

Raziskovalni modeli raka sečnega mehurja za izboljšanje diagnosticiranja in zdravljenja

Research models of urinary bladder cancer for improved diagnostics and treatment

Daša Zupančič, Samo Hudoklin

Inštitut za biologijo celice,
Medicinska fakulteta,
Univerza v Ljubljani,
Ljubljana, Slovenija

Korespondenca/ Correspondence:

Daša Zupančič, e: dasa.zupancic@mf.uni-lj.si

Ključne besede:

sečni mehur; rak;
raziskovalni modeli; in vitro; in vivo

Key words:

urinary bladder; cancer;
research model; in vitro;
in vivo

Prispelo: 24. 6. 2019

Sprejeto: 22. 7. 2019

Izvleček

Rak sečnega mehurja je ena najpogostejših rakavih boleznih pri moških in ima visoko stopnjo ponovljivosti, zaradi česar predstavlja velik ekonomski in socialni problem. Za izboljšanje diagnosticiranja in zdravljenja raka sečnega mehurja se uporablja veliko različnih raziskovalnih modelov. V preglednem članku so predstavljeni najpogosteje uporabljeni modeli, saj predstavljajo približek dejanskemu molekularnobiološkemu dogajanju v človeku med boleznijo. Procesi na celični ravni se raziskujejo na *in vitro* modelih celičnih kultur, obnašanje celic v živem organizmu pa v različnih živalskih modelih. Izsledke raziskav na teh modelih je potrebno ovrednotiti tudi na človeških vzorcih, ki so nepogrešljivi, preden pride nov diagnostični postopek ali določena nova učinkovina v proces kliničnih študij. V članku so kritično ovrednotene prednosti in slabosti posameznega modela raka sečnega mehurja ter predstavljene nekatere raziskovalne študije.

Abstract

Urinary bladder cancer is one of the leading malignancies in men with high recurrence rate, thus representing a huge economic and social burden. Many different research models are used for studying potential improvements in the diagnostics and treatment of bladder cancer. In this review, the most widely used models are described, since they represent the approximation to the molecular and biological processes occurring during human bladder carcinogenesis. Processes at the cellular level are investigated by *in vitro* models of cell cultures, while processes occurring in whole organisms are explored in different animal models. The results obtained by these two approaches should also be evaluated on human biopsy samples before any new diagnostic procedure or drug can be studied in clinical trials. We provide critical evaluation of advantages and disadvantages of specific models of the urinary bladder cancer and describe some of the studies using these models.

Citirajte kot/Cite as: Zupančič D, Hudoklin S. [Research models of urinary bladder cancer for improved diagnostics and treatment]. Zdrav Vestn. 2020;89(5–6):301–19.

DOI: 10.6016/ZdravVestn.2966

1 Uvod

1.1 Incidenca in dejavniki tveganja za nastanek raka sečnega mehurja

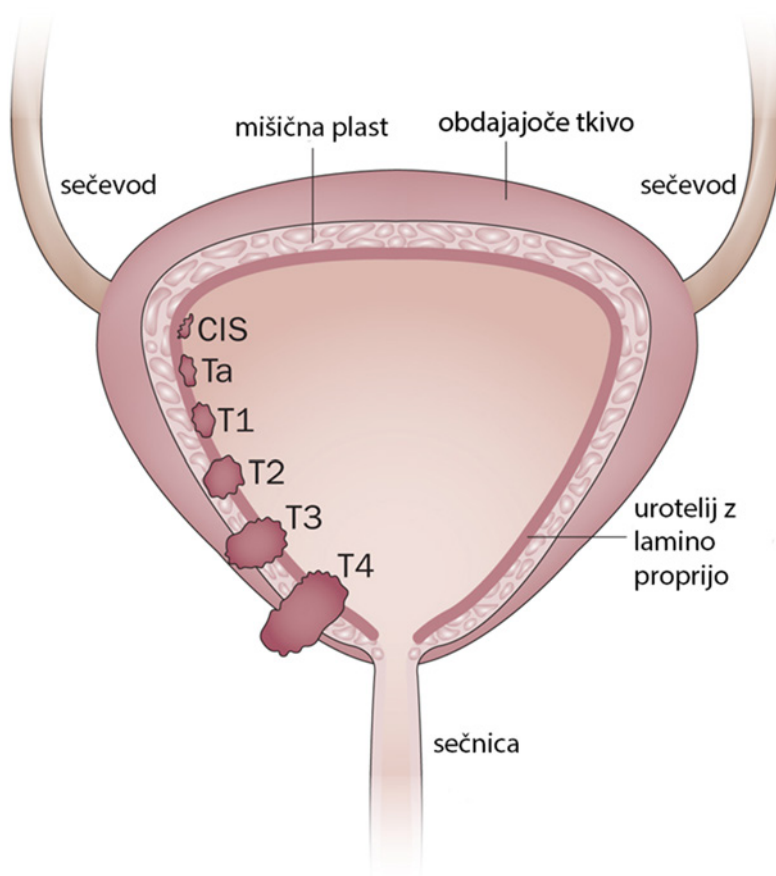
Rak sečnega mehurja je bolezen razvitih zahodnih držav, ki se je v zadnjem desetletju širila tudi na dežele v razvoju ter tako postala globalni zdravstveno-ekonomski problem. V svetovnem

merilu se uvršča na šesto mesto najpogostejše diagnosticiranih rakavih bolezni pri moških (1). Poleg tega predstavlja zaskrbljujoče dejstvo zelo visoka stopnja njegove ponovljivosti, ki se giblje med 50 % in 90 % (1). Zaradi pogostosti in (ne)učinkovitosti trenutnih načinov zdravljenja, ki zahtevajo dolgoročno spremljanje že zdravljenih bolnikov, pomeni rak mehurja veliko socialno ter finančno obremenitev družbe in posameznikov (2). Najvišja incidenca je pri moških južne in zahodne Evrope ter severne Amerike, kjer predstavlja četrto najpogostejšo obliko raka (3). V Sloveniji je rak mehurja osma najpogostejša oblika raka med moškimi (18,1 na 100.000), s čimer zavzema četrto mesto med državami južne Evrope (Tabela 1). Pri ženskah je incidenca raka mehurja trenutno precej nižja v primerjavi z moškimi (Tabela 1), vendar se povečuje od sredine 90. let prejšnjega stoletja, medtem ko se med moškimi zmanjšuje (1). Petletno preživetje bolnikov z rakom mehurja v Sloveniji je 53,7 %.

Glavni dejavnik tveganja za rak mehurja ostaja kajenje tobaka. Kadilci imajo do 2,5-krat višjo verjetnost za razvoj te oblike raka kot nekadilci, pri čemer je tobak odgovoren za približno 50 % vseh primerov in približno 40 % vseh smrti zaradi raka mehurja (4). Glede na te podatke ni presenetljivo, da vzorec incidence in smrtnosti zaradi raka mehurja v veliki meri sovпада z vzorcem kajenja (5). Pri tem je potrebno upoštevati zgodovino bolezni, saj se trenutni vzorec pojavljanja raka mehurja ujema s prevalenco kajenja izpred 20–30 let (6). V zadnjih desetletjih je pogostnost kajenja upadla v številnih Evropskih državah, kar se odlikava tudi v trendu nižanja incidence in smrtnosti zaradi raka mehurja pri moških v teh državah. V nasprotju s tem

Tabela 1: Incidenca in umrljivost zaradi raka sečnega mehurja v Evropskih državah (starostno standardizirana incidenca in umrljivost na 100.000) (povzeto po Antoni et al.) (1).

	Incidenca (moški / ženske)	Umrlijivost (moški / ženske)
Centralna in vzhodna Evropa		
Poljska (regionalno)	20,2 / 4,1	8,4 / 1,3
Češka	19,8 / 5,4	6,2 / 1,6
Slovaška	16,1 / 3,6	5,4 / 1,2
Bolgarija	15,6 / 3,3	5,2 / 1,1
Severna Evropa		
Danska	27,4 / 8,4	6,7 / 2,3
Norveška	21,9 / 6,4	4,9 / 1,6
Švedska	18,6 / 5,6	4,1 / 1,2
Irska	11,6 / 4,2	3,6 / 1,4
Južna Evropa		
Španija (regionalno)	36,7 / 5,0	8,2 / 1,1
Italija (regionalno)	33,2 / 6,1	5,8 / 1,0
Hrvaška	18,2 / 4,4	6,2 / 1,2
Slovenija	18,1 / 4,3	6,2 / 1,4
Zahodna Evropa		
Švica (regionalno)	26,2 / 6,3	4,0 / 1,3
Nemčija (regionalno)	21,8 / 5,5	4,2 / 1,3
Avstrija	20,3 / 5,2	4,2 / 1,1
Nizozemska	13,9 / 3,5	5,5 / 1,6



Slika 1: Klasifikacija raka sečnega mehurja glede na globino invazije (povzeto po Mertens et al.) (13).

pa se je v nekaterih državah prevalenca kajenja začela zmanjševati šele pred kratkim ali pa celo še vedno narašča, kar velja predvsem za ženske (7). To pomeni, da bo incidenca in smrtnost zaradi raka mehurja v teh populacijah še naraščala oziroma se bo začela zmanjševati šele čez nekaj desetletij.

Poleg kajenja je med karcinogene dejavnike, ki povzročajo raka mehurja, uvrščena tudi izpostavljenost aromatskim aminom in drugim kemikalijam, ki so prisotne v barvni, gumarski in aluminij-ski industriji (8). Tem sledi izpostavljenost določenim okoljskim onesnažilom, kot je na primer arzenik v pitni vodi (9). Študije kažejo, da imajo potencialno vlo-

go v karcinogenezi mehurja tudi pododani genetski dejavniki (10). Na drugi strani pa vloge različnih prehranskih diet pri razvoju raka mehurja študije ne potrjujejo (2).

