα στην ανίχνευση υποτροπών και όγκων χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Ωστόσο, εμφανίζει σχετικά υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και δεν αντικαθιστά την κυστεοσκόπηση ή την κυτταρολογία στην αρχική διάγνωση της νόσου (98).

CellDetect

Η CellDetect είναι μια κυτταρολογική διαγνωστική μέθοδος χρώσης που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως σε δείγματα ούρων. Η διάκριση μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων βασίζεται στη διαφορετική χρώση που αποκτούν: τα καρκινικά κύτταρα βάφονται κόκκινα, ενώ τα φυσιολογικά πράσινα. Παρουσιάζει αντίστοιχα ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας με την τεχνική UroVysion, ενώ υπερτερεί έναντι αυτής ως προς την απλούστερη εφαρμογή και το χαμηλότερο κόστος και για αυτό προτείνεται ως συμπληρωματική μέθοδος της κυστεοσκόπησης και της κυτταρολογικής εξέτασης (103).

4.2 Μοριακοί δείκτες DNA

Οι όγκοι απελευθερώνουν στην κυκλοφορία θραύσματα DNA, γνωστά ως κυκλοφορούν νεοπλασματικό DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), το οποίο αποτελεί υποσύνολο του κυκλοφορούντος ελεύθερου DNA (cell-free DNA, cfDNA). Το cfDNA περιλαμβάνει γενετικό υλικό που προέρχεται τόσο από φυσιολογικά όσο και από καρκινικά κύτταρα και ανιχνεύεται σε βιολογικά υγρά, όπως το αίμα και τα ούρα.

Το ctDNA φέρει χαρακτηριστικές γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις, όπως σωματικές μεταλλάξεις, μεταβολές στον αριθμό αντιγράφων (CNVs) και αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA. Οι ιδιότητες αυτές καθιστούν τόσο το cfDNA όσο και το ctDNA ιδιαίτερα χρήσιμα εργαλεία για τη μη επεμβατική μοριακή ανάλυση και παρακολούθηση των νεοπλασματικών νοσημάτων (107,117).

uCAPP-seq

Η uCAPP-seq (Urine Cancer Personalized Profiling by Deep Sequencing) είναι μια καινοτόμος μέθοδος βασισμένη στην αλληλούχηση υψηλής απόδοσης (HTS-High Throughput Sequencing) για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA στα ούρα (cell-free, cfDNA). Κατά τη μελέτη των Dudley *et al.*, αναλύθηκε μία γενωμική περιοχή που περιλαμβάνει 460 γονίδια, τα οποία εμφανίζουν μεταλλάξεις στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Οι δύο συχνότερα μεταλλαγμένες περιοχές ήταν οι υποκινητές των γονιδίων *TERT* και *PLEKHS1*. Επιπλέον, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53*, *FGFR3*, *ERBB2* και *RB*, χωρίς όμως να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον συνολικό αριθμό μεταλλάξεων και στο στάδιο της νόσου. Αντίθετα, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του DNA στα ούρα σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Ως νέα διαγνωστική δοκιμασία τόσο για την αρχική διάγνωση όσο και για τη μετέπειτα παρακολούθηση της νόσου, παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, οι οποίες ανέρχονται σε ποσοστά 83% και 97% αντίστοιχα. Παράλληλα, εμφανίζει καλύτερη απόδοση στην ανίχνευση όγκων χαμηλού βαθμού κακοήθειας σε σύγκριση με την κυτταρολογική εξέταση ούρων. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες, ώστε να τεκμηριωθεί πλήρως η κλινική της χρησιμότητα στην καθημερινή πράξη (104).

UroSEEK

Η UroSEEK αποτελεί μια σύγχρονη και πολλά υποσχόμενη μοριακή εξέταση που ανιχνεύει συγκεκριμένες μεταλλάξεις DNA σε αποφολιδωμένα κύτταρα ούρων, με σκοπό την πρόιμη διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως καθώς και την παρακολούθηση υποτροπής. Η εξέταση UroSEEK αποτελείται από τρία επιμέρους τμήματα: TERTSeqS, UroSeqS και FastSeqS. Κατά ανάλυση TERTSeq ανιχνεύονται μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου TERT, ενώ με την τεχνική FastSeqS εντοπίζεται ανευπλοειδία σε 39 χρωμοσωμικούς βραχίονες. Επίσης, μέσω της ανάλυσης UroSeqS ανιχνεύονται μεταλλάξεις στα γονίδια *FGFR3*, *TP53*, *CDKN2A*, *ERBB2*, *HRAS*, *KRAS*, *PIK3CA*, *MET*, *VHL* και *MLL* (105).

Στη μελέτη των Rodriguez Peña *et al.*, στην οποία συμπεριλήφθηκαν 348 ασθενείς με αιματουρία ή συμπτώματα από το κατώτερο ουροποιητικό, η εξέταση UroSEEK παρουσίασε υψηλή διαγνωστική ακρίβεια κατά την αρχική διερεύνηση, με ευαισθησία 96% και ειδικότητα 88%. Επιπλέον, στο πλαίσιο της παρακολούθησης για πιθανή υποτροπή, η μέθοδος εμφάνισε χαμηλότερη, αλλά ικανοποιητική απόδοση, με ευαισθησία 74% και ειδικότητα 72% (106).

Τέλος, η UroSEEK είναι χρήσιμη για την ανίχνευση υποτροπής του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, καθώς μπορεί να εντοπίσει καρκινικά κύτταρα έως και επτά μήνες νωρίτερα σε σύγκριση με τις υπάρχουσες μεθόδους (κυτταρολογία και κυστεοσκόπηση), ενώ οι μεταλλάξεις που ανιχνεύει καλύπτουν περίπου το 90% των περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (105).

Μεταλλαγές στον υποκινητή του γονιδίου *TERT* (Telomerase reverse transcriptase)

Οι μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase) ανιχνεύονται σε περίπου 80% των περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, ανεξαρτήτως σταδίου και ιστολογικού βαθμού κακοήθειας. Για τον λόγο αυτό, θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικός και αναδυόμενος μοριακός βιοδείκτης για την έγκαιρη διάγνωση, καθώς και για την παρακολούθηση της νόσου (110). Οι δύο βασικές περιοχές με συχνές μεταλλάξεις (hotspots), είναι οι C228T και C250T, που έχουν ανευρεθεί στο 60-85% των ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο της κύστεως, ενώ δεν παρατηρούνται σε ασθενείς με φλεγμονώδεις καταστάσεις ή λοιμώξεις του ουροποιητικού. Το 2019, οι Avogbe *et al.*, ανέπτυξαν τη δοκιμασία UroMuTERT για την ανίχνευση των δύο συχνότερων μεταλλάξεων του υποκινητή του γονιδίου *TERT*, στις θέσεις C228T και C250T, σε

ελεύθερο κυκλοφορούν DNA όγκου (ctDNA) και σε κυτταρικά ελεύθερο DNA (cfDNA) που απομονώθηκε από δείγματα ούρων ασθενών. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία next-generation sequencing (NGS), σε συνδυασμό με εξειδικευμένο βιοπληροφορικό αλγόριθμο για την αναγνώριση μεταλλάξεων χαμηλής συχνότητας. Η μέθοδος παρουσίασε ευαισθησία 87,1% και ειδικότητα 94,7%, ευρήματα που υποδηλώνουν ότι η UroMuTERT μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο, μη επεμβατικό συμπληρωματικό εργαλείο στη διάγνωση και παρακολούθηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, μειώνοντας ενδεχομένως την ανάγκη για συχνές επεμβατικές κυστεοσκοπήσεις (108,109).

Uromonitor-V2®

Η δοκιμασία Uromonitor-V2® είναι μια εμπορικά διαθέσιμη εξέταση που ανιχνεύει γενετικές αλλοιώσεις στα γονίδια *TERT*, *FGFR3* και *KRAS* σε αποφολιδωμένα κύτταρα των ούρων με την μέθοδο real-time qPCR. Πέραν των μεταλλάξεων στον υποκινητή του γονιδίου *TERT*, οι οποίες ανιχνεύονται σε υψηλό ποσοστό περιπτώσεων, ιδιαίτερη σημασία στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως παρουσιάζουν και οι μεταλλάξεις του γονιδίου *FGFR3*, οι οποίες απαντώνται συχνότερα σε όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Ωστόσο, η συχνότητα εμφάνισής τους είναι σημαντικά χαμηλότερη στους όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας. Για τον λόγο αυτό, στην τεχνική Uromonitor-V2 συμπεριλήφθηκαν επιπλέον και μεταλλάξεις του γονιδίου *KRAS*, οι οποίες σπάνια συνυπάρχουν με μεταλλάξεις του *FGFR3* στον ίδιο όγκο, με στόχο τη βελτίωση της συνολικής διαγνωστικής απόδοσης και την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου (111). Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται τα υψηλά ποσοστά ευαισθησίας (93,1%), ειδικότητας (85,4%) και αρνητικής προγνωστικής αξίας (95,3%), το χαμηλό κόστος εκτέλεσης, καθώς και ο σύντομος χρόνος ανακοίνωσης του αποτελέσματος, ο οποίος ανέρχεται περίπου σε έξι ώρες. Είναι κατάλληλη για την ανίχνευση υποτροπής σε ασθενείς με μη μυοδιηθητικό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως (NMIBC). Παρόλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να διερευνηθεί εάν η Uromonitor-V2® θα μπορούσε να αντικαταστήσει πλήρως την κυστεοσκόπηση και την κυτταρολογική εξέταση ούρων (112,113).

4.3 Επιγενετικοί μοριακοί δείκτες μεθυλίωσης DNA

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί μία επιγενετική τροποποίηση, η οποία επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση χωρίς να μεταβάλλει την αλληλουχία του DNA. Τα πρότυπα γονιδιακής μεθυλίωσης στα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από εκείνα των φυσιολογικών κυττάρων και για αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μοριακές διαγνωστικές τεχνικές για την ανίχνευση και την πρόγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Επιπλέον, η μεθυλίωση του DNA έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση στους ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνωμα (97,98).

Urodiag®

Η δοκιμασία Urodiag® αναπτύχθηκε το 2020 από τους Roperch *et al.*, για την παρακολούθηση υποτροπής σε ασθενείς με μη μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως ανεξαρτήτου βαθμού κακοήθειας. Στην δοκιμασία αυτή ανιχνεύονται οι συχνότερες μεταλλάξεις του γονιδίου *FGFR3* (G372C, R248C, S249C, Y375C) καθώς και επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η υπερμεθυλίωση των γονιδίων *HS3ST2*, *SEPTIN9* και *SLIT2*. Για την ανάλυση των τεσσάρων μεταλλάξεων του *FGFR3* οι ερευνητές ανέπτυξαν και επικύρωσαν μια multiplex PCR, την MASO-PCR (Mutated Allele Specific Oligonucleotide-PCR), ενώ για την ανίχνευση των μεθυλιωμένων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η QM-MSPCR (Quantitative Multiplex Methylation Specific-PCR). Και οι δύο δοκιμασίες εκτελούνται στην ίδια πλατφόρμα real time qPCR, γεγονός που διευκολύνει την εφαρμογή της Urodiag® στον εργαστηριακό χώρο. Η Urodiag® είναι εμπορικά διαθέσιμη σε μορφή Kit και αποτελεί μια απλή, οικονομική και κλινικά εύχρηστη διαγνωστική μέθοδο των μη μυοδιηθητικών όγκων της κύστεως. Σε σύγκριση με τις δοκιμασίες, Bladder Epicheck test, BTA, NMP22, UroVysion και Xpert BC Monitor, η Urodiag® έχει υψηλότερη ευαισθησία (95%), ειδικότητα (76%) και αρνητική προγνωστική αξία (99%) (114).

Bladder Epicheck®

Η δοκιμασία Bladder EpiCheck® (Nucleix, Rehovot, Israel) είναι μια εμπορικά διαθέσιμη μη επεμβατική εξέταση που βασίζεται στην ανάλυση 15 επιλεγμένων γονιδιωματικών περιοχών με παθολογικά πρότυπα μεθυλίωσης, που σχετίζονται με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Για την αξιολόγηση της κατάστασης μεθυλίωσης των 15 βιοδεικτών

εφαρμόζεται real-time PCR και κατόπιν τα αποτελέσματα αναλύονται μέσω ειδικού λογισμικού, το οποίο αποδίδει μία αριθμητική τιμή που ονομάζεται EpiScore®. Δείγματα με EpiScore® μεγαλύτερο του 60, σε κλίμακα 0–100, θεωρούνται θετικά για καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Επιπλέον, η Bladder EpiCheck® παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με τις δοκιμασίες BTA, ImmunoCyt, UroVysion και NMP22 (115). Σε αυτό το πλαίσιο και προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η διαγνωστική της απόδοση, στην μελέτη των Trenti *et al.*, αξιολογήθηκε ο συνδυασμός της κυτταρολογικής εξέτασης ούρων με την Bladder EpiCheck® με στόχο την αύξηση της διαγνωστικής ακρίβειας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνολική ευαισθησία της κυτταρολογικής εξέτασης ούρων (33%) μπορούσε να αυξηθεί σημαντικά όταν συνδυαζόταν με την EpiCheck® φθάνοντας το 67% για τον συνδυασμό των δύο δοκιμασιών. Αντίστοιχα, για τους υψηλού κινδύνου μη μυοδιηθητικούς όγκους, η ευαισθησία ήταν 67% για την κυτταρολογική εξέταση και 83% για την EpiCheck® ως μεμονωμένες δοκιμασίες, ενώ ο συνδυασμός τους οδήγησε σε συνολική ευαισθησία 90%. Κατά συνέπεια, η συνδυασμένη εφαρμογή των δύο εξετάσεων ενδέχεται να συμβάλει στη μείωση του αριθμού και της συχνότητας των κυστεοσκοπήσεων κατά την παρακολούθηση ασθενών με χαμηλού βαθμού κακοήθειας μη μυοδιηθητικούς όγκους. Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η EpiCheck® απαιτεί εξειδικευμένο και κατάλληλα εξοπλισμένο εργαστήριο για την εκτέλεση της real-time PCR (116).

AssureMDX

Η δοκιμασία AssureMDX αποτελεί μια μέθοδο που βασίζεται στην ποσοτική PCR (qPCR) και αξιοποιεί τον συνδυασμό γενετικών και επιγενετικών δεικτών. Συγκεκριμένα, εξετάζει τις μεταλλάξεις στα γονίδια *FGFR3*, *TERT* και *HRAS*, καθώς και τα πρότυπα μεθυλίωσης των γονιδίων *OTX1*, *ONECUT2* και *TWIST1*, σε αποφολιδωμένα κύτταρα που προέρχονται από τα ούρα. Στη μελέτη των van Kessel *et al.*, πέρα από την αξιολόγηση των συγκεκριμένων βιοδεικτών, συνεκτιμήθηκαν επιπλέον παράμετροι όπως η ηλικία των ασθενών και ο τύπος της αιματοουρίας (μικροσκοπική ή μακροσκοπική). Μέσω της εφαρμογής μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης, η AssureMDX έδειξε υψηλή απόδοση, με ευαισθησία 96%, ειδικότητα 73% και αρνητική προγνωστική αξία 99% και επιπλέον εντόπισε όλους τους όγκους του ανώτερου ουροποιητικού που δεν ήταν ανιχνεύσιμοι με κυστεοσκόπηση. Τέλος, η χρήση της AssureMDX ως εργαλείο διαλογής εκτιμάται ότι θα μπορούσε να μειώσει τον αριθμό των κυστεοσκοπήσεων έως και κατά 53% (118).

UroMark

Η δοκιμασία UroMark βασίζεται στην ανάλυση των προτύπων μεθυλίωσης σε 150 CpG θέσεις σε αποπίπτοντα κύτταρα των ούρων. Οι συγκεκριμένες CpG περιοχές επιλέχθηκαν ως επιγενετικοί δείκτες του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως χρησιμοποιώντας έναν ειδικό πρόγραμμα ανάλυσης (random forest). Για την ανάλυση των συγκεκριμένων θέσεων χρησιμοποιήθηκε η microdroplet PCR, μέσω της οποίας αλληλουχήθηκε ένας μεγάλος αριθμός γονιδιωματικών περιοχών παρά της μικρής ποσότητας του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA. Η UroMark παρουσίασε υψηλή διαγνωστική ακρίβεια για την ανίχνευση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, με ευαισθησία 96% και ειδικότητα 97%. Συνεπώς, η αξιοποίηση μιας μη επεμβατικής διαγνωστικής προσέγγισης, η οποία μπορεί να αποκλείσει με υψηλό βαθμό βεβαιότητας την παρουσία κακοήθειας, έχει τη δυνατότητα να μεταβάλει ουσιαστικά τη διαγνωστική και θεραπευτική διαχείριση της νόσου (119).

4.4 Μοριακοί δείκτες RNA

Διάφορες κατηγορίες RNA, όπως τα αγγελιοφόρα RNA (messenger RNAs-mRNAs), τα microRNAs (miRNAs) και τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non coding RNAs-lncRNAs), έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια και έχουν αναδειχθεί ως πολλά υποσχόμενοι μη επεμβατικοί βιοδείκτες στα ούρα για τη διάγνωση και την παρακολούθηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Τα μόρια αυτά παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, καθώς εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα, αντικατοπτρίζουν τη βιολογική κατάσταση των ιστών, χαρακτηρίζονται από νόσο-ειδικά πρότυπα έκφρασης και μπορούν να ανιχνευθούν με μη επεμβατικό τρόπο (120).

4.4.1 Μοριακοί δείκτες mRNA

Xpert® Bladder Cancer Monitor

Η εμπορικά διαθέσιμη δοκιμασία Xpert® Bladder Cancer Monitor βασίζεται στην ανάλυση των mRNA επιπέδων των γονιδίων *ABL1*, *CRH*, *IGF2*, *UPK1B* και *ANXA10* μέσω της τεχνικής αντίστροφης μεταγραφής real-time RT-PCR (Reverse Transcription-PCR). Η δοκιμασία Xpert Bladder Cancer Monitor παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία (87%) για την ανίχνευση υποτροπών όγκων υψηλού βαθμού κακοήθειας, με αρνητική προγνωστική αξία που φτάνει το 99%. Επιπλέον, επιδεικνύει ανώτερη ευαισθησία σε σύγκριση με τη μέθοδο UroVysion και την κυτταρολογική εξέταση, τόσο για όγκους χαμηλού όσο και υψηλού

βαθμού κακοήθειας. Κατά συνέπεια η Xpert[®] Bladder Cancer Monitor αποτελεί αποτελεσματικό εργαλείο για την ανίχνευση υποτροπής καρκίνου της ουροδόχου κύστεως στο πλαίσιο παρακολούθησης ασθενών με NMIBC (121).

Cxbladder[®]

Η δοκιμασία Cxbladder[®] αποτελεί μια κλινικά διαθέσιμη και εγκεκριμένη από τον FDA τεχνική που βασίζεται στην ανάλυση της έκφρασης του mRNA των γονιδίων *MDK*, *CDK1*, *IGFBP*, *HOXA13* και *CXCR2* στα ούρα, με σκοπό την διάγνωση και την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Η ανάλυση πραγματοποιείται με τη μέθοδο real-time RT-PCR. Η Cxbladder[®] περιλαμβάνει τα διαγνωστικά κιτ Cxbladder[®] Triage, Cxbladder[®] Detect και Cxbladder[®] Monitor, τα οποία είναι σχεδιασμένα για διαφορετικές κλινικές εφαρμογές. Συγκεκριμένα, η δοκιμασία Cxbladder[®] Triage έχει υψηλή αρνητική προγνωστική αξία και ενδείκνυται για τον αποκλεισμό της παρουσίας καρκίνου της ουροδόχου κύστεως σε χαμηλού κινδύνου ασθενείς που εμφανίζουν αιματουρία. Στην αξιολόγησή του συνυπολογίζονται κλινικές παράμετροι, όπως η ηλικία, το φύλο και το ιστορικό καπνίσματος. Για την αρχική διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως χρησιμοποιείται η δοκιμασία Cxbladder[®] Detect, η οποία παρουσιάζει ευαισθησία 81,8% και ειδικότητα 85,1%. Αντίστοιχα, η δοκιμασία Cxbladder[®] Monitor ενδείκνυται για την παρακολούθηση ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνωμα, καθώς εμφανίζει υψηλή ευαισθησία 91% και υψηλή αρνητική προγνωστική αξία 96%. Για τον λόγο αυτό, μπορεί να λειτουργήσει ως συμπληρωματική ή δυνητικά εναλλακτική προσέγγιση έναντι της κυστεοσκόπησης στο πλαίσιο της παρακολούθησης (122).

4.4.2 Μοριακοί δείκτες miRNAs

Τα miRNAs (microRNAs) αποτελούν μια κατηγορία μικρών μη κωδικοποιητικών RNA μορίων μήκους περίπου 22–23 νουκλεοτιδίων, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, μέσω της συμπληρωματικής τους δέσμευση στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR) του mRNA στόχου. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση, την εξέλιξη και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (97, 120). Παρουσιάζουν το πλεονέκτημα της σχετικής ανθεκτικότητας στην αποικοδόμηση από νουκλεάσες, γεγονός που αποδίδεται εν μέρει στο

μικρό τους μέγεθος (99). Επίσης, τα miRNAs είναι εγγενώς σταθερά μόρια, τα οποία διατηρούν την ακεραιότητά τους ακόμη και υπό ακραίες συνθήκες, όπως υψηλές θερμοκρασίες, έντονες μεταβολές pH και επαναλαμβανόμενους κύκλους κατάψυξης–απόψυξης (124). Τα miRNAs μπορούν να ανιχνευθούν στα ούρα με την μέθοδο qPCR και απαντώνται είτε ως ελεύθερα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα, είτε ως σύμπλοκα ριβονουκλεοπρωτεϊνών είτε εντός εξωκυττάρων κυστιδίων (extracellular vesicles, EVs), όπως τα εξωσώματα. Με βάση τα παραπάνω χαρακτηριστικά, τα miRNAs έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας ως πιθανοί διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει τα πρότυπα έκφρασης των miRNAs τόσο σε ιστούς όσο και σε βιολογικά υγρά, αναδεικνύοντας τη σημασία τους στην παθογένεση και την εξέλιξη της νόσου (120,125,126).

Συγκεκριμένα, στην μελέτη των Avgeris *et al.* αναλύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των miR-143/145 και του miR-224 με τη χρήση qRT-PCR, με σκοπό την αξιολόγηση του ρόλου τους στην πρόγνωση και την επιβίωση των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στους καρκινικούς ιστούς της ουροδόχου κύστεως παρατηρείται σημαντική υποέκφραση του συμπλέγματος miR-143/145 και υπερέκφραση του miR-224 σε σύγκριση με το φυσιολογικό ουροθήλιο. Ωστόσο, κατά τη σύγκριση μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών όγκων, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης και των τριών microRNAs ήταν υψηλότερα στους μυοδιηθητικούς (T2–T4) σε σχέση με τους μη μυοδιηθητικούς όγκους (Ta–T1), καθώς και στους όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας συγκριτικά με εκείνους χαμηλού βαθμού. Επιπλέον, στους μη μυοδιηθητικούς όγκους παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των miR-143, miR-145 και miR-224 σε όγκους σταδίου T1 έναντι των Ta, καθώς και σε ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και εξέλιξης της νόσου. Συμπερασματικά, η συνδυασμένη χρήση των miR-143/145 με καθιερωμένους δείκτες, όπως είναι το σύστημα διαστρωμάτωσης κινδύνου EORTC, βελτιώνει σημαντικά την ακρίβεια πρόβλεψης της εξέλιξης της νόσου, ενισχύοντας τη δυνητική τους εφαρμογή στην εξατομικευμένη διαχείριση των ασθενών (127).

