



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ivan Milas

**FENOTIP I GENOTIP ABO SUSTAVA
KRVNIH GRUPA KAO ČIMBENICI
RIZIKA U POJAVNOSTI KARCINOMA
MOKRAĆNOG MJEHURA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ivan Milas

DOKTORSKI RAD

**FENOTIP I GENOTIP ABO SUSTAVA
KRVNIH GRUPA KAO ČIMBENICI
RIZIKA U POJAVNOSTI KARCINOMA
MOKRAĆNOG MJEHURA**

Mentori:

Akademik Željko Kaštelan

Prof. dr. sc. József Petrik

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivan Milas

**PHENOTYPE AND GENOTYPE OF ABO
BLOOD GROUP SYSTEM AS A RISK
FACTORS IN THE INCIDENCE OF
BLADDER CANCER**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

F.C.A. Željko Kaštelan, PhD

Prof József Petrik, PhD

Zagreb, 2025.

Rad je izrađen pod mentorstvom akademika Željka Kaštelana i prof. dr. sc. Józsefa Petrika, na Klinici za urologiju KBC Zagreb i Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, u sklopu poslijediplomskog doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvala

Hvala mentoru akademiku Željku Kaštelanu na potpori, savjetima i poticanju u radu tijekom doktorskog studija i izrade disertacije. Hvala sumentoru prof.dr Józsefu Petriku na korisnim savjetima i poticanju tokom izrade rada.

Hvala svim djelatnicima Odjela za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu na pomoći u genotipizaciji uzoraka i izradi eksperimentalnog dijela rada.

Hvala kolegama i djelatnicima Kliničkog zavoda za rekonstruktivnu i renovaskularnu urologiju KBC Zagreb na svesrdnoj pomoći u prikupljanju uzoraka i korisnim savjetima.

Hvala kolegi i kumu doc.dr. Andreju Šribaru na statističkoj obradi podataka.

Hvala mojim roditeljima i sestri.

Hvala supruzi Slavenki na razumijevanju i bezuvjetnoj potpori.

Hvala mojim dečkima Petru i Matiji što mi pružaju motivaciju kroz život i zbog kojih sve ovo ima smisla.

Sažetak

Karcinom mokraćnog mjehura (KMM) je među deset najčešće dijagnosticiranih zloćudnih bolesti u svijetu. Njegova pojavnost je povezana s međudjelovanjem genetskih i okolišnih čimbenika. Razmatrani su mnogi biljezi kao potencijalni rizični čimbenici u njegovu nastanku, a jedan od njih je i ABO sustav krvnih grupa (ABO) koji je etabliran kao sustav s najizraženijim imunološkim odgovorom. Prethodna istraživanja temelje se na teoriji da antigeni krvnih grupa sudjeluju kao signalne molekule direktno ili indirektno putem medijatora na staničnu proliferaciju i tumorigenezu. Unatoč brojnim istraživanjima rezultati su kontradiktorni i točan mehanizam djelovanja nije utvrđen.

Cilj istraživanja je uz antigene (fenotipove), analizirati i genotipove i alele ABO kao čimbenike rizika za pojavnost, proširenost, stupanj malignosti i recidiviranje KMM. Istraživanjem parova je obuhvaćeno 326 bolesnika oboljelih od KMM i 142 dobrovoljna darivatelja krvi kao kontrolna skupina. Ispitanicima je uz standardnu serologiju rađena i genotipizacija 5 alela (O1, O2, A1, A2, B) pomoću lančane reakcije polimerazom sa početnicama specifičnim za određene sekvence.

Istraživanje je identificiralo genotipove **O1A2**, **A2A2** i **O1O2** kao čimbenike rizika za pojavnost bolesti i **O1O1** kao zaštitni uz statističku značajnost ($P < 0,001$). Na razini alela **A2** i **O2** su čimbenici rizika za pojavnost bolesti, dok je alel **O1** zaštitni također uz statističku značajnost ($P < 0,001$).

Ova studija pokazuje da određeni genotipovi i aleli ABO mogu biti povezani s rizikom i prognozom KMM. Provedena analiza može unaprijediti dijagnostiku, stratifikaciju rizika i ciljane terapijska rješenja te potaknuti daljnja istraživanja.

Ključne riječi: ABO, karcinom mokraćnog mjehura, fenotip, genotip, aleli

Extended abstract:

Many biomarkers were studied as risk factors in the development of malignant diseases, and one of them is ABO blood group system (ABO). Blood type is an inherited system characteristic and during last few decades many studies tried to correlate the link between the expression of histo-blood group antigens and tumorigenesis. Since the genome for the ABO was identified research has expanded to the genotypes and allele levels. Despite numerous attempts correlation remained unclear both at the level of antigen and genotype.

Bladder cancer (BC) is the 7th most commonly diagnosed cancer in males, whilst it drops to 10th position when both genders are considered. The most well-established risk factor for BC is active and passive tobacco smoking. The most common presenting complaint for BC is painless visible hematuria. Ultimately, the diagnosis of BC is made by cystoscopy and histological evaluation of resected tissue. According the World Health Organisation classification in more than 90% cases of BC is manifested histologically as urothelial carcinoma. In clinical practice, tumor, stage and histopathological grade are used to guide treatment and determine prognosis and multi-slice computed tomography (MSCT) is essential for local/distant staging of disease.

Since the early 20th century serological methods have remained standard for detection of ABO thanks to Karl Landsteiner. Today, we know that the gene that determines the blood group encodes a glycosyltransferase (GT) with three main allelic forms: A, B and O and is positioned on chromosome 9q34. The A, B and O GT transfer N-acetylgalactosamine, D galactose, and no sugar residue, to a protein known as H antigen, which is expressed on the surface of red blood cells and other tissues through the body.

Blood group antigen MUTation Database stores genes of human blood group systems using single-nucleotide polymorphisms (SNPs). SNP or RS represents a single base substitution present at a specific location of the gene, which we can use to identify a specific gene region.

For the purpose of ABO genotyping, the following sequences of SNPs have been identified: rs 507666 as the perfect surrogate for type A1, rs687289 as a marker for the O allele, rs 8176746 for the B allele, and rs8176704 for the A2 allele.

Aim

The aim of our research is to evaluate the association between ABO antigens/alleles and the risk for urinary BC. In addition we examined the association between the ABO and tumor grade, clinical stage, and incidence of disease recurrence in superficial bladder tumors.

Materials and methods:

Study Participants

The case-control study group comprised 326 patients who underwent surgery for a urinary bladder tumor at the Urology Clinic, University Clinical Hospital Centre Zagreb, in 2020 till 2023. The study received approval from the Ethics Committee number: 02/21 AG from November 2, 2020, and all procedures were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines. Preoperative blood samples were taken from the patients who had given signed consent. Laboratory analysis of the ABO genotype was analyzed by the Department of Molecular Diagnostics at the Croatian Institute of Transfusion Medicine. The control group comprised 142 asymptomatic and healthy (female and male) blood donors without a medical history of tumors. The median age of the participants in disease group was 72, and in the control group was 51 years. All participants in the control group resided in the same geographic region.

A transurethral resection or radical cystectomy was performed in patients with a BC. Specimens were processed according to standard histopathological procedures and evaluated by experienced uropathologists in a high-volume centre. The tumors were histologically graded as high grade and low grade and then divided into four groups: superficial, non-muscle invasive, muscle invasive, and metastatic tumors. The clinical stage of the disease was tagged according to the Tumor Node Metastasis classification system. For detecting distant disease multi-slice computed tomography was used.

ABO genotyping

Genomic deoxyribonucleic acid (DNA) isolation from ethylenediamine tetraacetic acid blood samples was performed using the commercial QIAmp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). ABO genotyping to given basic ABO alleles (O1, O2, A1, A2, B) and 15 genotypes was done by using the Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers in 8 parallel reactions to amplify exons 6 and 7 of the ABO blood group gene.

The presence of a gene fragment of the human growth hormone (as an internal control) in each SSP reaction showed that amplification was successful. The ABO alleles and genotypes were named according to the nomenclature used by Yamamoto.

Results:

The obtained results showed that no statistically significant difference was found among groups at the phenotypic level (antigens), and no statistically significant association was found between genotypes and alleles as potential markers for disease severity, grade, and recurrence. However, at the genotype level, the results indicated O1A2, A2A2, and O1O2 as risk factors for disease occurrence, and O1O1 as a protective genotype with statistical significance ($P < 0.001$). At the allele level, A2 and O2 were risk factors for disease occurrence, while allele O1 was protective, also with statistical significance ($P < 0.001$).

Conclusion:

This study provides an analysis of the association between ABO phenotype, genotype and alleles in patients with BC. Our results suggest associations and potential role of specific ABO genotypes and alleles as biomarkers in occurrence of BC. Our study is among the first to assess the risk factors for BC at the level of ABO genotypes and alleles, which can provide more detailed information related to individual alleles as possible hereditary factors for the occurrence of BC. Understanding the genetic basis of BC can contribute to improving diagnostics, risk stratification, and targeted therapeutic interventions.

Keywords : ABO blood group system, bladder cancer, phenotype, genotype, allele

KRATICE:

5'-UTR 5'neprevedeni kraj (engl. *5' untranslated region*)

ABO ABO sustav krvnih grupa

BCG Bacillus Calmette-Guérin otopina za intravezikalnu instilaciju

CD (engl. *Cluster of differentiation*)

CI interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

CIS karcinom in situ (engl. *carcinoma in situ*)

CUETO Španjolsko urološko društvo (španj. *Club Urologico Espanol de Tratamiento*)

DNA deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

EAU Europsko urološko društvo (engl. *European Association of Urology*)

EB cjelovito, u bloku (fr. *en-bloc*)

EDTA etilendiaminotetraoctena kiselina (eng. *ethylenediamine tetraacetic acid*)

EGFR receptor čimbenika rasta epidermisa (eng. *epidermal growth factor receptor*)

EORTIC Europska organizacija za istraživanje i liječenje karcinoma (engl. *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*)

FD fotodinamska dijagnostika

Fuc fukoza

FUT fukoziltransferaza

G gradus

Gal galaktoza

GalNAc N-acetilgalaktozamin

GT glikoziltransferaza

GWAS cjelogenomske studije povezanosti (engl. *Genome-Wide Association Studies*)

H H antigen

HG visoki gradus (eng. *High grade*)

HR omjer šansi za događaj u jednoj skupini u usporedbi s drugom (engl. *Hazard ratio*, HR)

HZTM Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

ICAM solubilna međustanična adhezijeska molekula (engl. *intercellular adhesion molecule*)

KBC Klinički bolnički centar

KH-1 tumor specifičan antigen koji se ispoljava se na adenokarcinomima

KMM karcinom mokraćnog mjehura

Le Lewis antigen

LG niski gradus (eng.*Low grade*)

lncRNA dugačke nekodirajuće ribonukleinske kiseline (engl. *long non-coding ribonucleic acid*)

LVI limfovaskularna invazija

miRNA mikro ribonukleinska kiselina (eng.*micro messenger ribonucleic acid*)

mPMR multiparametrijska magnetska rezonanca

mRNA glasnička ribonukleinska kiselina (eng.*messenger ribonucleic acid*)

MSCT višeslojna kompjutorizirana tomografija (engl. *Multi-slice computed tomography*)

N broj

NAT N-acetiltransferaza

NB ortotopična derivacija (engl. neobladder)

nsSNP nesinonimni jednonukleotidni polimorfizam

OMD Odjel za molekularnu dijagnostiku

P kratki krak kromosoma (fr.*petite*)

Pb parovi baza

PCR lančana reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PCR-SSP lančana reakcija polimerazom sa početnicama specifičnim za određene sekvence (engl. *Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers*)

PUNLMP urotelna neoplazma niskog malignog potencijala (engl. *Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*)

Q dugi krak kromosoma

RC radikalna cistektomija

RH Republika Hrvatska

se nesekretor

Se sekretor

SNP jednonukleotidni polimorfizam (engl. *single-nucleotid polymorphism*)

sSNP sinonimni jednonukleotidni polimorfizam

TNM tumor, čvor, metastaza (eng. *Tumor Node Metastasis*)

TSM tumor specifični mortalitet

TSP tumor specifično preživljenje

TURM transuretralna resekcija tumora mokraćnog mjehura

UC urotelni karcinom (engl. *urothelial cancer*)

UDP-GalNAc : uridildifosfat N-acetilgalaktozamin

US uskopojasno snimanje

UV ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*)

UZV ultrazvuk

VI-RADS Standardizirana metodologija opisivanja tumora mokraćnog mjehura magnetskom rezonancom (engl. *Vesical Imaging-Reporting and Data System*)

vWF von Willebrandov čimbenik

WHO Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

WL bijelo svjetlo (engl. *white light*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Povijest otkrića ABO sustava krvnih grupa	1
1.2. Eritrocitne krvne grupe.....	2
1.2.1 Antigeni	2
1.2.2. Aleli krvnih grupa.....	4
1.2.3 Nasljeđivanje krvnih grupa.....	6
1.2.4 Raspodjela antigena ABO u tkivima	7
1.3. ABO i zloćudne bolesti	9
1.3.1. Patogenetski mehanizmi antigena krvnih grupa u karcinogenezi s naglaskom na karcinom mokraćnog mjehura.....	10
1.4. Tipizacija ABO sustava krvnih grupa: serologija i genotipizacija	14
1.4.1 Metodologija ABO genotipizacije.....	15
1.5 Uloga genetskih polimorfizama kao potencijalnih biljega u nastanku zloćudnih bolesti.....	16
1.6 Etiologija KMM	20
1.6.1. Pušenje.....	20
1.6.2 Profesionalna izloženost.....	20
1.6.3 Naslijeđe	21
1.6.4 Prehrambene navike	21
1.6.5 Zračenje zdjelice.....	21
1.7. Patološka, klinička klasifikacija i stupnjevanje bolesti	21
1.7.1. Površinski i ne-mišićno invazivni KMM	21
1.7.2. Mišićno invazivni KMM	24
1.7.3 TNM klasifikacija KMM.....	25
1.7.4 Limfovaskularna invazija	26
1.8. Dijagnostika KMM.....	26
1.8.1. Simptomi i fizikalni pregled.....	26
1.8.2. Ultrazvuk	27
1.8.3 Cistoskopija	27
1.8.4. Kompjutorizirana tomografska urografija i intravenska urografija.....	28
1.8.5. Multi parametrijska magnetska rezonanca mokraćnog mjehura	29
1.8.6. Slikovna dijagnostika za stupnjevanje T2 KMM	29
1.8.7 Citologija urina.....	29
1.8.8. Testovi za urinske molekularne biljege	30
1.9. Transuretralna resekcija KMM.....	30
1.9.1. Transuretralna resekcija Ta i T1 KMM.....	30