1.2 Klasifikacija raka sečnega mehurja

Rak mehurja se praviloma razvije zaradi transformacije epitelnih celic, ki mejijo na svetlino mehurja in se imenujejo urotelijske celice (11). Rakava transformacija urotelijskih celic znotraj urotelija vodi v nastanek urotelijske neoplazije. Prva klasifikacija urotelijskih neoplazij je nastala leta 1973 in se je kljub določenim pomanjkljivostim uporabljala skoraj 30 let (12). Leta 1998 je Svetovna zdravstvena organizacija (*angl.* World Health Organisation, WHO) v sodelovanju z Mednarodnim združenjem uroloških patologov (*angl.* International Society of Urological Pathologist, ISUP) sprejela novo klasifikacijo WHO/ISUP, ki podrobneje razdeli neoplazije glede na obliko sprememb urotelija ter globino invazije rakavih urotelijskih celic (Slika 1 in Tabela 2). Klasifikacija WHO/ISUP za določanje urotelijskih neoplazij je v uporabi še danes.

1.3 Odkrivanje in zdravljenje raka sečnega mehurja

Najbolj ključna za ugoden razplet bolezni je hitra postavitve diagnoze, saj so na začetku razvoja bolezni v večini urotelijske neoplazije neinvazivnih papilarnih karcinomov oblike pTa. Osnovno diagnosticiranje urotelijskih neoplazij se izvaja z anamnezo in kliničnim pregledom, ki ga sestavljajo citološke preiskave urina ter cistoskopija in histopatološka preiskava biopta urotelijske neoplazije, pridobljenega med operacijo. Ob postavitvi diagnoze ima približ-

Tabela 2: Klasifikacija WHO/ISUP urotelijskih neoplazij in njihovih histopatoloških značilnosti (povzeto po Ovčak, Epstein et al.) (12,14).

Klasifikacija	Histopatološke značilnosti
Normalen urotelij	Do 7 skladov celic, za površinski sklad so značilne dežnikaste celice, minimalne citološke atipičnosti in spremembe v zgradbi celic.
Hiperplazija	
Enostavna hiperplazija	Zadebeljen urotelij brez citoloških atipičnosti.
Papilarna hiperplazija	Sluznica je nagubana, lahko tudi resičasta, prisotni so izrastki v obliki prstov, urotelij je neenakomerno zadebeljen in ne kaže citoloških atipičnosti.
Nepapilarne (ravne) spremembe z atipičnostmi	
Reaktivna (vnetna) atipičnost	Jedra urotelijskih celic so enakomerno povečana, jedrca so jasno vidna, prisotne so tudi mitoze.
Atipičnost neznanega izvora	Diagnoza, ko je odločitev med reaktivno atipičnostjo in neoplazijo težka. Zaradi intenzivnega vnetnega procesa je močno izražen polimorfizem jeder.
Displazija	Hude spremembe, ki se kažejo kot porušenje zgradbe celic, celični in jedrni polimorfizem in povečana mitotska aktivnost.
Karcinom <i>in situ</i> (CIS)	Prisotnost celic z velikimi, nepravilno oblikovanimi jedri, običajno v celotni debelini urotelija. Mitotska aktivnost je vidna tudi v površinskem in srednjem sloju urotelija.
Papilarne neoplazije	
Papilom	Papilarna benigna novotvorba z ozkim vezivnim tkivom, ki ga prekriva urotelij, ki se po zgradbi ne razlikuje bistveno od normalnega.
Papilarna urotelijska neoplazija nizkega malignega potenciala (PUNLMP)	Papilarna novotvorba z minimalnimi nepravilnostmi v zgradbi celic urotelija in minimalnimi jedrnimi atipijami. Urotelij je praviloma zadebeljen, jedra so večja kot pri papilomu, v bazalnem sloju so redke mitoze.
Neinvazivni papilarni urotelijski karcinom nizke stopnje (pTa, low grade)	Nepravilnosti v zgradbi celic so pogostejše, polimorfizem jeder je izrazit. Opazne so spremembe v velikosti, obliki in polarnosti celic. Blaga mitotska aktivnost se omejuje na bazalni sloj urotelija.
Neinvazivni papilarni urotelijski karcinom visoke stopnje (pTa, high grade)	Izrazite nepravilnosti v zgradbi in videzu rakavih celic. Opazna je nepravilna porazdelitev kromatina v jedrih, jedrca so jasno vidna in nepravilno oblikovana. Navadne in patološke mitoze so prisotne v vseh slojih urotelija.
Invazivni karcinom	
Invazija v lamino proprijo (T1)	Prisotnost skupkov ali posameznih rakavih celic v lamini propriji.
Invazija v proprijo muskularis (mišica detruzor) (T2)	Značilna je prisotnost rakavega tkiva med debelimi snopi gladkega mišičja stene mehurja.
Invazija skozi mišico (T3)	Prisotnost rakavih celic v tunici serosi.
Invazija v sosednje organe (T4)	Infiltracija rakavega tkiva v sosednje organe.

no 75 % bolnikov nemišičnoinvazivno obliko (pTa, CIS, T1) in približno 25 % mišičnoinvazivno obliko (stadij \geq T2) raka sečnega mehurja (15). Pri bolnikih z mišičnoneinvazivno obliko bolezni je petletno preživetje sicer relativno visoko (> 90 %), vendar pa je ponovljivost te bolezni izjemno visoka (50–90 %), zaradi česar je potrebno drago dolgoročno spremljanje z invazivno cistoskopijo (1). Zdravljenje papilarnih oblik karcinomov je največkrat transureterna resekcija sečnega mehurja (*angl.* Transurethral Resection of Bladder, TURB). Namen posega je odstraniti vse makroskopsko vidne dele karcinoma, pri čemer hkrati pridobimo biopsije rakavega tkiva, s katerimi se določijo stadij, stopnja ter globina invazije (16). Pri stadijih T3 in T4 je običajna oblika zdravljenja radikalna cistektomija z odstranitvijo lokalnih bezgavk (*angl.* Radical Cystectomy), ki ji sledi sistemska kemoterapija (17). Izkazalo se je, da neoadjuvantna kemoterapija na osnovi cisplatina pred radikalno cistektomijo izboljša dolgoročno preživetje le za 6 % (18). Približno 50 % bolnikov z diagnozo invazivne oblike raka mehurja umre v petih letih po postavitvi diagnoze (19,20). Ob tem pa spremljanje statistike petletnega preživetja pokaže, da se zdravljenje bolnikov s to obliko raka v zadnjih 20 letih ni bistveno izboljšalo (21). Tako je rak mehurja zaradi visoke pogostosti in ponovljivosti urotelijskih neoplazij ter slabega preživetja invazivnih oblik zelo resen problem javnega zdravstva. Zato je potrebno prihodnje raziskave usmeriti v iskanje novih metod in pristopov v diagnosticiranju ter iskanje novih napovednih dejavnikov. Visoka ponovljivost raka mehurja je verjetno posledica dejstva, da kljub kirurški odstranitvi cistoskopsko vidnih urotelijskih neoplazij ostane nekaj rakavih urotelijskih celic v sečnem mehurju, iz katerih se razvijejo nove ne-

oplazije. Zato je nujno iskati nove načine zdravljenja, kot je na primer ciljani vnos zdravil v rakave celice. Od leta 1990, ko so v onkologijo prvič vpeljali ciljano zdravljenje, so se številne terapije s ciljanim zdravljenjem uveljavile pri zdravljenju rakavih bolezni, predvsem levkemije, gastrointestinalnih in kolorektalnih tumorjev ter raka ledvic (22). Žal pa se nobeno od registriranih ciljanih zdravljenj ni izkazalo kot uspešno pri zdravljenju raka mehurja (23). Glavni vzroki za to so najverjetneje: a) izjemno hitro pridobljena odpornost tumorja na terapijo, ki je posledica molekularne heterogenosti rakavih urotelijskih celic (24), b) delovanje urotelijskih celic kot pregrada, ki lahko na celični ravni zmanjšuje dostop zdravil do rakavih celic ter c) številni toksični stranski učinki zdravljenja (23). Za razvoj novih oblik zdravljenja raka mehurja so ključni reprezentativni, dobro ovrednoteni in ponovljivi predklinični raziskovalni modeli raka, pri katerih se je potrebno zavedati prednosti in pomanjkljivosti posameznega modela.

2 Raziskovalni modeli raka sečnega mehurja

Razvoj novih načinov diagnosticiranja in zdravljenja raka mehurja se začne s temeljnimi celično-biološkimi in molekularnimi raziskavami na celičnih kulturah (sistemi *in vitro*), katerim sledijo raziskave na kompleksnejših živalskih modelih (predklinične študije *in vivo*). Živalski modeli raka omogočajo tudi raziskave mehanizmov delovanja že uveljavljenih terapij (npr. terapija z bacilom Calmette-Guerin) ter možnosti njihovega izboljšanja (25). Od vseh na modelnih sistemih testiranih inovativnih načinov zdravljenja jih le malo pride do stopnje, da se lahko izvede klinična študija na bolnikih.