Τα αποτελέσματα της μελέτης των Chen *et al.* ανέδειξαν ότι ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs, με σημαντικό αριθμό αυτών να εμφανίζει είτε αυξημένη είτε μειωμένη έκφραση σε σύγκριση με το φυσιολογικό ουροθηλιακό επιθήλιο. Ειδικότερα, μέσω ανάλυσης αλληλουχιών από καρκινικούς ιστούς της ουροδόχου κύστεως με χρήση της τεχνολογίας αλληλούχησης

Solexa, διαπιστώθηκε ότι συνολικά 74 miRNAs παρουσιάζουν απορρυθμισμένη έκφραση, εκ των οποίων τα 33 εμφανίζουν αυξημένη έκφραση, ενώ τα 41 μειωμένη. Μεταξύ αυτών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως πιθανοί καρκινικοί δείκτες παρουσιάζουν τα miR-143, miR-1, miR-100 και miR-101, καθώς εμφανίζουν σημαντική απορρύθμιση και έχουν συσχετιστεί με βασικές διεργασίες της καρκινογένεσης. Επιπλέον, μέλη της οικογένειας let-7, καθώς και τα miR-196a και miR-1268, ενδέχεται να συμβάλλουν στην μοριακή παθογένεση της νόσου και να αποτελέσουν δυνητικούς βιοδείκτες. Παρόλα αυτά, απαιτούνται επιπλέον ερευνητικές μελέτες ώστε να τεκμηριωθεί η αξία των συγκεκριμένων miRNAs ως διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών, καθώς και η πιθανή αξιοποίησή τους ως θεραπευτικών στόχων στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (128).

Αξιοσημείωτο είναι το εύρημα των Sasaki *et al.* για το miR-146a-5p, το οποίο αν και χαρακτηρίζεται ως ογκοκατασταλτικό miRNA, εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, σε αντίθεση με τα περισσότερα ογκοκατασταλτικά miRNAs που συνήθως υποεκφράζονται στις νεοπλασίες. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του miR-146a-5p στα ούρα βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Επιπλέον, στην ομάδα των ασθενών με θετική έκφραση, τα αυξημένα επίπεδα του miRNA επανήλθαν σε φυσιολογικά μετά από διουρηθρική εκτομή του όγκου (TUR), εύρημα που υποδηλώνει ότι το miR-146a-5p προέρχεται από καρκινικά κύτταρα και εκκρίνεται στα ούρα. Αντίθετα, σε ορισμένους ασθενείς δεν παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασής του, γεγονός που πιθανώς σχετίζεται με την ετερογένεια της νόσου και το διαφορετικό στάδιο του όγκου. Παράλληλα, οι ερευνητές υποστήριξαν ότι διάφορες γενετικές παραλλαγές μεταξύ των ασθενών ίσως να επηρεάζουν την έκφραση του miR-146a-5p. Τέλος, απαιτούνται μελέτες παρακολούθησης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, προκειμένου να διερευνηθεί η συσχέτιση των επιπέδων του miR-146a-5p στα ούρα με την πρόγνωση της νόσου, συμπεριλαμβανομένης της υποτροπής, της εξέλιξης και της θνησιμότητας (124).

Στη μελέτη των Pignot *et al.*, τα miR-9, miR-182 και miR-200b συσχετίστηκαν με αυξημένη επιθετικότητα του μυοδιηθητικού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (MIBC), καθώς και με δυσμενέστερη πρόγνωση, παρουσιάζοντας συσχέτιση με μειωμένη επιβίωση χωρίς υποτροπή και χαμηλότερη συνολική επιβίωση (129).

Αντίστοιχα, στη μελέτη των Pardini *et al.*, η ανάλυση των προφίλ έκφρασης miRNAs στα ούρα με τη χρήση της τεχνολογίας next-generation sequencing (NGS) ανέδειξε ότι συγκεκριμένα miRNAs παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση ανάλογα με τον υπότυπο

και την επιθετικότητα του ουροθηλιακού καρκίνου. Ιδιαίτερα, τα miR-30a-5p, let-7c-5p και miR-486-5p εμφάνισαν σημαντική μεταβολή της έκφρασής τους στους ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, ενώ τα miR-200c-3p, miR-21-5p, miR-106b-3p και miR-205-5p συσχετίστηκαν με πιο επιθετικές μορφές της νόσου. Τα ευρήματα της μελέτης υποστηρίζουν ότι η ανίχνευση miRNAs στα ούρα με την τεχνική NGS ενδέχεται να αποτελέσει χρήσιμο μη επεμβατικό εργαλείο για τη διάγνωση και τη διαστρωμάτωση των υποτύπων του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (131).

4.4.3 Μοριακοί δείκτες lncRNAs

Τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs) αποτελούν μόρια RNA, τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και έχουν μήκος μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια. Τα lncRNAs αλληλοεπιδρούν με DNA, RNA ή πρωτεΐνες, διαδραματίζοντας σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό καθώς και επιγενετικό επίπεδο. Έχει διαπιστωθεί ότι παρουσιάζουν απορρυθμισμένη έκφραση σε καρκινικά κύτταρα και ιστούς της ουροδόχου κύστεως, γεγονός που τα καθιστά πολλά υποσχόμενους μη επεμβατικούς μοριακούς δείκτες για την ανίχνευση της νόσου (97,120, 132). Τα lncRNAs ανιχνεύονται τόσο στο υπερκείμενο όσο και στο ίζημα των ούρων, καθώς και στα εξωκυττάρια κυστίδια (EVs) και αρκετά από αυτά παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στα ούρα των ασθενών με ουροθηλιακή νεοπλασία (133).

Ένα από τα lncRNAs που εμφανίζει αυξημένη έκφραση στα ούρα ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως είναι το ουροθηλιακό καρκινικό αντιγόνο 1 (Urothelial Carcinoma Antigen 1, UCA1). Το UCA1 έχει μήκος που υπερβαίνει τα 1400 νουκλεοτίδια, και εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 19p13.12 (134). Από διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί προκύπτει ότι το UCA1 επηρεάζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω του μεταγραφικού παράγοντα CREB (cAMP response element-binding protein), ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το PI3K-AKT (135). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το UCA1 παρουσιάζει ογκογόνο δράση, συμβάλλοντας στην εξέλιξη του ουροθηλιακού καρκίνου (136), ενώ η αυξημένη έκφρασή του ενισχύει τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων και την ανθεκτικότητά τους στη φαρμακευτική θεραπεία (137). Με βάση αυτά τα δεδομένα, το UCA1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο ως πιθανός προγνωστικός βιοδείκτης για την πορεία και την μεταστατική ικανότητα της νόσου, αλλά και ως μη επεμβατικός διαγνωστικός δείκτης στα ούρα, καθότι παρουσιάζει

ικανοποιητικά ποσοστά ευαισθησίας (84%) και ειδικότητας (87%) (134). Σε συνδυασμό με την κυτταρολογική εξέταση, θα μπορούσε να ενισχύσει την ανίχνευση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, μειώνοντας την ανάγκη για επαναλαμβανόμενες κυστεοσκοπήσεις στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου ή ακόμη και να τις αντικαταστήσει στο μέλλον (138).

Επιπροσθέτως, σε μελέτη των Zhan *et al.* αναλύθηκε το προφίλ έκφρασης τριών lncRNAs που προέρχονται από εξωσώματα και ανιχνεύονται στα ούρα με την χρήση της τεχνικής qRT-PCR. Πιο συγκεκριμένα, τα lncRNAs MALAT1, PCAT-1 και SPRY4-IT1 βρέθηκαν να υπερεκφράζονται στα ούρα των ασθενών με καρκίνο της κύστης συγκριτικά με των υγιών ατόμων. Η διαγνωστική τους απόδοση ήταν ανώτερη, σε σύγκριση με την κυτταρολογική εξέταση ούρων, παρουσιάζοντας ευαισθησία 62,5% και ειδικότητα 85%. Ένα επιπλέον σημαντικό εύρημα της μελέτης ήταν ότι η αυξημένη έκφραση των PCAT-1 και SPRY4-IT1 συσχετίστηκε με προχωρημένο στάδιο TNM, υποδηλώνοντας πιθανή σύνδεση των συγκεκριμένων lncRNAs με την επιθετικότητα και την εξέλιξη της νόσου. Παράλληλα, η αυξημένη έκφραση των MALAT1 και PCAT-1 συσχετίστηκε με δυσμενέστερη πρόγνωση στους ασθενείς με μη μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (NMIBC), γεγονός που αναδεικνύει την πιθανή προγνωστική αξία των συγκεκριμένων lncRNAs (139).

Αντίστοιχα, οι Yu X *et al.* διερεύνησαν τον ρόλο τεσσάρων lncRNAs, ως πιθανούς βιοδείκτες για τη διαφοροδιάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως από φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η ουροκυτίτιδα. Τα lncRNAs UCA1-201, HOTAIR, HYMA1 και MALAT1, που ανιχνεύθηκαν στο υπερκείμενο κλάσμα των ούρων, εμφάνισαν υψηλή διαγνωστική απόδοση, με ευαισθησία 95,7% και ειδικότητα 94,3% (140).

Παρόμοια, οι Du *et al.* μελέτησαν τα lncRNAs uc004cox.4 και GAS5 σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως και διαπίστωσαν ότι η αυξημένη έκφραση του uc004cox.4 στα ούρα των ασθενών σχετίζεται με πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου και δυσμενέστερη πρόγνωση. Αντίθετα, η μειωμένη έκφραση του GAS5 στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης επιβεβαιώνει τον ογκοκατασταλτικό του ρόλο, ο οποίος έχει επίσης παρατηρηθεί και σε άλλες κακοήθεις νεοπλασίες, όπως στον καρκίνο του προστάτη, των ωοθηκών και του μαστού (142,143,144). Επίσης, σε σύγκριση με την κυτταρολογική εξέταση ούρων, τα uc004cox.4 και GAS5 είχαν καλύτερη διαγνωστική απόδοση, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια (Ta και T1) του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Συμπερασματικά, η μελέτη ανέδειξε ένα διαγνωστικό πάνελ δύο lncRNAs, που μπορούν να διακρίνουν με υψηλή ακρίβεια τους

ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως από τα υγιή άτομα, ενώ η έκφραση του uc004cox.4 στα ούρα φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για την υποτροπή σε ασθενείς με μη μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (NMIBC) (141).

Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το lncRNA HOTAIR (HOX transcript antisense RNA), το οποίο έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη και εξέλιξη διαφόρων μορφών καρκίνου, καθώς και με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών (150,151). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το HOTAIR ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, όπως τα *SNAI1*, *LAMB3*, *LAMC2*, *JAM2* και *ABL2* (151,152).. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, η υπερέκφρασή του έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και με πιο επιθετική μορφή της νόσου (153). Για τους παραπάνω λόγους, το HOTAIR έχει προταθεί ως σημαντικός μη επεμβατικός βιοδείκτης, καθώς και ως πιθανός θεραπευτικός στόχος για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (154).

4.5 Αλλοιώσεις στο μικροδορυφορικό DNA

Οι μικροδορυφόροι (microsatellites) είναι πολυμορφικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται διάσπαρτες σε ολόκληρο το γονιδιώμα. Η ανάλυση μικροδορυφορικών δεικτών επιτρέπει την ανίχνευση γενετικών διαταραχών που σχετίζονται με την καρκινογένεση, όπως είναι η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) και η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI). Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό γενετικών αλλοιώσεων, οι οποίες σχετίζονται κυρίως με απώλεια ετεροζυγωτίας και μικροδορυφορική αστάθεια. Στην μελέτη των van Rhijn *et al.*, διερευνήθηκε η δυνατότητα χρήσης της ανάλυσης μικροδορυφόρων (microsatellite analysis, MA) σε δείγματα ούρων ως μη επεμβατικής μεθόδου παρακολούθησης ασθενών με επιφανειακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης, σε σύγκριση με την κυστεοσκόπηση (145). Σε πολλές μελέτες έχει αποδειχθεί η συσχέτιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως με μεταβολές στο μικροδορυφορικό DNA, ειδικότερα στα χρωμοσώματα 4p, 8p, 9p, 9q, 11p και 17p. Οι ερευνητές αξιολόγησαν κατά πόσο η ανάλυση γενετικών αλλοιώσεων, όπως η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) και η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), σε DNA που απομονώθηκε από τα ούρα, μπορούσε να ανιχνεύσει υποτροπές της νόσου (146).

4.6 Εξωκυτταρικά κυστίδια και εξωσώματα

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (extracellular vesicles, EVs) είναι μικρά κυστίδια που περιβάλλονται από λιπιδική μεμβράνη και εκκρίνονται από σχεδόν όλους τους τύπους κυττάρων. Ανιχνεύονται σε διάφορα βιολογικά υγρά, όπως το αίμα και τα ούρα. Περιέχουν ποικιλία βιομορίων, όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και μεταβολίτες. Τα EVs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία, καθώς μεταφέρουν το βιολογικό τους περιεχόμενο σε κύτταρα-στόχους, επηρεάζοντας διάφορες κυτταρικές λειτουργίες (97,120,147). Τα εξωσώματα είναι ένας υπότυπος των εξωκυττάρων κυστιδίων με μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 40-160 nm (148). Ιδιαίτερη σημασία έχουν τα εξωκυτταρικά κυστίδια που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα, καθώς περιέχουν βιολογικά ενεργές πρωτεΐνες που έχουν την δυνατότητα να προκαλούν αλλαγές στα φυσιολογικά κύτταρα. Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με διαδικασίες, που προάγουν την εξέλιξη και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (149). Τα τελευταία χρόνια, τα εξωκυτταρικά κυστίδια και ιδιαίτερα τα εξωσώματα έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας, καθώς περιέχουν μόρια (πρωτεΐνες, miRNAs, lncRNAs) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δυνητικοί βιοδείκτες για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της εξέλιξης των νεοπλασιών. Τα πλεονεκτήματα αυτών των βιοδεικτών είναι ότι η ανίχνευσή τους πραγματοποιείται με μη επεμβατικό τρόπο, αντανακλούν το μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων από τα οποία προέρχονται και ανευρίσκονται σε αυξημένες ποσότητες σε καρκινικά κύτταρα, γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευσή τους στα ούρα (149).

Στο πλαίσιο αυτό, πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τον ρόλο των εξωκυτταρικών κυστιδίων ως πιθανών βιοδεικτών για την διάγνωση και την παρακολούθηση του ουροθηλιακού καρκίνου, καθώς και ως δυνητικών θεραπευτικών στόχων (97, 99, 120). Αρχικά, στην μελέτη των Lee *et al.* διερευνήθηκε το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των εξωκυτταρικών κυστιδίων που απομονώθηκαν από τα ούρα ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Η πρωτεωμική ανάλυση ανέδειξε αυξημένη έκφραση πολλών πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων οι πιο σημαντικές που συσχετίζονται άμεσα με την μεταστατική ικανότητα του όγκου ήταν οι εξής: MUC1 (Mucin-1), CEA (Carcinoembryonic Antigen), EPS8L2 (epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2) και μοεσίνη. Τα ευρήματα της μελέτης υποστηρίζουν ότι τα EVs

αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη πηγή μη επεμβατικών βιοδεικτών για τη διάγνωση και παρακολούθηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (147).

Στην μελέτη των Berrondo *et al.* εντοπίστηκαν σε αυξημένη ποσότητα τα lncRNAs HOTAIR, HOX-AS-2, MALAT1, και lincRoR σε εξωσώματα στο δείγμα ούρων ασθενών με μυοδινητικό καρκίνο υψηλού βαθμού κακοήθειας (MIBC) συγκριτικά με υγιείς εθελοντές. Επιπλέον, με τη χρήση RNA sequencing ταυτοποιήθηκαν τέσσερα επιπλέον lncRNAs στα ουρικά εξωσώματα αυτών των ασθενών: HYMA1, LINC00477, LOC100506688 και OTX2-AS1. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, προκειμένου τα συγκεκριμένα lncRNAs να αποτελέσουν αξιόπιστους βιοδείκτες για το ουροθηλιακό καρκίνωμα (154).

Τέλος, και τα miRNAs που εντοπίζονται σε ουρικά εξωσώματα ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως έχουν μελετηθεί εκτενώς ως πιθανοί βιοδείκτες. Συγκεκριμένα, το miR-1224-3p παρουσίασε ευαισθησία 77% και ειδικότητα 83% για την ανίχνευση της νόσου. Επιπλέον, ο συνδυασμός των miR-15b, miR-135b και miR-1224-3p αύξησε την ευαισθησία στο 94,1%, με ειδικότητα 51% (155). Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης ο λόγος miR-126/miR-152, ο οποίος κατάφερε να διακρίνει τους ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης με ευαισθησία 72% και ειδικότητα 82% (156).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Η ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ

5.1 Αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος

Το μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελείται από διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και από ανοσοκατασταλτικά μόρια, τα οποία συμβάλλουν στην εξέλιξη του όγκου. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται: ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (Tregs), B λεμφοκύτταρα, κύτταρα NK, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο (TAMs), ουδετερόφιλα σχετιζόμενα με τον όγκο (TANs), μυελοειδή κατασταλτικά κύτταρα (MDSCs), ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF- β), η ινδολαμίνη-2,3-διοξυγενάση (IDO) και η αρτεμίνη (Artemin) (158). Ενδεικτικά, το κολλαγόνο που παράγεται από τα TAMs μπορεί να ενισχύσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT διαμέσου της ιντεγκρίνης $\alpha 2 \beta 1$ (158). Αντίστοιχα, ο άξονας COX2/mPGES1/PGE2 ρυθμίζει την έκφραση του PD-L1 στα μυελοειδή κύτταρα που διηθούν τον όγκο, συμβάλλοντας έτσι στη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την ανοσολογική απάντηση. Επιπλέον, παράγοντες όπως το χαμηλό pH, η υποξία, ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά και η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου μειώνουν την λειτουργικότητα των T-λεμφοκυττάρων (159).

Σε αυτό το ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον, ιδιαίτερη σημασία έχουν τα ανοσολογικά σημεία ελέγχου, τα οποία συμβάλλουν στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής και στην ρύθμιση της φλεγμονής. Οι αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου (immune checkpoint inhibitors, ICIs) δρουν αναστέλλοντας κυρίως τις οδούς PD-1/PD-L1 και CTLA-4, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της λειτουργίας των T-λεμφοκυττάρων (157).

5.1.1 Αναστολείς της οδού PD-1/PD-L1

Το μόριο PD-1 (programmed cell death protein-1) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη-υποδοχέας, που εκφράζεται κυρίως σε ενεργοποιημένα T- και B-λεμφοκύτταρα, αλλά και σε μακροφάγα, ενώ ο συνδέτης του PD-L1 (programmed death-ligand1), ανιχνεύεται τόσο σε αντιγονοπαρουσιαστικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα (160). Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται αυξημένη έκφραση του PD-L1, γεγονός που ενισχύει την δέσμευσή του με τον υποδοχέα PD-1 στα T-λεμφοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση αυτή καταστέλλει την

αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση και έχει συσχετιστεί με πιο επιθετική πορεία της νόσου, δυσμενέστερη πρόγνωση και αυξημένο κίνδυνο υποτροπής στον ουροθηλιακό καρκίνο (33).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και μελετηθεί μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν είτε το PD-1 είτε το PD-L1, με στόχο να μπλοκάρουν αυτό το ανασταλτικό σήμα (Πίνακας 5.1). Με αυτό τον τρόπο αποκαθίσταται η δραστηριότητα των T-λεμφοκυττάρων, ενισχύοντας την ανοσολογική απάντηση έναντι του όγκου και συμβάλλοντας στην θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν έγκριση από τον FDA είναι τα atezolizumab, avelumab και durvalumab, τα οποία στοχεύουν το PD-L1, ενώ τα nivolumab και pembrolizumab αναστέλλουν το PD-1 (Εικ.5.1) (161).

Το atezolizumab, που είναι ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα ισοτύπου IgG₁, αποτέλεσε τον πρώτο αναστολέα του μορίου PD-L1 που είχε σημαντική αντικαρκινική δράση σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Αρχικά, εγκρίθηκε το 2016 ως θεραπεία δεύτερης γραμμής για ασθενείς με μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα, οι οποίοι είχαν παρουσιάσει υποτροπή της νόσου μετά από χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Στη συνέχεια, η χρήση του επεκτάθηκε και σε επιλεγμένους ασθενείς πρώτης γραμμής, κυρίως σε εκείνους που δεν είναι κατάλληλοι για θεραπεία με σισπλατίνη (161,162). Η κλινική μελέτη IMvigor210 έδειξε ότι καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με atezolizumab παρουσίασαν ασθενείς με αυξημένη έκφραση των δεικτών PD-L1 και PD-1, οι οποίοι σύμφωνα με την ταξινόμηση του The Cancer Genome Atlas (TCGA) ανήκουν κυρίως στον μοριακό υπότυπο luminal-infiltrated (95,163).

Άλλα μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν το PD-L1 είναι τα avelumab και durvalumab, τα οποία έλαβαν έγκριση από τον FDA το 2017 για τη θεραπεία ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα μετά από αποτυχία χημειοθεραπείας βασισμένης στην πλατίνα.

Η κλινική αποτελεσματικότητα του avelumab τεκμηριώθηκε κυρίως από τη μελέτη JAVELIN Bladder 100, η οποία έδειξε ότι η χορήγησή του ως θεραπεία συντήρησης μετά από χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με πλατίνα οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της συνολικής επιβίωσης σε σύγκριση με τη βέλτιστη υποστηρικτική αγωγή μόνο (164). Αντίστοιχα, η αποτελεσματικότητα του durvalumab αξιολογήθηκε στη μελέτη φάσης I/II Study 1108, η οποία περιέλαβε ασθενείς με προχωρημένους συμπαγείς όγκους,

συμπεριλαμβανομένου και του ουροθηλιακού καρκίνου, και έδειξε κλινική δραστικότητα με αποδεκτό προφίλ ασφάλειας (165).