1.9.2 Transuretralna resekcija invazivnih KMM.....	31
1.9.3. Kirurški i tehnički aspekti resekcije tumora.....	32
1.9.4 Endoskopske biopsije mokraćnog mjehura.....	34
1.9.5. Biopsije prostatične uretre.....	34
1.9.6. Nove metode vizualizacije tumora.....	34
1.9.7. Re TURM.....	35
1.9.8. Patološko izvješće.....	36
1.10. Predviđanje povrata bolesti i progresije.....	39
1.10.1. Modeli bodovanja sukladno WHO 1973 sustavu klasifikacije.....	39
1.10.2. Model bodovanja upotrebljavajući WHO 2004/2016 i WHO 1973 klasifikacijski sustav	40
1.10.3. Drugi prognostički čimbenici.....	40
1.10.4 Primarni karcinom in situ.....	41
1.10.5 Stratifikacija bolesnika u rizične skupine.....	41
1.11. Radikalna cistektomija s derivacijom urina kod T2 KMM.....	44
1.11.1.Indikacije i kontraindikacije.....	45
1.11.2. Tehnika operacije i vrste derivacija.....	47
1.11.3. Komplikacije.....	50
1.11.4. Klinički značaj.....	51
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	53
2.1 Hipoteza.....	53
2.2.Ciljevi rada.....	53
3. MATERIJALI I METODE.....	54
3.1.Ispitanici.....	54
3.2. Uređaji i kemikalije.....	55
3.2.1. Laboratorijski uređaji.....	55
3.2.2. Kemikalije i ostala pomoćna sredstva.....	55
3.2.3. Otopine.....	56
3.3. METODE.....	57
3.3.1 Izolacija genomske DNA.....	57
3.3.2. PCR-SSP metoda.....	57
3.3.3 Elektroforeza PCR-SSP produkata.....	59
3.4. Statistička analiza.....	63
4. REZULTATI.....	64
4.1. Rezultati usporedbe skupine bolesnika i kontrolne skupine.....	64
4.2. Raspodjela krvnih grupa bolesnika i kontrole prema fenotipu i genotipu.....	65
4.3 Raspodjela genotipova prema fenotipu u svih ispitanika , bolesnika i kontrolne skupine.....	67
4.4 Rezultati usporedbe gradusa tumora s fenotipom i genotipom u skupini bolesnika.....	69

4.5. Rezultati usporedbe recidiva tumora s fenotipom i genotipom u skupini bolesnika	71
4.6 Rezultati proširenosti bolesti za fenotip i genotip	73
4.7.Usporedba raspodjele alela bolesnika i OP	75
4.8. Raspodjela alela u bolesnika i kontrolne skupine.....	76
4.9 Raspodjela alela ovisno o proširenosti bolesti.....	77
4.10 Raspodjela alela u ovisnosti o gradusu tumora	78
4.11. Raspodjela alela u odnosu na recidiv bolesti.....	80
5. RASPRAVA.....	81
6. ZAKLJUČAK	89
7. LITERATURA.....	90
8. PRILOZI.....	110
8.1. Kvalificirajući rad 1.....	110
8.2. Kvalificirajući rad 2.....	118
9. ŽIVOTOPIS	126

1. UVOD

1.1 Povijest otkrića ABO sustava krvnih grupa

ABO sustav krvnih grupa (ABO) je nasljedna i uglavnom nepromjenjiva karakteristika ljudi, a dobro je poznato da se temelji na prisutnosti antigena na površini eritrocita i protutijela u krvnoj plazmi. Karakterizira ga najizraženiji imunološki odgovor u organizmu, a etabliran je u transfuzijskoj medicini i transplantaciji solidnih organa i tkiva. Posljednjih nekoliko desetljeća o krvnim grupama se sve više piše i izvan navedenih domena i nastoji se pronaći poveznica s brojnim područjima kako u samoj medicini, tako i izvan nje. Primjerice, proučavana je poveznica krvnih grupa s tjelesnim osobinama, prehranom, osobnošću ili podnošenju stresa. Krvnim grupama i njihovim poveznicama s pojedinim područjima bave se liječnici, biokemičari, nutricionisti, sociolozi i psiholozi.

Engleski liječnik William Harvey je početkom 17. stoljeća detaljno opisao cirkulaciju krvi u ljudskom organizmu te od tada traju pokušaji transfuzije ljudske ili životinjske krvi u venu primatelja koji su uglavnom završavali fatalnim ishodom. Krajem 19. stoljeća je utvrđena aglutinacija humanih eritrocita u kontaktu sa serumom drugih individualaca, no smatralo se da je aglutinacija rezultat interakcije eritrocita s antitijelima iz seruma koja su nastala kao rezultat preboljenja zaraznih bolesti. Godine 1900. austrijski liječnik Karl Landsteiner je postavio temelj moderne transfuziologije. Definirao je tri glavne krvne grupe i opisao antigene A i B na membranama eritrocita te cirkulirajuća anti-A i anti-B protutijela u serumu. Najrjeđu krvnu grupu AB su otkrili Decastello i Sturli, a osnove nasljeđivanja su 1910. otkrili Hirszfild i von Dungem. Krajem 70-ih godina 20. stoljeća Englezi Watkins i Morgan definirali su ugljikohidratne antigene N-acetilgalaktozamin (GalNAc) za krvnu grupu A i galaktozu (Gal) za krvnu grupu B (1). Osim ABO, otkriveni su i brojni antigeni svrstani u 47 do danas otkrivenih različitih sustava krvnih grupa.

Razvojem tada novih tehnologija sekvenciranja gena, 1990. godine otkriven je humani gen na 9. kromosomu za koji je utvrđeno da definira ABO (2). Navedeno otkriće je omogućilo naprednije strukturne i funkcionalne analize ABO to jest otvorena je mogućnost proširenja istraživanja s razine antigena na razinu genotipova i alela.

U današnje vrijeme krvne grupe se svakodnevno određuju serološkim metodama za potrebe transfuzijskog liječenja, dok se genotipizacija radi u specifičnim slučajevima kao što je primjerice u slučaju autoimune hemolitičke anemije u kojima autoprotutijelo prikriva antigen

krvne grupe te ga nije moguće odrediti klasičnom serološkom metodom, u slučaju nejasnih krvnih grupa ili rijetkih krvnih grupa i podgrupa u svrhu dijagnostike i liječenja.

1.2. Eritrocitne krvne grupe

1.2.1 Antigeni

ABO je određen pojavnošću antigena A i B na stanicama eritrocita te anti-A i anti-B protutijela u krvnoj plazmi. Antigeni su biljezi na površini eritrocita, a sastoje se od ugljikohidrata ili proteina vezanih na lipide i proteine. Anti-A i anti-B protutitijela (imunoglobulini) su klase IgM i nisu prisutna u novorođenčadi, nego se pojavljuju u krvnoj plazmi tijekom prve godine života. Krvna grupa A je određena antigenom A i anti-B protutijelom, a krvna grupa B antigenom B te anti-A protutijelom. Nositelji krvne grupe AB na membrani eritrocita imaju A i B antigene, bez protutijela u krvnoj plazmi, a krvne grupe O nemaju antigen na membrani eritrocita, ali imaju anti-A i anti-B protutijelo (tablica 1)

Tablica 1. Antigeni i protutijela ABO sustava krvnih grupa

Krvna grupa fenotip	Antigen	Protutijelo
A	A	Anti-B
O	-	Anti-A, Anti-B
B	B	Anti A
AB	AB	-

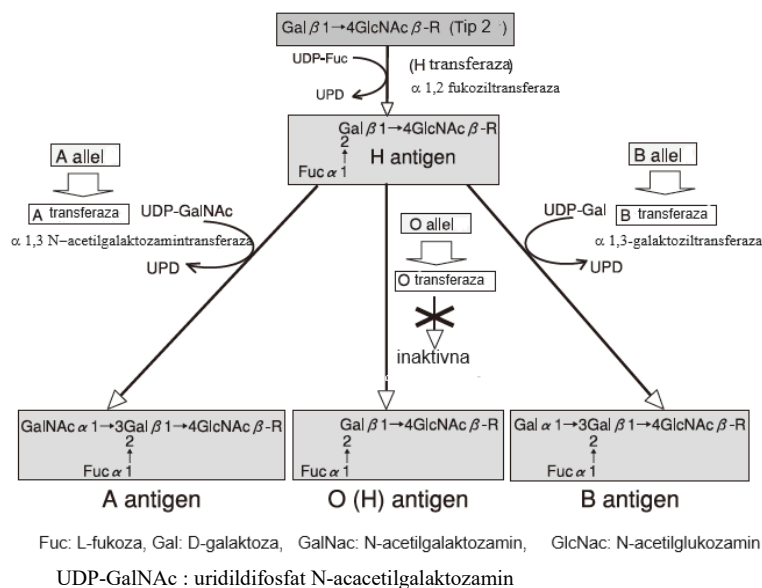
Antigeni ABO nisu primarni produkti gena koji reguliraju njihovu ekspresiju. Ugljikohidratni lanci su građeni sekvencijskim dodavanjem monosaharida; svaka ekstenzija lanca je katalizirana specifičnom glikoziltransferazom (GT). Ti enzimi kataliziraju prijenos monosaharida s nukleotidnog donora i njegovog privitka, u specifičnoj glikozilnoj vezi na supstrat primatelj. GT predstavljaju primarni produkt gena: ABO, FUT 1, FUT 2 i FUT3 (tablica 2).

Tablica 2. Genske regije i njihovi produkti potrebni za formiranje antigena sustava krvnih grupa. Preuzeto i prilagođeno prema (3).

Lokus	Alel	Glikoziltransferaza
FUT1	H	α 1,2-L-fukoziltransferaza
	<i>h</i>	
FUT2	Se	α 1,2-L-fukoziltransferaza
	<i>se</i>	
ABO	A	α 1,3-N-D-acetilgalaktozamintransferaza
	B	α 1,3-D-galaktoziltransferaza
	O	
FUT3	Le	α 1,3/4 -L-fukoziltransferaza
	<i>le</i>	

Prvi korak u sintezi antigena krvne grupe sastoji se od toga da enzim α 1,2 fukoziltransferaza (FUT) prenese fukozu (Fuc) putem α 1 $\rightarrow$ 2 veze na terminalnu galaktozu zajedničkog antigen prekursora vezanog na lipide ili transmembranske proteine eritrocita te će nastati antigen H (H) čiji je lokus smješten na kratkom kraku (fr.*petite*, p) kromosoma 19 (19p13.12). Sastoji se od 3 egzona veličine 5 kilobaza genomske deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA). Ukoliko je lokus za H inaktivan, ne dolazi do sinteze prekursora H, tj. neće doći do formiranja antigena na površini eritrocita, što će rezultirati fenotipom Oh (Bombay) (4).

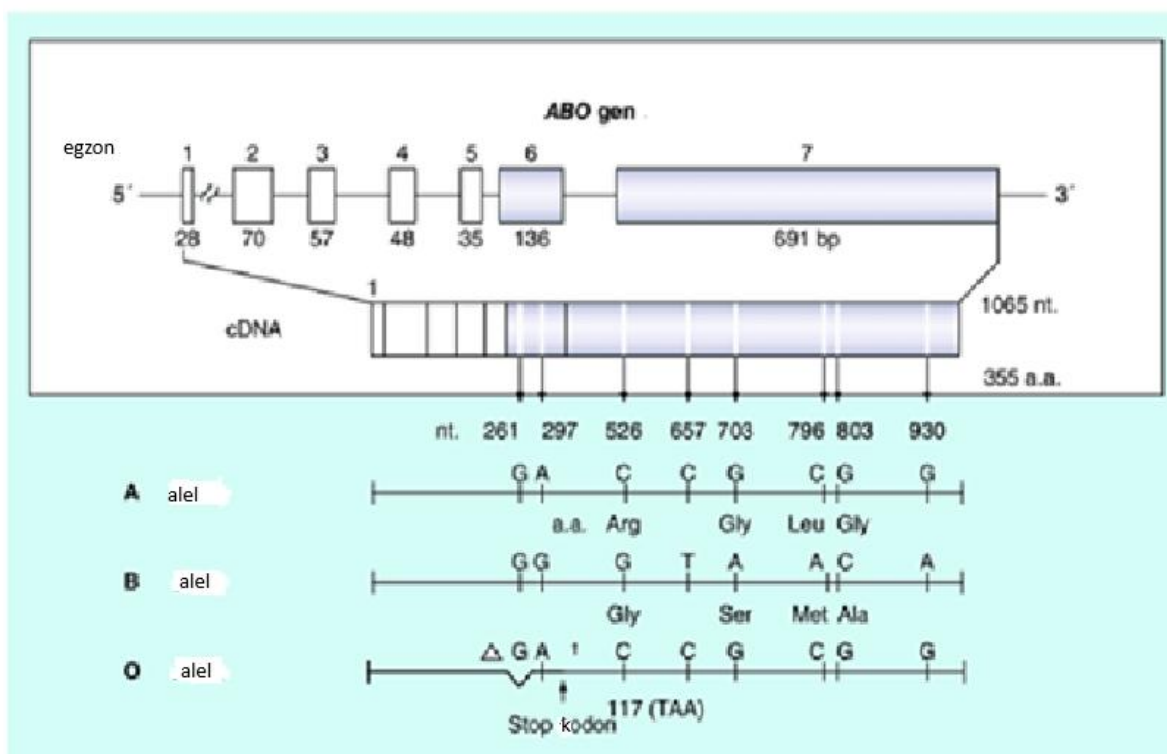
Gen za krvnu grupu nalazi se na dugom kraku (q) kromosoma 9 (9q34.1-q34.2) i ima tri glavna alela A, B i O. Nasljeđuje se kodominantno, po jedan alel od svakog roditelja. Transkripcija gena rezultira glasničkom ribonukleinskom kiselinom (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) koja na ribosomu translacijom sintetizira GT, enzim koji prenosi šećer na transmembranski H. GT A prenosi GalNAc na H rezultirajući antigenom A, dok GT B prenosi Gal rezultirajući antigenom B. Alel O je nekodirajući zbog delecije gvanina na poziciji 261 i stoga ne dolazi do sinteze GT na ribosomu, te posljedično nema prijenosa šećera na H. U tom slučaju se ne formira antigen krvne grupe (5–7) (slika 1).



Slika 1. Biosinteza ABO antigena. (8) Slika objavljena uz dozvolu Tokushima Medical Association

1.2.2. Aleli krvnih grupa

Uz tri glavna alela A, B i O postoje brojni podtipovi koji se razlikuju u supstitucijama pojedinih nukleotida rezultirajući translacijom različitih aminokiselina u enzimu GT. Gen za krvnu grupu se sastoji se od 7 egzona veličine 28 do 688 parova baza i 6 introna veličine 554 do 12982 parova baza. Zadnja dva egzona su odgovorna za formiranje katalitičke domene GT (2,9) (slika 2). Šest najčešćih alela ABO u bijelaca su A1, A2, B, O1, O1v i O2, a razlikuju se u egzonima 6 i 7 u samo nekoliko baza. Osim vezanja različitog supstrata, kodirane enzime karakterizira i razlika u njihovoj aktivnosti (npr. A1 i A2). Posljedica toga će biti veća ili manja količina antigena na membrani eritrocita, što će se u konačnici odraziti na samu jačinu aglutinacije (10).