2.1 *In vitro* sistemi omogočajo temeljne študije karcinogeneze urotelija

Celične kulture so odlično orodje za študij osnovnih celičnobioloških, molekularnih in genetskih značilnosti rakavih urotelijskih celic *in vitro*. Poglavitni prednosti uporabe *in vitro* sistemov urotelijskih celic sta možnost nadzovanja pogojev in neposrednega opazovanja celic v kulturi. Rast normalnih in rakavih urotelijskih celic, pridobljenih od glodavcev, prašičev ali ljudi, predstavlja možnost raziskovanja 'čistih' populacij celic brez vpliva celic drugih tkiv. Celične kulture omogočajo tudi prve faze testiranja novih zdravilnih učinkovin, npr. testiranje mehanizma vstopanja v celice, prenosov znotraj celic ter mehanizmov delovanja. V literaturi je opisanih več metod gojenja rakavih in normalnih urotelijskih celic, od trajnih celičnih linij in različno diferenciranih primarnih in sekundarnih celičnih kultur do kultur eksplantatov (26,27). Trajne celične linije urotelijskih celic se pridobijo bodisi iz normalnih urotelijskih celic, ki so bile izpostavljene kemijskim karcinogenom, bodisi iz rakavih celic različnih tumorjev sečnega mehurja (28). Obstaja več celičnih linij človeškega izvora (npr. RT4, RT112, T24, UMUC3 in UMUC14), ki predstavljajo raziskovalne modele različnih stopenj raka mehurja ter izražajo številne genetske in morfološke spremembe ter spremembe v izražanju genov, opažene v človeških urotelijskih neoplazijah. V raziskovalne namene se uporabljajo tudi mišje (npr. MB49 in MBT-2) in podganje trajne celične linije (npr. AY-27) (29). Vsi ti sistemi *in vitro* so modelni sistemi za študije vpliva dejavnikov, ki spremljajo rast in diferenciacijo normalnih in rakavih urotelijskih celic (npr. rastni faktorji, signalne molekule, mitogeni, inhibitorji). Poleg

tega omogočajo spremljanje nastanka in razvoja rakave transformacije celic po izpostavitvi karcinogenu ter prvo ugotavljanje učinkovitosti protirakavih zdravilnih učinkovin (30). Celične kulture omogočajo tudi raziskave genetskih sprememb, povezanih z razvojem raka mehurja, ter testiranje tumorogenosti in sposobnosti celic za metastaziranje. Čeprav so sistemi *in vitro* zaradi preglednosti in sorazmerno enostavne uporabe učinkovit modelni sistem, pa imajo svoje omejitve predvsem zaradi odsotnosti kompleksnega (tkivnega) okolja. Metabolizem (31) in odzivnost (32) celic na signale iz okolja v trajni celični liniji se npr. opazno razlikujeta od tistega, ki poteka v celicah normalnega ali rakavega tkiva *in situ*. Celične linije, ki rastejo v monoslojih, ne posnemajo kompleksne tridimenzionalne urejenosti, značilne za tkiva v organizmu. Z uporabo tridimenzionalnih sistemov celičnih kultur in komponent zunajceličnega matriksa lahko sicer vzpostavimo bolj fiziološki modelni sistem arhitekture in dinamike tumorja (33), ne moremo pa povsem nadomestiti kompleksnega okolja tkiva *in vivo*. Velik vpliv le-tega namreč prispevajo celice, ki obkrožajo rakave celice *in situ*, npr. imunske celice, mezenhimske celice, sistem ožiljenja, kompleksnost vezivnega tkiva in drugi tipi celic. Te omejitve celičnih kultur lahko delno premagamo z različnimi živalskimi modeli, ki so opisani v naslednjem poglavju.

V slovenskem prostoru se z gojenjem urotelijskih *in vitro* sistemov ukvarjamo na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete v Ljubljani. V odlično opremljenem celičnem laboratoriju gojimo primarne in sekundarne kulture urotelijskih celic, trajne celične linije in tudi kulture urotelijskega tkiva, ki jih uporabljamo za študije diferenciacije in regeneracije urotelija, za študije načinov internalizacije učinkovin, citotoksičnos-

ti idr. Na modelih *in vitro* urotelijskih celic raziskujemo tudi načine medcelične komunikacije z membranskimi nanocevkami (34) ter z zunajceličnimi vezikli (35,36), kar je v zadnjem obdobju v središču raziskovalne pozornosti in naj bi imelo vlogo tudi pri rakavih boleznih. Ob tem je ključno, da imamo vzpostavljene poleg modelov trajnih celičnih linij papilarnih in metastazirajočih urotelijskih celic tudi modele normalnih kultur urotelijskih celic, ki jih lahko diferenciramo do visoke stopnje. To nam omogoča raziskovanje podobnosti in razlik v celičnih procesih, ki potekajo v normalnih in rakavo spremenjenih urotelijskih celicah, izdelovanje sokultur ter spremljanje relevantne interakcije med normalnimi in rakavimi celicami med karcinogenezo (npr. način pritrjevanja rakavih celic na normalne, potek medcelične komunikacije med njimi, način migracije rakavih celic med normalnimi).

2.2 Živalski modeli raka sečnega mehurja so ključni za predklinične študije

Živalske modeli predstavljajo osrednjo raziskovalno povezavo med preprostejšimi sistemi *in vitro* ter kliničnimi študijami s končno aplikacijo spoznanj pri ljudeh. Poglavitna prednost živalskih modelov je njihova kompleksnost, ki omogoča sorazmerno dobro simulacijo celičnih procesov pri ljudeh, hkrati pa še vedno obstaja možnost za nadzorovanje eksperimentalnih pogojev. Najpogosteje uporabljene vrste živalskih modelov raka mehurja so v Tabeli 3. Razdelimo jih lahko na več načinov, npr. glede na gensko ozadje rakavih celic in gostiteljske živali, na singenske (enako ozadje) in na ksenogenske (različno ozadje) modele, glede na položaj tumorja v poskusni živali pa na heterotopne in ortotopne modele. Heterotopni modeli raka mehurja so sicer z vidika vzpostavitve enostavnejši, saj se nasaditev suspenzije rakavih urotelijskih celic izvede z injek-

Tabela 3: Vrste živalskih modelov, ki se uporabljajo v predkliničnih raziskavah raka sečnega mehurja (povzeto po van Kessel et al.) (29).

	Vrsta modela	Primeri
Gensko ozadje	singenski modeli	spontano nastali rak kemijsko induciran rak transgeni modeli, mišji modeli, pripravljene z genskim inženirstvom
	ksenogenski modeli	presaditev celic iste živalske vrste v gostiteljsko žival presaditev celic druge živalske vrste v gostiteljsko žival
Položaj tumorja	ortotopni ksenogenski modeli	tuje ali lastne celice rastejo v živali na anatomski lokaciji, ki je enaka lokaciji, iz katere so bile celice izolirane
	heterotopni ksenogenski modeli	tuje ali lastne celice rastejo v živali na anatomski lokaciji, ki je različna od lokacije, iz katere so bile celice izolirane

cijo bodisi subkutano (pod kožo), intravensko (v repno veno) ali intraperitonealno (v trebušno votlino). Tumor se torej razvije na anatomski lokaciji v organizmu, ki se razlikuje od lokacije, iz katere so se celice izolirale, zaradi česar se poraja vprašanje, ali se tumor na različnih lokacijah v telesu razvija enako, kot bi se razvijal v organu, iz katerega rakave celice izvirajo (37). Zato je bolj primerna uporaba ortotopnih modelov, pri katerih z intravezikalno naseditvijo rakavih urotelijskih celic vnesemo le-te neposredno v sečni mehur (38).

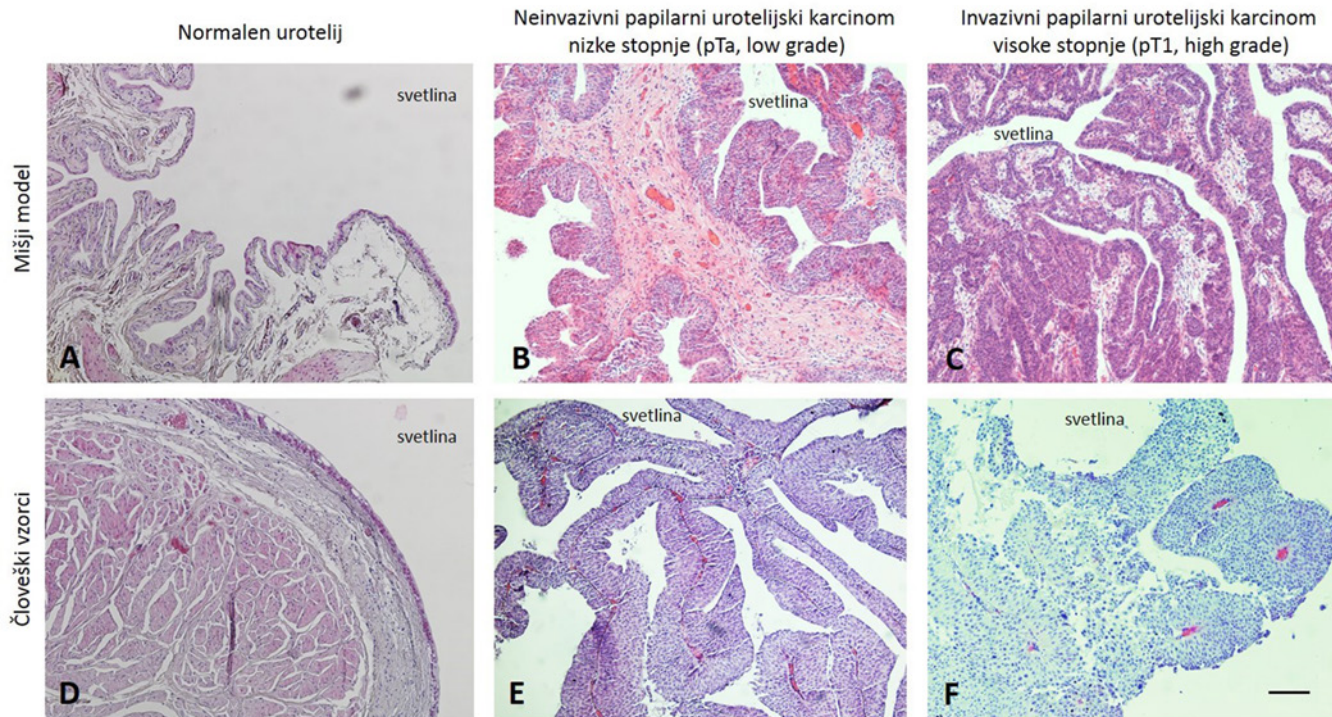
Prednost singenskih živalskih modelov je enotno gensko ozadje, saj se tumor razvije iz tkiva gostiteljske živali. Singenski modeli vključujejo poskusne živali, pri katerih tumorji nastanejo spontano ali jih inducirajo. Tumorje induciramo z določenimi kemikalijami (npr. 0,05-odstotnim N-butyl-N-(4-hidroksibutil) nitrozaminom (BBN)), z genskimi modifikacijami (npr. izbitje gena *p53* za supresorski protein za tumor P53) ali pa se uporabi kombinacija obojega. Spontano nastali tumorji pri glodavcih so zelo redki in so v več kot 99 % povezani z visoko starostjo (39). Znan je spontani model raka sečnega mehurja pri psih, pri katerih je spontano pojavljanje te bolezni podobno kot pri ljudeh (40). Pri psih gre najpogosteje za invazivni urotelijski karcinom visoke stopnje, ki je v svojih celičnih bioloških in molekularnih značilnostih, mestih in frekvencah metastaz ter odzivu na zdravljenje podoben človeškim invazivnim urotelijskim karcinomom. Pasji model je zato dobra dopolnitev mišjim in podganjim modelom raka mehurja (41). Največja prednost singenskih modelov je naravno makro- in mikrookolje tumorja, vključno z aktivnim imunskim sistemom poskusne živali.