Το pembrolizumab είναι ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα ισοτύπου IgG₄ που δρα ως αναστολέας του PD-1. Η αποτελεσματικότητά του τεκμηριώθηκε στην βασική κλινική μελέτη KEYNOTE-045, όπου έδειξε σημαντική βελτίωση της συνολικής επιβίωσης σε ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα σε σύγκριση με την χημειοθεραπεία, αποτελώντας τον πρώτο αναστολέα σημείων ανοσολογικού ελέγχου που κατέδειξε τέτοιο όφελος επιβίωσης σε σχέση με την χημειοθεραπεία (169). Χορηγείται ως θεραπεία δεύτερης γραμμής μετά από αποτυχία θεραπείας με πλατίνα, αλλά και ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς που δεν είναι κατάλληλοι για θεραπεία με σισπλατίνη (47,166). Τα θετικά αποτελέσματα του pembrolizumab στην μεταστατική νόσο οδήγησαν στην εφαρμογή του και σε ασθενείς με μη μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Στο πλαίσιο αυτό, ο FDA ενέκρινε το 2020 το pembrolizumab για ασθενείς υψηλού κινδύνου με CIS καρκίνωμα, στους οποίους δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί κυστεκτομή (168).

Τέλος, το nivolumab είναι και αυτό ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ισοτύπου IgG₄ που στοχεύει το PD-1 και πήρε έγκριση από τον FDA ως θεραπεία δεύτερης γραμμής για την θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως μέσω της κλινικής μελέτης CheckMate 275 (167).

Πίνακας 5.1. Κύριες κλινικές μελέτες αναστολέων PD-1/PD-L1 στον ουροθηλιακό καρκίνο

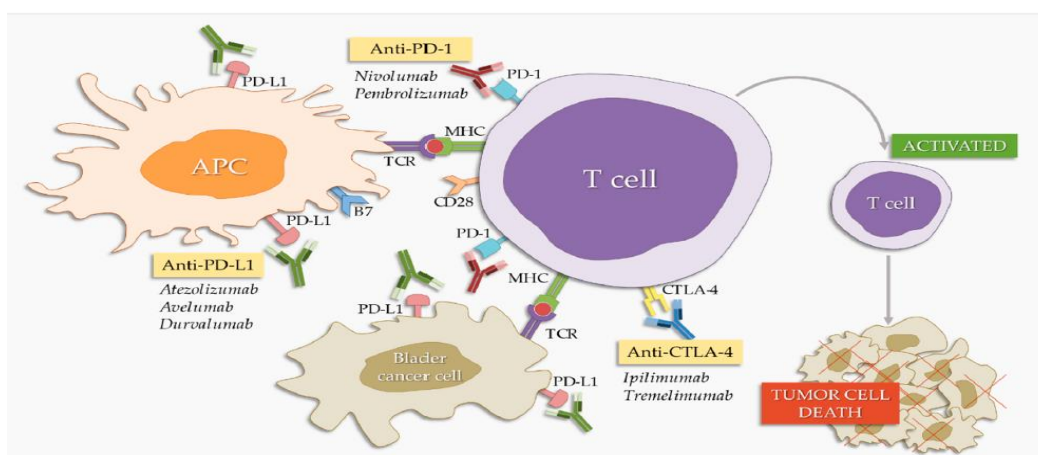
Αναστολέας	Μελέτη	Ασθενείς	Κλινικά αποτελέσματα
Atezolizumab	IMvigor210	Μεταστατικός UC μετά από πλατίνα	Σημαντική αντικαρκινική δραστικότητα
Pembrolizumab	KEYNOTE-045	Προχωρημένος/μεταστατικός UC	Βελτίωση συνολικής επιβίωσης έναντι χημειοθεραπείας
Nivolumab	CheckMate 275	Μετά από αποτυχία πλατίνας	Κλινική αποτελεσματικότητα και αποδεκτή ασφάλεια
Avelumab	JAVELIN Bladder 100	Συντήρηση μετά από πλατινούχο χημειοθεραπεία	Σημαντική βελτίωση συνολικής επιβίωσης
Durvalumab	Study 1108	Προχωρημένοι συμπαγείς όγκοι/UC	Κλινική δραστικότητα και καλή ανοχή

5.1.2 Αναστολέας του CTLA-4

Ένας ακόμη σημαντικός μηχανισμός ανοσολογικού ελέγχου περιλαμβάνει την πρωτεΐνη CTLA-4, η οποία εκφράζεται κυρίως σε ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα και στα ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs). Ο CTLA-4 ανταγωνίζεται τον υποδοχέα CD28 για τη δέσμευση των μορίων B7.1 και B7.2 που εκφράζονται από τα B λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης περιορίζεται η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των T-λεμφοκυττάρων, καταστέλλοντας την ανοσολογική απόκριση (157,161,169).

Τα δεδομένα από διάφορες κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση αντισωμάτων έναντι του CTLA-4 μπορεί να ενισχύσει την ανοσολογική απάντηση αυξάνοντας τα κυτταροτοξικά CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα και μειώνοντας την σχετική δράση των Tregs, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε καλύτερο έλεγχο της νόσου. Επίσης, φαίνεται ότι ανταποκρίνονται περισσότεροι ασθενείς με πιο επιθετικούς υποτύπους της νόσου, βελτιώνοντας την πρόγνωση τους (157,161).

Δύο μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν το CTLA-4 είναι το ipilimumab και το tremelimumab (Εικ.5.1.). Το ipilimumab έχει δείξει ικανοποιητικό προφίλ ασφάλειας σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, ενώ το tremelimumab μελετάται κυρίως σε συνδυασμό με άλλα μονοκλωνικά αντισώματα, όπως το durvalumab. Παρ' όλα αυτά, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να τεκμηριωθούν πλήρως η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια των συγκεκριμένων θεραπευτικών παραγόντων στον ουροθηλιακό καρκίνο (169) (Εικ.5.1).



Εικ.5.1. Δράση των αναστολέων σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στην θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Οι αναστολείς των PD-1/PD-L1 και του CTLA-4 παρεμβαίνουν στα ανασταλικά μόρια ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγώντας σε ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και καταστροφή των καρκινικών κυττάρων (169).

5.2 Αναστολείς του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras-MAPK

Μια σύγχρονη θεραπευτική στρατηγική στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως επικεντρώνεται στην οικογένεια των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (79,171,177). Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται οι 4 υποδοχείς: EGFR (ErbB1/Her1), EGFR2 (ERBB2/HER2), EGFR3 (ERBB3/HER3) και EGFR4 (ERBB4/HER4). Αποτελούνται από μία εξωκυττάρια περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυττάρια περιοχή με δράση τυροσινικής κινάσης. Η ενεργοποίηση ξεκινά μετά τη σύνδεση του προσδέτη στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, γεγονός που οδηγεί στον διμερισμό του με άλλα μέλη της οικογένειας EGFR. Στην συνέχεια πραγματοποιείται φωσφορυλίωση συγκεκριμένων θέσεων του υποδοχέα, οι οποίες λειτουργούν ως σημεία πρόσδεσης για διάφορες πρωτεΐνες σηματοδότησης. Μέσω αυτών ενεργοποιούνται πολλαπλά ενδοκυττάρια μονοπάτια, όπως τα PI3K/Akt/mTOR και RAS/MEK/ERK, τα οποία συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την ανάπτυξη και την εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων (171). Σύμφωνα με δεδομένα του The Cancer Genome Atlas (TCGA), διαταραχές στα μονοπάτια PI3K/Akt/mTOR και RAS/MEK/ERK ανιχνεύονται περίπου στο 42% και 44% των μυοδιηθητικών καρκίνων της ουροδόχου κύστεως αντίστοιχα. Για τον λόγο αυτό, έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες μελέτες για την ανάπτυξη μορίων που στοχεύουν στην αναστολή της ενεργοποίησης των συγκεκριμένων μονοπατιών, με στόχο τον έλεγχο της καρκινικής εξέλιξης (171).

Μια κατηγορία θεραπευτικών παραγόντων που αναστέλλουν τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε αυτό το μονοπάτι είναι οι αναστολείς της τυροσινικής κινάσης, που εμποδίζουν την δέσμευση του ATP (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKIs): gefitinib, erlotinib, lapatinib, afatinib και sorafenib (Πίνακας 5.2) (79,172). Τα μόρια gefitinib και erlotinib είναι πρώτης γενιάς, μικρού μοριακού βάρους αναστρέψιμοι αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του EGFR, που ανταγωνίζονται το ATP στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα και έτσι εμποδίζουν τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού, που ευνοεί την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Το gefitinib χρησιμοποιήθηκε σε ασθενείς με μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό σχήμα γεμισιταβίνης-σισπλατίνη. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά του δεν φάνηκε να υπερτερεί σε σύγκριση με τη συμβατική χημειοθεραπεία (173). Το erlotinib χρησιμοποιήθηκε σε μια κλινική μελέτη φάσης II, όπου

χορηγήθηκε σε ασθενείς με μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως πριν την ριζική κυστεκτομή. Μετά τη θεραπεία, το 25% των ασθενών δεν είχε ανιχνεύσιμη νόσο (pT0), ενώ στο 35% παρατηρήθηκε μείωση του σταδίου της νόσου (174).

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε σε ασθενείς με μεταστατικό μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως η αποτελεσματικότητα του διπλού αναστολέα lapatinib ως δεύτερης γραμμής θεραπεία μετά από χημειοθεραπεία βασισμένη σε πλατίνα που δεν είχε αποτέλεσμα. Ο αναστολέας lapatinib στοχεύει την ενδοκυττάρια επικράτεια των υποδοχέων EGFR και HER2. Ο υποδοχέας HER2 κωδικοποιείται από το γονίδιο *ERBB2*, το οποίο εμφανίζει μεταλλάξεις και υπερεκφράζεται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Οι ασθενείς που είχαν υπερέκφραση των γονιδίων *EGFR* και *ERBB2* φαίνεται ότι ωφελήθηκαν περισσότερο από το lapatinib (175).

Αντίστοιχα, ο αναστολέας τυροσινικής κινάσης afatinib, ο οποίος στοχεύει τους υποδοχείς EGFR, HER2 και HER4, αξιολογήθηκε σε κλινική μελέτη φάσης II σε ασθενείς με μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που είχαν παρουσιάσει εξέλιξη της νόσου μετά από θεραπεία με πλατίνα. Η χορήγησή του συσχετίστηκε με σημαντικά μεγαλύτερο κλινικό όφελος σε ασθενείς που έφεραν γενετικές μεταλλάξεις στους υποδοχείς HER2 ή HER3. Ένας άλλος αναστολέας τυροσινικής κινάσης με δράση σε πολλαπλούς στόχους είναι το μόριο sorafenib, που αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι RAF/MEK/ERK καθώς και υποδοχείς αυξητικών παραγόντων όπως οι VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 και ο PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), οδηγώντας σε αναστολή της ανάπτυξης και επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων και μείωση της αγγειογένεσης. Έχει μελετηθεί στον μυοδιηθητικό ουροθηλιακό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως σε συνδυασμό με το σχήμα gecimtabine-cisplatin, όπου παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης και παρατεταμένος έλεγχος της νόσου. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο *ARID1A* καθώς και σε γονίδια του μονοπατιού RAS-RAF ενδέχεται να σχετίζονται με μεγαλύτερη ευαισθησία και δυνητικά καλύτερη συμβολή του sorafenib στην θεραπευτική απάντηση (176).

Εκτός από τους αναστολείς τυροσινικής κινάσης, έχουν αναπτυχθεί και μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν την εξωκυττάρια περιοχή των υποδοχέων της οικογένειας του EGFR, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την δέσμευση των προσδετών τους και την επακόλουθη ενεργοποίησή τους. Το χημειοκλωνικό αντίσωμα cetuximab δεσμεύεται στον EGFR και ανταγωνίζεται τη δέσμευση του EGF, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού και οδηγώντας σε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης των καρκινικών κυττάρων (70,177). Παρόλα

αυτά φαίνεται ότι σε κάποιους όγκους μπορεί να υπάρξει αντοχή στο cetuximab λόγω του ότι ενεργοποιείται η σηματοδότηση μέσω του HER2 υποδοχέα. Προκειμένου να αναστείλουν ξανά την ανάπτυξη του όγκου, χορήγησαν έναν διπλό αναστολέα τυροσινικής κινάσης που στοχεύει και το EGFR και το HER2 (178).

Το trastuzumab μελετήθηκε σε κλινική μελέτη φάσης II, όπου χορηγήθηκε σε συνδυασμό με paclitaxel, carboplatin και gemcitabine σε ασθενείς με προχωρημένο HER2-θετικό ουροθηλιακό καρκίνο. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αντικαρκινική δραστηριότητα, με ποσοστό ανταπόκρισης περίπου 70% και μέσο όρο συνολικής επιβίωσης 14,1 μήνες. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά τοξικότητας, κυρίως μυελοκαταστολής και καρδιοτοξικότητας. Παρά τα ενθαρρυντικά αρχικά αποτελέσματα, η μελέτη δεν κατάφερε να αποδείξει με σαφήνεια την ανεξάρτητη συμβολή του trastuzumab στο θεραπευτικό όφελος, γεγονός που ανέδειξε την ανάγκη για περαιτέρω τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες (179).

Το γεγονός ότι οι αναστολείς των υποδοχέων EGFR και HER2 μπορούν να είναι αποτελεσματικοί σε ασθενείς με υπερέκφραση ή γενετικές αλλοιώσεις των EGFR ή/και HER2, ενώ δεν προσφέρουν ουσιαστικό όφελος σε ασθενείς χωρίς αυτές τις μεταβολές, αναδεικνύει τη σημασία της μοριακής ταυτοποίησης των συγκεκριμένων βιοδεικτών για την εφαρμογή εξατομικευμένης και στοχευμένης θεραπευτικής προσέγγισης (171).

Πίνακας 5.2. Θεραπείες έναντι του EGFR στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως

Θεραπευτικοί παράγοντες	Στόχος	Κλινικά δεδομένα στον ουροθηλιακό καρκίνο
Gefitinib	EGFR	Σε συνδυασμό με γεμισιταβίνη-σισπλατίνη δεν υπερίχε της συμβατικής χημειοθεραπείας
Erlotinib	EGFR	Σε μελέτη φάσης II πριν από κυστεκτομή, 25% των ασθενών εμφάνισαν πλήρη παθολογική ανταπόκριση (pT0) και 35% υποσταδιοποίηση της νόσου
Lapatinib	EGFR, HER2	Μεγαλύτερο όφελος σε ασθενείς με υπερέκφραση EGFR και ERBB2/HER2

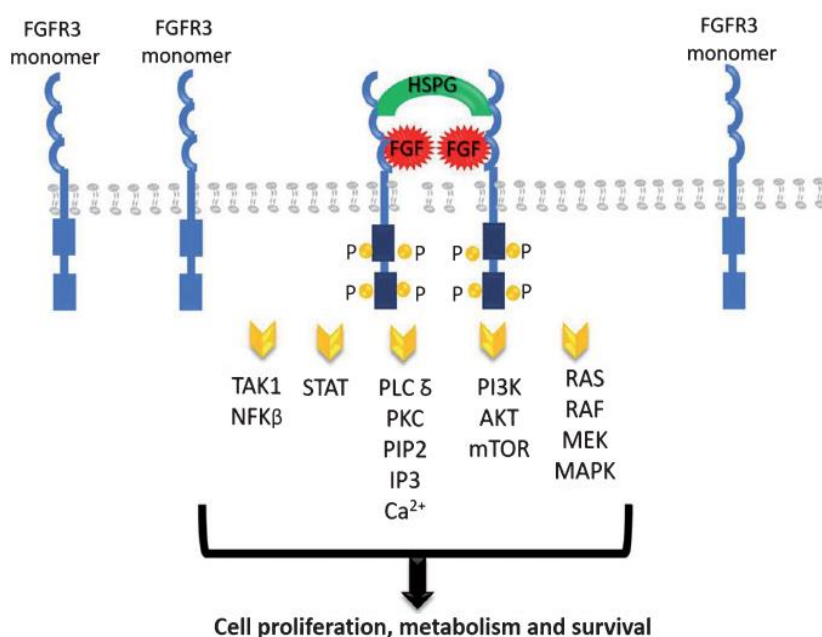
Θεραπευτικοί παράγοντες	Στόχος	Κλινικά δεδομένα στον ουροθηλιακό καρκίνο
Afatinib	EGFR, HER2, HER4	Καλύτερη ανταπόκριση σε ασθενείς με μεταλλάξεις HER2 ή HER3
Sorafenib	RAF, VEGFR-1/2/3, PDGFR	Υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης σε συνδυασμό με GC και παρατεταμένος έλεγχος της νόσου
Cetuximab	EGFR	Αναστέλλει τη δέσμευση του EGF και την ενεργοποίηση του EGFR, αλλά μπορεί να εμφανιστεί αντοχή μέσω HER2
Trastuzumab	HER2	Σε HER2-θετικό προχωρημένο UC παρουσίασε ORR ~70% και διάμεση συνολική επιβίωση 14,1 μήνες, με αυξημένη τοξικότητα

5.3 Αναστολείς των υποδοχέων του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα 3 (FGFR3)

Η οικογένεια των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor Receptor-FGFR) περιλαμβάνει τέσσερις διαμεμβρανικούς υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4), στους οποίους προσδένονται οι προσδέτες FGF (Fibroblast Growth Factor, FGF) στην εξωκύτταρια περιοχή του υποδοχέα. Το αποτέλεσμα αυτή της σύνδεσης είναι ο διμερισμός του υποδοχέα και η φωσφορυλίωση των ενδοκυττάρων περιοχών τυροσινικής κινάσης, που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας σειράς ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων των MAPK, STAT, PI3K/Akt, NF-κB, PLC-γ και DAG/PKC/IP3-Ca²⁺. Τα μονοπάτια αυτά συντελούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, την μετανάστευση, την επιβίωση και την αγγειογένεση (Εικ.5.2) (180,181,182).

Οι γενετικές αλλοιώσεις του FGFR, όπως οι μεταλλάξεις, η υπερέκφραση και οι χρωμοσωμικές μεταθέσεις, εμπλέκονται τόσο στην καρκινογένεση όσο και στην

αγγειογένεση του όγκου σε διάφορες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης. Ειδικότερα, μεταλλάξεις του FGFR3 ανιχνεύονται περίπου στο 60% των μη μυοδιηθητικών όγκων της ουροδόχου κύστεως, ενώ στους μυοδιηθητικούς καρκίνους παρατηρούνται σε ποσοστό της τάξης του 15–20% (181). Για τον λόγο αυτό ο FGFR3 αποτελεί θεραπευτικό στόχο στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως και του ανώτερου ουροποιητικού, ιδιαίτερα στους όγκους του υποτύπου luminal (184).



Εικ.5.2. Σηματοδοτικά μονοπάτια του FGFR3 (181).

Μία από τις πρώτες κατηγορίες θεραπευτικών παραγόντων που διερευνήθηκαν για την στόχευση του μονοπατιού FGFR είναι οι μη εκλεκτικοί αναστολείς τυροσινικής κινάσης (TKIs). Οι παράγοντες αυτοί αναστέλλουν την ενζυμική δραστηριότητα των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης, ανταγωνιζόμενοι την δέσμευση του ATP στην καταλυτική τους περιοχή. Αρχικά αναπτύχθηκαν με κύριο στόχο τους υποδοχείς PDGF και VEGF, ωστόσο διαπιστώθηκε ότι ασκούν παράλληλα ανασταλτική δράση και στους υποδοχείς FGFR. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα μόρια donitininib, ponatinib, pazopanib, nintedanib, lucitanib, brivanib και lenvatinib. Οι συγκεκριμένοι αναστολείς εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι του FGFR1 σε σύγκριση με τον FGFR3, γεγονός που ενδέχεται να περιορίζει την αποτελεσματικότητά τους σε όγκους που εξαρτώνται κυρίως από την

ενεργοποίηση του FGFR3. Επιπλέον, η περιορισμένη εκλεκτικότητά τους συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο ανεπιθύμητων ενεργειών, γεγονός που αποτελεί σημαντικό περιορισμό για την κλινική τους αξιοποίηση (181).

Πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα εμφανίζουν οι εκλεκτικοί αναστολείς του FGFR, όπως το μόριο erdafitinib, που στοχεύει τους υποδοχείς FGFR2 και FGFR3. Σε μια κλινική μελέτη φάσης II χορηγήθηκε σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο στάδιο της νόσου, όπου και έδειξε 40% θετική ανταπόκριση. Με βάση αυτά τα δεδομένα, το μόριο erdafitinib έχει λάβει έγκριση από τον FDA ως θεραπεία δεύτερης γραμμής για ασθενείς με προχωρημένο ουροθηλιακό καρκίνωμα που φέρουν κατάλληλες FGFR γενετικές αλλοιώσεις (185,186). Επιπρόσθετα, ένας εκλεκτικός αναστολέας των υποδοχέων FGFR1, FGFR2 και FGFR3 είναι το μόριο infigratinib, το οποίο έχει δείξει κλινική αποτελεσματικότητα σε ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνωμα που φέρουν γενετικές αλλοιώσεις του FGFR3 (187).

Μια επιπρόσθετη θεραπευτική κατηγορία για την στόχευση του μονοπατιού του FGFR3 είναι τα μονοκλωνικά αντισώματα. Το vofatamab είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 που στοχεύει εκλεκτικά τον υποδοχέα FGFR3, αναστέλλοντας την φωσφορυλίωση και την ενεργοποίησή του. Έχει μελετηθεί κυρίως σε ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα, οι οποίοι είχαν παρουσιάσει εξέλιξη της νόσου μετά από χημειοθεραπείες με βάση την πλατίνα. Μεγαλύτερη κλινική δραστηριότητα φαίνεται ότι έχει σε ασθενείς που εμφανίζουν γενετικές μεταλλάξεις του FGFR3. Επιπλέον, έχει διερευνηθεί κυρίως σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, όπως η δοσεταξέλη, στο πλαίσιο προσπαθειών για ενίσχυση της αντικαρκινικής του δράσης σε ασθενείς που έχουν λάβει προηγούμενη θεραπεία (188,189).

Απαιτείται περαιτέρω ανάλυση της δραστηριότητας των αναστολέων FGFR με βάση το είδος των γενετικών αλλοιώσεων, ώστε να βελτιστοποιηθεί η επιλογή των κατάλληλων ασθενών για στοχευμένη θεραπεία. Ωστόσο, παραμένει ανοιχτό το ζήτημα της βέλτιστης μεθόδου μοριακού ελέγχου, καθώς διαφορετικές θεραπείες βασίζονται είτε σε PCR είτε σε NGS, ενώ το διαθέσιμο βιολογικό υλικό από βιοψίες είναι συχνά περιορισμένο. Για τον λόγο αυτό, υπάρχει στροφή προς μη επεμβατικές προσεγγίσεις, όπως είναι η ανάλυση του ελεύθερου κυκλοφορούντος καρκινικού DNA στο αίμα ή στα ούρα, που επιτρέπουν ταχύτερη και πιο αποτελεσματική επιλογή ασθενών, ιδιαίτερα σε πρώιμα στάδια της νόσου (190).