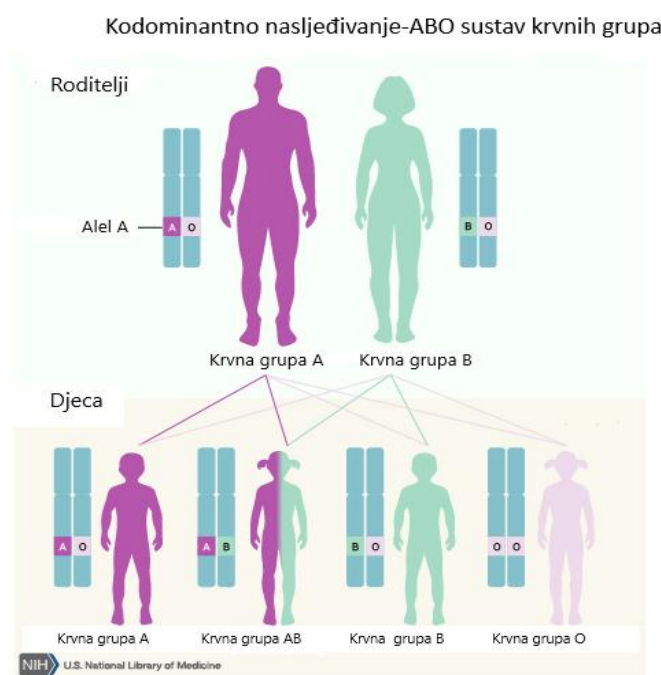


Slika 2.: Strukturni izgled genskog lokusa za krvnu grupu i nukleotidnih sekvenci A, B i O alela. Zasjenjeni su egzoni kodirajuće regije. Stop kodon u O alelu uzrokovan delecijom jednog para baza (8). Slika objavljena uz dozvolu Tokushima Medical Association

Primjerice, razlika između alela A2 i A1 je u deleciji baze na egzonu 7 koja će uzrokovati prekid stop kodona s posljedičnom razlikom u 21 aminokiselini. Alel B se od alela A1 razlikuje u 3 sinonimne i 4 nesinonimne mutacije. Kod nesinonimne mutacije dolazi do promjene sekvenca aminokiselina u kodiranom proteinu, dok sinonimne mutacije utječu na kodirani protein neizravno djelujući na stabilnost mRNA. Nukleotidne sekvence alela A1 i O1 se razlikuju po deleciji jednog para baza na egzonu 6 (slika 2). Ta delecija pomiče okvir čitanja, stvarajući tako preuranjeni stop kodon što će za posljedicu imati izostanak sinteze GT ili sintezu nepotpunog enzima. S druge strane mutacije u alelu O2 imaju za posljedicu poništavanje enzimske aktivnosti zbog zahvaćanja mjesta vezanja šećera. Uz najčešćih 6 alela opisano je više od 80 varijacija koji se razlikuju uglavnom na egzonima koji kodiraju katalitička mjesta na enzimu. Navedeno dovodi do zaključka da unutar gena za ABO postoji visoka razina rekombinantne aktivnosti što govori u prilog njegove bioraznolikosti (11).

1.2.3 Nasljeđivanje krvnih grupa

ABO se nasljeđuje kodominantno, po jedan alel od svakog roditelja (slika 3). Postoje tri glavne alelne forme: i , I^A i I^B . Alel I^A će odrediti krvnu grupu A, a alel I^B krvnu grupu B, alel i će odrediti krvnu grupu O. Aleli I^A i I^B su dominantni s obzirom da njihove genske regije kodiraju enzim GT što će rezultirati prijenosom šećera na H i formiranjem antigena A ili B. Genska regija alela i je recesivna (nekodirajuća) te neće doći do sinteze GT što će rezultirati formiranjem krvne grupe O, ali samo u homozigotnoj formi ii . Osobe koje imaju kombinaciju $I^A I^A$ kao homozigoti ili $I^A i$ kao heterozigoti će imati krvnu grupu A. Osobe koje naslijede $I^B I^B$ ili $I^B i$ imaju krvnu grupu B. Nositelji genotipa $I^A I^B$ imaju oba antigena tj. fenotipa jer A i B pokazuju kodominaciju s obzirom da su genske regije njihovih alela kodirajuće (tablica 3). Jedna od varijanti AB fenotipa je i cis forma koja ima jedan enzim koji sintetizira oba antigena i A i B. Njihova ekspresija u toj varijanti je puno slabija nego kod osoba s normalnom A i B krvnom grupom što u konačnici može rezultirati pojavom genetski nemoguće krvne grupe, na primjer da dijete krvne grupe O ima roditelja krvne grupe AB (12).



Slika 3. Shematski prikaz nasljeđivanja ABO sustava krvnih grupa. Preuzeto i prilagođeno prema (13). Objavljeno sukladno uvjetima www.medlineplus.gov

Standardno određivanje krvnih grupa vrši se serološkim metodama pomoću anti-A i anti-B antiseruma te je moguće odrediti šest fenotipova: A, B, A₂, A₂B, AB i O. Razvojem molekularnih metoda omogućena je i ABO genotipizacija. Ona se radi metodom lančane reakcije polimerazom sa početnicama specifičnim za određene sekvence (engl. *Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers*, PCR-SSP) koja se temelji na nemogućnosti Taq polimeraze da popravi neslaganje na 3'kraju DNA početnice. Temeljem genotipizacije moguće je odrediti O¹, O², A¹, A² i B alele koje je moguće upariti u 15 genotipova.

Tablica 3. Kombinacije u nasljeđivanju krvnih grupa (Izvor: autor)

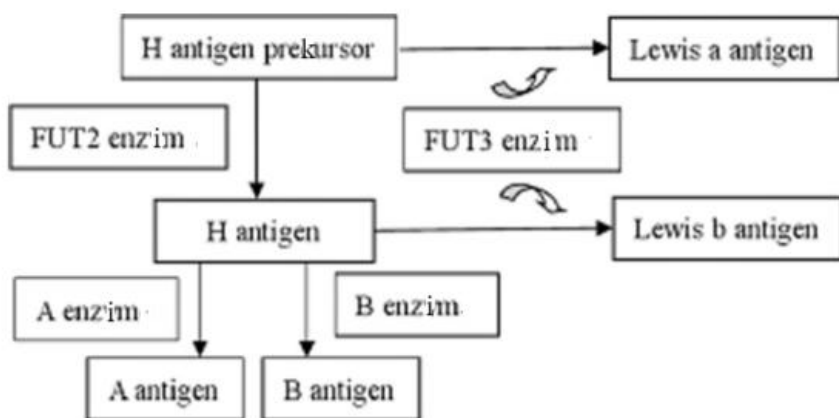
Nasljeđivanje ABO krvnih grupa					
Majka	Otac	A	B	AB	O
A		O, A	O, A, B, AB	A, B, AB	O, A
B		O, A, B, A	O, B	A, B, AB	O, B
AB		A, B, AB	A, B, AB	A, B, AB	A, B
O		O, A	O, B	A, B	O

1.2.4 Raspodjela antigena ABO u tkivima

Osim na membrani eritrocita antigeni krvnih grupa se mogu nalaziti i na drugim tkivima kao što su endotel krvnih žila, urotel, gastrotrakt... Činjenica da A i B antigeni nisu izloženi samo na membranama eritrocita već i u tjelesnim tekućinama poput sline i sjemena je poznata još od 1926. godine (14). Stanice i tkiva koje izlažu antigene krvnih grupa na svojoj površini nazivamo sekretorima. Ustanovljeno je da se nasljeđivanje sekretorskog statusa provodi sukladno Mendelovim zakonima, genetski neovisno o ABO (15). Lokus koji kontrolira sekreciju ABO je nazvan sekretor (Se) i dominantan je nad nesekretorom (se) (16). Ekspresija antigena krvne grupe na tkivima je regulirana FUT 1, 2 i 3 smještenih na kromosomima 19q13.3, 19q1.3, 19q13.3 te genu ABO (9q34.1). Prekursori A i B antigena su oligosaharidi, a postoje dva oblika. Tip 1 prekursora koji završava s Gal β 1-3-GalNAc-β-1-R sekvencom i uglavnom perzistira na urotelu i epitelu gastrointestinalnog sustava. Za sintezu lanca tipa 1 potrebna je α-1,2- FUT kodirana genom FUT 2, koja preferencijalno prepoznaje Gal β 1-3-GalNAc-β-1-R receptor čineći H. Povijesno gledano definirani su *Se* ili *se* aleli, koji kodiraju aktivnu ili inaktivnu FUT 2, a zavisno o tome reguliraju ekspresiju H na stanicama tkiva. S obzirom da *Se* i *se* aleli determiniraju prisutnost H na tkivima, ekspozicija antigena ABO nije zavisna samo

o prisutnosti GT A i B, već prvenstveno o *Se/FUT 2* alelu. U slučaju oblika *se* ne formira se H pa ne dolazi do akceptiranja supstrata GT A i B.

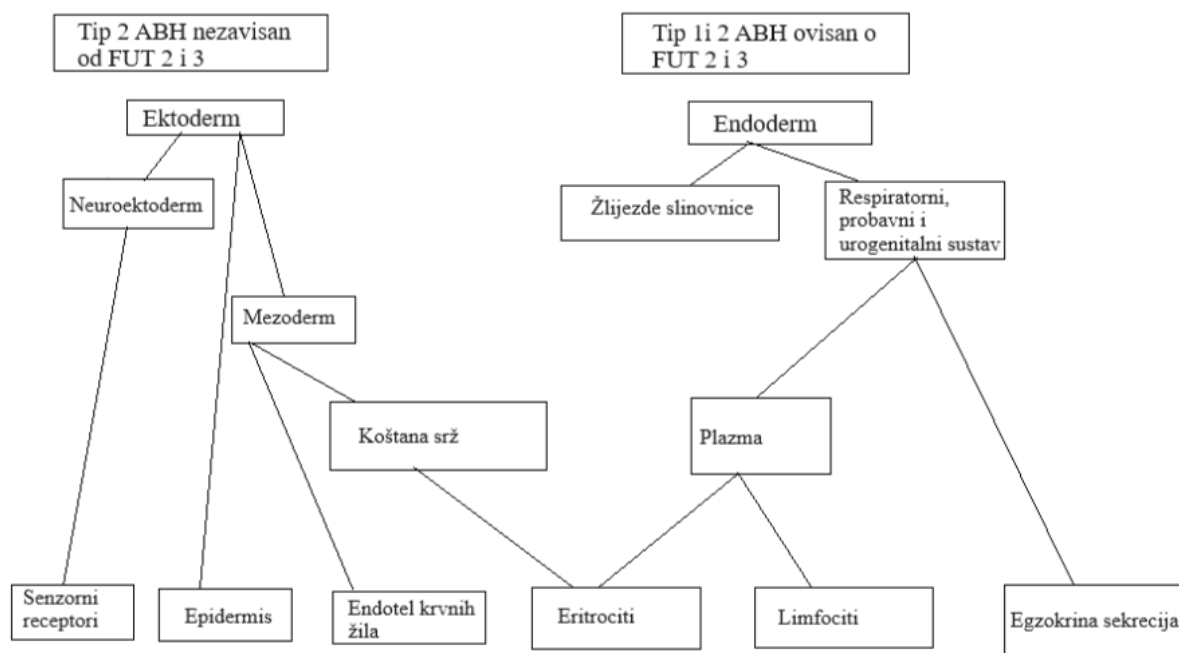
Nositelji *Se* alela će ispoljavat H na ostalim tkivima, dok će nositelji *se* alela biti nesekretori pri čemu neće doći do ispoljavanja tih antigena na tkivnim stanicama. Gen *FUT 3* kodira GT koja katalizira dodavanje fukoze na sekretorni H na tkivima čineći Lewis antigen (Le) (17). Ukoliko su nositelji *se* alela tj. nesekretori, Fuc se neće katalizirati na H, već na njegov prekursor čineći Le^a . (Slika 4) Uz Le^a i Le^b postoje njihove izomerne forme Le^x i Le^y (18).



Slika 4. Shematski prikaz sinteze ABO i Le antigena u ovisnosti o FUT 2 i 3 enzima te A i B GT. Izrađeno pomoću programa MS Paint. Preuzeto i prilagođeno prema (19).

Vrijedno je napomenuti da je mehanizam ispoljavanja antigena na tkivima reguliran te može biti poremećen u patološkim stanjima, primjerice upali ili tumoru (20,21). Tip 1 prekursora se ispoljava na eritrocitima, trombocitima, endotelnim stanicama i nije određen sekretorskim statusom (22). Sinteza prekursora tip 1 zahtijeva *FUT 1* gen koji kodira $\alpha 1,2$ -FUT koja dodaje terminalnu Fuc na Gal i stvarajući $Fuc \alpha 1-2-Gal-\beta 1-4-GalNAc-\beta 1-R$ sekvencu tj. H koji služi kao baza za formiranje antigena A prijenosom *GalNAc* pomoću GT A u $\alpha 1,3$ vezi ili Gal na subterminalnu Gal putem GT B formirajući B antigen. H i Le su širom rasprostranjeni po ljudskom tijelu i nerijetko označavani kao tkivno-krvni antigeni. Oriol i suradnici (4) su saželi u shemu rasprostranjenost i genetsku kontrolu H i Le u različitim tkivima (slika 5). Uz nekoliko iznimaka prevladavaju sljedeća pravila:

1. U tkivima podrijetla ektoderma i mezoderma H je pod kontrolom FUT 1 enzima (Tip 2 H nezavisan od FUT 2 i 3), a izloženi često zajedno s Le^x i/ili Le^y antigenima. To uključuje hematopoetsko tkivo, kožu, primarne senzorne neurone, vaskularni endotel, renalne glomerule i sabirne kanaliće.
2. U tkivima endodermalnog podrijetla poput probavne, respiratorne mukoze i urotela, H i Le su tip 1 ili 2 i primarno kontrolirani sa FUT2 (Se) i FUT 3 (Le).



Slika 5. Genetska kontrola ekspresije ABO i H po tkivima proizašlih iz endoderma, mezoderma i ektoderma. Izrađeno pomoću programa MS paint. Preuzeto i prilagođeno prema (4)

1.3. ABO i zloćudne bolesti

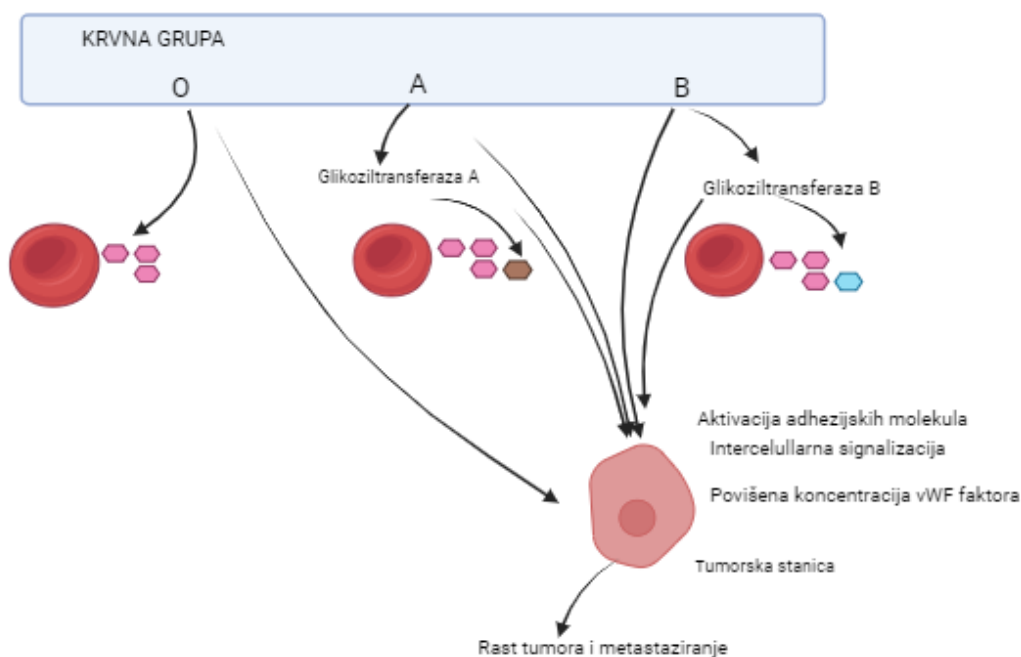
Osim na membranama eritrocita antigeni ABO su rasprostranjeni i na stanicama raznih organskih sustava. Protutijela na tkivne antigene mogu dovesti do odbacivanja transplantiranog organa ili tkiva, primjerice transplantiranog bubrega (23). ABO nije povezan samo s nepovoljnim ishodom transfuzijskog liječenja ili transplantacije organa, već ga se povezuje i s bakterijskim i virusnim infekcijama te pojavom tumora i onkogeneom (24). Ranija istraživanja su pokazala da je abnormalna ekspresija antigena krvne grupe povezana s onkogeneom i metastatskim potencijalom tumora, no za većinu tumorskih sjela poveznica između ABO i utjecaja na preživljenje od karcinoma ostaje kontraverzna (25,26). Kod karcinoma pluća

istraživana je poveznica između ABO i von Willebrandovog faktora (vWF), faktora VIII i razine proteaze s trombospondinskim modulom te je nađena značajno viša razina vWF i faktora VIII u nositelja ne-O krvne grupe u usporedbi s O krvnom grupom te značajno niža razine proteaze u kontrolnoj skupini. Povećana razina vWF potiče invaziju i metastaze tumora (27).