Ksenogenski modeli raka mehurja so modeli, pri katerih uporabimo rakave

celice neke živalske vrste in jih presadimo v gostiteljsko žival druge vrste. S tem dosežemo, da so rakave celice bolj podobne raku donorskega organizma (npr. človeka), katerega biologija nas najbolj zanima. Pri presaditvi človeških rakavih celic v mehur poskusnih živali so nastale neoplazije načeloma bolj podobne raku mehurja pri ljudeh, kot če uporabimo (živalski) singenski model karcinogeneze. Vendar pa imajo ksenogenski modeli določene omejitve. Za njihovo uporabo je potrebno imeti živali z imunsko pomanjkljivostjo, s čimer omogočimo, da človeške rakave celice preživijo v tujem organizmu (42). Za čim boljšo ohranjenost heterogenosti tumorske arhitekture raka mehurja je najboljša neposredna presaditev svežega ksenografta iz bolnika v poskusno žival. Prva študija, ki opisuje metodo priprave ksenografta, pridobljenega iz bolnika, je bila objavljena leta 2015 (43), vendar se uporaba uveljavlja sorazmerno počasi. Kljub napredku v presajanju tujih ali lastnih rakavih urotelijskih celic ter razvoju najrazličnejših gensko spremenjenih modelnih živali se za predklinične študije še vedno najpogosteje uporabljajo kemijsko inducirani modeli raka mehurja.

2.2.1 Kemijsko inducirani rak sečnega mehurja

Najpogosteje uporabljani kemijski karcinogen za indukcijo raka mehurja, ki se uporablja še danes, je BBN (44). BBN se pogosto pojavlja v barvni industriji in je metabolni produkt različnih N-nitroso sestavin, ki so prisotne tudi v cigaretne dimu (45). Za z BBN inducirani model raka mehurja so bile narejene obsežne histološke, morfološke, celičnobiološke, molekularne in genetske analize ter primerjave s človeških rakom mehurja (46,47). Največja prednost BBN je odsotnost sistemske toksičnosti in



Slika 2: Parafinske rezine, obarvane s hematoksilinom in eozinom. Normalni mišji (A) in človeški (D) uroteliji.

Patohistologija mišjega modela raka mehurja, inducirane z BBN (B - 0,05 % BBN v pitni vodi 20 tednov; C - 0,05 % BBN v pitni vodi 20 tednov in nato še 15 tednov pitja vode brez BBN) in človeških vzorcev, primerljivih stopenj raka mehurja (E - pTa, low grade; F - pT1, high grade). Merilo: 200 µm.

indukcija izključno urotelijskih neoplazij (48), ki so po nastanku in časovnem poteku pojavljanja ekvivalentne človeškim urotelijskim neoplazijam (46,47).

Patološke in genetske podobnosti med modelom raka mehurja, induciranim z BBN, in človeško boleznijo uvrščajo ta model med najbolj primerne sisteme za študij različnih stopenj človeških urotelijskih neoplazij (Slika 2). Kot tak omogoča raziskave biologije urotelijskih rakavih celic in razvoja tumorjev s pomočjo slikovnih, genetskih, molekularnih, histoloških in elektronskomikroskopskih metod. Z BBN inducirani model raka mehurja pri glodavcih je tudi zelo uporaben za ovrednotenje novih načinov zdravljenja raka mehurja ter ciljanega vnosa zdravilnih učinkovin v rakave celice. Ta model se uporablja za določanje učinkovitosti zdravilnih učinkovin, ki se v organizem vnesejo intra-

vezikalno (s katetrom v sečni mehur) ali na druge načine, kot sta oralno ali intraperitonealno (27). Pred začetkom obravnave poskusnih živali je nujno potrebno potrditi, da so rakave urotelijske celice sposobne privzemanja zdravilne učinkovine, kar se običajno testira na celičnih kulturah.

BN inducira raka mehurja pri miših, podganah in psih, medtem ko se je pri hrčkih in prašičih izkazal kot šibek karcinogen (49,50). Najpogosteje se v raziskavah uporablja model BBN karcinogeneze pri miših in podganah, s katerimi je sorazmerno enostavno rokovati in jih imeti nastanjene, njihovo vzdrževanje pa je poceni. Psi se zaradi etičnih razlogov, cene in zahtevnejših pogojev nastanitve kot modelni sistemi karcinogeneze ne uporabljajo več (51).

BBN se vnese v žival v obliki 0,05-odstotne raztopine v pitni vodi, lahko pa

tudi 0,005-odstotne ali 0,5-odstotne, odvisno od seva miši oziroma podgan in stopnje želenega tumorja (52). Zaužiti BBN se presnavlja v jetrih, kjer encimski sistem alkohol/aldehid dehidrogenaze oksidira alkoholno skupino BBN v karboksilno skupino in nastane N-butil-N-(3-karboxipropil)-nitrozamin (BCPN). BCPN se izloča iz telesa z urinom, ki se skladišči v mehurju in na ta način pride v stik z urotelijem. BCPN je stabilna molekula, ki se kovalentno veže na urotelijske celice in je neposredno odgovorna za začetek procesa rakave preobrazbe (53).

Glede na mehanizem delovanja sodi BBN med genotoksične ali DNA-reaktivne karcinogene (54). BBN povzroči poškodbe molekul DNA v urotelijskih celicah in na ta način selektivno inducira raka mehurja pri miših in podganah (55). Intenziteta procesa karcinogeneze in stopnja, do katere se v določeni poskusni živali razvije rak mehurja (hiperplazija, displazija, CIS, neinvazivni papilarni urotelijski karcinom nizke in visoke stopnje, invazivni karcinomi), je odvisna od uporabljene koncentracije BBN, trajanja pitja vode z BBN (2–24 tednov), časovnega presledka od prenehanja pitja vode z BBN do evtanazije živali in odvzema urotelijskega tkiva ter vrste in seva živali. Pri mišji patogenezi pride običajno najprej do vnetnih procesov v lamini propriji pod urotelijem, čemur sledi displazija z urotelijsko metaplazijo različnih stopenj ali brez nje, nato nastopita CIS in invazivni karcinom (56). Metastaze pri mišjem modelu niso tipične, saj se živali zaradi obstruktivske uropatije evtanazirajo, preden pride do metastaziranja. Za razliko od mišjega modela je pri podganjem modelu rezultat obravnave z BBN skoraj izključno neinvazivni papilarni karcinom nizke in visoke stopnje. Med razvojem tumorjev je nujno opravljati redne telesne preglede poskusnih živali. Pri miših in podganah

se klasično uporabljata palpacija mehurja in pregled urina. Hematurija in otipljiva masa v sečnem mehurju sta znaka, ki se razvijeta šele pri poznih in napredujočih stopnjah raka. Za spremljanje razvoja tumorja so zato priporočljive neinvazivne *in vivo* metode slikanja, kot so UZ, endoskopija, cistoskopija in magnetno resonančno slikanje (MRI) ter računalniško podprta aksialna tomografija (CAT) in bioluminiscenca. Možnost uporabe teh metod slikanja omogoča natančno spremljanje in merjenje tumorjev ter s tem zmanjšanje števila živali, potrebnih za raziskavo. Poleg tega metode *in vivo* slikanja omogočajo tudi natančnejše spremljanje počutja živali in ugotavljanje stopnje njihovega trpljenja, kar omogoča zvestejše sledenje uveljavljenim etičnim pravilom, imenovanim 3Rs (*angl.* Replacement, Reduction, Refinement).

V Sloveniji smo na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete v Ljubljani s pomočjo mišjega in podganjega modela BBN analizirali spremenjeno izražanje uroplakinov (UP), ki so značilni za visoko diferencirane urotelijske celice (57). Poleg tega smo na modelih BBN proučevali selektivno vezavo lektinov (glikoproteinov, ki se specifično vežejo na določene sladkorne preostanke) na normalne in rakavo spremenjene urotelijske celice, kar bi lahko omogočilo izboljšano diagnosticiranje in ciljano zdravljenje raka mehurja (58).

2.2.2 Ortotopni modeli raka sečnega mehurja

Ortotopni modeli raka mehurja omogočajo široko paleto celičnobioloških raziskav rakavih celic znotraj gostiteljevega zdravega, normalno diferenciranega urotelija ter novih možnosti zdravljenja. Ksenogeni ortotopni modeli odlično posnemajo morfološke značilnosti človeških tumorjev, singenski

ortotopni modeli pa naravno sistemsko okolje organizma (imunski in hormonalni sistem). Izvedbeno so ortotopni modeli kar zahtevni in vključujejo dve fazi vzpostavljanja tumorja. V prvi je potrebno gojenje rakavih urotelijskih celic, ki so lahko človeškega, mišjega ali podganjega izvora, v ustreznih *in vitro* sistemih. V drugi fazi je potrebna uspešna nasaditev rakavih celic v ustrezno predpripravljeni sečni mehur živali. Pri tem je potrebno suspenzijo rakavih urotelijskih celic vnesti v svetlino mehurja, kar je možno izvesti z injekcijo pri odprti trebušni votlini ali pa z injiciranjem suspenzije celic po katetru skozi sečnico. Predpriprava mehurja pomeni, da zdrav, normalen urotelij gostiteljske živali prej kemijsko ali mehansko poškodujemo, sicer se rakave urotelijske celice nanj ne morejo pritrčiti (59). Po nasaditvi rakavih celic v žival je potrebno zdravstveno stanje le-teh redno spremljati in opravljati serijske preglede urina za primer hematurije ter ugotavljati, ali nastaja otipljiva tumorska masa v sečnem mehurju. Za spremljanje rasti tumorja se lahko uporabijo tudi v poglavju 2.2.1 omenjeni neinvazivne metode *in vivo* slikanja.