5.4 Θεραπευτική στόχευση του μονοπατιού p53

Το γονίδιο p53 αποτελεί έναν από τους βασικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, με αποτέλεσμα η μετάλλαξη του να οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και καρκινογένεση. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, οι μεταλλάξεις στο p53 είναι συχνές και σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση. Η αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας του μονοπατιού p53 αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό στόχο, γεγονός που έχει ενισχύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας. Η μεταφορά των φυσιολογικών γονιδίων πραγματοποιείται μέσω αδενοϊκών φορέων, που έχουν χάσει την ικανότητα αναπαραγωγής *in vivo* και μπορούν να μολύνουν τα κύτταρα ανεξάρτητα από τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα περισσότερα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του ουροθηλιακού καρκινώματος εκφράζουν τον υποδοχέα coxsackie/adenovirus receptor (CAR) και είναι ευάλωτα σε μόλυνση από αδενοϊούς. Με βάση αυτά τα δεδομένα, έχει γίνει επισταμένη έρευνα για την αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στο ουροθηλιακό καρκίνωμα με αξιοποίηση γονιδιακών θεραπειών (79,191).

Στην μελέτη των Pagliaro *et al.* διερευνήθηκε η δράση του αδενοϊκού φορέα AdCMV-TP53, που μετέφερε το φυσιολογικό γονίδιο p53 σε κυτταρικές σειρές ουροθηλιακού καρκινώματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γονιδιακή μεταφορά του p53 έχει σημαντική κυτταροτοξική δράση και μπορεί να ενισχύσει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, ενώ παρατηρήθηκε και συνεργική δράση με την σισπλατίνη, οδηγώντας σε αυξημένη αντικαρκινική αποτελεσματικότητα. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν ότι ο συνδυασμός γονιδιακής θεραπείας και χημειοθεραπευτικών παραγόντων που προκαλούν βλάβη στο DNA μπορεί να αποτελέσει υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση στον ουροθηλιακό καρκίνο (191). Επίσης, στη μελέτη των Kuball *et al.*, πραγματοποιήθηκε ενδοκυστική χορήγηση του φυσιολογικού γονιδίου p53 μέσω του αδενοϊκού φορέα Ad5CMV-p53 σε ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνωμα. Η θεραπεία οδήγησε σε επιτυχή μεταφορά και έκφραση του p53, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με συγκριτική ανάλυση βιοψιών πριν και μετά τη χορήγηση. Σε ορισμένους ασθενείς καταγράφηκε μείωση του όγκου, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη προσέγγιση είναι ασφαλής και παρουσιάζει δυνητική θεραπευτική αποτελεσματικότητα, ενισχύοντας την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της γονιδιακής θεραπείας στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (192).

5.5 Θεραπευτική στόχευση του μονοπατιού αγγειογένεσης

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ρυθμιστές της αγγειογένεσης στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, καθώς προάγει τον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων μέσω της διέγερσης του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η υπερέκφρασή του έχει συσχετιστεί με προχωρημένο στάδιο της νόσου, αυξημένη αγγειοδιήθηση και δυσμενή πρόγνωση. Ο VEGF αποτελεί μια οικογένεια σχετιζόμενων μεταξύ τους αυξητικών παραγόντων και περιλαμβάνει τα επιμέρους μέλη VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C και VEGF-D, καθένα από τα οποία έχει διαφοροποιημένη ιστική έκφραση και λειτουργία, κυρίως στην αγγειογένεση και στην λεμφαγγειογένεση. Με βάση τον κεντρικό ρόλο του VEGF στην αγγειογένεση και την εξέλιξη του όγκου, έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεραπευτικές στρατηγικές που στοχεύουν την αναστολή της δράσης του (Πίνακας 5.3) (193,194).

Ένας από τους σημαντικότερους εκπροσώπους αυτής της κατηγορίας είναι το bevacizumab, ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του VEGF-A, το οποίο εμποδίζει την σύνδεσή του με τους υποδοχείς VEGFR και αναστέλλει τον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων που απαιτούνται για την ανάπτυξη και την μετάσταση του όγκου. Η αποτελεσματικότητα του bevacizumab αξιολογήθηκε σε μια πολυκεντρική μελέτη φάσης II, όπου χορηγήθηκε σε συνδυασμό με γεμισιταβίνη και σισπλατίνη ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα. Ο συνδυασμός εμφάνισε υψηλά ποσοστά αντικειμενικής ανταπόκρισης και βελτιωμένη επιβίωση σε σύγκριση με την χημειοθεραπεία, ωστόσο συνοδεύτηκε από αυξημένη συχνότητα ανεπιθύμητων ενεργειών, κυρίως θρομβοεμβολικών, αιμορραγικών και καρδιαγγειακών συμβαμάτων (195). Συνεπώς, η κλινική χρήση του bevacizumab στον ουροθηλιακό καρκίνο παραμένει περιορισμένη, καθώς το συνολικό όφελος επιβίωσης δεν κρίθηκε επαρκές για την καθιέρωσή του ως στάνταρ θεραπευτική επιλογή (195).

Μεταξύ των αναστολέων του VEGF συγκαταλέγεται και η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη aflibercept, που προκύπτει από την σύντηξη των εξωκυττάρων περιοχών των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2 με το Fc τμήμα της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG1. Τα στοιχεία που διαφοροποιούν το μόριο αυτό είναι ότι μπορεί και δεσμεύει και άλλα μέλη της οικογένειας VEGF, όπως τον PDGF (Platelet Derived Growth Factor) και τον VEGF-B και

επιπλέον έχει υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης για τον VEGF-A σε σύγκριση με το bevacizumab (196).

Μια άλλη θεραπευτική προσέγγιση στοχεύει τους υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3), οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης. Οι υποδοχείς αυτοί διαθέτουν κοινή δομή, αποτελούμενη από μια εξωκυττάρια περιοχή δέσμευσης του VEGF, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυττάριο τμήμα με δράση τυροσινικής κινάσης. Στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης που δρουν στο μονοπάτι του VEGF συγκαταλέγονται τα sunitinib, sorafenib, pazopanib και axitinib, τα οποία έχουν αξιολογηθεί στον ουροθηλιακό καρκίνο, χωρίς όμως να καταδείξουν σημαντικό κλινικό όφελος ως μονοθεραπεία (193). Αντίθετα, το μονοκλωνικό αντίσωμα ramucirumab, το οποίο στοχεύει ειδικά την εξωκυττάρια περιοχή του VEGFR-2, έχει παρουσιάσει πιο ενθαρρυντικά κλινικά αποτελέσματα. Στην μελέτη RANGE, μια τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή κλινική μελέτη φάσης III, αξιολογήθηκε ο συνδυασμός ramucirumab και docetaxel έναντι placebo και docetaxel σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα μετά από θεραπεία με πλατίνα. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική βελτίωση της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου και υψηλότερα ποσοστά αντικειμενικής ανταπόκρισης στην ομάδα του ramucirumab, χωρίς όμως να παρατηρηθεί στατιστικά σημαντικό όφελος στη συνολική επιβίωση (197).

Πίνακας 5.3. Στοχευμένες θεραπείες έναντι του VEGF στον ουροθηλιακό καρκίνο

Παράγοντες	Στόχος	Κύρια αποτελέσματα
Bevacizumab	Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του VEGF-A	Υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης και βελτιωμένη επιβίωση σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, αλλά αυξημένη τοξικότητα. Περιορισμένο συνολικό όφελος επιβίωσης.
Aflibercept	Διαλυτός υποδοχέας που δεσμεύει VEGF-A, VEGF-B και PDGF	Ισχυρή βιολογική δράση, αλλά ανεπαρκής κλινική αποτελεσματικότητα ως μονοθεραπεία.
Sunitinib Sorafenib Pazopanib Axitinib	Αναστολείς τυροσινικής κινάσης των VEGFR-1/2/3	Δεν ανέδειξαν σημαντικό κλινικό όφελος ως μονοθεραπείες στον ουροθηλιακό καρκίνο.
Ramucirumab	Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του VEGFR-2	Βελτίωση της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου και των ποσοστών ανταπόκρισης σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, χωρίς σημαντική διαφορά στη συνολική επιβίωση.

5.6 Αναστολείς DNA μεθυλοτρασφερασών

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν σημαντικό επιγενετικό μηχανισμό που ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση. Πρόκειται για την προσθήκη μια μεθυλομάδας στην κυτοσίνη από το ένζυμο DNA μεθυλοτρανσφεράση (DNMT). Η ενζυμική αυτή τροποποίηση πραγματοποιείται σε περιοχές που είναι πλούσιες στις δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες CpG. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως παρατηρείται συχνά υπερμεθυλίωση περιοχών των υποκινητών στα ογκοκατασταλτικά γονίδια, η οποία οδηγεί σε σίγαση αυτών των γονιδίων

και απώλεια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Η διαδικασία αυτή είναι δυνητικά αναστρέψιμη και για αυτό οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) αποτελούν σημαντικό θεραπευτικό στόχο στη σύγχρονη ογκολογική έρευνα (198,199).

Μια κατηγορία θεραπευτικών παραγόντων που στοχεύουν τις DNMTs είναι τα ανάλογα νουκλεοσιδίων, τα οποία ενσωματώνονται στο DNA στην θέση των κυτοσινών, αναστέλλοντας την δράση των DNMTs. Με αυτό τον τρόπο αποκαθίσταται η λειτουργικότητα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που έχουν επιγενετικά κατασταλεί. Η αζακυτιδίνη (5-azacytidine, Vidaza®) και η δεσιταβίνη (decitabine, Dacogen®) είναι δύο αναστολείς των DNMTs που έχουν εγκριθεί από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) και τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (79,200,201). Στην προκλινική μελέτη των Ramakrishnan *et al.* διερευνήθηκε η δράση της δεσιταβίνης σε κυτταρικές σειρές μυοδιηθητικού καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, όπου διαπιστώθηκε ότι η δράση της προκαλεί απομεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *NOTCH1*, οδηγώντας σε ενεργοποίηση της έκφρασής του. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού *NOTCH1* συσχετίστηκε με αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, προαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης και μεταβολές σε ανοσολογικές οδούς σηματοδότησης. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν ότι οι απομεθυλιωτικοί παράγοντες, όπως η δεσιταβίνη, μπορούν να αναστρέψουν την επιγενετική σίγαση σημαντικών γονιδίων και να αποτελέσουν μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση στον μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (203).

Εκτός από τα νουκλεοσιδικά ανάλογα, έχουν μελετηθεί και άλλες εγκεκριμένες από τον FDA ενώσεις, όπως η προκαΐνη και η προκαΐναμίδη, παράγωγα του 4- αμινοβενζοϊκού οξέος, οι οποίες εμφανίζουν απομεθυλιωτική δράση, αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων. Ειδικότερα, η προκαΐνη φαίνεται να μειώνει τη δραστηριότητα των DNMT1 και DNMT3a χωρίς να μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασής τους, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ανασταλτική της δράση ασκείται σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο (200,202).

Επιπλέον, εκτεταμένη έρευνα έχει πραγματοποιηθεί και σε στοχευμένες μοριακές προσεγγίσεις που δρουν άμεσα στην έκφραση των DNA μεθυλοτρανσφερασών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μόριο MG98, ένα αντινοσηματικό ολιγονουκλεοτίδιο (ASO) έναντι της DNMT1, το οποίο αναστέλλει την μετάφραση του

αντίστοιχου mRNA. Το MG98 έχει αξιολογηθεί σε πρώιμες κλινικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένων ασθενών με προχωρημένο ουροθηλιακό καρκίνωμα, χωρίς ωστόσο να έχει αναδείξει σημαντική αντικαρκινική δραστηριότητα ως μονοθεραπεία, γεγονός που έχει περιορίσει την περαιτέρω κλινική του εφαρμογή (204).

Παρότι οι απομεθυλιωτικοί παράγοντες έχουν την δυνατότητα να επανενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια και να ενισχύουν την αντικαρκινική ανοσολογική απάντηση, η κλινική τους εφαρμογή στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως παραμένει περιορισμένη. Αυτό οφείλεται κυρίως στη σημαντική συστηματική τοξικότητα που προκαλούν, με χαρακτηριστικότερη την μυελοκαταστολή, η οποία αποτελεί σοβαρό πρόβλημα ιδιαίτερα σε ηλικιωμένους ασθενείς ή σε άτομα με συννοσηρότητες. Επιπλέον, η έλλειψη εκλεκτικότητας οδηγεί σε απομεθυλίωση και φυσιολογικών γονιδίων, αυξάνοντας τον κίνδυνο ανεπιθύμητων επιδράσεων και περιορίζοντας την συνολική τους ασφάλεια και αποτελεσματικότητα (202).

5.7 Αναστολείς της κινάσης της ραπαμυκίνης (mTOR)

Η πρωτεΐνη mTOR (mammalian target of rapamycin) ανήκει στην οικογένεια των κινασών που σχετίζονται με την φωσφατιδυλινωσιτόλη (phosphatidylinositol kinase-related kinases, PIKKs) και αποτελεί μια κινάση σερίνης/θρεονίνης με κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού, του μεταβολισμού και της επιβίωσης των κυττάρων (208). Η mTOR λειτουργεί ως συστατικό πρωτεϊνικών συμπλόκων που ενσωματώνουν σήματα από αυξητικούς παράγοντες, θρεπτικά συστατικά και συνθήκες υποξίας, ρυθμίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τις κυτταρικές αποκρίσεις στις εκάστοτε μεταβολές του μεταβολισμού. Η απορρύθμιση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR παρατηρείται συχνά σε διάφορες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως, καθιστώντας την mTOR σημαντικό θεραπευτικό στόχο (169,205,208).

Δύο μόρια αναστολείς της κινάσης mTOR που έχουν μελετηθεί εκτεταμένα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως είναι τα everolimus και sirolimus. Οι παράγοντες αυτοί προσδένονται στην πρωτεΐνη FKBP-12 δημιουργώντας ένα σύμπλοκο που αναστέλλει την δραστηριότητα της κινάσης mTORC1. Ως αποτέλεσμα, προκαλείται αναστολή του κυτταρικού κύκλου, μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και περιορισμός της

αγγειογένεσης μέσω μείωσης της έκφρασης του παράγοντα HIF-1 και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) (169,205).

Το μόριο everolimus μελετήθηκε από τους Seront *et al.* σε μια μελέτη φάσης II, η οποία περιέλαβε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που είχαν εμφανίσει εξέλιξη της νόσου μετά από προηγούμενη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά όσον αφορά τον έλεγχο της νόσου, καθώς οι περισσότεροι ασθενείς παρουσίασαν σταθεροποίηση της νόσου, ενώ σε ορισμένους παρατηρήθηκε και μερική συρρίκνωση του όγκου. Παράλληλα, η θεραπεία με everolimus εμφάνισε ικανοποιητικό προφίλ ανοχής και ασφάλειας, γεγονός που υποστηρίζει τη διερεύνηση του φαρμάκου ως πιθανής θεραπευτικής επιλογής για τον ουροθηλιακό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (206).

Στην προκλινική μελέτη των Pinto-Leite *et al.* αξιολογήθηκε το θεραπευτικό αποτέλεσμα του συνδυασμού του everolimus με cisplatin σε κυτταρικές σειρές καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Τα ευρήματα κατέδειξαν σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αύξηση της κυτταροτοξικότητας στα καρκινικά κύτταρα, υποδεικνύοντας πιθανή συνεργιστική δράση μεταξύ everolimus και cisplatin (207).

Τέλος, οι Wu *et al.* αξιολόγησαν την αντικαρκινική δράση του sirolimus σε κυτταρικές σειρές και σε ποντίκια με ουροθηλιακό καρκίνο. Η θεραπεία με sirolimus οδήγησε σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων, ενώ παράλληλα μείωσε την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF-A. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντικός περιορισμός της ανάπτυξης των όγκων στα ποντίκια, υποστηρίζοντας τον πιθανό θεραπευτικό ρόλο του στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (209).

5.8 Θεραπευτική στόχευση των miRNAs και lncRNAs

Η ραγδαία πρόοδος στην μοριακή ογκολογία έχει αναδείξει τα miRNAs και τα lncRNAs ως κρίσιμους ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης που εμπλέκονται στην καρκινογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Τα μόρια αυτά δρουν είτε ως ογκοκατασταλτικοί είτε ως ογκογόνοι παράγοντες, επηρεάζοντας βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση και η επιδιόρθωση του DNA. Λόγω της ειδικής τους δράσης σε σημαντικά γονίδια που εμπλέκονται στον ουροθηλιακό καρκίνο, τα miRNAs και lncRNAs έχουν προσελκύσει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον ως πιθανοί

θεραπευτικοί στόχοι, είτε μέσω αποκατάστασης της φυσιολογικής τους έκφρασης είτε μέσω αναστολής της παθολογικής τους δράσης (Πίνακας 5.4) (210,211).

Ο ρόλος του miR-125b στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως εξετάστηκε στην μελέτη των Huang *et al.*, όπου διαπίστωσαν ότι η έκφρασή του είναι σημαντικά μειωμένη στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με το φυσιολογικό ουροθήλιο. Η μελέτη ανέδειξε ότι το miR-125b στοχεύει άμεσα τον μεταγραφικό παράγοντα E2F3, έναν κρίσιμο ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η πειραματική επανέκφραση του miR-125b, μέσω μεταφοράς συνθετικών miRNAs σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροθηλιακού καρκίνου, οδήγησε σε καταστολή της έκφρασης του E2F3 και σε σημαντική αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, τα μειωμένα επίπεδα του miR-125b συσχετίστηκαν με αυξημένη έκφραση του E2F3, ενισχύοντας τον ογκογόνο του ρόλο. Παρά τα θετικά αποτελέσματα, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την επιβεβαίωση των ευρημάτων και την αξιολόγηση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας και ασφάλειας της συγκεκριμένης προσέγγισης (212).

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό παράδειγμα ογκοκατασταλτικού miRNA είναι το miR-34a, του οποίου ο ρόλος διερευνήθηκε από τους Li *et al.* όσον αφορά την θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως σε συνδυασμό με σισπλατίνη. Το miR-34a είχε μειωμένη έκφραση στα καρκινικά κύτταρα λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του, ενώ η χορήγηση σισπλατίνης προκάλεσε απομεθυλίωση και επανενεργοποίηση της έκφρασής του. Η αυξημένη έκφραση του miR-34a οδήγησε σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ενίσχυση της απόπτωσης μέσω άμεσης καταστολής του γονιδίου CD44. Επιπλέον, τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε πειραματικά ζωικά μοντέλα, η επανέκφραση του miR-34a αύξησε σημαντικά την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στην σισπλατίνη και περιόρισε την ανάπτυξη των όγκων. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι το miR-34a λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό miRNA και θα μπορούσε να αποτελέσει δυνητικό θεραπευτικό στόχο για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας στον ουροθηλιακό καρκίνο (213). Επιπλέον, η αναγνώριση του miR-34a ως ισχυρού ογκοκατασταλτικού miRNA αποτέλεσε την βάση για την ανάπτυξη του MRX34, ενός συνθετικού μιμητή του miR-34a. Στην μελέτη φάσης I των Hong *et al.*, το MRX34 χορηγήθηκε σε ασθενείς με προχωρημένους συμπαγείς όγκους, παρουσιάζοντας αντικαρκινική δράση. Ωστόσο, η εμφάνιση σοβαρών ανοσολογικών ανεπιθύμητων ενεργειών οδήγησε στην διακοπή της μελέτης, υπογραμμίζοντας ότι, παρά την σημαντική θεραπευτική προοπτική του miR-34a,

απαιτούνται περαιτέρω βελτιώσεις στα συστήματα χορήγησης και στο προφίλ ασφάλειας των miRNA-βασισμένων θεραπειών (214).

Επιπρόσθετα, η μελέτη των Tassone *et al.* αποτέλεσε την πρώτη κλινική αξιολόγηση του LNA-i-miR-221, ενός εκλεκτικού αναστολέα του ογκογόνου miR-221, σε ασθενείς με προχωρημένες ανθεκτικές κακοήθειες. Το LNA-i-miR-221 βασίζεται στην τεχνολογία των Locked Nucleic Acids (LNA), η οποία προσδίδει αυξημένη σταθερότητα και υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τον RNA-στόχο. Μέσω αυτής της προσέγγισης επιτυγχάνεται η αποτελεσματική και εκλεκτική δέσμευση του miR-221, οδηγώντας σε αναστολή της βιολογικής του δράσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η θεραπεία ήταν γενικά ασφαλής και καλά ανεκτή. Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα, το 50% των ασθενών παρουσίασε σταθεροποίηση της νόσου, ενώ καταγράφηκε παρατεταμένη μερική ανταπόκριση διάρκειας μεγαλύτερης των τριών ετών σε ασθενή με καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την θέση του miR-221 ως δυνητικού θεραπευτικού στόχου και παρέχουν ισχυρή τεκμηρίωση για την συνέχιση της κλινικής ανάπτυξης θεραπειών που βασίζονται στα miRNAs (215).

Στην προηγούμενη ενότητα είχε αναφερθεί ότι η αυξημένη έκφραση του HOTAIR σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο και εξέλιξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως και για αυτό τον λόγο υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για την στόχευσή του. Στην μελέτη των Liu *et al.* αξιολογήθηκε ο ρόλος του σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα επιτεύχθηκε η καταστολή της έκφρασής του μέσω siRNA, έχοντας ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση τόσο της κυτταρικής ανάπτυξης όσο και της διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων καθώς και αύξηση της απόπτωσης. Παράλληλα, παρατηρήθηκε τροποποίηση της έκφρασης μορίων που εμπλέκονται στην μετάσταση και την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT), γεγονός που υποδηλώνει ότι το HOTAIR διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην επιθετική βιολογική συμπεριφορά του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την προοπτική αξιοποίησης του HOTAIR ως δυνητικού θεραπευτικού στόχου (216,217).

Οι θεραπείες που βασίζονται στα miRNAs και lncRNAs παρουσιάζουν μεγάλες προοπτικές για την αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Παρόλα αυτά, η κλινική τους εφαρμογή είναι ακόμα περιορισμένη, λόγω προβλημάτων τοξικότητας και ανοσογονικότητας που μπορεί να προκληθούν. Επειδή τα miRNAs και τα lncRNAs αναγνωρίζουν τους στόχους τους μέσω μερικής συμπληρωματικότητας αλληλουχιών, μπορούν να καταστείλουν ακούσια την έκφραση μη στοχευόμενων γονιδίων, επηρεάζοντας

πολλαπλές κυτταρικές οδούς και προκαλώντας ανεπιθύμητες επιδράσεις, όπως μεταβολικές διαταραχές, απόπτωση, δυσλειτουργία κυττάρων ή τοξικότητα οργάνων. Παρότι η γνώση γύρω από τη βιοσύνθεση και τη δράση των miRNAs και lncRNAs, ιδιαίτερα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, έχει αυξηθεί σημαντικά, εξακολουθούν να υπάρχουν σημαντικά κενά σχετικά με τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, γεγονός που καθιστά αναγκαία την περαιτέρω έρευνα για την ανάπτυξη ασφαλέστερων και αποτελεσματικότερων θεραπειών (218,219).