U bolesnika s metastatskim karcinomom bubrega koji su liječeni inhibitorom tirozin kinaze utvrđeno je da je krvna grupa O povezana s povećanim brojem metastaza (28). S druge strane među ranije objavljenim studijama koje su utvrđivale povezanost antigena ABO i karcinoma gušterače utvrđen je povišen rizik u nositelja A krvne grupe (29). U istraživanju koje je rađeno na 3944 pacijentica s rakom dojke nađena je jednaka raspodjela krvnih grupa u zdravih i bolesnih uz napomenu da je krvna grupa O povezana s boljom prognozom (30). U Kini je rađena studija koja je utvrdila povezanost krvnih grupa i karcinoma želuca. Tipizacija ABO je istaknut kao jeftin i dostupan test koji ima svoje mjesto u procjeni prognoze bolesti iako sam mehanizam nije utvrđen. Uz studiju je rađena i meta-analiza koja je utvrdila i prijemčljivost nositelja krvne grupe A za *Helicobacter pylori* infekciju (31).

1.3.1. Patogenetski mehanizmi antigena krvnih grupa u karcinogenezi s naglaskom na KMM

Podležeći mehanizmi u kojima ABO ili njemu bliske genetske varijante mogu interferirati s razvojem karcinoma i njegovom progresijom nisu razjašnjene i predmet su brojnih istraživanja. Postavljene su brojne hipoteze, a jedna od mogućih obuhvaća disregulaciju enzimske aktivnosti GT ABO koje su posebno uključene u proces međustanične adhezije, membranske signalizacije te imunološkog odgovora domaćina (32). Izmjene navedenih membranskih molekula mogu poticati proces onkogeneze kroz mehanizme analogne dobro poznatoj ulozi GT ABO u modifikaciji plazmatske koncentracije vWF (Slika 6). Naime, utvrđeno je da vWF sudjeluje u staničnom ciklusu kao važan modulator regulirajući angiogenezu i apoptozu, događaje koji su uključeni u proces tumorogeneze (33).



Slika 6. Antigeni krvnih grupa, von Willebrandov faktor i karcinogeneza (34). Slika objavljena uz dozvolu SIMITIPRO Sri

Druga teorija je da sami ugljikohidratni površinski antigeni tj. njihova morfologija može biti udružena s razvojem zloćudnih tumora i metastaza: ugljikohidratna površina stanica normalnih tkiva involvirana je u regulaciju tumorskih stanica kroz interakcije između njenih specifičnih signalnih i prepoznavajućih molekula i ugljikohidratne strukture na površini stanice metastaze (35). Aberantna glikozilacija i prekomjerna ekspresija pojedinih dijelova ugljikohidratnih antigena karakteristika je tumorskih stanica te su stoga tumor specifični oligosaharidi predmet brojnih istraživanja kao ciljna meta u primjeni imunoterapije (36). Tumorske stanice ispoljavaju abnormalne produkte glikozilacije tijekom karcinogeneze, a oni se zovu tumor udruženi ugljikohidratni antigeni. Posebice se ističu ugljikohidratni antigeni Lewisovog tipa: Le^x , Le^y i tumor specifičan antigen koji se ispoljava se na adenokarcinomima, a ne ispoljava se na normalnim stanicama (KH-1) (37). Strukturalnu razliku Le^y i Le^x antigena čini dodatna α -L-Fuc spojena na 3-O mjesto ostatka galaktoze na nereducirajućem kraju potonjeg antigena, dok je KH-1 heterodimer Le^y i Le^x antigena. (38) Le^y antigen kao izomer Le^b antigena krvnih grupa se ispoljava na 60 - 90% karcinomskih stanica epitelnog podrijetla u ljudi poput karcinoma kolona, dojke, želuca i pluća. Također je utvrđeno da Le^y antigen sudjeluje kao unutarstanična signalna molekula u migraciji stanica (39). Nekoliko studija rađenih monoklonskim protutijelima na

uzorcima urina ispitanika utvrdilo je da Le^x antigen nije prisutan na stanicama urotela, ali se ispoljava na stanicama urotelnog karcinoma (engl. *urothelial cancer*, UC) ovisno o sekretorskom statusu, gradusu ili stadiju tumora. Provedeno je istraživanje s ciljem pronalaska idealnog urinskog ugljikohidratnog tumor biljega visoke osjetljivosti i specifičnosti u svrhu smanjivanja potrebe za kontrolnim cistoskopijama nakon transuretralne resekcije tumora mokraćnog mjehura (TURM), jer citologija urina koja je standardni neinvazivni urinski biljeg zadnjih nekoliko desetljeća, ima izrazito nisku osjetljivosti za karcinome niskog malignog potencijala (40).

Prema nekim autorima rani genetski događaj u tumorogenezi KMM (KMM) je gubitak alela na kromosomu 9. Navedena pojava je nađena u 50% površinskih i 70% invazivnih KMM (41). Gubitak antigena A je utvrđen u urotelnom KMM, pogotovo u invazivnom tipu, te je utvrđena jako niska razina GT A (42). Antigen A je povoljan za analizu stoga što ostaje izrazito stabilan i podložan analizi nakon fiksacije preparata u formalinu što je pogotovo primjenjivo i za analizu manjih tumora kod kojih nije moguće provesti gensku analizu. DNA ekstrahirana iz parafinskih blokova se često ne može uspješno umnožiti. Dva su mehanizma redukcije ekspresije A antigena na stanicama KMM: genetski, koji se reflektira gubitkom alela ABO genske regije i/ili epigenetski, putem metilacije promotorske regije što rezultira izostankom sinteze antigena. Navedeni mehanizmi pokazali su značajnu korelaciju u redukciji ekspresije A antigena na stanicama UC dok je ekspresija A antigena održana na displastičnim stanicama i normalnom urotelu sugerirajući da je gubitak ABO gena i/ili hipermetilacija njegove promotorske regije moguć specifičan biljeg za UC mokraćnog mjehura (43). Unutar same genske regije ABO istraživani su polimorfizmi te je utvrđen njihov utjecaj na koncentraciju čimbenika tumorske nekroze α , solubilne međustanične adhezije molekule (engl *intercellular adhesion molecule*, ICAM), E-selektina i P-selektina. Navedene molekule medijatori su kroničnog upalnog odgovora te aktivatori imunoloških stanica pa se njihova uloga u karcinogenezi ne može isključiti. Stoga prema nekim autorima, zajedno s antigenima krvnih grupa one mogu predstavljati biološku bazu koja čini direktnu poveznicu ABO sustava, onkogeneze i samog širenja tumora (44, 45). Ekspresija solubilne ICAM-1, koja inhibira adheziju limfocita na stanice endotela vežući se na ICAM ligande cirkulirajućih stanica je značajno reducirana u bolesnika sa ne-O krvnom grupom u usporedbi s nositeljima krvne grupe O (46). Ustanovljeno je da stanice tumora rabe sličan mehanizam za adheziju na endotel i posljedično metastaziranje, a smanjena koncentracija solubilne ICAM u pacijenata s ne-O krvnom grupom može promovirati metastatsko širenje tumora. Također, moguć patogenetski mehanizam koji

predstavlja jedan od ključnih koraka u karcinogenezi je i abnormalna glikozilacija proteina stanične površine koja potiče epitelno-mezenhimalnu tranziciju. S obzirom da je na stanicama KMM utvrđena promjena ili gubitak antigena, navedeni mehanizam bi mogao imati ulogu u tumorskoj proliferaciji i kod ovog sijela (47). Meta analiza iz 2022. uključila je 15 204 ispitanika i 10 studija u kojima je analizirana povezanost antigena ABO sustava krvnih grupa i KMM. Rezultati su podijeljeni po krvnim grupama. (48)

1.3.1.1 Ne-O i O krvna grupa

Provedene su studije u kojima su analizirani ishodi u bolesnika liječenih radikalnom cistektomijom (RC). U jednoj je utvrđeno da ne-O u usporedbi s O krvnom grupom ne utječe na stopu tumor specifičnog preživljenja i povrat bolesti. Štoviše, razlike nisu od utjecaja na lošiji patohistološki nalaz i invaziju regionalnih limfnih čvorova (49). Druga studija je potvrdila iz jednovarijabilnih analiza da omjeri šansi za povrat bolesti ((Hazard ratio (HR): 1,18, 95% CI: 1,01 - 1,37)) i tumor specifični mortalitet (TSM) (HR: 1,20, 95% CI: 1,04 - 1,39) mogu biti povezani i s ne-O i O krvnom grupom. Prema multivarijantnim analizama nije nađena poveznica s povratom bolesti (HR: 1,18, 95% CI: 0,99 - 1,39), dok TSM (HR: 1,22, 95% CI: 1,04 - 1,44) može biti povezan s O i ne-O krvnim grupama (50).

1.3.1.2. Krvna grupa B

U usporedbi s krvnom grupom O, za B nije nađena statistički značajna povezanost u vezi povrata bolesti, tumor specifičnog i ukupnog preživljenja u studijama koje su analizirale liječenje RC. Također je utvrđeno da krvna grupa B nije čimbenik rizika za nepovoljni patohistološki stadij ili invaziju limfnih čvorova. Kod pacijenta operiranih TURMom prema Wangovoj i Chengovoj studiji krvna grupa B je indikativna za niži postotak recidiva i progresije bolesti (51, 52).

1.3.1.3 Krvna grupa A

Iako su sve studije iz meta-analize uključivale i krvnu grupu A, rezultati prognoze uključenih pacijenata su kontraverzni. Od 6 studija u kojima su analizirani ishodi u bolesnika operiranih RC jedino je Gershmanova studija (50) dokazala utjecaj krvne grupe A na povrat bolesti (HR: 1,18, 95% CI: 1,01 - 1,37) i TSM (HR: 1,23, 95% CI: 1,06 - 1,44). Ostale studije nisu pokazale utjecaj A krvne grupe na povrat bolesti, ukupno i TSP. U tri studije u kojima su analizirani pacijenti operirani TURMom nađen je utjecaj A krvne grupe na ishode liječenja u bolesnika s ne-mišićno invazivnim KMM. Chengova studija (51) je pokazala da bolesnici s krvnom grupom O imaju veće šanse za povrat bolesti i progresiju nego nositelji krvne grupe A dok su

Wangove i Heova studije pokazale kako krvna grupa O ima niži postotak povrata i progresije bolesti nego krvna grupa A (52, 53).

1.3.1.4. Krvna grupa AB

Što se tiče krvne grupe AB u usporedbi s O nije nađena statistički značajna povezanost s prognozom kod bolesnika operiranih RC, ni u bolesnika s operiranih TURMom.

1.4. Tipizacija ABO sustava krvnih grupa: serologija i genotipizacija

Klinička testiranja ABO provode se prvenstveno serološkim testiranjem, pomoću dobro opisanih i standardiziranih seruma za identifikaciju antigena na eritrocitima uporabom referentnih eritrocita za prisutnost/odsutnost specifičnih isoaglutinina i unakrsnog povezivanja stanica između seruma davatelja i primatelja za testiranje imunološke kompatibilnosti prije transplantacije organa. Taj način tipizacije dobro funkcionira jer se većina antigena ABO uklapa u paradigmu četiri fenotipa, a i patofiziologija povezana s nepodudarnosti ABO temelji se na serološkoj reaktivnosti protutijela (54). Međutim, postoje situacije kada serološka ispitivanja mogu dati kontradiktorne ili netočne podatke. Neonatusi i mala djeca ne ispoljavaju antigene u punom obujmu ili nemaju još razvijena protutijela, stoga su podložna mogućoj pogrešnoj tipizaciji. Recentna transfuzija velikog volumena univerzalno kompatibilnih krvnih pripravaka kao što su koncentрати eritrocita krvne grupe O, plazme ili imunoglobulina mogu privremeno zamijeniti tj. maskirati fenotip primatelja. U navedenih ispitanika serološka tipizacija može rezultirati dvosmislenim rezultatima bilo koristeći anti-A i anti-B serum kako bi se ispitali antigeni na eritrocitima bolesnika, bilo upotrebljavajući komercijalizirane eritrocite kako bi se testirala protutijela na antigene krvnih grupa. Lijekovi poput magrolimaba koji je monoklonalno protutijelo vežući se na CD (engl. *Cluster of differentiation*) 47 receptore eritrocita može rezultirati lažnom reaktivnošću u tipizaciji ABO (55).

Hematopoetska matična stanica transplantirana s nositelja druge krvne grupe može uzrokovati permanentnu promjenu primateljeve krvne grupe. Ustanovljeno je da pacijentova krvna grupa A može promijeniti fenotip u B uslijed infekcija (56). U navedenim slučajevima za identifikaciju krvne grupe nužno je napraviti genetsku analizu determinanti ABO. Antigeni ABO nisu izravno kodirani iz genoma, već su generirani aktivnošću multiplih genetički kodiranih enzima (3). Identifikacija genskih sekvenci koje za krajnji produkt ima ekspresiju antigena ABO omogućila je razvoj testiranja DNA krvnih grupa u kliničkoj primjeni. Važno je napomenuti da testiranje DNA ima svojevrsnih ograničenja u identifikaciji fenotipa ABO prvenstveno stoga jer se sama aktivnost GT ne može predvidjeti iz genskog zapisa (57). Upravo

činjenica testiranja spriječila je genotipizaciju da postane primarna metoda u određivanju krvne grupe. Subtipizacija ABO s brojnim subtipovima predstavlja rastuću dijagnostičku potrebu. Najčešći i imunološki najrelevantnije su A varijante koje reguliraju transfer GalNAc rezultirajući u povećanoj, smanjenoj ili odsutnoj ekspresiji A antigena na površini eritrocita (58).

Kako različiti genski polimorfizmi reguliraju količinu antigena, oni su podijeljeni u podgrupe A1 (rezultirajući normalnom količinom antigena) i A2 (rezultirajući smanjenom razinom antigena). S praktične strane za potrebe transfuzijskog liječenja podjela na podgrupe nije klinički značajna, no opisane su uspješne transplantacije bubrega i jetre od donora podgrupe A2 u primatelja O ili B, budući da nositelj A2 ima značajno manje antigena pa je i značajno smanjena funkcija istog kao odgovarajuća meta za alotipska protutijela (59).