Ortotopni modeli raka mehurja imajo določene omejitve. Tako se npr. indukcija razvoja raka razlikuje od naravnega začetka bolezni pri ljudeh. Poleg tega se ne morejo izvajati raziskave ugotavljanja specifičnega imunskega odziva na zdravljenje v miših z imunsko pomanjkljivostjo, ki so potrebne v primerih ksenogenskih modelov. Tudi časovni okvir študij metastaziranja je pri ortotopnih modelih zelo omejen, saj pride pogosto do smrti poskusne živali zaradi obstrukcije sečnice, ki jo povzroči že primarni tumor pred nastankom invazivnega raka in metastaziranja. V primerih, ko pride do metastaziranja, pa se mesta metastaz poskusnih živali mnogokrat razlikujejo

od mest, ki so značilna za človeške urotelijske karcinome (60).

Pri singenskih ortotopnih modelih raka mehurja se v sečni mehur vsadijo rakave urotelijske celice iste živalske vrste. Najbolj znana sta podganji (61) in mišji model, pri katerih se presadijo rakave urotelijske celice istega seva živali (38). Slabost singenskih ortotopnih modelov je v tem, da gre za celične linije mišjih ali podganjih rakavih urotelijskih celic, katerih rakava preobrazba se kemijsko inducira, zaradi česar se razlikujejo od človeških rakavih urotelijskih celic. Poleg tega onkogene mutacije, ki so za nekatere človeške celične linije znane (na primer celice T24 – mutaciji *HRAS in TP53*, celice RT4 – mutacija *RHOA*, celice UMUC3 – mutacije *PTEN in KRAS*), niso znane za podganjo celično linijo AY-27 ter za mišji celični liniji MB49 in MBT-2 (29). Prednosti singenskih ortotopnih modelov raka mehurja pa so v tem, da so poskusne živali imunsko brezhibne in torej lahko raziskujemo rast tumorja in učinke različnih terapij v organu in organskem sistemu, kjer hormonski in imunološki procesi potekajo nemoteno. Čeprav je fiziološko stanje imunskega sistema teh poskusnih živali normalno in torej podobno stanju v človeškem organizmu, pa se je pri interpretaciji rezultatov potrebno zavedati medvrstnih razlik in razlik med spoloma (62). Na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete v Ljubljani smo uporabili singenski ortotopni mišji model, pri katerem smo nasadili mišje rakave urotelijske celice MB49 neposredno v mehur preko katetra. Uspešnost nasaditve se je povečala po predpripravi urotelija s poli-L-lizinom, s katerim se je večina visoko diferenciranih površinskih urotelijskih celic odluščila, tako da so se rakave celice lahko pritrdile na nediferencirane urotelijske celice in tvorile tumor (63). Histopatološka analiza teh

tumorjev je pokazala, da so podobni človeškemu karcinomom *in situ* (CIS).

2.2.3 Transgeni modeli – mišji modeli, pripravljene z genskim inženirstvom

Mišji modeli, pripravljene z genskim inženirstvom (*angl.* Genetically engineered mouse models, GEM ali GEMM) se v danes pogosto uporabljajo za različne raziskave biologije rakavih celic, vključno z analizo tumorskega fenotipa, modeliranje podtipov bolezni, mehanične raziskave kandidatnih genov in signalnih poti ter predklinična testiranja možnih zdravilnih učinkovin (64). Najpomembnejša prednost modelov GEM je, da se pri njih tumorji razvijejo na novo v mikrookolju urotelija podobno kot pri kemijsko induciranih modelih, hkrati pa so zasnovani na natančno opredeljenih genskih spremembah. Tako lahko študiramo vpliv spremenjenega, vendar poznanega izražanja genov na razvoj raka. Na drugi strani je neugodno to, da je opisanih sorazmerno malo modelov GEM za raka mehurja, še posebej takih z mišično invazivnim in/ali metastatskim fenotipom. Večina enojnih mutacij in tudi številne kombinacije mutacij se namreč zrcalijo kot majhne spremembe fenotipa (hiperplazija, CIS in neinvazivni papilarni urotelijski karcinomi) (65). Zaradi nedavnega opisa molekularnih sprememb, značilnih za raka mehurja, ki se lahko modelirajo v miših (66), bodo verjetno igrali modeli GEM vse pomembnejšo vlogo v prihodnosti.

Razvoj modelov GEM za raka mehurja se je pospešil po odkritju genov za uroplakine, ki so integralni transmembranski proteini, značilni predvsem za urotelijske celice (67,68). Promotor za mišji gen, ki kodira uroplakin II (UPII), se lahko namreč uporabi za nadzorovani vnos onkogenih mutacij v mišje urotelijske

celice. Najprej so promotor za UPII uporabili v kombinaciji z onkoproteinom SV40T, ki inaktivira tumor supresorska proteina p53 in pRb (protein retinoblastoma), za katera je znano, da sta pogosto mutirana v človeških rakavih urotelijskih celicah (69). Za transgene miši, ki so nastale na ta način, so značilni predvsem CIS in invazivni urotelijski karcinomi, izmed katerih nekateri tudi metastazirajo (69,70). Molekularni profil teh miši je podoben kot pri ljudeh (71).

Druge prednosti modelov GEM je visoka predvidljivost poteka tvorbe in razvoja tumorja, zaradi česar je lažje določiti specifične vplive na inhibiranje razvoja tumorja. Za modele GEM se običajno uporabljajo inbridirani sevi poskusnih živali, kar zelo zmanjša vplive različnih genskih ozadij na metabolizem zdravilnih učinkovin, na odziv tumorja in na odpornost tumorja na zdravilno učinkovino. Na teh modelih lahko raziskujemo tako inovativne terapevtske pristope kot tudi preventivne strategije in to na različnih stopnjah napredovanja tumorja (72).

Večina današnjih modelov GEM vključuje ciljan vnos genov v specifično tkivo. Vendar pa take modele raka mehurja vedno bolj zamenjuje sistem vnosa genov z aleli Cre, ki omogoča še bolj ciljani vnos genov, izključno v izbrani celični tip (65). Znano je, da pogojno aktiviranje β -katenina v mehurju z aleli Cre, ki so vezani na izražanje promotora gena *UPII* (imenovani UroII-Cre), povzroči hiperplazijo, skupaj z aktiviranjem genov *Hras* in *Kras* ali pa izgubo funkcije gena *Pten* pa neinvazivni papilarni urotelijski karcinom (72).

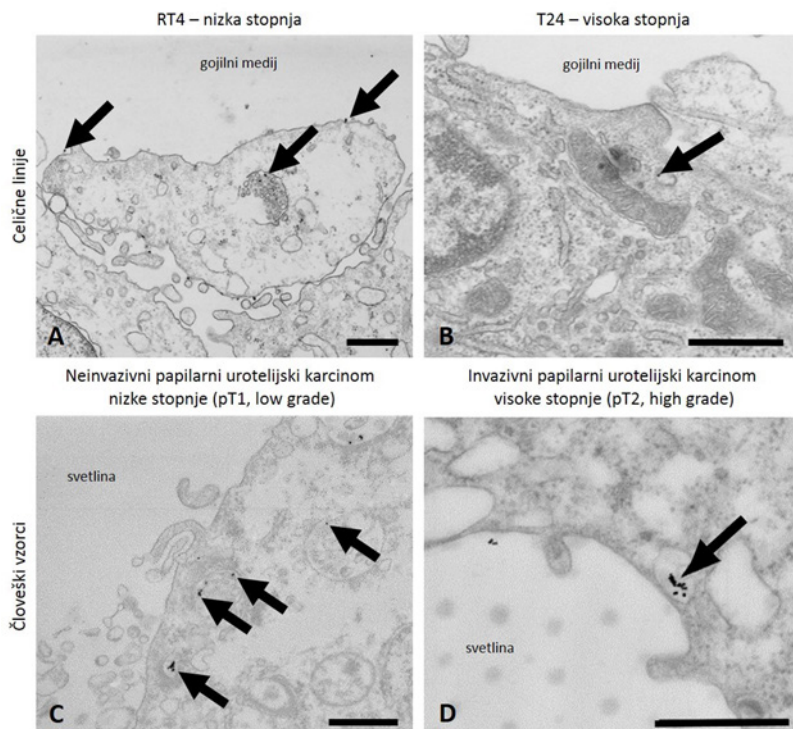
Druge metode za študij vpliva spremenjenega izražanja genov v uroteliju na razvoj in napredovanje raka mehurja je s pomočjo vnosa genov z adenovirusi. Za to je potrebna kateterizacija poskusne živali in vnos adenovirusov z

zapisom za želeni gen v svetlino sečnega mehurja (73). V praksi se največkrat uporabljajo mišje samičke; kateterizacija samčkov je namreč zaradi anatomije prostate in dolžine sečnice bolj zahtevna. Prednost vnosa genov z adenovirusi je možnost vnosa transgena (74) ali pa gena za rekombinazo Cre (tak sistem se imenuje Adeno-Cre), ki povzroči deležije glodavskih genov, označenih z mesti flox/flox (73). Poleg tega je ta živalski model sorazmerno poceni. Največja slabost sistema je nepopoln prenos virusne DNA ali RNA v genom urotelijskih celic in, v odvisnosti od uspešnosti prenosa, dolgotrajno čakanje na razvoj fenotipskih sprememb. Vendar pa predhodno tretiranje svetline mehurja z detergenti, kot sta natrijev dodecil sulfat (SDS) in dodecil- β -D-maltozid (DDM), izboljša učinkovitost vnosa virusne nukleinske kisline (74); verjetno zato, ker povzroči majhne poškodbe apikalne plazmaleme urotelijskih celic. S sistemom Adeno-Cre so inaktivirali gena za *Trp53* in *Pten* v urotelijskih celicah, zaradi česar se je razvil invazivni rak sečnega mehurja, ki je pogosto metastaziral (73). Nadaljnje raziskave modelov Adeno-Cre so potrdile njihovo uporabnost v predkliničnih študijah zdravljenja v mehurju z rapamicinom (75) in so osnova za klinične študije, namenjene oceni učinkovitosti intravazikalnega tretiranja z rapamicinom pri visoko tveganih zgodnjih stopnjah raka sečnega mehurja (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02009332>). Podobno so predklinične študije na tem modelu pokazale učinkovitost vnosa več različnih kemoterapevtikov skozi mehur, razporejenih po posebnem režimu. Tudi te raziskave so vodile do kliničnih študij, namenjenih oceni učinkovitosti obravnave na ljudeh (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02202772>). Ti primeri kažejo, da so lahko predklinične raziskave na modelih GEM uporabne pri testira-

nju učinkovitosti obetavnih novih zdravilnih učinkovin, a tudi pri optimizaciji načina vnosa teh učinkovin.