Πίνακας 5.4. Θεραπευτική στόχευση των miRNAs και lncRNAs

Θεραπευτικά Μόρια	Μοριακή Στόχευση	Αποτελέσματα
miR-125b	Επανάκφραση ογκοκατασταλτικού miRNA	Αναστολή του E2F3 και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού
miR-34a	Αποκατάσταση έκφρασης του miRNA	Ενίσχυση απόπτωσης και αύξηση ευαισθησίας στη σισπλατίνη
MRX34	Συστηματική χορήγηση συνθετικού miRNA	Αντικαρκινική δράση αλλά σοβαρή ανοσοτοξικότητα
miR-221	Αναστολή ογκογόνου miRNA με LNA-i-miR-221	Σταθεροποίηση νόσου και κλινική δραστηριότητα
HOTAIR	Καταστολή με siRNA	Μείωση ανάπτυξης, διήθησης και EMT των καρκινικών κυττάρων

5.9 Αντισώματα συζευγμένα με κυτταροτοξικούς παράγοντες

Η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για τον προχωρημένο και μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνο έχει οδηγήσει στην εισαγωγή καινοτόμων προσεγγίσεων που συνδυάζουν την στοχευμένη θεραπεία με την ισχυρή αντικαρκινική δράση των κυτταροτοξικών παραγόντων. Στο πλαίσιο αυτό, τα αντισώματα συζευγμένα με κυτταροτοξικούς παράγοντες (Antibody–Drug Conjugates, ADCs) αποτελούν μία από τις σημαντικότερες εξελίξεις της σύγχρονης ογκολογίας. Τα ADCs αποτελούνται από τρία

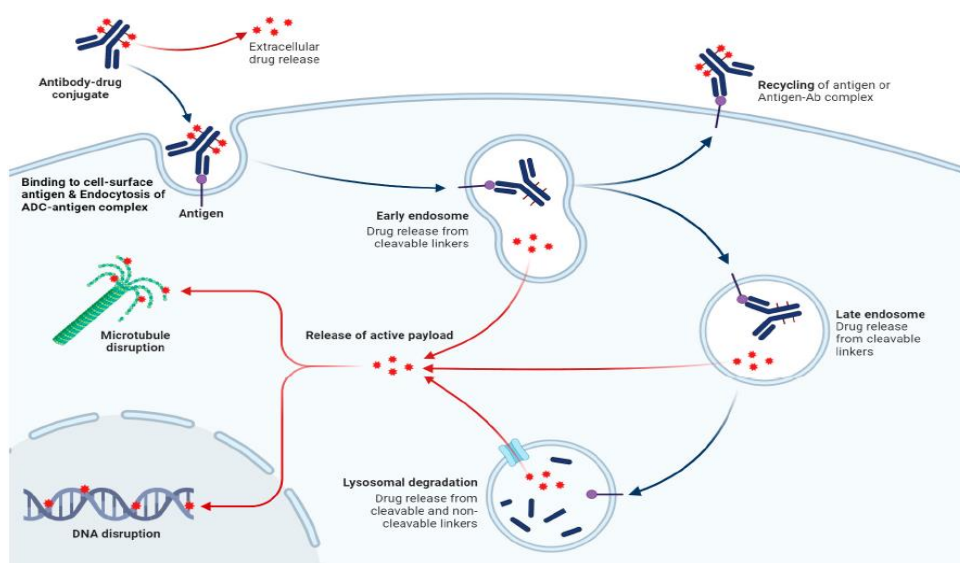
βασικά δομικά στοιχεία: ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά ένα αντιγόνο του όγκου, έναν χημικό συνδέτη και ένα ισχυρό κυτταροτοξικό μόριο. Μετά την σύνδεση του αντισώματος με το αντιγόνο-στόχο, το σύμπλοκο εισέρχεται στο καρκινικό κύτταρο, όπου απελευθερώνεται ο κυτταροτοξικός παράγοντας και προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την στοχευμένη καταστροφή των νεοπλασματικών κυττάρων, περιορίζοντας παράλληλα την έκθεση των φυσιολογικών ιστών σε τοξικές ουσίες. Ως αποτέλεσμα, τα ADCs εμφανίζουν βελτιωμένο θεραπευτικό προφίλ και μειωμένη συστηματική τοξικότητα σε σύγκριση με την συμβατική χημειοθεραπεία (220,221).

5.9.1 Μηχανισμός δράσης των ADCs

Ο βασικός μηχανισμός δράσης των ADCs ξεκινά με τη σύνδεση του μονοκλωνικού αντισώματος σε ένα ειδικό αντιγόνο που υπερεκφράζεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Η σύνδεση αυτή οδηγεί στην ενδοκύττωση του συμπλόκου ADC–αντιγόνου και στην μεταφορά του σε ενδοσώματα, τα οποία στη συνέχεια συγχωνεύονται με λυσοσώματα. Στο λυσοσωμικό περιβάλλον πραγματοποιείται η αποδέσμευση του κυτταροτοξικού φορτίου, το οποίο αλληλεπιδρά με την τουμπουλίνη και διαταράσσει τη δυναμική των μικροσωληνίσκων, προκαλώντας αναστολή της μίτωσης και τελικά κυτταρικό θάνατο (Εικ.5.3) (220,222).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, το απελευθερωμένο κυτταροτοξικό φορτίο μπορεί να διαχέεται σε γειτονικά καρκινικά κύτταρα, ασκώντας αντικαρκινική δράση πέραν εκείνων που εκφράζουν τον θεραπευτικό στόχο. Η ιδιότητα αυτή ενισχύει την συνολική θεραπευτική αποτελεσματικότητα, ιδιαίτερα σε όγκους που εμφανίζουν ετερογενή έκφραση του αντιγόνου-στόχου (223).

Πέραν της άμεσης μεταφοράς κυτταροτοξικών παραγόντων, τα ADCs μπορούν να ενεργοποιούν ανοσολογικούς μηχανισμούς, όπως η εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα, η εξαρτώμενη από αντισώματα φαγοκυττάρωση και η εξαρτώμενη από το σύστημα του συμπληρώματος κυτταροτοξικότητα. Οι μηχανισμοί αυτοί συμβάλλουν περαιτέρω στην εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα φυσικά φονικά κύτταρα και τα μακροφάγα (222).



Εικ.5.3. Μηχανισμός δράσης των αντισωμάτων συζευγμένων με κυτταροτοξικούς παράγοντες (220).

Επιπλέον, ορισμένα ADCs διατηρούν την βιολογική δραστικότητα του μονοκλωνικού αντισώματος από το οποίο προέρχονται, αναστέλλοντας κρίσιμες οδούς κυτταρικής σηματοδότησης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το trastuzumab, το οποίο δεσμεύει τον υποδοχέα HER2 και εμποδίζει τον σχηματισμό ετεροδιμερών με άλλους υποδοχείς της οικογένειας HER. Η αναστολή αυτή διακόπτει μονοπάτια σηματοδότησης που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, όπως οι οδοί PI3K/AKT και MAPK, οδηγώντας τελικά σε αναστολή της ανάπτυξης και απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (220).

Η αυξημένη αποτελεσματικότητα των ADCs στον ουροθηλιακό καρκίνο αποδίδεται κυρίως στην υπερέκφραση επιφανειακών δεικτών στα καρκινικά κύτταρα, όπως οι πρωτεΐνες Nectin-4 και Trop-2. Η διαφορική αυτή έκφραση σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς επιτρέπει την εκλεκτική στόχευση των νεοπλασματικών κυττάρων, ενισχύοντας την θεραπευτική δράση και μειώνοντας την εκτός στόχου τοξικότητα (Πίνακας 5.5) (223).

Παράλληλα, τα ADCs μπορούν να συνδυαστούν αποτελεσματικά με ανοσοθεραπευτικούς παράγοντες, όπως οι αναστολείς σημείων ελέγχου PD-1/PD-L1, οι οποίοι ήδη χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Ο συνδυασμός αυτός φαίνεται να δρα συνεργιστικά, ενισχύοντας την ανοσολογική απόκριση έναντι του όγκου και οδηγώντας σε βελτιωμένα κλινικά αποτελέσματα, γεγονός που καθιστά τη συγκεκριμένη στρατηγική ιδιαίτερα υποσχόμενη για μελλοντικές θεραπείες (225).

Τέλος, λόγω του στοχευμένου τρόπου δράσης τους, τα ADCs παρουσιάζουν γενικά καλύτερο προφίλ ανεκτικότητας, καθώς το κυτταροτοξικό φορτίο απελευθερώνεται κυρίως εντός των καρκινικών κυττάρων. Αυτό τα καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλη θεραπευτική επιλογή για ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνο, οι οποίοι συχνά είναι μεγαλύτερης ηλικίας ή επιβαρυνμένοι από συννοσηρότητες (220,221).

5.9.2 Θεραπευτική εφαρμογή των ADCs στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως

Ένα φάρμακο που έχει λάβει έγκριση από τον FDA για την θεραπεία ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο της ουροδόχου κύστεως είναι το enfortumab vedotin, που στοχεύει την διαμεμβρανική πρωτεΐνη Nectin-4, η οποία υπερεκφράζεται στα κύτταρα του ουροθηλιακού καρκίνου (226,227). Το enfortumab vedotin χορηγείται σε ασθενείς μετά από αποτυχία προηγούμενων συστηματικών θεραπειών, καθώς και σε όσους δεν είναι κατάλληλοι για σισπλατίνη και έχουν λάβει προηγουμένως ανοσοθεραπεία ως θεραπεία πρώτης γραμμής. Η αποτελεσματικότητά του τεκμηριώθηκε αρχικά στην μελέτη EV-201, μια πολυκεντρική, μονοσκελής μελέτη φάσης II, στην οποία συμμετείχαν ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνο που είχαν παρουσιάσει εξέλιξη της νόσου μετά από πλατινούχα χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία. Στην μελέτη αυτή, το 44% των ασθενών εμφάνισε πλήρη ή μερική ανταπόκριση στην θεραπεία με enfortumab vedotin (228). Η αντικαρκινική του δράση επιβεβαιώθηκε περαιτέρω στην μελέτη EV-301, μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III, η οποία συνέκρινε το enfortumab vedotin με καθιερωμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα (δοσεταξέλη, πακλιταξέλη ή βινφλουνίνη) σε ασθενείς με μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνο που είχαν λάβει προηγουμένως πλατινούχα θεραπεία και ανοσοθεραπεία. Η μελέτη ανέδειξε σημαντική βελτίωση στην συνολική επιβίωση, με μείωση του κινδύνου θανάτου κατά περίπου 30% και αύξηση της διάρκειας επιβίωσης κατά περίπου 4 μήνες σε σύγκριση με την χημειοθεραπεία (231).

Η μελέτη EV-103 ανέδειξε την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού enfortumab vedotin και pembrolizumab, ο οποίος έλαβε έγκριση από τον FDA το 2023. Ο συνδυασμός χορηγήθηκε ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που δεν ήταν κατάλληλοι για θεραπεία με σισπλατίνη και συσχετίστηκε με υψηλά ποσοστά αντικειμενικής ανταπόκρισης και παρατεταμένη διάρκεια ανταπόκρισης. Αξιοσημείωτο είναι ότι κλινικό όφελος παρατηρήθηκε ακόμη και σε ασθενείς με δυσμενή προγνωστικά χαρακτηριστικά, όπως η παρουσία ηπατικών μεταστάσεων. Τα ευρήματα αυτά ενισχύθηκαν από την μελέτη φάσης III EV-302, στην οποία ο συνδυασμός συγκρίθηκε

με την καθιερωμένη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής (γεμισιταβίνη σε συνδυασμό με σισπλατίνη ή καρβοπλατίνη) σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν σημαντική βελτίωση τόσο της συνολικής επιβίωσης όσο και της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου, καθιερώνοντας τον συνδυασμό ως το νέο πρότυπο θεραπείας πρώτης γραμμής (229,234).

Ένα άλλο ADC φάρμακο που έλαβε έγκριση από τον FDA το 2021 είναι το sacituzumab gonitican, που στοχεύει την διαμεμβρανική πρωτεΐνη TROP-2, η οποία υπερεκφράζεται στον ουροθηλιακό καρκίνο. Στην μελέτη TROPHY-U-01, το sacituzumab gonitican χορηγήθηκε σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνο, οι οποίοι είχαν παρουσιάσει αντοχή σε πλατινούχα σχήματα και σε αναστολείς PD-1/PD-L1, όπου έδειξε κλινικά σημαντική αντικαρκινική δράση με ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης 27%, υποδηλώνοντας ότι αποτελεί μια υποσχόμενη θεραπευτική επιλογή για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (230).

Το disitamab vedotin και το trastuzumab deruxtecan είναι δυο νεότερα φάρμακα ADCs που στοχεύουν τον υποδοχέα του επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα HER2, η υπερέκφραση του οποίου παρατηρείται σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο, κυρίως σε περιπτώσεις ανθεκτικές στην θεραπεία με σισπλατίνη (232). Στην μελέτη φάσης II RC48-C011, η χορήγηση disitamab vedotin οδήγησε σε ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης 26% σε ασθενείς με HER2-αρνητικούς όγκους ή χαμηλή έκφραση HER2, ενώ το 68% των ασθενών παρουσίασε σταθεροποίηση της νόσου. Αντίστοιχα, σε ασθενείς με HER2-θετικό ουροθηλιακό καρκίνο, οι οποίοι είχαν λάβει πολλαπλές προηγούμενες θεραπείες, το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης έφθασε το 50,5% (233). Όσον αφορά το trastuzumab deruxtecan, τα σημαντικότερα δεδομένα προέρχονται από την μελέτη DESTINY-PanTumor02 η οποία περιέλαβε ασθενείς με HER2-εκφραζόμενους συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένου του ουροθηλιακού καρκίνου. Στην μελέτη φάσης II DESTINY-PanTumor02, παρουσίασε αξιολογημένη αντικαρκινική δραστηριότητα, με ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης 37,1% και μεγαλύτερο κλινικό όφελος σε ασθενείς με υψηλή έκφραση του HER2 (IHC3+), αναδεικνύοντάς το ως μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική επιλογή (235).

Τα ADCs αποτελούν πλέον σημαντικό κομμάτι της θεραπείας του ουροθηλιακού καρκίνου. Παρότι πρόκειται για πολύπλοκες θεραπείες και η ανάπτυξή τους παρουσιάζει προκλήσεις, ο αριθμός των εγκεκριμένων ADCs αναμένεται να αυξηθεί στο μέλλον, καλύπτοντας σημαντικά ανεκπλήρωτα ιατρικά κενά τόσο σε συχνές όσο και σε σπάνιες μορφές καρκίνου.

Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι τα φάρμακα αυτά παρουσιάζουν ικανοποιητική αποτελεσματικότητα και αποδεκτή τοξικότητα σε ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνο. Ωστόσο, παραμένουν αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με την βέλτιστη διάρκεια θεραπείας, την συνέχιση μετά από πλήρη ανταπόκριση, την επαναχορήγηση σε περίπτωση υποτροπής, καθώς και τον πραγματικό βαθμό συνεργίας τους με την ανοσοθεραπεία (220,222).

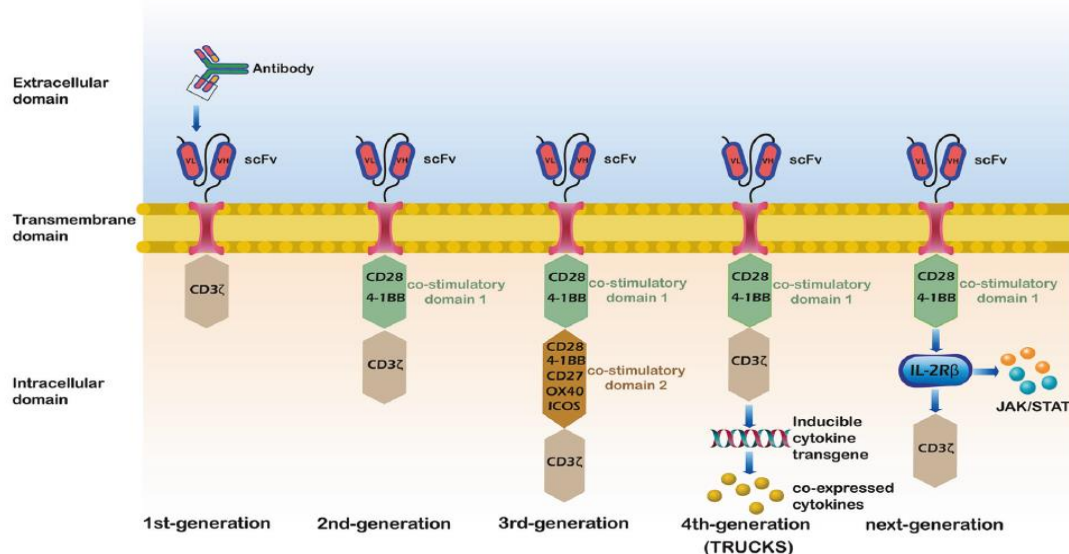
Πίνακας 5.5. Κύρια ADCs για την θεραπεία του ουροθηλιακού καρκίνου, οι μοριακοί στόχοι τους και τα σημαντικότερα κλινικά αποτελέσματα.

ADC φάρμακο	Μοριακός στόχος	Κλινικές μελέτες	Βασικά αποτελέσματα
Enfortumab vedotin	Nectin-4	EV-201 (Φάσης II)	ORR 44% σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνο
		EV-301 (Φάσης III)	Περίπου 30% μείωση του κινδύνου θανάτου και αύξηση της διάμεσης συνολικής επιβίωσης κατά περίπου 4 μήνες έναντι της χημειοθεραπείας.
		EV-103 & EV-302 (Φάσης III)	Ο συνδυασμός με pembrolizumab βελτίωσε σημαντικά τη συνολική επιβίωση (OS) και την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS), καθιερώνοντας νέο πρότυπο θεραπείας πρώτης γραμμής.
Sacituzumab govitecan	TROP-2	TROPHY-U-01	ORR 27% με σημαντική αντικαρκινική δραστηριότητα σε προθεραπευμένους ασθενείς.
Disitamab vedotin	HER2	RC48-C011 (Φάσης II)	ORR 26% σε HER2-low/αρνητικούς όγκους και σταθεροποίηση της νόσου στο 68%. Σε HER2-θετικούς ασθενείς το ORR έφτασε το 50,5%.
Trastuzumab deruxtecan	HER2	DESTINY-PanTumor02	Το ORR ήταν 37,1%, με διάμεση διάρκεια ανταπόκρισης 11,3 μήνες, με PFS 6,9 μήνες και διάμεση συνολική επιβίωση (OS) 13,4 μήνες. Ανταποκρίσεις παρατηρήθηκαν και στην ομάδα του ουροθηλιακού καρκίνου.

5.10 Θεραπευτική εφαρμογή των CAR-T λεμφοκυττάρων

Η θεραπεία με CAR-T λεμφοκύτταρα (Chimeric Antigen Receptor T-cell therapy) αποτελεί μια καινοτόμο μέθοδο ανοσοθεραπείας (Adoptive cellular therapy-ADC), κατά την οποία τα T-λεμφοκύτταρα του ασθενούς τροποποιούνται γενετικά ώστε να αναγνωρίζουν και να εξαλείφουν εκλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα. Σε αντίθεση με την φυσιολογική ανοσολογική απόκριση, η δράση των CAR-T κυττάρων δεν εξαρτάται από την παρουσίαση αντιγόνων μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), γεγονός που επιτρέπει την άμεση αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων και την ενεργοποίηση ισχυρής κυτταροτοξικής απόκρισης. Η θεραπευτική αυτή προσέγγιση έχει επιτύχει εντυπωσιακά αποτελέσματα σε αιματολογικές κακοήθειες, ιδιαίτερα σε νεοπλάσματα των B-λεμφοκυττάρων, οδηγώντας στην έγκριση πολλών CAR-T προϊόντων για κλινική χρήση (235,236,237).

Η δομή του χιμαιρικού αντιγονικού υποδοχέα (CAR) αποτελείται από τρία βασικά τμήματα: το εξωκυτταρικό τμήμα αναγνώρισης του αντιγόνου, το διαμεμβρανικό τμήμα και το ενδοκυτταρικό τμήμα σηματοδότησης, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων μέσω συνδεδεργτικών μορίων. Οι πρώτες γενιές CAR-T κυττάρων παρουσίαζαν περιορισμένη ενεργοποίηση και χαμηλή αντικαρκινική αποτελεσματικότητα, καθώς διέθεταν αποκλειστικά το σηματοδοτικό μόριο CD3ζ, χωρίς τα απαραίτητα συνδεδεργτικά σήματα για την πλήρη ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (240). Για την υπέρβαση αυτών των περιορισμών, αναπτύχθηκαν διαδοχικά πέντε γενιές CAR-T κυττάρων, καθεμία από τις οποίες ενσωματώνει επιπλέον λειτουργικά χαρακτηριστικά με στόχο τη βελτίωση της θεραπευτικής τους αποτελεσματικότητας. Συγκεκριμένα, η δεύτερη γενιά περιλαμβάνει ένα συνδεδεργτικό μόριο, όπως το CD28 ή το 4-1BB, ενισχύοντας σημαντικά την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την επιμονή των CAR-T κυττάρων (241,242). Η τρίτη γενιά ενσωματώνει δύο συνδεδεργτικά μόρια, επιδιώκοντας περαιτέρω ενίσχυση της αντικαρκινικής τους δράσης. Στην τέταρτη γενιά προστέθηκε η δυνατότητα έκκρισης ανοσοδιεγερτικών κυτταροκινών, όπως οι IL-7, IL-12, IL-18 και IL-21, οι οποίες ενισχύουν την λειτουργία των CAR-T κυττάρων και τροποποιούν το μικροπεριβάλλον του όγκου προς όφελος της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης. Τέλος, η πέμπτη γενιά σχεδιάστηκε ώστε να ενεργοποιεί επιπλέον ενδοκυτταριες οδούς σηματοδότησης, όπως την οδό IL-2R/JAK/STAT, προάγοντας τον σχηματισμό T κυττάρων μνήμης και παρατείνοντας την διάρκεια της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης (Εικ. 5.4) (243).



Εικ.5.4. Δομική εξέλιξη των CAR T κυττάρων από την πρώτη έως την πέμπτη γενιά, με διαδοχική προσθήκη συνδιεγερτικών μορίων, κυτταροκινών και σηματοδοτικών στοιχείων που ενισχύουν την θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα (238).

Η εντυπωσιακή αποτελεσματικότητα της θεραπείας με CAR-T κύτταρα στις αιματολογικές κακοήθειες έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στην εντατική διερεύνηση της εφαρμογής της και στους συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένων των νεοπλασμάτων του ουροποιητικού συστήματος. Η παρουσία ειδικών αντιγόνων στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων καθιστά εφικτή την ανάπτυξη CAR-T κυττάρων που στοχεύουν επιλεκτικά τους όγκους αυτούς, προσφέροντας μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, τον καρκίνο του προστάτη και τον ουροθηλιακό καρκίνο (237,238).