1.4.1 Metodologija ABO genotipizacije

Glavne alelne varijante ABO su O1, O2, A1 i A2. Metode za genotipizaciju ABO najviše uključuju neku varijaciju lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), obično praćene analizom duljine restrikcijskih fragmenata polimorfizama ili pomoću početnica specifičnih za sekvencu (60). Iako su korisne za otkrivanje osnovnih alela ABO, ove su metode ograničene nemogućnošću otkrivanja novih alela ABO stvorenih križanjem, rekombinacijom ili konverzijom gena (57, 61). Metode PCR jednolančanog konformacijskog polimorfizma omogućavaju otkrivanje novih alela zbog nepoznatih mutacija unutar regija omeđenih parovima početnica (62, 63). Najveći broj tipizacija ABO provodi se u laboratorijima sa svrhom transfuzijskog liječenja. Za tu svrhu je nužno serološko testiranje, a genotipizacija davatelja se ne smatra prikladnom metodom za određivanje ABO. Indikaciju za genotipizaciju čini dvosmislenost u serološkim nalazima, čime se sprječava rizik od po život potencijalno opasnih transfuzijskih reakcija. Genotipizacija ABO je potisnuta u status dodatne informacije i provodi se visoko specijaliziranim ustanovama, primjerice kod transplantacije organa gdje se navodnom metodom može otkloniti rizik imunološki nekompatibilne krvne grupe. To se odnosi na primatelje krvne grupe B koji su u statistički nepovoljnijem položaju u odnosu na druge. Ukoliko se u njih dokaže dovoljno nizak titar anti-A protutijela, nema zapreke za transplantacijom organa donora u kojeg je genotipizacijom utvrđen A2 podtip krvne grupe zbog ekspresije niske količine antigena. Iako je uspješna transplantacija kod inkompatibilnih krvnih grupa opisana, ona je ograničena na žive donore i svakako je potrebna predtransplantacijska desenzibilizacija (64). Kao i kod svih kliničkih testova, tako i kod tipizacije ABO u kliničkom pogledu najvažnije je da nam ona pruži točnu i relevantnu interpretaciju. Za genotipizaciju ABO

važno je napomenuti kako se ne može koristiti samostalno radi usmjeravanja odluka o transfuzijskom liječenju. Međutim, genotipizacija ABO je pokazala značajnu korist kao pomoćni dijagnostički pristup, osobito u transplantaciji organa, te se podaci o genotipu ABO davatelja moraju tumačiti u kontekstu ABO primatelja i titra njegovih hemaglutunina kako bi se odredila imunološka kompatibilnost (65).

1.5 Uloga genetskih polimorfizama kao potencijalnih biljega u nastanku zloćudnih bolesti

Utjecaj genetskih polimorfizama na ljudsko zdravlje podložan je brojnim čimbenicima kao što su: genetsko naslijeđe, životni stil, socioekonomski i okolišni utjecaji te dostupnost zdravstvene usluge. Navedeni čimbenici predstavljaju startnu poziciju za prevenciju i promociju zdravog životnog stila. Međutim, nije sasvim jasan njihov utjecaj na zdravlje ukupne populacije. Izloženost vanjskim i okolišnim čimbenicima doprinosi uglavnom utjecaju na zdravstveno stanje pojedinca, primjerice kao što su pušenje, prehrana ili konzumacija alkohola. U zadnje vrijeme sve se više ističe uloga biljega različitih etničkih skupina kod kojih vanjski i okolišni čimbenici mogu potencirati promjenu zdravstvenog stanja, tj. nastanak bolesti. Primjerice, ljudski organizam ima konfiguriran obrambeni mehanizam od vanjskih utjecaja temeljen na učinkovitom imunološkom sustavu te zahvaljujući genetskom naslijeđu može popraviti potencijalnu štetu uzrokovanu vanjskim čimbenicima pomoću sustava različitih enzima kodiranih vlastitim genom. Rezultat toga je da u različitim populacijama određeni vanjski čimbenik može ili ne mora dovesti do promjene zdravstvenog stanja (66). Humani genom sadrži otprilike tri milijarde parova baza sadržanih u 23 para kromosoma u jezgri stanice. Svaki kromosom sadrži stotine tisuća gena koje kodiraju različite proteine. Poznato je oko 30.000 gena od kojih svaki u prosjeku kodira tri proteina (Američki Nacionalni institut za istraživanje humanog genoma). Osim što se utvrđuju funkcije specifičnih genskih regija, utvrđuju se i njihove varijacije koje se u konačnici mogu odraziti i na različitost fenotipskih osobina, kao što su npr. boja kose i očiju, ali ne i samo fizičkih osobina. Stoga nema sumnje da geni utječu na karakter; osobnost i osjetljivost, a uzimajući u obzir i utjecaj epigenetskih faktora kao što su metilacija DNA, modifikacija histona i ekspresija mikro glasničkom ribonukleinskom kiselinom (engl. *micro messenger ribonucleic acid*, miRNA) prenesenih s roditelja na djecu. Varijabilnost gena u ljudi je široko poznata. Dobro su poznate genetske razlike među pojedincima vezane uz naslijeđe od roditelja, kao i one varijabilnosti vidljive među određenom etničkom populacijom. Ukoliko uzmemo u obzir genetsku osnovicu same bolesti, možemo razlikovati dvije vrste gena: uzročni i osjetljivi geni. Uzročni su oni koji u izmijenjenom ili mutiranom obliku dovode do pojave bolesti. U slučaju osjetljivosti gena, prisutnost

izmijenjenog alela ne znači nužno pojavu bolesti u pojedinca, već samo povišen rizik (67, 68). Posljednjih 30-ak godina genski polimorfizmi predmet su mnogih istraživanja brojnih znanstvenih polja vezanih uz javno zdravstvo i bolest. Genski polimorfizmi su najčešći tip genetske varijacije u ljudi. Javljaju se u populaciji s učestalošću većom od 1% i razlikuju se od DNA mutacija koje karakterizira izrazito niska frekvencija pojavljivanja u malom broju pojedinaca. Oni su važni čimbenici varijacija među pojedincima od kad su istraživani kao potencijalni biljezi u medicinskom kontekstu. Dok je genska mutacija rijetka i u konačnici dovodi do razvoja bolesti, polimorfizmi nisu nužno s njima povezani. Tijekom života ljudi su neprestano izloženi određenim vanjskim utjecajima u svom radnom ili životnom okruženju. To ne uključuje samo istraživanje utječu li određeni agensi na razvoj bolesti u pojedinca, već i njihov utjecaj na određenu etničku skupinu ljudi. Primjer je studija koja je istraživala rizičnu osjetljivost na vanjske čimbenike u radnom okruženju za pojavu bolesti u četiri etičke populacije: afričke, istočno-azijske, južno-azijske i europske, predviđajući model osjetljivosti među tim skupinama. Među njima su istraživani polimorfizmi involvirani u proces metabolizma reparacije DNA, detoksifikacije i oksidativnog stresa. Nađen je najveći relativni rizik u južno-azijskoj populaciji vezan uz gene za detoksifikaciju i oksidativni stres, dok je najveći rizik udružen uz gene za popravak DNA utvrđen u populaciji bijele rase (69).

Razvojna istraživanja su utvrdila niz potencijalnih gena udruženih s povećanom osjetljivošću za karcinom. Dogovorene smjernice za njihovo utvrđivanje temelje se na cjelogenomskim studijama (engl. *Genome-Wide Association Studies*, GWAS). Temelje se na istraživanju genskih razlika u nukleotidima, znanih kao jednonukleotidni polimorfizmi (engl. *single-nucleotide polymorphism*, SNP). SNP predstavlja odstupanje od predviđenog slijeda nukleotida u sekvenci DNA koji nastaje kad se promijeni jedan nukleotid. Ovisno o poziciji SNP-a unutar gena, različiti su patogenetski mehanizmi kojima SNP doprinosi povišenoj osjetljivosti za karcinom. Na primjer, SNP-ovi u regiji promotora smanjuju transkripciju gena inhibicijom vezanja faktora transkripcije, time potičući tumorigenezu kod karcinoma prostate, dojke, debelog crijeva i gušterače ili vršeći utjecaj pomoću epigenetskih mehanizama putem metilacije DNA i modifikacije histona (70, 71).

Unutar egzona klasifikacija SNP-ova temelji se na njihovoj sposobnosti da zamijene kodiranu aminokiselinu: nesinonimni (nsSNP) mijenja strukturu proteina, a sinonimni (sSNP) utječe na strukturu proteina neizravno moduliranjem stabilnosti *mRNA*. Navedene promjene utječu na staničnu signalizaciju i razinu onkogenih i tumor supresor proteina (72,73). SNP-ovi u regiji introna generiraju varijante spajanja transkripata i promoviraju ili remete vezanje i funkciju

dugih nekodirajućih RNA (74). SNP-ovi na 5'-neprevedenom dijelu (engl. 5' *untranslated region* , 5'-UTR) utječu na translaciju, dok oni na 3' utječu na miRNA vezanje (75).

SNP-ovi u regijama koji su locirani daleko od aktualne genske regije reduciraju ili poboljšavaju transkripciju gena kroz dugo-dometni *cis* učinak (76).

SNP-ovi u egzonima generalno utječu na karcinogenezu prvenstveno genetičkim mehanizmima. nsSNPovi rezultiraju zamjenom aminokiseline što utječe na funkciju proteina. U većini slučajeva radi se o zamjeni prve dvije baze kodona. Preinake u slijedu aminokiselina utječu na sekundarnu strukturu proteina povećavajući ili smanjujući vezanje vodika i fosforilaciju, što može utjecati na interakciju proteina i funkciju. Navedene preinake mijenjaju signalne stanične puteve i utječu na razinu onkogenih i tumor supresor proteina. Više od 13000 poznatih SNP-ova se nalazi unutar egzona različitih gena, od kojih su 58% nsSNPovi (77). Primjer za nsSNP je rs 752955201 koji rezultira u supstituciji valina u izoleucin arylamin N-acetiltransferaze (NAT) 2 što rezultira sniženjem afininteta enzima za supstrat. NATovi su polimorfni enzimi koji posreduju u biotransformaciji arilaminskih/arilhidrazinskih ksenobiotika, uključujući farmaceutske proizvode i karcinogene iz okoliša (78). nsSNPovi također mijenjaju slijed aminokiselina protein-protein sučelja. To su regije u kojima su dva proteina u bliskom kontaktu, a čije promjene preinačuju interakcije proteina, stabilnost i posttranslacijske modifikacije. Leucin 858 arginin mutacija povećava sposobnost receptora za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) da tvori dimere što je karakteristično za staničnu proliferaciju (79). sSNPovi preinačuju strukturu i funkciju proteina indirektno, što znači da ne utječu na slijed aminokiselina kodirajućeg proteina. U većini slučajeva promjena nukleotida je udružena sa supstitucijom na trećoj bazi kodona. Nedavne studije su pokazale da sSNPovi utječu na gensku funkciju i ekspresiju mijenjajući ekspresiju susjednih gena. sSNPovi mijenjaju sekundarnu strukturalnu konformaciju mRNA i proteina tako da formiraju drugačiji haplotip. Primjer su tri SNP-a u neuravnoteži povezanosti gena koji generiraju haplotip koji smanjuje funkciju P-glikoproteina (transportera za lijekove) suptilno mijenjajući konformaciju vežućeg mjesta za adenzin trifosfat (80). sSNPovi također utječu na RNA spajanje, stabilnost, strukturu i proteinsko preklapanje. Te promjene značajno utječu na funkciju proteina rezultirajući promjenama u staničnom odgovoru što za posljedicu ima različitu reakciju pojedinaca na lijekove (81). Primjer je i rs 74090726 sinonimna polimorfna varijacija u egzonu 5 regije koja kodira acetyl koenzim A dehidrogenazu srednjeg lanca što dovodi do inaktivacije egzonalnog spajča, što za posljedicu ima deficijenciju proteina (82). sSNPovi također mogu ubrzati ili usporiti brzinu kojom se ribosomi kreću na mRNA, što utječe

na dinamiku translacije i posljedično sintezu proteina. Također mogu utjecati na sekundarnu strukturu mRNA i proteina pomoću alfa zavojnice i beta preklapanja (83).

Intronalni SNP-ovi djeluju na gensku ekspresiju putem *cis*-djelujućih regulatornih elemenata. To su regije nekodirajuće DNA koja regulira transkripciju susjednih gena. Intronalne sekvence sadrže mnoge *cis*-djelujuće regulatorne elemente kao što su faktori aktivacije transkripcije, pojačivači, prigušivači i izolatori koji reguliraju ekspresiju gena, a često su žarišna točka u varijantama genskih rizika (84). GWAS je identificirao rs 2981578 varijantu u receptoru za faktor rasta fibroblasta 2 kao jedan od najrizičnijih alela u karcinomu dojke. Heterozigotni klonovi rs 2981578 pokazali su visoku razinu hepatocitnog nuklearnog faktora 3-alfa, faktora vezanja transkripcije na taj intronalni SNP (85). Navedeni SNP uz još dva identificirana preslikavaju se na utišivač transkripcije pojačavajući njegovu aktivnost što za rezultat ima nižu ekspresiju receptora i povišen estrogenski odgovor i rizik za karcinom dojke (86). mRNA spajanje je proces koji predstavlja preradu prekursora mRNA u zrele mRNA što uključuje spajanje donorskih i akceptorskih mjesta, spajanje pojačivača egzona i spajanje proteina. Sekvence se mijenjaju zbog nesinonimne ili sinonimne SNP-om modulirane mRNA aktivnosti spajanja, rezultirajući produkcijom spajajućih varijanti. Npr. SNP koji rezultira promjenom G > A u intronu 32 gena Duchenneove mišićne distrofije deaktivira mjesta spajanja donora (87). Polimorfizam na mjestu spajanja donora ZNF419 gena producira ZAPHIR, alternativni spojeni polimorfni antigen histokompatibilnosti kod karcinoma bubrega (88). Intronalne sekvence sadrže mnogo nekodirajućih RNA motiva, koji ne kodiraju proteine, ali reguliraju njihovu ekspresiju kroz epigenetsku, transkripcijsku i posttranskripcijsku regulaciju. Primjer su nekodirajuće RNA tzv. dugačke nekodirajuće RNA (engl. *long non-coding ribonucleic acid*, lncRNA) koje su uključene u modeliranje kromatina, histona, sudjelujući u transkripcijskoj aktivaciji ili represiji, alternativnom spajanju, transportu endosoma i aktivaciji i supresiji onkogenog/tumorskog supresora gena lncRNA koje su u bliskom odnosu s malignom tumorogenezom. Polimorfizmi u lncRNA-kodirajućim genima utječu na normalne biološke funkcije putem kompetitivne miRNA koje utječu na mRNA i tako utječu na ekspresiju gena. Brojni polimorfizmi s lncRNA su udruženi s malignim sijelima, a jedno od njih je i rak prostate. Genska ekspresija nekodirajuće RNA1 je povišena u karcinomu prostate i prostatičnoj intraepitelnoj neoplaziji s tim da je vijabilnost tumorskih stanica i aktivnost androgenih receptora snižena kad je taj lokus utišan (89).