2.3 Človeški vzorci, pridobljeni z biopsijami

Zaradi pogostosti in visoke ponovljivosti urotelijskih neoplazij je treba prihodnje raziskave usmeriti v iskanje novih diagnostičnih pristopov ter v iskanje novih napovednih dejavnikov, kot je na primer analiza soodvisnosti različnih diagnostičnih in napovednih označevalcev. Še vedno nimamo dobrih napovednih označevalcev odzivanja tumorja, ki bi jih lahko učinkovito uporabili kot vodilo pri odločanju o najprimernejšem načinu zdravljenja. Zato je pri raku mehurja nujno dolgoročno kooperativno spremljanje bolnikov. Z ugotovitvijo, kateri označevalci so primerni za napovedovanje preživetja bolnika z rakom mehurja in napredovanja bolezni, oziroma katere od obravnavanih bolnikov bi bilo potrebno aktivno spremljati po operaciji in katere ne, bi zelo zmanjšali obremenitev zdravstvenega sistema. Za takšne študije so najprimernejši človeški vzorci, pridobljeni z biopsijo. Poleg celičnih kultur in živalskih modelov je namreč koristno preveriti, ali se določena nova zdravilna učinkovina lahko internalizira v človeške rakave urotelijske celice *in situ*. Na našem inštitutu smo s presewno elektronsko mikroskopijo analizirali selektivno endocitozo lektinov, označenih s koloidnim zlatom, v normalne in rakave urotelijske celice, gojene *in vitro*. Uporabili smo model normalnih prašičjih urotelijskih celic in dve celični liniji rakavih urotelijskih celic RT4 in T24. Normalne urotelijske celice lektinov niso endocitirale, medtem ko so rakave urotelijske celice endocitirale lektine (Slika 3). Nato smo endocitozo lektinov preverili tudi na človeških vzorcih



Slika 3: Presevna elektronska mikroskopija rakavih urotelijskih celic z endocitiranim lektinom jakalinom označenim s koloidnim zlatom. Celice celičnih linij RT4 (A) in T24 (B), ki so rasle v gojilnem mediju *in vitro*. Koloidno zlato, vezano na lektin jakalin (puščice), se nahaja na površini celic in v endocitotskih veziklih. Celice človeških vzorcev *ex vivo* so bile odvzete z biopsijami pri bolnikih z neinvazivnim papilarnim urotelijskim karcinomom nizke stopnje (C) in neinvazivnim papilarnim urotelijskim karcinomom visoke stopnje (D). Koloidno zlato, vezano na lektin jakalin (puščice), se nahaja v endocitotskih veziklih urotelijskih celic. Merilo: 500 nm.

takoj po biopsiji (tj. na vzorcih *ex vivo*) in ugotovili, da tudi te rakave urotelijske celice endocitirajo lektine (Slika 3 C, D). Ker smo endocitozo lektinov potrdili ne le na celičnih kulturah, pač pa tudi na človeških vzorcih, lahko iz teh raziskav zaključimo, da bi se lektini uporabljali lahko za ciljani vnos zdravilnih učinkovin v rakave urotelijske celice.

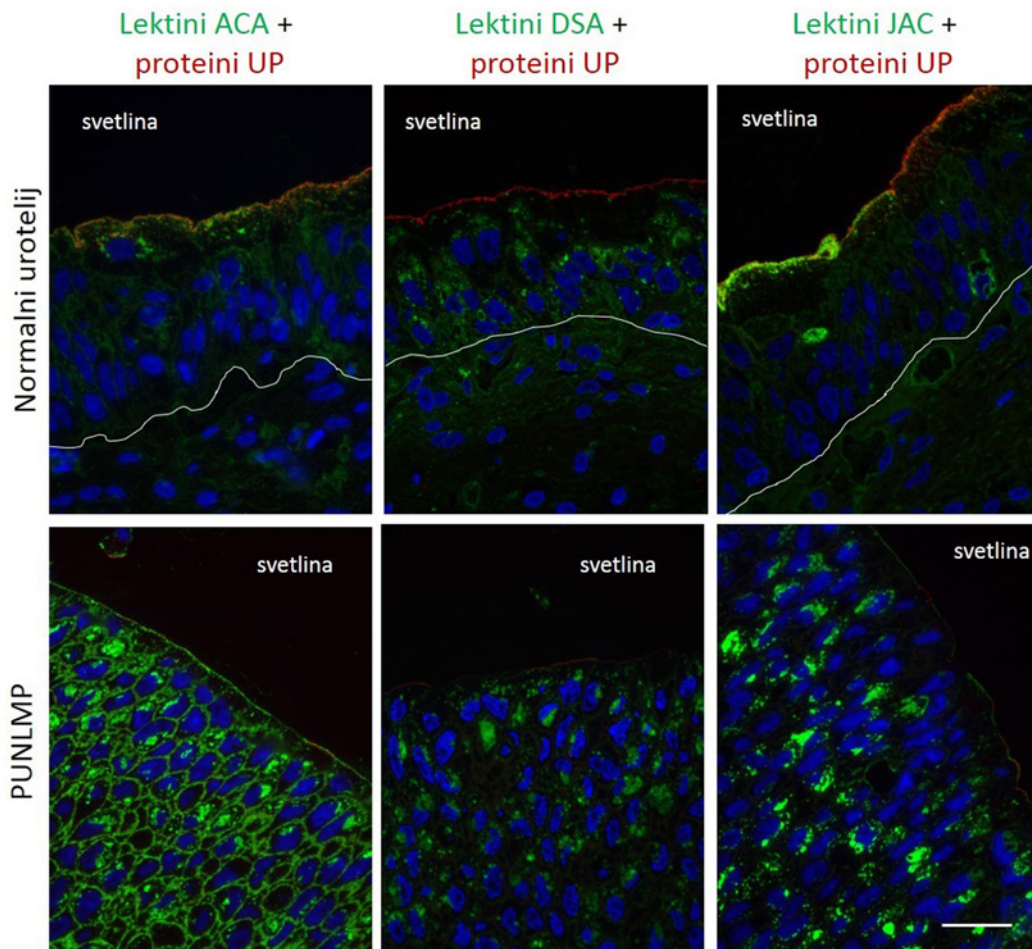
Za dolgoročno spremljanje bolnikov in retrospektivne študije so najbolj uporabni arhivirani človeški vzorci, pridobljeni z biopsijo, ki jih običajno vklaplamo v parafin, ali pa se zamrznejo in hranijo na -80°C . Na zamrznjenih

vzorcih je možno izvajati imunohisto-kemijska in ostala specifična označevanja ter tudi najrazličnejše molekularne, biokemijske in genetske analize. V Sloveniji se vsi parafinski bloki z vzorci bolnikov arhivirajo na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Ob pridobitvi ustreznega etičnega dovoljenja se lahko uporabijo za različne študije. Vzorci, ki so bili že uporabljeni v raziskovalne namene na Inštitutu za Biologijo celice Medicinske fakultete v Ljubljani, se hranijo pri nas. Gre za parafinske in eponske (za presevno elektronsko mikroskopijo) bloke, pa tudi zamrznjene, krioptanke in ultratanke rezine in zamrznjene vzorce za biokemijske analize ter posušene vzorce za vrstično elektronsko mikroskopijo.

3 Inovativni pristopi diagnosticiranja in zdravljenja

Trenutni načini zdravljenja raka mehurja predstavljajo običajno le kratkotrajno rešitev, saj se tumor pogosto ponovi. Najverjetnejši vzrok visoke ponovljivosti tumorjev mehurja je preživetje rakavih matičnih urotelijskih celic po resekciji in kemoterapiji s citostatiki. Ker konvencionalni načini zdravljenja s citostatiki delujejo le na proliferativne celice, lahko mirujoče rakave matične urotelijske celice preživijo. Razumevanje bioloških mehanizmov, ki kontrolirajo proliferacijo in diferenciacijo matičnih celic, bi lahko vodilo v razvoj inovativnih protirakavih strategij in njihovih kombinacij, ki bi uspešno odstranile populacije vseh tipov rakavih urotelijskih celic, tudi matičnih rakavih celic.