Ειδικότερα, στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως η εφαρμογή της θεραπείας με CAR-T παραμένει σε ερευνητικό στάδιο, με τις πρόσφατες μελέτες να επικεντρώνονται στην ταυτοποίηση κατάλληλων στόχων και στην ενίσχυση της αντικαρκινικής τους δράσης. Σε αυτό το πλαίσιο, οι Chang *et al.* ανέπτυξαν CAR-T κύτταρα δεύτερης γενιάς που στοχεύουν την NECTIN-4, μια πρωτεΐνη που όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπερεκφράζεται στον ουροθηλιακό καρκίνο. Τα τροποποιημένα T κύτταρα επέδειξαν ισχυρή και στοχευμένη κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων με υψηλή έκφραση της NECTIN-4. Αξιοσημείωτο εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι τα NECTIN-4 CAR-T κύτταρα διατήρησαν την αντικαρκινική τους δράση ακόμη και έναντι όγκων ανθεκτικών στο enfortumab vedotin,

υπογραμμίζοντας την δυνητική τους αξία ως καινοτόμου θεραπευτικής προσέγγισης για τον προχωρημένο ουροθηλιακό καρκίνο (244).

Παράλληλα, οι Parriott *et al.* ανέπτυξαν τροποποιημένα T-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν έναν χιμαιρικό υποδοχέα PD-1/DAP10/CD3ζ, ο οποίος μετατρέπει το ανασταλτικό σήμα του PD-1 σε ενεργοποιητικό σήμα για τα T κύτταρα. Σε προκλινικά μοντέλα συμπαγών όγκων σε ποντίκια, τα τροποποιημένα αυτά κύτταρα οδήγησαν σε σημαντική μείωση του όγκου, υποδεικνύοντας ενισχυμένη αντικαρκινική δράση (245).

Παρά τις σημαντικές προόδους, η εφαρμογή της θεραπείας με CAR-T κύτταρα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως εξακολουθεί να αντιμετωπίζει σημαντικές προκλήσεις, όπως η ανοσοκαταστολή του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, η αντιγονική ετερογένεια και οι θεραπευτικές τοξικότητες. Η συνεχής εξέλιξη των τεχνολογιών CAR-T αναμένεται να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα και να ενισχύσει τη μελλοντική κλινική αξιοποίησή τους (237,238).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως αποτελεί μια από τις συχνότερες κακοήθειες του ουροποιητικού συστήματος, με αυξανόμενη παγκόσμια επίπτωση και σημαντική θνησιμότητα, επηρεάζοντας κυρίως τον ανδρικό πληθυσμό. Αποτελεί μια ετερογενή κακοήθεια με σημαντική κλινική και μοριακή πολυπλοκότητα, η οποία αντικατοπτρίζεται τόσο στη βιολογική συμπεριφορά όσο και στην ετερογενή θεραπευτική απόκριση. Οι γενετικές και επιγενετικές διαταραχές που χαρακτηρίζουν την νόσο επηρεάζουν κρίσιμα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως τα Ras–MAPK και PI3K–AKT–mTOR, καθώς και μηχανισμούς του κυτταρικού κύκλου και της γονιδιωματικής σταθερότητας. Η διαφοροποίηση μεταξύ μη μυοδιηθητικών και μυοδιηθητικών όγκων συνδέεται άμεσα με το μοριακό τους προφίλ, με τους πρώτους να χαρακτηρίζονται συχνότερα από ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα γονίδια *FGFR3*, *HRAS* και *PIK3CA* και τους δεύτερους από απώλεια των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *TP53* και *RB1*.

Η ανάγκη για τον προσδιορισμό μοριακών διαγνωστικών δεικτών με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, οι οποίοι να επιτρέπουν την έγκαιρη ανίχνευση των ουροθηλιακών όγκων με μη επεμβατικό τρόπο, καθίσταται ολοένα και πιο επιτακτική. Προς την κατεύθυνση αυτή έχουν αναπτυχθεί και διατίθενται ήδη εμπορικά διάφορες δοκιμασίες ανίχνευσης βιοδεικτών στα ούρα, όπως οι BTA, NMP22, UroVysion και Xpert BC Monitor. Παρότι οι μέθοδοι αυτές παρουσιάζουν σε αρκετές περιπτώσεις υψηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με την κυτταρολογική εξέταση ούρων, η περιορισμένη ειδικότητά τους, το αυξημένο κόστος και η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων δεν έχουν επιτρέψει μέχρι σήμερα την πλήρη αντικατάσταση της κυστεοσκόπησης στην κλινική πράξη. Παράλληλα, η πρόοδος της μοριακής βιολογίας και των τεχνολογιών υψηλής απόδοσης έχει οδηγήσει στην ανάδειξη νέων υποσχόμενων βιοδεικτών, όπως το ctDNA, τα miRNAs, τα lncRNAs, τα εξωκυτταρικά κυστίδια και οι επιγενετικές μεταβολές, οι οποίοι εμφανίζουν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την επικύρωση της διαγνωστικής και προγνωστικής τους αξίας, ώστε να ενσωματωθούν με ασφάλεια και αξιοπιστία στην καθημερινή κλινική πρακτική.

Παράλληλα, η θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως έχει μεταβληθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, μεταβαίνοντας από τις συμβατικές

θεραπευτικές προσεγγίσεις προς πιο στοχευμένες και ανοσολογικά κατευθυνόμενες στρατηγικές. Οι αναστολείς των ανοσολογικών σημείων ελέγχου (ICIs) έχουν πλέον καθιερωθεί ως βασικός πυλώνας της θεραπείας του προχωρημένου και μεταστατικού ουροθηλιακού καρκίνου. Οι αναστολείς του PD-1, όπως το pembrolizumab και το nivolumab, καθώς και οι αναστολείς του PD-L1, όπως τα atezolizumab, avelumab και durvalumab, αποκαθιστούν την αντικαρκινική δράση των T-λεμφοκυττάρων μέσω της άρσης της ανοσοκαταστολής που προκαλεί ο όγκος. Επιπλέον, οι αναστολείς του CTLA-4, με κύριο εκπρόσωπο το ipilimumab, αξιολογούνται κυρίως σε συνδυασμό με αναστολείς του άξονα PD-1/PD-L1, με στόχο την ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης.

Επιπρόσθετα, η θεραπευτική στόχευση των miRNAs και των lncRNAs αναδεικνύεται ως μία από τις πλέον υποσχόμενες στρατηγικές για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Χαρακτηριστικά, η επανέκφραση των miR-125b και miR-34a έχει συσχετιστεί με αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αύξηση της ευαισθησίας στη σισπλατίνη, ενώ η καταστολή του lncRNA HOTAIR έχει αποδειχθεί ότι περιορίζει την διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, ζητήματα όπως η τοξικότητα, η ανοσογονικότητα και οι μη στοχευμένες επιδράσεις εξακολουθούν να περιορίζουν την ευρεία κλινική εφαρμογή των RNA-βασισμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Η έρευνα εστιάζει ολοένα και περισσότερο σε συνδυαστικές θεραπευτικές στρατηγικές, όπως ο συνδυασμός διαφορετικών ανοσοθεραπευτικών παραγόντων ή η συγχορήγησή τους με χημειοθεραπεία και στοχευμένες θεραπείες, επιδιώκοντας την βελτίωση της αποτελεσματικότητας και την υπέρβαση των μηχανισμών αντίστασης. Σημαντική θέση στο σύγχρονο θεραπευτικό τοπίο κατέχουν και τα εγκεκριμένα από τον FDA ADCs, όπως το enfortumab vedotin και το sacituzumab govitecan, τα οποία αξιοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα για την στοχευμένη μεταφορά κυτταροτοξικών παραγόντων στα καρκινικά κύτταρα και έχουν αποδείξει σημαντικό κλινικό όφελος σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι στοχευμένες θεραπείες έναντι συγκεκριμένων μοριακών στόχων. Οι αναστολείς της οικογένειας των υποδοχέων EGFR/HER, όπως το lapatinib και το afatinib, έχουν αξιολογηθεί σε ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα, εμφανίζοντας μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε όγκους που φέρουν μεταλλάξεις ή υπερέκφραση των γονιδίων HER2 (ERBB2) και HER3. Παράλληλα, η αναστολή της αγγειογένεσης μέσω του άξονα VEGF/VEGFR, με παράγοντες όπως το bevacizumab και το ramucirumab, έχει διερευνηθεί κυρίως σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία ή ανοσοθεραπεία, με στόχο τον περιορισμό της

νεοαγγείωσης και την ενίσχυση της αντικαρκινικής δράσης. Ωστόσο, τα μέχρι σήμερα αποτελέσματα παραμένουν περιορισμένα και δεν έχουν οδηγήσει σε ευρεία εφαρμογή των συγκεκριμένων παραγόντων στην καθημερινή κλινική πρακτική.

Μία ακόμη καινοτόμος θεραπευτική προσέγγιση αποτελεί η κυτταρική ανοσοθεραπεία με γενετικά τροποποιημένα CAR-T λεμφοκύτταρα, η οποία έχει ήδη επιφέρει σημαντικά θεραπευτικά αποτελέσματα στις αιματολογικές κακοήθειες και διερευνάται πλέον και στον ουροθηλιακό καρκίνο. Παρότι τα μέχρι σήμερα προκλινικά και πρώιμα κλινικά δεδομένα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, η εφαρμογή της στους συμπαγείς όγκους εξακολουθεί να περιορίζεται από την έντονη ετερογένεια των καρκινικών αντιγόνων, την δυσχερή διείσδυση των T-λεμφοκυττάρων στον όγκο, το ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον, καθώς και από πιθανές σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως το σύνδρομο απελευθέρωσης κυτταροκινών και η νευροτοξικότητα. Η ανάπτυξη νέας γενιάς CAR-T κυττάρων και ο συνδυασμός τους με άλλες ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις αναμένεται να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητά τους στο μέλλον.

Συμπερασματικά, η ολοένα αυξανόμενη κατανόηση της μοριακής και ανοσολογικής βιολογίας του ουροθηλιακού καρκίνου σηματοδοτεί μια νέα εποχή στην διαχείριση της νόσου. Η στενή σύνδεση της βασικής έρευνας με την κλινική εφαρμογή αναμένεται να επιταχύνει την ανάπτυξη καινοτόμων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων, με απώτερο στόχο την παροχή πιο αποτελεσματικής, ασφαλούς και εξατομικευμένης φροντίδας στους ασθενείς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αναγνώστου, Θ. Γ., & ΜΔ, Μ. (2006). Ανατομία του Ουροποιογεννητικού Συστήματος. Σε: *Μελέκος ΜΔ.(ed). Σύγχρονη Ουρολογία. Αθήνα, Ιατρικές εκδόσεις ΠΧ. Πασχαλίδης*, 18-22.
2. Sellers, D., Chess-Williams, R., & Michel, M. C. (2018). Modulation of lower urinary tract smooth muscle contraction and relaxation by the urothelium. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 391(7), 675-694.
3. Shermadou, E. S., Rahman, S., & Leslie, S. W. (2018). Anatomy, abdomen and pelvis, bladder.
4. Andersson, K. E., & Arner, A. (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 84(3), 935-986.
5. Bolla, S. R., Odeluga, N., & Jetty, R. (2019). Histology, bladder.
6. Dalghi, M. G., Montalbetti, N., Carattino, M. D., & Apodaca, G. (2020). The urothelium: life in a liquid environment. *Physiological reviews*, 100(4), 1621-1705.
7. Andersson, K. E., & McCloskey, K. D. (2014). Lamina propria: the functional center of the bladder?. *Neurourology and urodynamics*, 33(1), 9-16.
8. Drumm, B. T., Koh, S. D., Andersson, K. E., & Ward, S. M. (2014). Calcium signalling in Cajal-like interstitial cells of the lower urinary tract. *Nature reviews Urology*, 11(10), 555-564.
9. Khandelwal, P., Abraham, S. N., & Apodaca, G. (2009). Cell biology and physiology of the uroepithelium. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 297(6), F1477-F1501.
10. Leslie, S. W., Sajjad, H., & Murphy, P. B. (2025). Bladder stones. In *StatPearls [internet]*. StatPearls Publishing.
11. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology*, 13(5), 269-284.
12. Shin, J. H., Lim, J. S., & Jeon, B. H. (2018). Pathophysiology of bladder cancer. In *Bladder Cancer* (pp. 33-41). Academic Press.
13. Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., Padala, S. A., & Barsouk, A. (2020). Epidemiology of bladder cancer. *Medical sciences*, 8(1), 15.
14. https://worldbladdercancer.org/news_events/globocan-2022-bladder-cancer-is-the-9th-most-commonly-diagnosed-worldwide/
15. https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/30-bladder-fact-sheet.pdf?utm_source=chatgpt.com

16. Zhang, Y., Rungay, H., Li, M., Yu, H., Pan, H., & Ni, J. (2023). The global landscape of bladder cancer incidence and mortality in 2020 and projections to 2040. *Journal of global health*, 13, 04109.
17. https://worldbladdercancer.org/news_events/globocan-2020-bladder-cancer-10th-most-commonly-diagnosed-worldwide/?utm_source=chatgpt.com
18. https://www.wcrf.org/preventing-cancer/cancer-statistics/bladder-cancer-statistics/?utm_source=chatgpt.com
19. www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2025/02/eu-country-cancer-profile-greece-2025_a45fb957/22087cfa-en.pdf?utm_source=chatgpt.com
20. Freedman, N. D., Silverman, D. T., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., & Abnet, C. C. (2011). Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *Jama*, 306(7), 737-745.
21. Rink, M., Crivelli, J. J., Shariat, S. F., Chun, F. K., Messing, E. M., & Soloway, M. S. (2015). Smoking and bladder cancer: a systematic review of risk and outcomes. *European urology focus*, 1(1), 17-27.
22. Ng, K. L. (2022). The etiology of renal cell carcinoma and upper tract urothelial carcinoma.
23. Hoffmann, D., Hoffmann, I., & El-Bayoumy, K. (2001). The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical research in toxicology*, 14(7), 767-790.
24. Yan, H., Ying, Y., Xie, H., Li, J., Wang, X., He, L., ... & Zheng, X. (2018). Secondhand smoking increases bladder cancer risk in nonsmoking population: a meta-analysis. *Cancer management and research*, 3781-3791.
25. Burger, M., Catto, J. W., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Herr, H., Karakiewicz, P., ... & Lotan, Y. (2013). Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European urology*, 63(2), 234-241.
26. Meliker, J. R., & Nriagu, J. O. (2007). Arsenic in drinking water and bladder cancer: review of epidemiological evidence. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, 9, 551-584.
27. Lobo, N., Afferi, L., Moschini, M., Mostafid, H., Porten, S., Psutka, S. P., ... & Lotan, Y. (2022). Epidemiology, screening, and prevention of bladder cancer. *European urology oncology*, 5(6), 628-639.
28. Singh, N., Baby, D., Prasad Rajguru Jagadish, P. P. B., & Thakkannavar Savita, S. (2019). Bhojaraj Pujari Veena. *Inflammation and Cancer. Ann Afr Med*, 18(3), 121-126.

29. Bertram, J. S., & Craig, A. W. (1972). Specific induction of bladder cancer in mice by butyl-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and the effects of hormonal modifications on the sex difference in response. *European Journal of Cancer* (1965), 8(6), 587-594.
30. Mostafa, M. H., Sheweita, S. A., & O'Connor, P. (1999). Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 97-111.
31. Chou, W. H., McGregor, B., Schmidt, A., Carvalho, F. L., Hirsch, M. S., Chang, S. L., ... & Mossanen, M. (2021, October). Cyclophosphamide-associated bladder cancers and considerations for survivorship care: A systematic review. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 39, No. 10, pp. 678-685). Elsevier.
32. Groah, S. L., Weitzenkamp, D. A., Lammertse, D. P., Whiteneck, G. G., Lezotte, D. C., & Hamman, R. F. (2002). Excess risk of bladder cancer in spinal cord injury: evidence for an association between indwelling catheter use and bladder cancer. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 83(3), 346-351.
33. Mushtaq, J., Thurairaja, R., & Nair, R. (2019). Bladder cancer. *Surgery (Oxford)*, 37(9), 529-537.
34. Wang, G., & McKenney, J. K. (2019). Urinary bladder pathology: world health organization classification and American joint committee on cancer staging update. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 143(5), 571-577.
35. Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M., & Reuter, V. E. (2016). The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part B: prostate and bladder tumours. *European urology*, 70(1), 106-119.
36. Sanli, O., Dobruch, J., Knowles, M. A., Burger, M., Alemozaffar, M., Nielsen, M. E., & Lotan, Y. (2017). Bladder cancer. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-19.
37. Babjuk, M., Burger, M., Capoun, O., Cohen, D., Compérat, E. M., Escrig, J. L. D., ... & Sylvester, R. J. (2022). European Association of Urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1, and carcinoma in situ). *European urology*, 81(1), 75-94.
38. Magers, M. J., Lopez-Beltran, A., Montironi, R., Williamson, S. R., Kaimakliotis, H. Z., & Cheng, L. (2019). Staging of bladder cancer. *Histopathology*, 74(1), 112-134.
39. Andersson, K. E. (2015). Purinergic signalling in the urinary bladder. *Autonomic Neuroscience*, 191, 78-81.
40. Martin, J. W., Carballido, E. M., Ahmed, A., Farhan, B., Dutta, R., Smith, C., & Youssef, R. F. (2016). Squamous cell carcinoma of the urinary bladder: Systematic review of clinical characteristics and therapeutic approaches. *Arab journal of urology*, 14(3), 183-191.

41. Yu, E. M., Belay, S., Li, W., & Aragon-Ching, J. B. (2022). Non-urothelial and urothelial variants of bladder cancer. *Cancer Treatment and Research Communications*, 33, 100661.
42. Nath, V., & Baliga, M. (2016). Urinary bladder adenocarcinoma metastatic to the abdominal wall: report of a case with cytohistologic correlation. *Case Reports in Pathology*, 2016(1), 8608412.
43. Zhao, X., & Flynn, E. A. (2012). Small cell carcinoma of the urinary bladder: a rare, aggressive neuroendocrine malignancy. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 136(11), 1451-1459.
44. <https://karagiannisathanasios.gr/tupos-karkinou/genika-stoicheia-gia-ton-karkino-tis-oyrodochoy-kystis/>
45. Sylvester, R. J., van der Meijden, A., Witjes, J. A., Jakse, G., Nonomura, N., Cheng, C., ... & Kurth, K. H. (2005). High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology*, 66(6), 90-107.
46. Prasad, S. M., DeCastro, G. J., & Steinberg, G. D. (2011). Urothelial carcinoma of the bladder: definition, treatment and future efforts. *Nature Reviews Urology*, 8(11), 631-642.
47. Lenis, A. T., Lec, P. M., Chamie, K., & Mshs, M. D. (2020). Bladder cancer: a review. *Jama*, 324(19), 1980-1991.
48. Soukup, V., Čapoun, O., Cohen, D., Hernandez, V., Babjuk, M., Burger, M., ... & Zigeuner, R. (2017). Prognostic performance and reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization grading classification systems in non-muscle-invasive bladder cancer: a European Association of Urology Non-muscle Invasive Bladder Cancer Guidelines Panel systematic review. *European urology*, 72(5), 801-813.
49. Mostofi, F. K. (1973). Histological typing of urinary bladder tumors. *International histological classification of tumors*, 10, 15-34.
50. Babjuk, M., Böhle, A., Burger, M., Capoun, O., Cohen, D., Compérat, E. M., ... & Zigeuner, R. (2017). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016. *European urology*, 71(3), 447-461.
51. Readal, N., & Epstein, J. I. (2010). Papillary urothelial hyperplasia: relationship to urothelial neoplasms. *Pathology*, 42(4), 360-363.
52. DeGEORGE, K. C., Holt, H. R., & Hodges, S. C. (2017). Bladder cancer: diagnosis and treatment. *American family physician*, 96(8), 507-514.
53. Davis, R., Jones, J. S., Barocas, D. A., Castle, E. P., Lang, E. K., Leveillee, R. J., ... & Weitzel, W. (2012). Diagnosis, evaluation and follow-up of asymptomatic

- microhematuria (AMH) in adults: AUA guideline. *The Journal of urology*, 188(6S), 2473-2481.
54. Hall, M. C., Chang, S. S., Dalbagni, G., Pruthi, R. S., Seigne, J. D., Skinner, E. C., ... & Schellhammer, P. F. (2007). Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *The Journal of urology*, 178(6), 2314-2330.
55. Puneet, A., Balagopal, N., Ginil, K., Georgie, M., Sanjeevan, K. V., & Appu, T. (2017). Correlation of transabdominal ultrasonography and cystoscopy in follow-up of patients with non-muscle invasive bladder cancer. *Indian Journal of Surgical Oncology*, 8(4), 548-553.
56. Allard, Bernard, Fradet, & Têtu. (1998). The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer: a proposed prognostic index. *British journal of urology*, 81(5), 692-698.
57. Guerrero-Ramos, F., Subiela, J. D., Rodriguez-Faba, O., Aumatell, J., Manfredi, C., Bozzini, G., ... & Couñago, F. (2022). Predicting recurrence and progression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer: systematic review on the performance of risk stratification models. *Bladder Cancer*, 8(4), 339-357.
58. Kurth, K. H., Denis, L., Bouffieux, C. H., Sylvester, R., Debruyne, F. M. J., Pavone-Macaluso, M., & Oosterlinck, W. (1995). Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder tumours. *European Journal of Cancer*, 31(11), 1840-1846.
59. Sylvester, R. J., Van Der Meijden, A. P., Oosterlinck, W., Witjes, J. A., Bouffieux, C., Denis, L., ... & Kurth, K. (2006). Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *European urology*, 49(3), 466-477.
60. Masood, S., Sriprasad, S., Palmer, J. H., & Mufti, G. R. (2003). T1G3 bladder cancer—indications for early cystectomy. *International urology and nephrology*, 36(1), 41-44.
61. Divrik, R. T., Sahin, A. F., Yildirim, Ü., Altok, M. & Zorlu, F. Impact of routine second transurethral resection on the long-term outcome of patients with newly diagnosed pT1 urothelial carcinoma with respect to recurrence, progression rate, and disease-specific survival: a prospective randomised clinical trial. *Eur. Urol.* **58**, 185–190 (2010).
62. Pettenati, C., & Ingersoll, M. A. (2018). Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer. *Nature reviews urology*, 15(10), 615-625.
63. Messing, E. M., Tangen, C. M., Lerner, S. P., Sahasrabudhe, D. M., Koppie, T. M., Wood Jr, D. P., ... & Thompson Jr, I. M. (2018). Effect of intravesical instillation of gemcitabine vs saline immediately following resection of suspected low-grade non-muscle-invasive bladder cancer on tumor recurrence: SWOG S0337 randomized clinical trial. *Jama*, 319(18), 1880-1888.