Zbog toga što GWAS studije istražuju SNP-ove, one predstavljaju obećavajuću tehniku za istraživanje kompleksa i prevalenciju bolesti u kojoj brojne genetske varijante doprinose riziku

od njihova nastanka. Također, pružaju puno informacija za identifikaciju genetskih markera udruženih s karcinomima, jer u svakoj analizi može biti ispitano stotine tisuća SNP-ova (90). GWAS studije pružaju agnostički pristup istraživanju genetske osnove bolesti te su provedene kod gotovo svih zloćudnih sijela. Utvrđeno je više od 450 genetskih varijanti udruženih s povišenim rizikom od nastanka tumora. Uz otkrivanje novih putova važnih u karcinogenezi, ove studije su pokazale da uobičajena genetska varijacija značajno doprinosi nasljednom riziku od mnogih uobičajenih vrsta zloćudnih oboljenja. Analize različitih polimorfizama u sklopu GWAS studija s vremenom repositioniraju ulogu polimorfizama s kliničke primjene u liječenja bolesti na samu prevenciju i njeno rano otkrivanje (91).

1.6 Etiologija KMM

KMM nalazi se na sedmom mjestu najčešće dijagnosticiranih novotvorina u muškaraca i na desetom su mjestu kad se uzmu u obzir oba spola. Incidencija u svijetu na 100.000 stanovnika je 9,5 u muškaraca i 2,4 u žena, dok je u Europskoj uniji 20 u muškarca i 4,6 u žena. Stopa dobno standardiziranog mortaliteta u svijetu (100.000 stanovnika/godinu) iznosi 3,3 za muškarce i 0,86 za žene (92). Incidencija i mortalitet variraju među državama, a zavise o izloženosti rizičnim čimbenicima, detekciji i dijagnostici te dostupnosti zdravstvene zaštite. Dodatno, moguće su i varijacije zavisno o metodologiji analize i kvaliteti baza podataka (93). Oko 75% bolesnika se prezentiraju tumorom ograničenim na mukozu ili submukozu. Oni imaju višu prevalenciju zahvaljujući dugoročnom preživljenju i nižem riziku od TSM u usporedbi s pacijentima s lokalno uznapredovalom i metastatskom bolešću (92,93).

1.6.1. Pušenje

Pušenje duhana je najvažniji rizični čimbenik u oko 50% slučajeva za pojavnost KMM (93–96). Aromatični amini i policiklički aromatički hidrokarboni unutar duhanskog dima izlučuju se bubrežnom ekskrecijom te su povezani s njegovim nastankom. Rizik je proporcionalan intenzitetu pušenja i duljini pušačkog staža (97). Cigarete niže razine katrana nisu povezane s nižim rizikom od razvoja tumora (98). Rizik povezan s elektronskim cigaretama još nije adekvatno procijenjen, iako su karcinogeni nađeni u urinu pušača elektronskih cigareta (99, 100). Pasivno pušenje je također povezano s povišenim rizikom za nastanak KMM (93).

1.6.2 Profesionalna izloženost

Profesionalna izloženost aromatičnim aminima, policikličkim aromatičkim hidrokarbonima i kloriranim hidrokarbonima je drugi najvažniji rizični čimbenik za KMM, u oko 10% svih slučajeva. Ovaj tip profesionalne izloženosti javlja se u industriji boja, metala i proizvoda od

petroleja. U razvijenim industrijskim postrojenjima, zahvaljujući mjerama zaštite na radu, izjednačena je incidencija u radnika s općom populacijom (93, 94).

1.6.3 Naslijeđe

Obiteljska anamneza, čini se, ima vrlo mali utjecaj, ali može biti predisponirajući čimbenik za veću osjetljivost prema vanjskim agensima time objašnjavajući obiteljsko grupiranje oboljelih u rođaka prvog i drugog koljena (93). U studijama su identificirana tri SNP-a povezana s razvojem agresivnog ne-mišićno invazivnog KMM iako za sada nema dovoljno dokaza koji bi podržali genetski probir (100).

1.6.4 Prehrambene navike

Prehrambene navike imaju, čini se, ograničeni utjecaj na pojavnost KMM. Sugeriran je protektivan utjecaj flavonoida i mediteranske prehrane bogate povrćem i nezasićenim masnim kiselinama iz maslinova ulja (101, 102).

1.6.5 Zračenje zdjelice

Izloženost ionizirajućem zračenju je udružena s povećanim rizikom od KMM. U retrospektivnoj analizi u bolesnika kod kojih je provedena iradijacija lokaliziranog karcinoma prostate, vanjska radioterapija je utvrđena kao neovisan čimbenik u razvoju primarnog KMM(103).

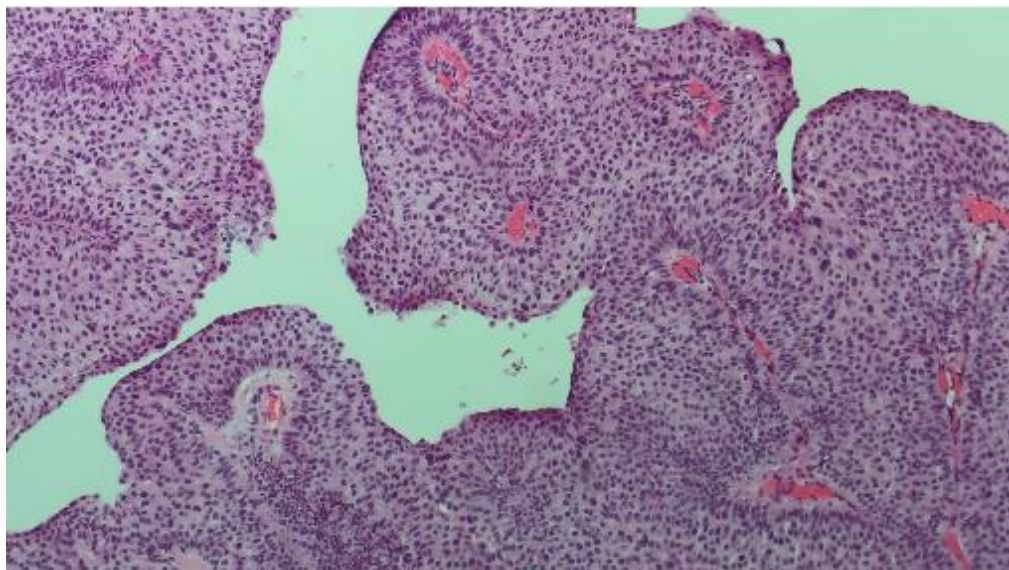
1.7. Patološka, klinička klasifikacija i stupnjevanje bolesti

Epitel sluznice urotrakta, pa tako i mokraćnog mjehura naziva se urotel te se najčešći histološki tipovi novotvorina mokraćnog mjehura odnose na urotelne tumore, od kojih čisti UC čini preko 90% svih tumora. Ostali histološki tipovi poput skvamoznog, glandularnog, karcinoma urahusa, neuroendokrinog, mezenhimalnog, tumora Mullerovog tipa i melanocitnih tumora su puno rjeđi (104).

1.7.1. Površinski i ne-mišićno invazivni KMM

KMM koji su ograničeni na mukozu klasificirani su kao površinski ili neinvazivni stadija Ta (slika 7), a oni koji probijaju laminu propriju kao ne-mišićno invazivni stadija T1 (slika 8) sukladno tumor, čvor, presadnica (engl. *Tumor Node Metastasis*, TNM) sustavu klasifikacije. Intrakavitarni tumori visokog gradusa (engl. *high grade*, HG) ograničeni na mukozu su klasificirani kao CIS (engl. *carcinoma in situ*, CIS). Svi navedeni se mogu liječiti TURM-om i eventualno u kombinaciji s intravezikalnom instilacijom. Zbog toga su za potrebe liječenja svi

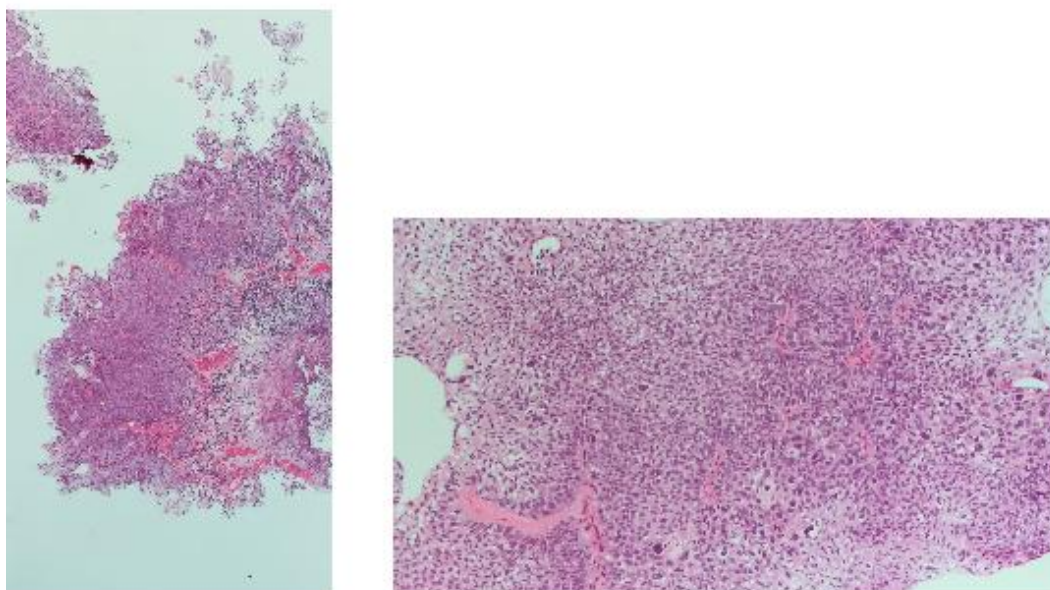
grupirani u ne-mišićno invazivne KMM. Navedeni pojam definira skupinu tumora pa se svaki mora posebno stupnjevati sukladno gradusu (G) te kliničkom i patološkom stadiju (105).



Slika 7. Histološka slika površinskog KMM Ta. Uvećanje 200x. Hemalaun-eozin metoda. Preparat izrađen u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb. Objavljeno uz dopuštenje doc.dr. Stele Bulimbašić

1.7.1.1 T1 subklasifikacija

Dubina i širenje invazije na laminu propriu (T1 podstupnjevanje) pokazalo se kao prognostički čimbenik u retrospektivnim studijama (105, 106) te je predloženo da se tako koristi i u klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation*, WHO) iz 2022. godine (107). T1 podstupnjevanje je bilo temeljeno na mikrometrijskim (T1e i T1m) ili histo-anatomskim (T1a i T1b) principima (104).



Slika 8. Histološke slike ne-mišićno invazivnog KMM T1. Uvećanje lijevo 40x, a desno 200x. Vidi se prodor tumorskih stanica u stromu. Hemalaun-eozin metoda. Preparat izrađen u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC Zagreb. Objavljeno uz dopuštenje doc.dr. Stele Bulimbašić

1.7.1.2 Histološko stupnjevanje neinvazivnih urotelnih tumora mokraćnog mjehura

WHO je 2004. objavila histološku klasifikaciju za UC koja uključuje urotelne neoplazme niskog malignog potencijala (engl. *Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*, PUNLMP), neinvazivni papilarni karcinom niskog gradusa (engl. *low grade*, LG) i HG, urotelni papilom, invertirani urotelni papilom, urotelnu displaziju i urotelnu proliferaciju neizvjesnog malignog potencijala. Navedeni sustav je dio i ažurirane 2016/2022 WHO klasifikacije (107). Za razliku od WHO klasifikacije 1973. koja ih dijeli na graduse 1, 2 i 3 tumora pruža se drugačija stratifikacija bolesnika među individualnim kategorijama (108) (tablica 4). Sustavni prikazi i meta analize nisu pokazali kako novija klasifikacija nadmašuje staru u predviđanju recidiva i progresije (109).

Tablica 4. Usporedba stupnjevanja tumora mokraćnog mjehura iz klasifikacije 1973. i 2004/2022.. Preuzeto i prilagođeno prema (110).

WHO 1973	WHO 2004/2022
G1	PUNLMP
G2	LG
G3	HG

1.7.1.3 CIS

CIS je intraepitelni, HG, neinvazivni urotelni karcinom. Lako može promaknuti ili se krivo interpretirati kao upalna lezija tijekom cistoskopije ako se ne bioptira. CIS je često multifokalan i osim u mokraćnom mjehuru često se nalazi u gornjem urotaktu, uretri i prostatičnim vodovima (111).

S kliničkog stanovišta CIS se klasificira kao:

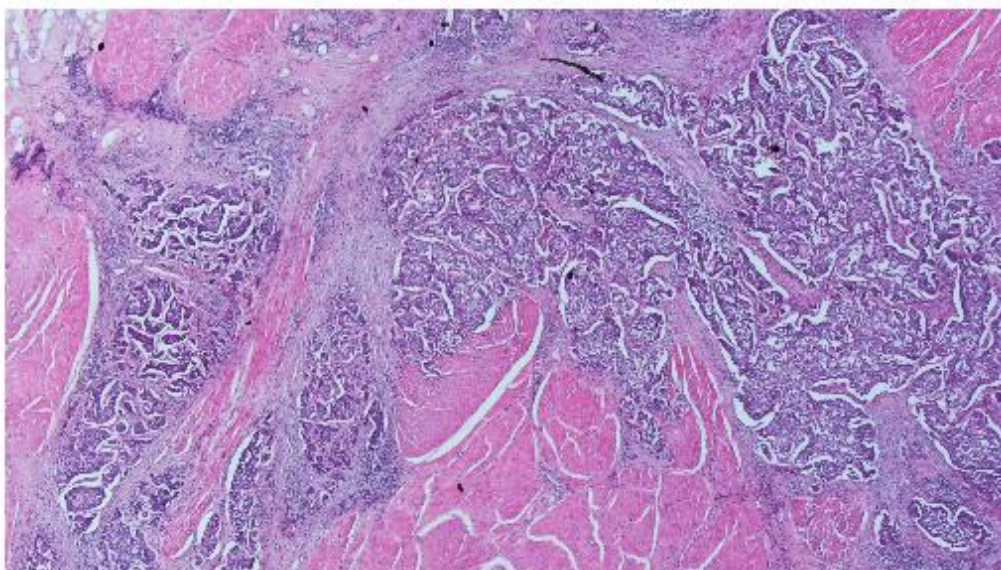
- primarni - izolirani CIS bez udruženog papilarnog tumora i prethodnog CIS-a
- sekundarni - CIS dokazan tijekom praćenja bolesnika s prijašnjim tumorom koji nije CIS
- udruženi - CIS u prisutnosti nekog drugog KMM (112).

1.7.2. Mišićno invazivni KMM

Mišićno invazivni KMM stadija T2 i više je svaki UC sa prodirom u mišić detruzor koji se nalazi u zidu mokraćnog mjehura ispod sluznice. Svaki T2 KMM je visokog gradusa (slika 9). Iz tog razloga podatak o gradusu tumora nije dovoljan za određivanje prognoze i tijeka liječenja, već je za to nužno odrediti histološki podtip (113, 114).

Podtipovi su slijedeći:

1. UC (90% slučajeva)
2. UC s djelomičnom skvamoznom i/ili žljezdanom diferencijacijom
3. mikropapilarni UC
4. ugniježđeni/mikorcistični UC
5. veliki ugniježđeni UC
6. mikrotubularni UC
7. plasmacitoidni UC
8. nalik-limfoepiteliomima UC
9. gigantocelularni, difuzni, nediferencirani UC
10. sarkomatoidni UC
11. UC s djelomičnom ili kompletnom neuroendokrinom diferencijacijom (88).