Poleg proteinskih označevalcev raka mehurja, kot so uroplakini in puriner-gični receptorji, se v zadnjem času vedno bolj raziskuje tudi spremenjene sladkorne preostanke proteinov. Spremembe v



Slika 4: Metoda združene lektinske histokemije in imunohistokemije (CLIH) na človeškem normalnem uroteliju in vzorcu papilarne urotelijske neoplazije nizkega malignega potenciala (PUNLMP). Z zelenim fluorokromom so označeni lektini (ACA – *Amaranthus caudatus* aglutinin, DSA – *Datura stramonium* aglutinin, JAC – jakalin). Z rdečim fluorokromom so označeni proteini uroplakini (UP). Bela črta predstavlja potek bazalne lamine. Merilo: 20 μ m.

sestavi sladkornih preostankov na površini celic so namreč klasičen znak rakave transformacije. Čeprav spremembe v glikozilaciji med rakavo transformacijo urotelija še niso dovolj natančno raziskane, velja, da vendarle povzročajo spremembe v interakcijah med celicami in z ligandi (76). Takšni ligandi so npr. lektini, ki imajo zaradi svoje specifične afinitete do vezave sladkornih preostankov tudi zmožnost označevanja ciljnih molekul. Zaradi svojih lastnosti so postali lektini zelo uporabni v raziskovalnem delu, saj omogočajo karak-

terizacijo in izoliranje glikoproteinov ter raziskovanje sladkornih preostankov in njihovega spreminjanja med rakavo transformacijo (77). Metoda, s katero označujemo sladkorne preostanke, se imenuje lektinska histokemija. Le-ta bi lahko predstavljala inovativni pristop pri diagnosticiranju in napovedovanju poteka bolezni. Neposredno soodvisnost med proteinskimi in sladkornimi označevalci je mogoče izvesti na isti tkivni rezini z združenim označevanjem sladkornih preostankov z lektinsko histokemijo in proteinov z imunohistokemijo

(Slika 4). To kombinirano metodo smo uvedli na Inštitutu za biologijo celice in jo poimenovali metoda združene lektinske histokemije in imunohistokemije (*angl.* Correlative Lectin- and Immuno-Histochemistry, CLIH). Uporabili smo kriopoltanke rezine človeškega normalnega urotelija in različnih urotelijskih neoplazij. Lektina ACA (*Amaranthus caudatus agglutinin*) in JAC (jakalin) sta se vezala na apikalno plazmalemo in apikalno citoplazmo dežnikastih celic, medtem ko se je lektin DSA (*Datura stramonium agglutinin*) vezal predvsem na vmesne celice normalnega urotelija (Slika 4). Protitelesa proti uroplakinom so označila apikalno plazmalemo dežnikastih celic, v katerih je prišlo do kolokalizacije uroplakinov z lektinoma ACA in JAC. Pri vzorcu papilarne urotelijske neoplazije nizkega malignega potenciala (PUNLMP) so bile z vsemi tremi lektini močno označene vmesne celice, torej je bila označba drugačna kot pri normalnem uroteliju (Slika 4). Imunohistokemija uroplakinov je bila negativna (Slika 4). Ker CLIH omogoča sočasno umeščanje sladkornih preostankov in proteinov, bi lahko dodatno prispevala k izboljššanemu diagnosticiranju. Prav tako se lektini uporabljajo v raziskavah ciljanega vnosa zdravil v rakave celice (Slika 3), kar bi lahko pripomoglo k učinkovitejšim strategijam zdravljenja raka mehurja. Poleg lektinov smo na našem inštitutu testirali uporabnost nanodiamantov (78), kombinacije UV-sevanja in nanodelcev iz titanijevega oksida (79) ter hitozana (80). Vsi inovativni načini zdravljenja raka mehurja so se izkazali kot potencialno uporabni.

4 Zaključek

Trenutno nobeno sredstvo za ciljani vnos zdravilnih učinkovin v rakave celice, ki ima dovoljenje za zdravljenje rakavih bolezni, še ni v uporabi za zdravljenje raka sečnega mehurja. Poleg tega so imele že zaključene klinične študije zelo omejene uspehe, pogosto zaradi pomanjkanja učinkovitosti in zaradi obsežnih stranskih učinkov (29). Na drugi strani pa nova sredstva za ciljani vnos zdravilnih učinkovin in določene inovativne tehnologije vlivajo upanje za večjo učinkovitost zdravljenja v prihodnosti. Opisani raziskovalni modeli so pri tem osnova za predklinične in klinične raziskave, ki bodo omogočile večjo uspešnost odkrivanja, znižanje ponovljivosti in učinkovitejše zdravljenja raka sečnega mehurja.

5 Zahvala

Avtorja se zahvaljujeva doc. dr. Tomažu Smrkolju, dr. med., in Igorju Sterletu, dr. med., s Kliničnega oddelka za urologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, in vsem bolnikom, ki so darovali biopsijske vzorce raka sečnega mehurja v raziskovalne namene. Najlepša hvala tudi prof. dr. Petru Veraniču, predstojniku Inštituta za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani za pregled članka in konstruktivne pripombe. Delo je nastalo v okviru raziskovalnega programa št. P3-0108, infrastrukturnega programa št. MRIC UL IP-0510 in projekta št. J3-7494, ki jih je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.

Literatura

1. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol.* 2017;71(1):96–108.

2. Casilla-Lennon MM, Choi SK, Deal AM, Bensen JT, Narang G, Filippou P, et al. Financial Toxicity among Patients with Bladder Cancer: Reasons for Delay in Care and Effect on Quality of Life. *J Urol*. 2018;199(5):1166–73.
3. Siegel S, Noblett K, Mangel J, Bennett J, Griebing TL, Sutherland SE, et al. Five-Year Followup Results of a Prospective, Multicenter Study of Patients with Overactive Bladder Treated with Sacral Neuromodulation. *J Urol*. 2018;199(1):229–36.
4. Park S, Jee SH, Shin HR, Park EH, Shin A, Jung KW, et al. Attributable fraction of tobacco smoking on cancer using population-based nationwide cancer incidence and mortality data in Korea. *BMC Cancer*. 2014;14(1):406.
5. Ng M, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Dwyer-Lindgren L, Thomson B, et al. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980–2012. *JAMA*. 2014;311(2):183–92.
6. Moolgavkar SH, Stevens RG. Smoking and cancers of bladder and pancreas: risks and temporal trends. *J Natl Cancer Inst*. 1981;67(1):15–23.
7. Eriksen M, Mackay J, Schluger N, Islami Gomeshtapeh F, Drope J. *The tobacco atlas*. 5th ed. New York: American Cancer Society; 2015.
8. Coglian VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, et al. Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(24):1827–39.
9. Steinmaus C, Miller MD, Cushing L, Blount BC, Smith AH. Combined effects of perchlorate, thiocyanate, and iodine on thyroid function in the National Health and Nutrition Examination Survey 2007–08. *Environ Res*. 2013;123:17–24.
10. Antonova O, Toncheva D, Grigorov E. Bladder cancer risk from the perspective of genetic polymorphisms in the carcinogen metabolizing enzymes. *J BUON*. 2015;20(6):1397–406.
11. Jost SP, Gosling JA, Dixon JS. The morphology of normal human bladder urothelium. *J Anat*. 1989;167:103–15.
12. Ovčak Z. Klasifikacija urotelnih tumorjev sečnega mehurja WHO/ISUP (WHO/ISUP classification of the urothelial tumors of the urinary bladder). *Zdr Vestn*. 2005;74:529–33.
13. Mertens LS, Neuzillet Y, Horenblas S, van Rhijn BW. Landmarks in non-muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2014;11(8):476–80.
14. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK; Bladder Consensus Conference Committee. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(12):1435–48.
15. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BW, Compérat E, et al.; European Association of Urology. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol*. 2013;64(4):639–53.
16. Herr HW, Donat SM. Quality control in transurethral resection of bladder tumours. *BJU Int*. 2008;102(9b):1242–6.
17. Shariat SF, Karakiewicz PI, Palapattu GS, Lotan Y, Rogers CG, Amiel GE, et al. Outcomes of radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: a contemporary series from the Bladder Cancer Research Consortium. *J Urol*. 2006;176(6 Pt 1):2414–22.
18. Griffiths G, Hall R, Sylvester R, Raghavan D, Parmar MK; International Collaboration of Trialists; et al. International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2171–7.
19. Nomura S, Suzuki Y, Takahashi R, Terasaki M, Kimata R, Hamasaki T, et al. Snail expression and outcome in T1 high-grade and T2 bladder cancer: a retrospective immunohistochemical analysis. *BMC Urol*. 2013;13(1):73.
20. Stein JP, Skinner DG. Radical cystectomy for invasive bladder cancer: long-term results of a standard procedure. *World J Urol*. 2006;24(3):296–304.
21. Abdollah F, Gandaglia G, Thuret R, Schmitges J, Tian Z, Jeldres C, et al. Incidence, survival and mortality rates of stage-specific bladder cancer in United States: a trend analysis. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(3):219–25.
22. DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*. 2008;68(21):8643–53.
23. Ghosh M, Brancato SJ, Agarwal PK, Apolo AB. Targeted therapies in urothelial carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2014;26(3):305–20.
24. Gerlinger M, Catto JW, Orntoft TF, Real FX, Zwarthoff EC, Swanton C. Intratumour heterogeneity in urologic cancers: from molecular evidence to clinical implications. *Eur Urol*. 2015;67(4):729–37.
25. Kamat AM, Tharakan ST, Sung B, Aggarwal BB. Curcumin potentiates the antitumor effects of Bacillus Calmette-Guerin against bladder cancer through the downregulation of NF-kappaB and upregulation of TRAIL receptors. *Cancer Res*. 2009;69(23):8958–66.
26. Kreft ME, Hudoklin S, Sterle M. Establishment and characterization of primary and subsequent subcultures of normal mouse urothelial cells. *Folia Biol (Praha)*. 2005;51(5):126–32.
27. Višňar T, Kocbek P, Kreft ME. Hyperplasia as a mechanism for rapid resealing urothelial injuries and maintaining high transepithelial resistance. *Histochem Cell Biol*. 2012;137(2):177–86.
28. Masters JR, Petzoldt JL. *In vitro* studies on the pathogenesis of bladder cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1993;77:157–60.
29. van Kessel KE, Zuiverloon TC, Alberts AR, Boormans JL, Zwarthoff EC. Targeted therapies in bladder cancer: an overview of *in vivo* research. *Nat Rev Urol*. 2015;12(12):681–94.
30. Sens DA, Park S, Gurel V, Sens MA, Garrett SH, Somji S. Inorganic cadmium- and arsenite-induced malignant transformation of human bladder urothelial cells. *Toxicol Sci*. 2004;79(1):56–63.