64. Witjes, J. A., Lebre, T., Compérat, E. M., Cowan, N. C., De Santis, M., Bruins, H. M., ... & Ribal, M. J. (2017). Updated 2016 EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *European urology*, 71(3), 462-475.
65. Clark, P. E. (2013). National comprehensive cancer network (NCCN). Bladder cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 11, 446.
66. Chang, S. S., Bochner, B. H., Chou, R., Dreicer, R., Kamat, A. M., Lerner, S. P., ... & Holzbeierlein, J. M. (2017). Treatment of non-metastatic muscle-invasive bladder cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO guideline. *The Journal of urology*, 198(3), 552-559.
67. Dogliotti, L., Carteni, G., Siena, S., Bertetto, O., Martoni, A., Bono, A., ... & Marini, L. (2007). Gemcitabine plus cisplatin versus gemcitabine plus carboplatin as first-line chemotherapy in advanced transitional cell carcinoma of the urothelium: results of a randomized phase 2 trial. *European urology*, 52(1), 134-141.
68. van Oers, J. M., Adam, C., Denzinger, S., Stoehr, R., Bertz, S., Zaak, D., ... & Hartmann, A. (2006). Chromosome 9 deletions are more frequent than FGFR3 mutations in flat urothelial hyperplasias of the bladder. *International journal of cancer*, 119(5), 1212-1215.
69. Sjödaahl, G., Lauss, M., Gudjonsson, S., Liedberg, F., Halldén, C., Chebil, G., ... & Lindgren, D. (2011). A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1. *PloS one*, 6(4), e18583.
70. Netto, G. J. (2012). Molecular biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder: are we there yet?. *Nature Reviews Urology*, 9(1), 41-51.
71. Cancer Genome Atlas Research Network. (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507(7492), 315.
72. di Martino, E., L'hôte, C. G., Kennedy, W., Tomlinson, D. C., & Knowles, M. A. (2009). Mutant fibroblast growth factor receptor 3 induces intracellular signaling and cellular transformation in a cell type-and mutation-specific manner. *Oncogene*, 28(48), 4306-4316.
73. Williams, S. V., Hurst, C. D., & Knowles, M. A. (2013). Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Human molecular genetics*, 22(4), 795-803.
74. Worst, T. S., Weis, C. A., Stöhr, R., Bertz, S., Eckstein, M., Otto, W., ... & Erben, P. (2018). CDKN2A as transcriptomic marker for muscle-invasive bladder cancer risk stratification and therapy decision-making. *Scientific reports*, 8(1), 14383.
75. Hurst, C. D., Platt, F. M., Taylor, C. F., & Knowles, M. A. (2012). Novel tumor subgroups of urothelial carcinoma of the bladder defined by integrated genomic analysis. *Clinical Cancer Research*, 18(21), 5865-5877.
76. Stańkowska, W., Sarkisyan, D., Bruhn-Olszewska, B., Duzowska, K., Bieńkowski, M., Jąkałski, M., ... & Dumanski, J. P. (2024). Tumor predisposing post-zygotic

- chromosomal alterations in bladder cancer—insights from histologically normal urothelium. *Cancers*, 16(5), 961.
77. Kamat, A. M., Hahn, N. M., Efstathiou, J. A., Lerner, S. P., Malmström, P. U., Choi, W., ... & Kassouf, W. (2016). Bladder cancer. *The Lancet*, 388(10061), 2796-2810.
78. Mo, L., Zheng, X., Huang, H. Y., Shapiro, E., Lepor, H., Cordon-Cardo, C., ... & Wu, X. R. (2007). Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation*, 117(2), 314-325.
79. Mitra, A. P., Datar, R. H., & Cote, R. J. (2006). Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *Journal of Clinical Oncology*, 24(35), 5552-5564.
80. Ws, E. D. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817-825.
81. Schmitz-Dräger, B. J., Goebell, P. J., Ebert, T., & Fradet, Y. (2000). p53 immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer: Playground for urology scientists?. *European urology*, 38(6), 691-700.
82. Kawamoto, K., Enokida, H., Gotanda, T., Kubo, H., Nishiyama, K., Kawahara, M., & Nakagawa, M. (2006). p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 339(3), 790-796.
83. Chatterjee, S. J., George, B., Goebell, P. J., Alavi-Tafreshi, M., Shi, S. R., Fung, Y. K., ... & Cote, R. J. (2004). Hyperphosphorylation of pRb: a mechanism for RB tumour suppressor pathway inactivation in bladder cancer. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 203(3), 762-770.
84. Xu, H. J., Cairns, P., Hu, S. X., Knowles, M. A., & Benedict, W. F. (1993). Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *International journal of cancer*, 53(5), 781-784.
85. Oxford, G., & Theodorescu, D. (2003). The role of Ras superfamily proteins in bladder cancer progression. *The Journal of urology*, 170(5), 1987-1993.
86. Lee, M. G., Kim, H. Y., Byun, D. S., Lee, S. J., Lee, C. H., Kim, J. I., ... & Chi, S. G. (2001). Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma. *Cancer research*, 61(18), 6688-6692.
87. Bogale, D. E. (2024). The roles of FGFR3 and c-MYC in urothelial bladder cancer. *Discover Oncology*, 15(1), 295.
88. Fong, M. H. Y., Feng, M., McConkey, D. J., & Choi, W. (2020). Update on bladder cancer molecular subtypes. *Translational andrology and urology*, 9(6), 2881.

89. Sjö Dahl, G., Lauss, M., Lövgren, K., Chebil, G., Gudjonsson, S., Veerla, S., ... & Höglund, M. (2012). A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clinical cancer research*, 18(12), 3377-3386.
90. Damrauer, J. S., Hoadley, K. A., Chism, D. D., Fan, C., Tiganelli, C. J., Wobker, S. E., ... & Kim, W. Y. (2014). Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proceedings of the national academy of sciences*, 111(8), 3110-3115.
91. Choi, W., Porten, S., Kim, S., Willis, D., Plimack, E. R., Hoffman-Censits, J., ... & McConkey, D. J. (2014). Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer cell*, 25(2), 152-165.
92. Robertson, A. G., Kim, J., Al-Ahmadie, H., Bellmunt, J., Guo, G., Cherniack, A. D., ... & Tam, A. (2017). Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer. *Cell*, 171(3), 540-556.
93. Kamoun, A., de Reynies, A., Allory, Y., Sjö Dahl, G., Robertson, A. G., Seiler, R., ... & Weinstein, J. (2020). A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *European urology*, 77(4), 420-433.
94. Schmitz-Dräger, B. J., Droller, M., Lokeshwar, V. B., Lotan, Y., Hudson, M. L. A., Van Rhijn, B. W., ... & Shariat, S. F. (2015). Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus. *Urologia internationalis*, 94(1), 1-24.
95. Soria, F., Krabbe, L. M., Todenhöfer, T., Dobruch, J., Mitra, A. P., Inman, B. A., ... & Shariat, S. F. (2019). Molecular markers in bladder cancer. *World journal of urology*, 37(1), 31-40.
96. Σκορίλας, Α. (2020). Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική, βασικές αρχές και σύγχρονες προσεγγίσεις. Αθήνα. *Βασικές αρχές και σύγχρονες προσεγγίσεις (Clinical Biochemistry and Molecular Diagnostics: Basic Principles and Modern Approaches)*. Πασχαλίδης.
97. Tomiyama, E., Fujita, K., Hashimoto, M., Uemura, H., & Nonomura, N. (2024). Urinary markers for bladder cancer diagnosis: A review of current status and future challenges. *International Journal of Urology*, 31(3), 208-219.
98. Charpentier, M., Gutierrez, C., Guillaudeux, T., Verhoest, G., & Pedeut, R. (2021). Noninvasive urine-based tests to diagnose or detect recurrence of bladder cancer. *Cancers*, 13(7), 1650.
99. Tilki, D., Burger, M., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Hakenberg, O. W., Palou, J., ... & Zlotta, A. R. (2011). Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *European urology*, 60(3), 484-492.

100. Schmitz-Dräger, B. J., Droller, M., Lokeshwar, V. B., Lotan, Y., Hudson, M. L. A., Van Rhijn, B. W., ... & Shariat, S. F. (2015). Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus. *Urologia internationalis*, 94(1), 1-24.
101. Margulis, V., Lotan, Y., & Shariat, S. F. (2008). Survivin: a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer. *World journal of urology*, 26(1), 59-65.
102. Schultz, I. J., Kiemeny, L. A., Karthaus, H. F., Witjes, J. A., Willems, J. L., Swinkels, D. W., ... & de Kok, J. B. (2004). Survivin mRNA copy number in bladder washings predicts tumor recurrence in patients with superficial urothelial cell carcinomas. *Clinical chemistry*, 50(8), 1425-1428.
103. Shang, D., Liu, Y., Xu, X., Chen, Z., & Wang, D. (2021). Diagnostic value comparison of CellDetect, fluorescent in situ hybridization (FISH), and cytology in urothelial carcinoma. *Cancer Cell International*, 21(1), 465.
104. Dudley, J. C., Schroers-Martin, J., Lazzareschi, D. V., Shi, W. Y., Chen, S. B., Esfahani, M. S., ... & Diehn, M. (2019). Detection and surveillance of bladder cancer using urine tumor DNA. *Cancer discovery*, 9(4), 500-509.
105. Eich, M. L., Rodriguez Pena, M. D. C., Springer, S. U., Taheri, D., Tregnago, A. C., Salles, D. C., ... & Netto, G. J. (2019). Incidence and distribution of UroSEEK gene panel in a multi-institutional cohort of bladder urothelial carcinoma. *Modern Pathology*, 32(10), 1544-1550.
106. Rodriguez Pena, M. D. C., Springer, S. U., Taheri, D., Li, L., Tregnago, A. C., Eich, M. L., ... & Netto, G. J. (2020). Performance of novel non-invasive urine assay UroSEEK in cohorts of equivocal urine cytology. *Virchows Archiv*, 476(3), 423-429.
107. Lopez-Beltran, A., Cheng, L., Gevaert, T., Blanca, A., Cimadamore, A., Santoni, M., ... & Montironi, R. (2020). Current and emerging bladder cancer biomarkers with an emphasis on urine biomarkers. *Expert review of molecular diagnostics*, 20(2), 231-243.
108. Avogbe, P. H., Manel, A., Vian, E., Durand, G., Forey, N., Voegelé, C., ... & Le Calvez-Kelm, F. (2019). Urinary TERT promoter mutations as non-invasive biomarkers for the comprehensive detection of urothelial cancer. *EBioMedicine*, 44, 431-438.
109. Hosen, M. I., Forey, N., Durand, G., Voegelé, C., Bilici, S., Avogbe, P. H., ... & Zvereva, M. (2020). Development of sensitive droplet digital PCR assays for detecting urinary TERT promoter mutations as non-invasive biomarkers for detection of urothelial cancer. *Cancers*, 12(12), 3541.
110. Hurst, C. D., Platt, F. M., & Knowles, M. A. (2013). Comprehensive mutation analysis of the TERT promoter in bladder cancer and detection of mutations in voided urine. *European urology*, 65(2), 367-369.

111. Jebar, A. H., Hurst, C. D., Tomlinson, D. C., Johnston, C., Taylor, C. F., & Knowles, M. A. (2005). FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene*, 24(33), 5218-5225.
112. Sieverink, C. A., Batista, R. P., Prazeres, H. J., Vinagre, J., Sampaio, C., Leao, R. R., ... & Soares, P. (2020). Clinical validation of a urine test (Uromonitor-V2®) for the surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer patients. *Diagnostics*, 10(10), 745.
113. Batista, R., Vinagre, J., Prazeres, H., Sampaio, C., Peralta, P., Conceição, P., ... & Soares, P. (2019). Validation of a novel, sensitive, and specific urine-based test for recurrence surveillance of patients with non-muscle-invasive bladder cancer in a comprehensive multicenter study. *Frontiers in genetics*, 10, 1237.
114. Roperch, J. P., & Hennion, C. (2020). A novel ultra-sensitive method for the detection of FGFR3 mutations in urine of bladder cancer patients—design of the Urodiag® PCR kit for surveillance of patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC). *BMC Medical Genetics*, 21(1), 112.
115. Mancini, M., Righetto, M., Zumerle, S., Montopoli, M., & Zattoni, F. (2020). The bladder EpiCheck test as a non-invasive tool based on the identification of DNA methylation in bladder cancer cells in the urine: a review of published evidence. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6542.
116. Trenti, E., D'Elia, C., Mian, C., Schwienbacher, C., Hanspeter, E., Pycha, A., ... & Pycha, A. (2019). Diagnostic predictive value of the Bladder EpiCheck test in the follow-up of patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *Cancer cytopathology*, 127(7), 465-469.
117. Qin, Z., Ljubimov, V. A., Zhou, C., Tong, Y., & Liang, J. (2016). Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chinese journal of cancer*, 35(1), 36.
118. van Kessel, K. E., de Jong, J. J., Ziel-van der Made, A. C., Roshani, H., Haensel, S. M., Wolterbeek, J. H., ... & Zwarthoff, E. C. (2020). A urine based genomic assay to triage patients with hematuria for cystoscopy. *The Journal of urology*, 204(1), 50-57.
119. Feber, A., Dhami, P., Dong, L., de Winter, P., Tan, W. S., Martínez-Fernández, M., ... & Kelly, J. D. (2017). UroMark—a urinary biomarker assay for the detection of bladder cancer. *Clinical epigenetics*, 9(1), 8.
120. Santoni, G., Morelli, M. B., Amantini, C., & Battelli, N. (2018). Urinary markers in bladder cancer: an update. *Frontiers in oncology*, 8, 362.
121. Cowan, B., Klein, E., Jansz, K., Westenfelder, K., Bradford, T., Peterson, C., ... & Lotan, Y. (2021). Longitudinal follow-up and performance validation of an mRNA-based urine test (Xpert® Bladder Cancer Monitor) for surveillance in patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU international*, 128(6), 713-721.
122. Harvey, J. C., Cambridge, L. M., Ellen, C. W., Colonval, M., Hazlett, J. A., Newell, J., ... & Guilford, P. J. (2024). Analytical validation of Cxbladder® Detect, Triage, and

- Monitor: assays for detection and management of urothelial carcinoma. *Diagnostics*, 14(18), 2061.
123. Santoni, G., Morelli, M. B., Amantini, C., & Battelli, N. (2018). Urinary markers in bladder cancer: an update. *Frontiers in oncology*, 8, 362.
 124. Sasaki, H., Yoshiike, M., Nozawa, S., Usuba, W., Katsuoka, Y., Aida, K., ... & Chikaraishi, T. (2016). Expression level of urinary microRNA-146a-5p is increased in patients with bladder cancer and decreased in those after transurethral resection. *Clinical genitourinary cancer*, 14(5), e493-e499.
 125. Fuessel, S., Lohse-Fischer, A., Vu Van, D., Salomo, K., Erdmann, K., & Wirth, M. P. (2017). Quantification of microRNAs in urine-derived specimens. In *Urothelial Carcinoma: Methods and Protocols* (pp. 201-226). New York, NY: Springer New York.
 126. Piao, X. M., Cha, E. J., Yun, S. J., & Kim, W. J. (2021). Role of exosomal miRNA in bladder cancer: a promising liquid biopsy biomarker. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1713.
 127. Avgeris, M., Mavridis, K., Tokas, T., Stravodimos, K., Fragoulis, E. G., & Scorilas, A. (2015). Uncovering the clinical utility of miR-143, miR-145 and miR-224 for predicting the survival of bladder cancer patients following treatment. *Carcinogenesis*, 36(5), 528-537.
 128. Chen, Y. H., Wang, S. Q., Wu, X. L., Shen, M., Chen, Z. G., Chen, X. G., ... & Tao, Z. H. (2013, February). Characterization of microRNAs expression profiling in one group of Chinese urothelial cell carcinoma identified by Solexa sequencing. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 31, No. 2, pp. 219-227). Elsevier.
 129. Pignot, G., Cizeron-Clairac, G., Vacher, S., Susini, A., Tozlu, S., Vieillefond, A., ... & Bieche, I. (2013). microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. *International journal of cancer*, 132(11), 2479-2491.
 130. Pardini, B., Cordero, F., Naccarati, A., Viberti, C., Birolo, G., Oderda, M., ... & Matullo, G. (2018). microRNA profiles in urine by next-generation sequencing can stratify bladder cancer subtypes. *Oncotarget*, 9(29), 20658.
 131. Kaytaz, M., Degirmenci, M. E., Kucukgergin, C., Aydin, A. F., Sanli, O., Erdem, S., ... & Dogru Abbasoglu, S. (2026). Expression of lncRNA-ATB and miR-200c in patients with bladder cancer: a pilot study. *Laboratory Medicine*, 57(3), lmag011.
 132. Mirzaei, S., Paskeh, M. D. A., Hashemi, F., Zabolian, A., Hashemi, M., Entezari, M., ... & Hushmandi, K. (2022). Long non-coding RNAs as new players in bladder cancer: Lessons from pre-clinical and clinical studies. *Life sciences*, 288, 119948.
 133. Zeuschner, P., Linxweiler, J., & Junker, K. (2020). Non-coding RNAs as biomarkers in liquid biopsies with a special emphasis on extracellular vesicles in urological malignancies. *Expert review of molecular diagnostics*, 20(2), 151-167.

134. Wang, Z., Wang, X., Zhang, D., Yu, Y., Cai, L., & Zhang, C. (2017). Long non-coding RNA urothelial carcinoma-associated 1 as a tumor biomarker for the diagnosis of urinary bladder cancer. *Tumor Biology*, 39(6), 1010428317709990.
135. Yang, C., Li, X., Wang, Y., Zhao, L., & Chen, W. (2012). Long non-coding RNA UCA1 regulated cell cycle distribution via CREB through PI3-K dependent pathway in bladder carcinoma cells. *Gene*, 496(1), 8-16.
136. Zhen, S., Hua, L., Liu, Y. H., Sun, X. M., Jiang, M. M., Chen, W., ... & Li, X. (2016). Inhibition of long non-coding RNA UCA1 by CRISPR/Cas9 attenuated malignant phenotypes of bladder cancer. *Oncotarget*, 8(6), 9634.
137. Wang, F., Li, X., Xie, X., Zhao, L., & Chen, W. (2008). UCA1, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion. *FEBS letters*, 582(13), 1919-1927.
138. Srivastava, A. K., Singh, P. K., Rath, S. K., Dalela, D., Goel, M. M., & Bhatt, M. L. B. (2014). Appraisal of diagnostic ability of UCA1 as a biomarker of carcinoma of the urinary bladder. *Tumor Biology*, 35(11), 11435-11442.
139. Zhan, Y., Du, L., Wang, L., Jiang, X., Zhang, S., Li, J., ... & Wang, C. (2018). Expression signatures of exosomal long non-coding RNAs in urine serve as novel non-invasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *Molecular Cancer*, 17(1), 142.
140. Yu, X., Wang, R., Han, C., Wang, Z., & Jin, X. (2020). A panel of urinary long non-coding RNAs differentiate bladder cancer from urocystitis. *Journal of Cancer*, 11(4), 781.
141. Du, L., Duan, W., Jiang, X., Zhao, L., Li, J., Wang, R., ... & Wang, C. (2018). Cell-free lncRNA expression signatures in urine serve as novel non-invasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(5), 2838-2845.
142. Xue, D., Zhou, C., Lu, H., Xu, R., Xu, X., & He, X. (2016). RETRACTED ARTICLE: LncRNA GAS5 inhibits proliferation and progression of prostate cancer by targeting miR-103 through AKT/mTOR signaling pathway. *Tumor Biology*, 37(12), 16187-16197.
143. Li, J., Huang, H., Li, Y., Li, L., Hou, W., & You, Z. (2016). Decreased expression of long non-coding RNA GAS5 promotes cell proliferation, migration and invasion, and indicates a poor prognosis in ovarian cancer. *Oncology Reports*, 36(6), 3241-3250.
144. Han, L., Ma, P., Liu, S. M., & Zhou, X. (2016). Circulating long noncoding RNA GAS5 as a potential biomarker in breast cancer for assessing the surgical effects. *Tumor Biology*, 37(5), 6847-6854.

145. van Rhijn, B. W., Lurkin, I., Kirkels, W. J., van der Kwast, T. H., & Zwarthoff, E. C. (2001). Microsatellite analysis—DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: A Phase II trial. *Cancer*, 92(4), 768-775.
146. van der Aa, M. N., Zwarthoff, E. C., Steyerberg, E. W., Boogaard, M. W., Nijsen, Y., van der Keur, K. A., ... & van der Kwast, T. H. (2009). Microsatellite analysis of voided-urine samples for surveillance of low-grade non-muscle-invasive urothelial carcinoma: feasibility and clinical utility in a prospective multicenter study (Cost-Effectiveness of Follow-Up of Urinary Bladder Cancer trial [CEFUB]). *European urology*, 55(3), 659-668.
147. Lee, J., McKinney, K. Q., Pavlopoulos, A. J., Niu, M., Kang, J. W., Oh, J. W., ... & Hwang, S. (2018). Altered proteome of extracellular vesicles derived from bladder cancer patients urine. *Molecules and cells*, 41(3), 179-187.
148. Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *science*, 367(6478), eaau6977
149. Yang, L., Wu, X. H., Wang, D., Luo, C. L., & Chen, L. X. (2013). Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. *Molecular medicine reports*, 8(4), 1272-1278.
150. Yan, T. H., Lu, S. W., Huang, Y. Q., Que, G. B., Chen, J. H., Chen, Y. P., ... & Jiang, J. H. (2014). Upregulation of the long noncoding RNA HOTAIR predicts recurrence in stage Ta/T1 bladder cancer. *Tumor Biology*, 35(10), 10249-10257.
151. Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., ... & Chang, H. Y. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *nature*, 464(7291), 1071-1076.
152. Zhang, Z. Z., Shen, Z. Y., Shen, Y. Y., Zhao, E. H., Wang, M., Wang, C. J., ... & Xu, J. (2015). HOTAIR long noncoding RNA promotes gastric cancer metastasis through suppression of poly r (C)-binding protein (PCBP) 1. *Molecular cancer therapeutics*, 14(5), 1162-1170.
153. Martínez-Fernández, M., Feber, A., Dueñas, M., Segovia, C., Rubio, C., Fernandez, M., ... & Paramio, J. M. (2015). Analysis of the Polycomb-related lncRNAs HOTAIR and ANRIL in bladder cancer. *Clinical epigenetics*, 7(1), 109.
154. Berrondo, C., Flax, J., Kuchеров, V., Siebert, A., Osinski, T., Rosenberg, A., ... & Beckham, C. J. (2016). Expression of the long non-coding RNA HOTAIR correlates with disease progression in bladder cancer and is contained in bladder cancer patient urinary exosomes. *PloS one*, 11(1), e0147236.
155. Miah, S., Dudziec, E., Drayton, R. M., Zlotta, A. R., Morgan, S. L., Rosario, D. J., ... & Catto, J. W. F. (2012). An evaluation of urinary microRNA reveals a high sensitivity for bladder cancer. *British journal of cancer*, 107(1), 123-128.

156. Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A. C., Kausch, I., Jocham, D., ... & Sczakiel, G. (2010, November). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. In *Urologic oncology: seminars and original investigations* (Vol. 28, No. 6, pp. 655-661). Elsevier.
157. Ajalli, M. M., Sansebli, Y., Ekrami, D., Alaeenejad, F., Abbasi, A., Eini, P., ... & Bahrami, N. (2026). Immune checkpoint inhibitors in bladder cancer: from mechanistic insights to emerging combination frontlines. *Clinical and Experimental Medicine*.
158. Spano, D., & Zollo, M. (2012). Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. *Clinical & experimental metastasis*, 29(4), 381-395.
159. Davern, M., Donlon, N. E., O'Connell, F., Gaughan, C., O'Donovan, C., McGrath, J., ... & Lysaght, J. (2023). Nutrient deprivation and hypoxia alter T cell immune checkpoint expression: potential impact for immunotherapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(8), 5377-5395.
160. Parvez, A., Choudhary, F., Mudgal, P., Khan, R., Qureshi, K. A., Farooqi, H., & Aspatwar, A. (2023). PD-1 and PD-L1: architects of immune symphony and immunotherapy breakthroughs in cancer treatment. *Frontiers in immunology*, 14, 1296341.
161. Rhea, L. P., Mendez-Marti, S., Kim, D., & Aragon-Ching, J. B. (2021). Role of immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Treatment and Research Communications*, 26, 100296.
162. Powles, T., Eder, J. P., Fine, G. D., Braith, F. S., Loriot, Y., Cruz, C., ... & Vogelzang, N. J. (2014). MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, 515(7528), 558-562.
163. Rosenberg, J. E., Hoffman-Censits, J., Powles, T., Van Der Heijden, M. S., Balar, A. V., Necchi, A., ... & Dreicer, R. (2016). Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*, 387(10031), 1909-1920.
164. Heery, C. R., O'Sullivan-Coyne, G., Madan, R. A., Cordes, L., Rajan, A., Rauckhorst, M., ... & Gulley, J. L. (2017). Avelumab for metastatic or locally advanced previously treated solid tumours (JAVELIN Solid Tumor): a phase 1a, multicohort, dose-escalation trial. *The Lancet Oncology*, 18(5), 587-598.
165. Massard, C., Gordon, M. S., Sharma, S., Rafii, S., Wainberg, Z. A., Luke, J., ... & Segal, N. H. (2016). Safety and efficacy of durvalumab (MEDI4736), an anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint inhibitor, in patients with advanced urothelial bladder cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34(26), 3119-3125.
166. Vaughn, D. J., Bellmunt, J., Fradet, Y., Lee, J. L., Fong, L., Vogelzang, N. J., ... & de Wit, R. (2018). Health-related quality-of-life analysis from KEYNOTE-045: a phase

- III study of pembrolizumab versus chemotherapy for previously treated advanced urothelial cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 36(16), 1579-1587.
167. Sharma, P., Retz, M., Siefker-Radtke, A., Baron, A., Necchi, A., Bedke, J., ... & Galsky, M. D. (2017). Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The lancet oncology*, 18(3), 312-322.
168. Balar, A. V., Kulkarni, G. S., Uchio, E. M., Boormans, J., Mourey, L., Krieger, L. E. M., ... & De Wit, R. (2019). Keynote 057: Phase II trial of Pembrolizumab (pembro) for patients (pts) with high-risk (HR) nonmuscle invasive bladder cancer (NMIBC) unresponsive to bacillus calmette-guérin (BCG).
169. Wołacewicz, M., Hryniewicz, R., Grywalska, E., Suchojad, T., Leksowski, T., Roliński, J., & Niedźwiedzka-Rystwej, P. (2020). Immunotherapy in bladder cancer: current methods and future perspectives. *Cancers*, 12(5), 1181.
170. Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J., & Allison, J. P. (2009). Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, 206(8), 1717-1725.
171. Mooso, B. A., Vinall, R. L., Mudryj, M., Yap, S. A., deVere White, R. W., & Ghosh, P. M. (2015). The role of EGFR family inhibitors in muscle invasive bladder cancer: a review of clinical data and molecular evidence. *The Journal of urology*, 193(1), 19-29.
172. Hale, G. M., & Querry, M. R. (2014). Bladder cancers respond to EGFR inhibitors. *Cancer Discov*, 4(9), 980-981.
173. Philips, G., Sanford, B., Halabi, S., Bajorin, D., & Small, E. J. (2006). Phase II study of cisplatin (C), gemcitabine (G) and gefitinib for advanced urothelial carcinoma (UC): analysis of the second cohort of CALGB 90102. *Journal of Clinical Oncology*, 24(18_suppl), 4578-4578.
174. Pruthi, R. S., Nielsen, M., Heathcote, S., Wallen, E. M., Rathmell, W. K., Godley, P., ... & Kim, W. (2010). A phase II trial of neoadjuvant erlotinib in patients with muscle-invasive bladder cancer undergoing radical cystectomy: clinical and pathological results. *BJU international*, 106(3), 349-354.
175. Wülfing, C., Machiels, J. P. H., Richel, D. J., Grimm, M. O., Treiber, U., De Groot, M. R., ... & El-Hariry, I. A. (2009). A single-arm, multicenter, open-label phase 2 study of lapatinib as the second-line treatment of patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma. *Cancer*, 115(13), 2881-2890.
176. Necchi, A., Vullo, S. L., Raggi, D., Perrone, F., Giannatempo, P., Calareso, G., ... & Salvioni, R. (2018, January). Neoadjuvant sorafenib, gemcitabine, and cisplatin administration preceding cystectomy in patients with muscle-invasive urothelial bladder carcinoma: An open-label, single-arm, single-center, phase 2 study. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 36, No. 1, pp. 8-e1). Elsevier.

177. Perrotte, P., Matsumoto, T., Inoue, K., Kuniyasu, H., Eve, B. Y., Hicklin, D. J., ... & Dinney, C. P. (1999). Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clinical Cancer Research*, 5(2), 257-264.
178. Inoue, K., Slaton, J. W., Perrotte, P., Davis, D. W., Bruns, C. J., Hicklin, D. J., ... & Dinney, C. P. (2000). Paclitaxel enhances the effects of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody ImClone C225 in mice with metastatic human bladder transitional cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 6(12), 4874-4884.
179. Hussain, M. H., MacVicar, G. R., Petrylak, D. P., Dunn, R. L., Vaishampayan, U., Lara Jr, P. N., ... & Smith, D. C. (2007). Trastuzumab, paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine in advanced human epidermal growth factor receptor-2/neu-positive urothelial carcinoma: results of a multicenter phase II national cancer institute trial. *Journal of Clinical Oncology*, 25(16), 2218-2224.
180. Koshkin, V. S., O'Donnell, P., Yu, E. Y., & Grivas, P. (2019). Systematic review: targeting HER2 in bladder cancer. *Bladder Cancer*, 5(1), 1-12.
181. Ibrahim, T., Gizzi, M., Bahleda, R., & Loriot, Y. (2019). Clinical development of FGFR3 inhibitors for the treatment of urothelial cancer. *Bladder Cancer*, 5(2), 87-102.
182. Dieci, M. V., Arnedos, M., Andre, F., & Soria, J. C. (2013). Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives. *Cancer discovery*, 3(3), 264-279.
183. Chen, Y., Li, X., Eswarakumar, V. P., Seger, R., & Lonai, P. (2000). Fibroblast growth factor (FGF) signaling through PI 3-kinase and Akt/PKB is required for embryoid body differentiation. *Oncogene*, 19(33), 3750-3756.
184. Robinson, B. D., Vlachostergios, P. J., Bhinder, B., Liu, W., Li, K., Moss, T. J., ... & Faltas, B. M. (2019). Upper tract urothelial carcinoma has a luminal-papillary T-cell depleted contexture and activated FGFR3 signaling. *Nature communications*, 10(1), 2977.
185. Soria, J. C., Italiano, A., Cervantes, A., Tabernero, J., Infante, J., Lara, P. N., ... & Hammerman, P. (2016). Safety and activity of the pan-fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor erdafitinib in phase 1 study patients with advanced urothelial carcinoma. *Annals of Oncology*, 27, vi269.
186. Loriot, Y., Necchi, A., Park, S. H., Garcia-Donas, J., Huddart, R., Burgess, E., ... & Siefker-Radtke, A. O. (2019). Erdafitinib in locally advanced or metastatic urothelial carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 381(4), 338-348.
187. Nogova, L., Sequist, L. V., Perez Garcia, J. M., Andre, F., Delord, J. P., Hidalgo, M., ... & Wolf, J. (2017). Evaluation of BGJ398, a fibroblast growth factor receptor 1-3 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors harboring genetic alterations in

- fibroblast growth factor receptors: results of a global phase I, dose-escalation and dose-expansion study. *Journal of Clinical Oncology*, 35(2), 157-165.
188. Hanna, K. S. (2020). Vofatamab. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR-3) antibody, Treatment of urothelial carcinoma. *Drugs of the Future*, 45(6).
 189. Bellmunt, J., Picus, J., Kohli, M., Arriaga, Y. E., Milowsky, M. I., Currie, G., ... & Pal, S. K. (2018). FIERCE-21: Phase 1b/2 study of docetaxel+ b-701, a selective inhibitor of FGFR3, in relapsed or refractory (R/R) metastatic urothelial carcinoma (mUCC).
 190. Pal, S. K., Rosenberg, J. E., Hoffman-Censits, J. H., Berger, R., Quinn, D. I., Galsky, M. D., ... & Bajorin, D. F. (2018). Efficacy of BGJ398, a fibroblast growth factor receptor 1–3 inhibitor, in patients with previously treated advanced urothelial carcinoma with FGFR3 alterations. *Cancer discovery*, 8(7), 812-821.
 191. Pagliaro, L. C. (2000). Gene therapy for bladder cancer. *World journal of urology*, 18(2), 148-151.
 192. Kuball, J., Wen, S. F., Leissner, J., Atkins, D., Meinhardt, P., Quijano, E., ... & Schuler, M. (2002). Successful adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with bladder cancer by intravesical vector instillation. *Journal of Clinical Oncology*, 20(4), 957-965.
 193. Mazzola, C. R., & Chin, J. (2015). Targeting the VEGF pathway in metastatic bladder cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(7), 913-927.
 194. Aldebasi, Y. H., Rahmani, A. H., Khan, A. A., & Aly, S. M. (2013). The effect of vascular endothelial growth factor in the progression of bladder cancer and diabetic retinopathy. *International journal of clinical and experimental medicine*, 6(4), 239.
 195. Hahn, N. M., Stadler, W. M., Zon, R. T., Waterhouse, D., Picus, J., Nattam, S., ... & Sweeney, C. J. (2011). Phase II trial of cisplatin, gemcitabine, and bevacizumab as first-line therapy for metastatic urothelial carcinoma: Hoosier Oncology Group GU 04-75. *Journal of clinical oncology*, 29(12), 1525-1530.
 196. Twardowski, P., Stadler, W. M., Frankel, P., Lara, P. N., Ruel, C., Chatta, G., ... & Gandara, D. R. (2010). Phase II study of Aflibercept (VEGF-Trap) in patients with recurrent or metastatic urothelial cancer, a California Cancer Consortium Trial. *Urology*, 76(4), 923-926.
 197. Petrylak, D. P., De Wit, R., Chi, K. N., Drakaki, A., Sternberg, C. N., Nishiyama, H., ... & Vaishampayan, U. (2017). Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel in patients with locally advanced or metastatic urothelial carcinoma after platinum-based therapy (RANGE): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet*, 390(10109), 2266-2277.
 198. Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews genetics*, 3(6), 415-428.

199. Cote, R. J., Laird, P. W., & Datar, R. H. (2005). Promoter hypermethylation: a new therapeutic target emerges in urothelial cancer. *Journal of clinical oncology*, 23(13), 2879-2881.
200. Nunes, S. P., Henrique, R., Jeronimo, C., & Paramio, J. M. (2020). DNA methylation as a therapeutic target for bladder cancer. *Cells*, 9(8), 1850.
201. Bohl, S. R., Bullinger, L., & Rücker, F. G. (2018). Epigenetic therapy: azacytidine and decitabine in acute myeloid leukemia. *Expert review of hematology*, 11(5), 361-371.
202. Puia, D., Ivănuță, M., & Pricop, C. (2025). DNA Methylation in Bladder Cancer: Diagnostic and Therapeutic Perspectives—A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(15), 7507.
203. Ramakrishnan, S., Hu, Q., Krishnan, N., Wang, D., Smit, E., Granger, V., ... & Woloszynska-Read, A. (2017). Decitabine, a DNA-demethylating agent, promotes differentiation via NOTCH1 signaling and alters immune-related pathways in muscle-invasive bladder cancer. *Cell Death & Disease*, 8(12), 3217.
204. Davis, A. J., Gelmon, K. A., Siu, L. L., Moore, M. J., Britten, C. D., Mistry, N., ... & Eisenhauer, E. A. (2003). Phase I and pharmacologic study of the human DNA methyltransferase antisense oligodeoxynucleotide MG98 given as a 21-day continuous infusion every 4 weeks. *Investigational new drugs*, 21(1), 85-97.
205. Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., ... & Kaelin Jr, W. G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & development*, 18(23), 2893-2904.
206. Seront, E., Rottey, S., Sautois, B., Kerger, J., D'Hondt, L. A., Verschaeve, V., ... & Machiels, J. P. (2012). Phase II study of everolimus in patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma of the urothelial tract: clinical activity, molecular response, and biomarkers. *Annals of oncology*, 23(10), 2663-2670.
207. Pinto-Leite, R., Arantes-Rodrigues, R., Palmeira, C., Colaço, B., Lopes, C., Colaço, A., ... & Santos, L. (2013). Everolimus combined with cisplatin has a potential role in treatment of urothelial bladder cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 67(2), 116-121.
208. Pinto-Leite, R., Arantes-Rodrigues, R., Sousa, N., Oliveira, P. A., & Santos, L. (2016). mTOR inhibitors in urinary bladder cancer. *Tumor Biology*, 37(9), 11541-11551.
209. Wu, M. J., Chang, C. H., Chiu, Y. T., Wen, M. C., Shu, K. H., Li, J. R., ... & Chen, Y. T. (2012, January). Rictor-dependent AKT activation and inhibition of urothelial carcinoma by rapamycin. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 30, No. 1, pp. 69-77). Elsevier.

210. Wang, W. T., & Chen, Y. Q. (2014). Circulating miRNAs in cancer: from detection to therapy. *Journal of hematology & oncology*, 7(1), 86.
211. Han, Y., Chen, J., Zhao, X., Liang, C., Wang, Y., Sun, L., ... & Cai, Z. (2011). MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing. *PloS one*, 6(3), e18286.
212. Huang, L., Luo, J., Cai, Q., Pan, Q., Zeng, H., Guo, Z., ... & Lin, T. (2011). MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3. *International journal of cancer*, 128(8), 1758-1769.
213. Li, H., Yu, G., Shi, R., Lang, B., Chen, X., Xia, D., ... & Xu, H. (2014). Cisplatin-induced epigenetic activation of miR-34a sensitizes bladder cancer cells to chemotherapy. *Molecular cancer*, 13(1), 8.
214. Hong, D. S., Kang, Y. K., Borad, M., Sachdev, J., Ejadi, S., Lim, H. Y., ... & Beg, M. S. (2020). Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *British journal of cancer*, 122(11), 1630-1637.
215. Tassone, P., Di Martino, M. T., Arbitrio, M., Fiorillo, L., Staropoli, N., Ciliberto, D., ... & Tagliaferri, P. (2023). Safety and activity of the first-in-class locked nucleic acid (LNA) miR-221 selective inhibitor in refractory advanced cancer patients: a first-in-human, phase 1, open-label, dose-escalation study. *Journal of hematology & oncology*, 16(1), 68.
216. Liu, H., Feng, Y., He, W., Kang, Y., & Jiang, M. (2018). Knockdown of HOTAIR reduces the malignancy of bladder cancer cells via downregulation of invasions and metastasis-related genes. *Translational Cancer Research*, 7(5).
217. Eltaib, L., Alhazmi, B. H., Alzahrani, A. R., Asdaq, S. M. B., Ali, A., Aldhafiri, F. J., ... & Imran, M. (2024). Long non-coding RNA HOTAIR: A biomarker and therapeutic target in urological tumors. *Pathology-Research and Practice*, 262, 155549.
218. Gao, L., Chen, J., Shang, K., Wang, G., Li, C., & He, H. (2025). MicroRNAs in bladder cancer: biogenesis, function, and therapeutic strategies. *International Journal of Surgery*, 10-1097.
219. Jurj, A., Fontana, B., Varani, G., & Calin, G. A. (2024). Small molecules targeting microRNAs: new opportunities and challenges in precision cancer therapy. *Trends in cancer*, 10(9), 809-82
220. Kwon, W. A., Lee, S. Y., Jeong, T. Y., Kim, H. H., & Lee, M. K. (2024). Antibody-drug conjugates in urothelial cancer: from scientific rationale to clinical development. *Cancers*, 16(13), 2420.
221. Fu, Z., Li, S., Han, S., Shi, C., & Zhang, Y. (2022). Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 93.

222. Samantasinghar, A., Sunildutt, N. P., Ahmed, F., Soomro, A. M., Salih, A. R. C., Parihar, P., ... & Choi, K. H. (2023). A comprehensive review of key factors affecting the efficacy of antibody drug conjugate. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 161, 114408.
223. Heath, E. I., & Rosenberg, J. E. (2021). The biology and rationale of targeting nectin-4 in urothelial carcinoma. *Nature Reviews Urology*, 18(2), 93-103.
224. Grant, M. J., Stockhammer, P., Austin, M. R., Nemeth, Z., & Petrylak, D. P. (2024). Efficacy of antibody drug conjugates alone and in combination with other agents in metastatic urothelial carcinoma: a scoping review. *Bladder Cancer*, 10(1), 9-23.
225. You, X., Zhu, C., Yu, P., Wang, X., Wang, Y., Wang, J., ... & Wang, K. (2024). Emerging strategy for the treatment of urothelial carcinoma: Advances in antibody-drug conjugates combination therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 171, 116152.
226. Hoffman-Censits, J. H., Lombardo, K. A., Parimi, V., Kamanda, S., Choi, W., Hahn, N. M., ... & Matoso, A. (2021). Expression of nectin-4 in bladder urothelial carcinoma, in morphologic variants, and nonurothelial histotypes. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 29(8), 619-625.
227. Wong, J. L., & Rosenberg, J. E. (2021). Targeting nectin-4 by antibody-drug conjugates for the treatment of urothelial carcinoma. *Expert opinion on biological therapy*, 21(7), 863-873.
228. Rosenberg, J., Sridhar, S. S., Zhang, J., Smith, D., Ruether, D., Flaig, T. W., ... & Petrylak, D. P. (2020). EV-101: a phase I study of single-agent enfortumab vedotin in patients with nectin-4-positive solid tumors, including metastatic urothelial carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 38(10), 1041-1049.
229. Rosenberg, J. E., Flaig, T. W., Friedlander, T. W., Milowsky, M. I., Srinivas, S., Petrylak, D. P., ... & Hoimes, C. J. (2020). Study EV-103: Preliminary durability results of enfortumab vedotin plus pembrolizumab for locally advanced or metastatic urothelial carcinoma.
230. Grivas, P., Pouessel, D., Park, C. H., Barthelemy, P., Bupathi, M., Petrylak, D. P., ... & Loriot, Y. (2024). Sacituzumab govitecan in combination with pembrolizumab for patients with metastatic urothelial cancer that progressed after platinum-based chemotherapy: TROPHY-U-01 cohort 3. *Journal of Clinical Oncology*, 42(12), 1415-1425.
231. Powles, T., Rosenberg, J. E., Sonpavde, G. P., Loriot, Y., Durán, I., Lee, J. L., ... & Petrylak, D. P. (2021). Enfortumab vedotin in previously treated advanced urothelial carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 384(12), 1125-1135.
232. Ross, J. S., Wang, K., Gay, L. M., Al-Rohil, R. N., Nazeer, T., Sheehan, C. E., ... & Stephens, P. J. (2014). A high frequency of activating extracellular domain ERBB2 (HER2) mutation in micropapillary urothelial carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 20(1), 68-75.

233. Lattanzi, M., Niederhausern, A., Zheng, J., Bahadur, N., Nichols, C., Barton, L., ... & Iyer, G. (2022). Incidence and clinical outcomes of HER2-altered bladder cancer (BC) patients (pts).
234. Powles, T., Valderrama, B. P., Gupta, S., Bedke, J., Kikuchi, E., Hoffman-Censits, J., ... & van der Heijden, M. S. (2024). Enfortumab vedotin and pembrolizumab in untreated advanced urothelial cancer. *New England Journal of Medicine*, 390(10), 875-888.
235. Meric-Bernstam, F., Makker, V., Oaknin, A., Oh, D. Y., Banerjee, S., González-Martín, A., ... & Lee, J. Y. (2024). Efficacy and safety of trastuzumab deruxtecan in patients with HER2-expressing solid tumors: primary results from the DESTINY-PanTumor02 phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*, 42(1), 47-58.
236. Atrash, S., Bano, K., Harrison, B., & Abdallah, A. O. (2020). CAR-T treatment for hematological malignancies. *Journal of Investigative Medicine*, 68(5), 956-964.
237. Liu, R., & Wang, J. (2026). Recent advances in immunotherapy for bladder cancer: mechanisms, clinical applications, and future perspectives. *Frontiers in Oncology*, 16, 1786965.
238. Zhang, G., Wang, Y., Lu, S., Ding, F., Wang, X., Zhu, C., ... & Wang, K. (2024). Molecular understanding and clinical outcomes of CAR T cell therapy in the treatment of urological tumors. *Cell Death & Disease*, 15(5), 359.
239. Whalen, K. (2018). *Lippincott® illustrated reviews: pharmacology*. Wolters kluwer india Pvt Ltd.
240. Thistlethwaite, F. C., Gilham, D. E., Guest, R. D., Rothwell, D. G., Pillai, M., Burt, D. J., ... & Hawkins, R. E. (2017). The clinical efficacy of first-generation carcinoembryonic antigen (CEACAM5)-specific CAR T cells is limited by poor persistence and transient pre-conditioning-dependent respiratory toxicity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(11), 1425-1436.
241. Roselli, E., Boucher, J. C., Li, G., Kotani, H., Spitler, K., Reid, K., ... & Davila, M. L. (2021). 4-1BB and optimized CD28 co-stimulation enhances function of human mono-specific and bi-specific third-generation CAR T cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(10), e003354.
242. Hombach, A. A., Heiders, J., Foppe, M., Chmielewski, M., & Abken, H. (2012). OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4+ T cells. *Oncoimmunology*, 1(4), 458-466.

243. Kagoya, Y., Tanaka, S., Guo, T., Anczurowski, M., Wang, C. H., Saso, K., ... & Hirano, N. (2018). A novel chimeric antigen receptor containing a JAK–STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nature medicine*, 24(3), 352-359.
244. Chang, K., Delavan, H. M., Yip, E., Kasap, C., Zhu, J., Lodha, R., ... & Chou, J. (2025). Modulating the PPAR γ pathway upregulates NECTIN4 and enhances chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy in bladder cancer. *Nature Communications*, 16(1), 8215.
245. Parriott, G., Deal, K., Crean, S., Richardson, E., Nylen, E., & Barber, A. (2020). T-cells expressing a chimeric-PD1-Dap10-CD3zeta receptor reduce tumour burden in multiple murine syngeneic models of solid cancer. *Immunology*, 160(3), 280-294.