Slika 9. Histološka slika T2 KMM sa prodorom u mišić detruzor . Vide se tumorske stanice oko glatkih mišićnih stanica. Hemalaun-eozin metoda. Uvećanje 100x. Preparat izrađen u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC Zagreb. Objavljeno uz dopuštenje doc.dr Stele Bulimbašić

1.7.3 TNM klasifikacija KMM

TNM klasifikacija je najčešće upotrebljavana metoda za procjenu proširenosti većine zloćudnih tumora pa tako i za KMM (115).

T - primarni tumor

Tx - primarni tumor se ne može utvrditi

T0 - nema nalaza primarnog tumora

Ta - neinvazivni papilarni karcinom

Tis - karcinom in situ

T1 - tumor invadira subepitelno vezivno tkivo

T2 - tumor invadira mišićni dio stijenke; T2a- invazija gornje polovice mišićnog sloja T2b- invazija donje polovice mišićnog sloja

T3 - tumor infiltrira perivezikalno masno tkivo; T3a-mikroskopski T3b-makroskopski

T4 - tumor infiltrira bilo što od sljedećeg: T4a- stromu prostate, seminalne vezikule, uterus, vaginu, T4b - zdjelični zid, abdominalni zid

N - regionalni limfni čvorovi

Nx - nema regionalnih limfnih čvorova

N0 - nema metastaza u regionalne limfne čvorove

N1 - metastaza u jednom limfnom čvoru zdjelice (hipogastrični, obturatorni, vanjsko ilijačni i presakralni)

N2 - metastaze u limfne čvorove zdjelice

N3 - metastaze u zajedničke ilijačne limfne čvorove

M - udaljene metastaze

M0 - nema udaljenih metastaza

M1a - metastaze u neregionalne limfne čvorove

M1b - ostale udaljene metastaze

TNM klasifikacija KMM nakon adjuvantne kemoterapije i radikalne cistektomije se bilježi kao ypTNM (116).

1.7.4 Limfovaskularna invazija

Prisutnost limfovaskularne invazije u uzorcima TURM-a je udružena s povišenim rizikom patološkog nadstupnjevanja i lošije prognoze, a za njenu potvrdu nije nužna imonohistokemijska potvrda (107, 117).

1.8. Dijagnostika KMM

1.8.1. Simptomi i fizikalni pregled

Hematurija je nalaz karakterističan i za površinske i za mišićno invazivne KMM. Najčešći simptom s kojim se bolesnici javljaju u hitnu urološku ambulantu je bezbolna makrohematurija, a za razliku od mikrohematurije taj simptom je karakterističan za tumore visokog stupnja malignosti (107). Ostali simptomi i klinički znakovi uključuju: urgenciju, dizuriju, bol u zdjelici i simptome povezane s opstrukcijom urinarnog trakta. Iritativni simptomi mokrenja su nešto češće udruženi s CIS-om. Fizikalni pregled uključuje uzimanje anamneze (pušenje, antikoagulantna terapija), orijentacijski ultrazvuk kojim postavimo sumnju na intraluminalni egzofit ili opstrukciju gornjeg urotrakta, kompletnu krvnu sliku i sediment urina. Ukoliko se radi o profuznoj hematuriji s ugrušcima kroz mokraćnu cijev, uvađamo operativni troluminalni kateter, radimo lavažu ugrušaka špricom te ispiranje.

1.8.2. Ultrazvuk

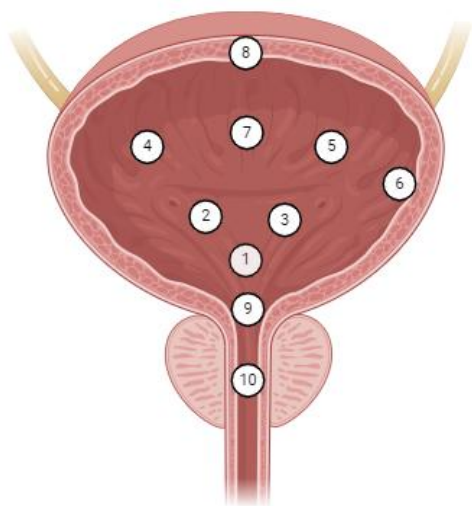
Ultrazvuk (UZV) je komplementarna metoda s fizikalnim pregledom te ima umjerenu osjetljivost za širok raspon abnormalnosti gornjeg i donjeg urotrakta. Njime se otkrivaju tumorski procesi bubrega, hidronefroza i intraluminalna tvorba unutar mokraćnog mjehura, ali se ne mogu detektirati svi potencijalni uzroci hematurije. UZV urotrakta ne može sa sigurnošću detektirati tumorski proces gornjeg urotrakta te u tom pogledu kompjutorizirana višeslojna tomografska (engl. *multi-slice computed tomography, MSCT*) urografija predstavlja dijagnostičku metodu prvog izbora (118).

1.8.3 Cistoskopija

Bolesnicima kojima ultrazvučno postavimo sumnju na KMM moramo učiniti cistoskopiju, TURM te kliničko-patološko stupnjevanje bolesti. Ultimativno, dijagnoza se radi cistoskopijom te histološkom evaluacijom resektiranog tumora. U ambulantnim uvjetima preporučuje se fleksibilna cistoskopija čime obavljam inspekciju cjelokupne sluznice mokraćnog mjehura (slika 10). U svakodnevnoj praksi, ukoliko je tumor mjehura nađen na kompjutoriziranoj tomografiji, magnetskoj rezonanciji ili ultrazvuku, dijagnostička cistoskopija se može izbjeći te se bolesnik može izravno podvrgnuti TURMu radi resekcije tumora i potvrde histološke dijagnoze. Tijekom operacije obvezna je inspekcija cijelog mokraćnog mjehura kako ne bi promaknuo koji manji tumor, posebice na vratu. Potreban je detaljan opis cistoskopije. Nužno je navesti lokaciju, broj, veličinu i oblik (papilarni ili solidni), kao i opis ostalih abnormalnosti na mukozi. Poželjno je uporabiti grafički dijagram mokraćnog mjehura (119). (slika 11)



Slika 10. cistoskopski nalaz papilarnog KMM. Privatna slika autora slikana za vrijeme ambulantne cistoskopije na Klinici za urologiju KBC Zagreb



Slika 11. Dijagram mokraćnog mjehura za označavanje lokacije tumora nakon cistoskopije: 1 trigonum, 2 desno uretralno ušće, 3 lijevo ureteralno ušće, 4 desna lateralna stijenka, 5 i 6 lijeva lateralna stijenka, 7 stražnja stijenka, 8 urahus, 9 vrat 10 prostatična uretra

Izrađeno pomoću alata BioRender.com. Preuzeto i prilagođeno prema (120).

1.8.4. Kompjutorizirana tomografska urografija i intravenska urografija

MSCT urografija se rabi za detekciju papilarnih tumora cijelog urotela pa tako i KMM. Tumori se manifestiraju kao intraluminalne tvorbe te defekti punjenja kontrasta sa ili bez hidronefroze (121). Intravenska urografija je alternativa ukoliko MSCT nije dostupan, (122) ali MSCT urografija pruža više informacija posebice kod T2 KMM i UC gornjeg urotakta, uključujući status limfnih čvorova i parenhimskih organa. Opće prednosti MSCT snimanja uključuju visoku prostornu rezoluciju, kraće vrijeme snimanja, veću pokrivenost u jednom zadržavanju daha i manju osjetljivost na promjenjive čimbenike bolesnika. MSCT urografija ne može razlikovati stadije tumora od primjerice Ta do T3a, ali je korisna za otkrivanje invazije u perivezikalno masno tkivo i susjedne organe. Točnost MSCT-a u određivanju ekstravezikalnog proširenja tumora povećava se napredovanjem bolesti (123). Status metastaza u regionalne limfne čvorove baziran na njihovoj veličini je ograničen i sukladno tome MSCT ne može identificirati metastaze u limfne čvorove normalne veličine i/ili one početno povećane. Stoga se zdjelični limfni čvorovi veći od 8 mm i abdominalni veći od 10 mm u kraćem promjeru smatraju patološki povećanim (124). Potreba za snimanjem MSCT urografije sa svrhom isključivanja udruženog tumora gornjeg urotakta je upitna jednom kad otkrijemo tumor mokraćnog mjehura, s obzirom na nisku incidenciju od 1,8%, a koja se penje i na 7,5% ukoliko se tumor nalazi na trigonumu mokraćnog mjehura (125). Rizik od tumora gornjeg urotakta tijekom praćenja povećava se u bolesnika s multifokalnim i tumorima mokraćnog mjehura

visokog stupnja malignosti (126). Prije određivanja terapijskog modaliteta, poglavito kod sumnje na T2 KMM, bitno je utvrditi i postojanje udaljenih metastaza. MSCT i magnetska rezonanca su metode izbora za utvrđivanje plućnih i jetrenih metastaza, dok su koštane i moždane metastaze rijetke u T2 KMM (127, 128).

1.8.5. Multi parametrijska magnetska rezonanca mokraćnog mjehura

Standardizirana metodologija opisivanja tumora mokraćnog mjehura magnetskom rezonancom zove se skraćeno VI-RADS (engl. *Vesical Imaging-Reporting and Data System*) (129). Sistematski prikaz 8 studija pokazao je kako VI-RADS sustav može precizno razlikovati mišićno invazivni od ne-mišićno invazivnog KMM (119). Za liječenje KMM od ključne je važnosti razlučiti T1 od T2 tumora, a mpMR mokraćnog mjehura ima superiorniju rezoluciju kontrasta mekih tkiva nad MSCT-om. Multiparametrijska magnetska rezonanca (mpMR) mokraćnog mjehura upotrebljavajući VI-RADS sustav je pokazala razlikovanje Ta/T1 od T2 KMM s visokom dijagnostičkom preciznošću, dok se CIS ne može dijagnosticirati slikovnim metodama. (129). Sistematski prikaz istraživanja pokazao je ukupnu osjetljivost i specifičnost od 90% i 88% koje se poboljšavaju na 92% i 96% ako se rabi uređaj jačine 3 Tesla (130). Prema modificiranoj Delphi metodologiji koja je dogovorena konsensusom radiologa, urologa, onkologa, radioterapeuta i udruge pacijenata, utvrđene su preporuke za mpMR dijagnostiku KMM. Između ostalog stručnjaci su se usuglasili da ukoliko je moguće snimanje mPMRa mokraćnog mjehura i VI-RADS analiza bude rađena uvijek prije TURM-a (131).

1.8.6. Slikovna dijagnostika za stupnjevanje T2 KMM

U kliničkoj praksi histopatološka analiza i stupnjevanje bolesti su neizbježni za odabir adekvatnog modaliteta liječenja i određivanja prognoze (132). Slikovna dijagnostika je ključna za lokalno i udaljeno stupnjevanje KMM, a zlatni standard je kompjutorizirana tomografija prsnog koša, abdomena i zdjelice. Ciljevi slikovne dijagnostike u bolesnika s KMM su:

- detektirati tumor
- izdiferencirati T1 od T2 tumora s obzirom kako se njihovo liječenje razlikuje
- evaluirati opseg lokalne proširenosti bolesti i zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova
- procijeniti istovremeno postojanje tumora u gornjem urotraktu ili udaljenih metastaza.

1.8.7 Citologija urina

Analiza izmokrenog urina ili ispirka mokraćnog mjehura na izljuštene maligne stanice ima visoku osjetljivost za tumore visokog stupnja malignosti i koristan je pokazatelj u slučajevima

HG tumora ili CIS-a, iako pozitivna citologija urina može imati podrijetlo iz bilo kojeg dijela urinarnog trakta. Evaluacija citologije urina može biti pogrešno interpretirana uslijed malog broja stanica u uzorku, infekcije mokraćnog sustava, kamenaca ili intravezikalnih instilacija. Za iskusne citologe specifičnost dostiže preko 90% iako negativna citologija ne isključuje postojanje tumora, posebice za pTa tumore (126). Kategoriziranje citologije urina radi se prema Pariškoj klasifikaciji iz 2022.

- adekvatnost uzorka urina
- negativna citologija za UC HG
- atipične urotelne stanice
- suspektne stanice na UC HG
- UC HG.

1.8.8. Testovi za urinske molekularne biljege

Zbog niske osjetljivosti citologije urina u bolesnika s LG KMM, razvijeni su brojni urinski testovi, ali nijedan od njih nije prihvaćen u svakodnevnoj praksi bilo za detekciju ili praćenje u bolesnika s KMM (133). Generalno je zauzet sljedeći stav glede urinskih testova za detekciju KMM:

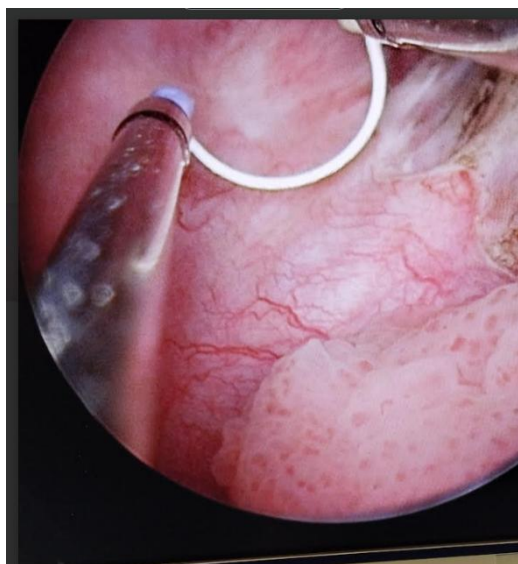
- osjetljivost testova je obično viša na račun niske specifičnosti u usporedbi za citologijom urina (134)
- benigna stanja i prijašnje intravezikalne instilacije Bacillus Calmette-Guérin otopine (BCG) utječu na rezultate urinskih testova (135)
- zahtjevi za osjetljivost i specifičnost testova za urinske biljege široko ovise o kliničkom kontekstu bolesnika (radi li se o probiru, primarnoj detekciji, praćenju ili o tumoru visokog ili niskog stupnja malignosti) (134).

1.9. Transuretralna resekcija KMM

1.9.1. Transuretralna resekcija Ta i T1 KMM

Ciljevi transuretralne resekcije Ta i T1 tumora jesu: utvrditi adekvatnu patološku dijagnozu, stupnjevanje i kompletno odstranjenje svih vidljivih lezija ukoliko je moguće. TURM je ključna procedura u liječenju KMM i mora biti napravljena sistematski korak po korak (136).

Operativni koraci koji se rade da bi se zadovoljili postulati uspješnog TURM-a uključuju identifikaciju faktora kojima se procjenjuje rizik bolesti (broj tumora, veličina, arhitektura, lokacija, udruženost sa CIS-om, primarni vs. recidivni tumor), klinički stupanj bolesti (bimanuelna palpacija), adekvatnost resekcije (vizualizacija kompletne resekcije, makroskopska prisutnost mišićnog sloja na bazi resekcije), vizualizacija tumora u distalnom ureteru i prisutnost komplikacija (isključenje perforacije) (136). Cistoskopski dokumentirane karakteristike tumora tj. kliničke procjene gradusa tumora i stadija bolesti su bitne za procjenu potrebe za instilacijom intravezikalne kemoterapije odmah nakon operativnog zahvata ili u slučaju mišićno invazivnih tumora da budu brzo usmjereni definitivnom tretmanu (137). Za procjenu veličine tumora može se rabiti eza resektoskopa koja je otprilike oko 1 cm široka (slika 12). Izgledom tumori mogu biti na peteljci, nodularni, papilarni, miješani papilarno/solidni ili ravni.