31. DeBerardinis RJ, Thompson CB. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? *Cell*. 2012;148(6):1132–44.
32. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev*. 1998–1999;17(3):279–84.
33. Kyker KD, Culkin DJ, Hurst RE. A model for 3-dimensional growth of bladder cancers to investigate cell-matrix interactions. *Urol Oncol*. 2003;21(4):255–61.
34. Resnik N, Prezelj T, De Luca GM, Manders E, Polishchuk R, Veranič P, et al. Helical organization of microtubules occurs in a minority of tunneling membrane nanotubes in normal and cancer urothelial cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):17133.
35. Ogorevc E, Hudoklin S, Veranič P, Kralj-Iglič V. Extracellular vesicle-mediated transfer of membranous components from the highly malignant T24 urinary carcinoma cell line to the non-malignant RT4 urinary papilloma cell line. *Protoplasma*. 2014;251(3):699–702.
36. Lainšček D, Kadunc L, Keber MM, Bratkovič IH, Romih R, Jerala R. Delivery of an Artificial Transcription Regulator dCas9-VPR by Extracellular Vesicles for Therapeutic Gene Activation. *ACS Synth Biol*. 2018;7(12):2715–25.
37. Ibrahim EH, Nigam VN, Brailovsky CA, Madarnas P, Elhilali M. Orthotopic implantation of primary N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide-induced bladder cancer in bladder submucosa: an animal model for bladder cancer study. *Cancer Res*. 1983;43(2):617–22.
38. Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, et al. Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res*. 1999;59(12):2834–7.
39. Clayson DB, Fishbein L, Cohen SM. Effects of stones and other physical factors on the induction of rodent bladder cancer. *Food Chem Toxicol*. 1995;33(9):771–84.
40. Knapp DW, Henry CJ, Widmer WR, Tan KM, Moore GE, Ramos-Vara JA, et al. Randomized trial of cisplatin versus firocoxib versus cisplatin/firocoxib in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Intern Med*. 2013;27(1):126–33.
41. Knapp DW, Ramos-Vara JA, Moore GE, Dhawan D, Bonney PL, Young KE. Urinary bladder cancer in dogs, a naturally occurring model for cancer biology and drug development. *ILAR J*. 2014;55(1):100–18.
42. Sausville EA, Burger AM. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res*. 2006;66(7):3351–4.
43. Jäger W, Xue H, Hayashi T, Janssen C, Awrey S, Wyatt AW, et al. Patient-derived bladder cancer xenografts in the preclinical development of novel targeted therapies. *Oncotarget*. 2015;6(25):21522–32.
44. Matsuo T, Miyata Y, Asai A, Sagara Y, Furusato B, Fukuoka J, et al. Green Tea Polyphenol Induces Changes in Cancer-Related Factors in an Animal Model of Bladder Cancer. *PLoS One*. 2017;12(1):e0171091.
45. Slocum SL, Kensler TW. Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch Toxicol*. 2011;85(4):273–84.
46. Gofrit ON, Birman T, Dinaburg A, Ayesh S, Ohana P, Hochberg A. Chemically induced bladder cancer—a sonographic and morphologic description. *Urology*. 2006;68(1):231–5.
47. Ariel I, Ayesh S, Gofrit O, Ayesh B, Abdul-Ghani R, Pizov G, et al. Gene expression in the bladder carcinoma rat model. *Mol Carcinog*. 2004;41(2):69–76.
48. Bertram JS, Craig AW. Specific induction of bladder cancer in mice by butyl-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and the effects of hormonal modifications on the sex difference in response. *Eur J Cancer*. 1972;8(6):587–94.
49. Kunze E, Chowanec J. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the urinary bladder. *IARC Sci Publ*. 1990(99):345–97.
50. Okajima E, Hiramatsu T, Hirao K, Ijuin M, Hirao Y, Babaya K, et al. Urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in dogs. *Cancer Res*. 1981;41(5):1958–66.
51. Vasconcelos-Nóbrega C, Colaço A, Lopes C, Oliveira PA. Review: BBN as an urothelial carcinogen. *In Vivo*. 2012;26(4):727–39.
52. Tsuda H, Miyata Y, Hagiwara A, Hasegawa R, Shirai T, Ito N. Damage and repair of DNA in urinary bladder epithelium of rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gan*. 1977;68(6):781–3.
53. Airolidi L, Magagnotti C, Bonfanti M, Fanelli R. Alpha-oxidative metabolism of the bladder carcinogens N-nitrosobutyl(4-hydroxybutyl)amine and N-nitrosobutyl(3-carboxypropyl)amine within the rat isolated bladder. *Carcinogenesis*. 1990;11(8):1437–40.
54. Cohen SM, Ohnishi T, Clark NM, He J, Arnold LL. Investigations of rodent urinary bladder carcinogens: collection, processing, and evaluation of urine and bladders. *Toxicol Pathol*. 2007;35(3):337–47.
55. Cohen SM. Urinary bladder carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 1998;26(1):121–7.
56. Ohtani M, Kakizoe T, Nishio Y, Sato S, Sugimura T, Fukushima S, et al. Sequential changes of mouse bladder epithelium during induction of invasive carcinomas by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer Res*. 1986;46(4 Pt 2):2001–4.
57. Zupančič D, Ovčak Z, Vidmar G, Romih R. Altered expression of UPIa, UPIb, UPII, and UPIIIa during urothelial carcinogenesis induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats. *Virchows Arch*. 2011;458(5):603–13.
58. Zupančič D, Kreft ME, Romih R. Selective binding of lectins to normal and neoplastic urothelium in rat and mouse bladder carcinogenesis models. *Protoplasma*. 2014;251(1):49–59.
59. Chan ES, Patel AR, Smith AK, Klein JB, Thomas AA, Heston WD, et al. Optimizing orthotopic bladder tumor implantation in a syngeneic mouse model. *J Urol*. 2009;182(6):2926–31.
60. Sengeløv L, Kamby C, von der Maase H. Pattern of metastases in relation to characteristics of primary tumor and treatment in patients with disseminated urothelial carcinoma. *J Urol*. 1996;155(1):111–4.

61. Xiao Z, McCallum TJ, Brown KM, Miller GG, Halls SB, Parney I, et al. Characterization of a novel transplantable orthotopic rat bladder transitional cell tumour model. *Br J Cancer*. 1999;81(4):638–46.
62. Marks P, Soave A, Shariat SF, Fajkovic H, Fisch M, Rink M. Female with bladder cancer: what and why is there a difference? *Transl Androl Urol*. 2016;5(5):668–82.
63. Erman A, Kapun G, Novak S, Pavlin M, Dražič G, Drobne D, et al. How cancer cells attach to urinary bladder epithelium in vivo: study of the early stages of tumorigenesis in an orthotopic mouse bladder tumor model. *Histochem Cell Biol*. 2019;151(3):263–73.
64. Abate-Shen C, Pandolfi PP. Effective utilization and appropriate selection of genetically engineered mouse models for translational integration of mouse and human trials. *Cold Spring Harb Protoc*. 2013;2013(11):pdb.top078774.
65. Kobayashi T, Owczarek TB, McKiernan JM, Abate-Shen C. Modelling bladder cancer in mice: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(1):42–54.
66. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014;507(7492):315–22.
67. Wu XR, Lin JH, Walz T, Häner M, Yu J, Aebi U, et al. Mammalian uroplakins. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. *J Biol Chem*. 1994;269(18):13716–24.
68. Wu XR, Manabe M, Yu J, Sun TT. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation. *J Biol Chem*. 1990;265(31):19170–9.
69. Zhang ZT, Pak J, Shapiro E, Sun TT, Wu XR. Urothelium-specific expression of an oncogene in transgenic mice induced the formation of carcinoma in situ and invasive transitional cell carcinoma. *Cancer Res*. 1999;59(14):3512–7.
70. Ayala de la Peña F, Kanasaki K, Kanasaki M, Tangirala N, Maeda G, Kalluri R. Loss of p53 and acquisition of angiogenic microRNA profile are insufficient to facilitate progression of bladder urothelial carcinoma in situ to invasive carcinoma. *J Biol Chem*. 2011;286(23):20778–87.
71. Stone R, Sabichi AL, Gill J, Lee IL, Adegboyega P, Dai MS, et al. Identification of genes correlated with early-stage bladder cancer progression. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(6):776–86.
72. Wu XR. Biology of urothelial tumorigenesis: insights from genetically engineered mice. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(3–4):281–90.
73. Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, et al. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev*. 2009;23(6):675–80.
74. Ramesh N, Memarzadeh B, Ge Y, Frey D, VanRoey M, Rojas V, et al. Identification of pretreatment agents to enhance adenovirus infection of bladder epithelium. *Mol Ther*. 2004;10(4):697–705.
75. Seager CM, Puzio-Kuter AM, Patel T, Jain S, Cordon-Cardo C, McKiernan J, et al. Intravesical delivery of rapamycin suppresses tumorigenesis in a mouse model of progressive bladder cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2(12):1008–14.
76. Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J*. 1997;14(5):569–76.
77. Višnjar T, Romih R, Zupančič D. Lectins as possible tools for improved urinary bladder cancer management. *Glycobiology*. 2019;29(5):355–65.
78. Zupančič D, Kreft ME, Grdadolnik M, Mitev D, Igljič A, Veranič P. Detonation nanodiamonds are promising nontoxic delivery system for urothelial cells. *Protoplasma*. 2018;255(1):419–23.
79. Imani R, Veranič P, Igljič A, Kreft ME, Pazoki M, Hudoklin S. Combined cytotoxic effect of UV-irradiation and TiO₂ microbeads in normal urothelial cells, low-grade and high-grade urothelial cancer cells. *Photochem Photobiol Sci*. 2015;14(3):583–90.
80. Erman A, Veranič P. The Use of Polymer Chitosan in Intravesical Treatment of Urinary Bladder Cancer and Infections. *Polymers (Basel)*. 2018;10(3):E265.