Slika 12. Transuretralna resekcija papilarnog KMM. Privatna slika autora slikana za vrijeme TURMa na Klinici za urologiju KBC Zagreb

1.9.2 Transuretralna resekcija invazivnih KMM

Cilj TURM-a je omogućiti histopatološku dijagnozu i stupnjevanje, što zahtijeva prisutnost mišićne stijenke detruzora u reseciranom uzorku. U slučaju sumnje na T2 KMM, tumor mora biti reseciran odvojeno u dijelovima, koji uključuje egzofitični dio tumora te podležću stijenku s prisutnim mišićem detruzorom i rubovima reseciranog područja. Najdublji dio reseciranog uzorka mora biti referiran patologu u posebnoj posudi sa svrhom postavljanja ispravne dijagnoze (138). Tumor prostatične uretre je udružen s tumorom mokraćnog mjehura u jednog od tri bolesnika, posebice ako su tumori locirani na trigonumu, vratu mokraćnog

mjehura, u slučaju multiplih tumora ili onih udruženih sa CIS-om (139, 140). Zahvaćenost prostatične uretre može se odrediti tijekom TURM-a ili na patološkom smrznutom preparatu nakon učinjene cistoprostatektomije. Negativni nalaz na smrznutoj sekciji identificira bolesnike u kojih ne treba raditi uretrektomiju. Dijagnoza uretralnog tumora prije RC će u konačnici rezultirati uretrektomijom, a što je kontraindikacija za izvođenje ortotopične derivacije. Međutim, odluka za ortotopičnu (engl. neobladder, NB) derivaciju urina se ne smije bazirati samo nalazu preoperativne biopsije, već i na nalazu smrznute sekcije koja mora biti dio postupka u radikalnoj cistektomiji, posebice u muških pacijenata (141).

1.9.3. Kirurški i tehnički aspekti resekcije tumora

1.9.3.1 Kirurška strategija resekcije

Kompletna resekcija tumora rađena bilo frakcionirano ili cjelovitom (fr.*en-bloc*, EB) resekcijom je ključna za postizanje dobre prognoze (142). Frakcionirana resekcija tumora (posebno egzofitični dio, a posebno baza i rubovi resekcije daju dobru informaciju o vertikalnom i horizontalnom širenju tumora (143). Navedena tehnika se radi ezom s monopolarnom ili bipolarnom dijatermijom ili Thulium-Yag laserom kao mogućom alternativom (144). EB resekcija tumora monopolarom, bipolarom ili laserom je izvediva kod selektiranih egzofitičnih tumora. Ona pruža visokokvalitetne resecirane uzorke s prisutnošću mišićnog sloja u 96 - 100% uzoraka (142, 145). Usporedba EB i frakcionirane tehnike TURM-a ostaje za raspravu. U određenim studijama utvrđena je približno jednaka stopa recidiva rađenih bilo EB ili konvencionalnom tehnikom te jednaka ili veća prisutnost mišićne stijenke u TURM-ova rađenih EB nad konvencionalnom tehnikom (146, 147). Odabir tehnike zavisi o veličini, lokaciji tumora te iskustvu kirurga. Veličina tumora pogodna za EB resekciju izravno zavisi o endoskopskoj opremi, a dokazano je kako uspjeh opada s tumorima većima od 3 cm (148).

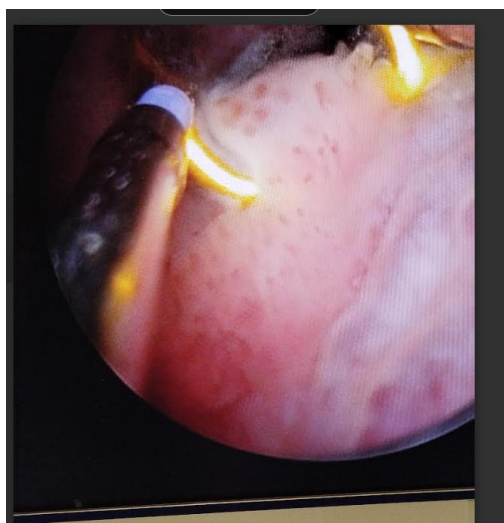
1.9.3.2. Evaluacija kvalitete resekcije

Odsutnost mišića detruzora u uzorku je udružena sa značajno višim rizikom za rezidualnu bolest, rani povratak i podstupnjevanje same bolesti. Prisutnost stijenke detruzora u uzorku predstavlja surogat za uspješnost same kvalitete resekcije tumora (osim za Ta LG tumore) (149). U svrhu standardizacije zahvata potrebno je postupiti po kirurškim kontrolnim listama koje dokumentiraju ključne korake operacije radi kontrole kvalitete operacije i uzimanja adekvatnog uzorka (136). Dokazano je kako kirurško iskustvo poboljšava rezultate te se potiče razvoj programa učenja na simulatorima (150). U retrospektivnim studijama je dokazano da kirurško iskustvo doprinosi nižem broju komplikacija, povrata bolesti i dužini preživljenja bolesnika (151-153). Također je dokazano kako je ispunjavanje kontrolne liste tijekom

edukacije specijalizanata kirurškim tehnikama TURM-a važan čimbenik koji doprinosi većem postotku dobivanja mišićne stijenke u prikupljenom preparatu (136).

1.9.3.3 Resekcija monopolarom i bipolarom

Monopolarna i bipolarna struja su vrste električne energije koje se koriste u kirurškim zahvatima za rezanje i koagulaciju tkiva. Monopolarna struja rabi elektrodu na vrhu kirurškog instrumenta za rezanje te jastučić za uzemljenje koji se lijepi najčešće na kožu bolesnika, a struja se provodi od instrumenta do elektrode na uzemljenje. Druga vrsta aparata je bipolarni kauter. Ova vrsta koristi uređaj s dvije elektrode koja se prsloni na tkivo (najčešće bipolarna pinceta), a struja ide od jedne elektrode prema drugoj tijekom čega zagrijava i koagulira tkivo (slika 13). U početku je resekcija bipolarom predstavljena kao metoda s nižim rizikom za komplikacije (podraživanje obturatornog živca s posljedičnom perforacijom mjehura). Novija istraživanja pokazuju kontroverzne rezultate. Sustavni pregled rađen na 2379 pacijenta operiranih TURM-om nije pokazao razliku u učinkovitosti i sigurnosti između monopolarne i bipolarne (154), dok su druga istraživanja pokazala manji gubitak krvi, kraću hospitalizaciju te kvalitetnije uzorke posljedično manjem termalnom oštećenju u korist bipolarne (155).



Slika 13. Resekcija KMM bipolarnom strujom. Privatna slika autora slikana za vrijeme TURMa na Klinici za urologiju KBC Zagreb

1.9.3.4 Resekcija incidentalno nađenih malih KMM prilikom operacijskog liječenja benigne hiperplazije prostate

Tijekom transuretralne resekcije prostate u bolesnika s benignom hiperplazijom prostate ponekad se incidentalno pronađe i KMM. Pod uvjetom da se radi o manjem, papilarnom i unilokularnom tumoru u istom aktu je izvedivo raditi i TURM i transuretralnu resekciju prostate

uz nizak perioperacijski i rizik za rasap bolesti, čak i ako je postoperacijski potrebno instilirati intravezikalnu kemoterapiju u mokraćni mjehur (156, 157).

1.9.4 Endoskopske biopsije mokraćnog mjehura

CIS je posebni kliničko-patološki entitet koji se prezentira kao baršunasti, crvenkasti areal i koji se teško razlikuje od upale ili ne mora uopće biti vidljiv. Iz tog razloga se uzimaju biopsije sa suspektnih mjesta u mokraćnom mjehuru ili kod bolesnika s pozitivnom citologijom urina, a normalnog izgleda sluznice, moraju se uzeti nasumične biopsije: tzv. mapiranje mokraćnog mjehura. Kako bi se mapiranje adekvatno napravilo, moraju se uzeti biopsije s trigonuma, krova, lijeve, desne, anteriorne i posteriorne stijenke (158, 159).

1.9.5. Biopsije prostatične uretre

U bolesnika s KMM moguća je prisutnost udružene lezije i u prostatičnoj uretri. Stoga se kod tumora lociranih na trigonumu i vratu, multifokalnih ili sumnje na CIS preporučuje uzeti i biopsija prostatične uretre na položaju 5 i 7 sati prije verumontanuma (160, 161).

1.9.6. Nove metode vizualizacije tumora

Kao standardna procedura, cistoskopija i TURM se rade pod bijelim svjetlom (engl. *white light*, WL). Međutim, uporaba WL može dovesti do propusta u detekciji lezije koje postoje ali nisu vidljive, što je uvjetovalo razvoj novih metoda detekcije.

1.9.6.1. Fotodinamska dijagnoza (fluorescentna cistoskopija ili cistoskopija plavim svjetlom)

Fotodinamska dijagnostika (FD) se izvodi uz pomoć plavog svjetla nakon instilacije 5-aminolevulinske ili heksaminolevulinske kiseline .

1.9.6.1.1. Utjecaj na detekciju karcinoma

Potvrđeno je kako biopsija i resekcija KMM pod fluorescentnim svjetlom ima veću osjetljivost nego konvencionalne metode za detekciju malignih tumora, posebno CIS-a, što je opisano u preglednim radovima i meta-analizama (92% vs 71%). Ipak, FD ima nižu specifičnost nego WL i ne pomaže za isključenje lezije u prostatičnoj uretri (162, 163). Lažno pozitivan nalaz može biti induciran upalom, nedavnim TURM-om ili tijekom prva tri mjeseca nakon instilacije BCG-a (164).

1.9.6.1.2 Utjecaj na povrat bolesti

Blagotvoran utjecaj FD na povrat bolesti je analiziran kroz pregledne članke koji su demonstrirali niži rizik od povrata bolesti i u kraćem i u duljem razdoblju. Međutim, nije nađena razlika u progresiji i stopi mortaliteta (165). Najnovija Cochrane pregledna analiza je pokazala

da FD asistiran TURM produžuje ne samo razdoblje bez povrata bolesti, već i progresiju bolesti ali uz nisku sigurnost dokaza (166). U suprotnosti s prethodnim dokazima, multicentrična studija iz Ujedinjenog Kraljevstva je pokazala da FD ne utječe na redukciju povrata bolesti niti je isplativ u usporedbi s konvencionalnim WL TURM-om kroz trogodišnje razdoblje (167).

1.9.6.1.3 Uskopojasno snimanje

Kod uskopojasnog snimanja (US) ističe se kontrast između normalnog urotela i hipervaskularnog zloćudnog tkiva. Pojačana detekcija karcinoma je dokazana kod biopsija mjehura i TURMa vođenih US (168). Iako su ukupni rezultati negativni, korist metode je nakon tri mjeseca i nakon jedne godine utvrđena za tumore niskog rizika (169). Pregledni članak i meta analiza Russoa i autora pokazala je poboljšanu detekciju (dijagnostički precizniju) tumora mjehura rađenu FD ili US prema WL cistoskopiji (170). Obrnuto, meta analiza koja je uzela u obzir jednokratnu postoperacijsku instilaciju kemoterapeutika pokazala je nižu stopu recidiva u jednogodišnjem razdoblju samo primjenom FD, ali ne i u US asistiranim TURM-om (171).

1.9.6.1.4 IMAGE1S

IMAGE1S je slikovno poboljšanje koje se temelji na kompjuteriziranom procesuiranju različitih komponenata boja upotrebljavajući specifične svjetlosne filtre. Iako uz ograničene dokaze, do sada su utvrđena poboljšanja u dijagnostičkoj preciznosti u četiri različita svjetlosna spektra te je utvrđen niži postotak povrata bolesti u odnosu na konvencionalne WL za T1 tumore nižeg i srednjeg rizika (172).

1.9.7. Re TURM

1.9.7.1. Detekcija rezidualne bolesti i dostupnjevanje tumora

Značajan rizik od zaostalog tumora nakon inicijalne TURM procedure opisan je kod Ta i T1 lezija (173). Taj rezidualan tumor ima potencijal pogoršati onkološke ishode i stoga dalje naglašava važnost dobro napravljenog inicijalnog TURM-a. Za bolesnike kojima je napravljen inkompletan TURM, bilo zbog veličine tumora ili intraoperativnih komplikacija, i kojima treba kompletna resekcija u drugom aktu, bitan je dokumentirani podatak da tumor u prvom aktu nije do kraja izresecirano. Glavne svrhe ponovnog TURM-a su: odstraniti rezidualni tumor, re-resecirati mjesto ranije resekcije radi dobivanja adekvatnog patološkog nalaza, dopuniti nedostajuće kliničke podatke (npr. proširenost tumora, zahvaćanje prostatične uretre). Sustavnom analizom podataka o bolesnicima s Ta i T1 HG KMM uočen je rizik za ostatni tumor od 51% te 8 % za podstupnjevanje bolesti. Većina rezidualnih lezija je nađena na mjestu inicijalnog tumora (174). Također je utvrđeno kako je u bolesnika s T1 tumorom

prevalencija rezidualnog tumora i dostupnjevanje bolesti u invazivni tumor nakon ponovnog TURM-a visoka. Visoka je i u bolesnika u kojih se na inicijalnom TURM-u dobio mišićni sloj u preparatu. U skupini promatranih bolesnika se u 58% našao rezidualan tumor, a u 11% se tumor restupnjevaio u invazivni (175).

1.9.7.2 Utjecaj re-TURM-a na ishode liječenja

Re-TURM povećava razdoblje bez recidiva bolesti, poboljšava ishode nakon BCG tretmana, i pruža prognostičku informaciju (176,177). U retrospektivnim evaluacijama bolesnika sa T1 tumorima i onih liječenim BCG-om, ponovni TURM se pokazao povoljnim čimbenikom za produljenje razdoblja bez recidiva i progresije bolesti te ukupnog preživljenja u bolesnika u kojih je inicijalnim TURM-om dobiven mišić detruzor (178). Retrospektivne studije koje su analizirale bolesnike u kojih je rađen ponovni TURM utvrdile su bolje ukupno preživljenje. Tu pojavu je moguće pogledati i kroz prizmu selekcije bolesnika za ponovni TURM s obzirom da su ipak zdravstveno spremniji bolesnici u mogućnosti ići na dva zahvata u kratkom roku. Stoga je u budućnosti ključno identificirati specifične podgrupe pacijenata koje imaju koristi od ponovnog TURM-a (179).

1.9.7.3 Vrijeme tempiranja ponovnog TURM-a

Retrospektivna evaluacija je pokazala kako je vrijeme 14 do 42 dana nakon inicijalne resekcije za ponovni TURM optimalno tj. da produljuje razdoblje bez recidiva i progresije bolesti. Bazirano na navedenom dokazu donesene su i preporuke za provođenje ponovnog TURM-a 2 do 6 tjedana nakon inicijalne resekcije (180).

1.9.7.4. Dokumentacija rezultata

Rezultati ponovnog TURM-a (rezidualni tumor i podstupnjevanje bolesti) odražavaju se na kvalitetu i efektivnost inicijalnog TURM-a. S obzirom da je cilj poboljšati kvalitetu inicijalnog TURM-a, moraju se zabilježiti rezultati druge resekcije.

1.9.8. Patološko izvješće

Patološka analiza uzorka dobivenog TURM-om i biopsijom je ključan korak u vezi daljnjih odluka vezanih za liječenje KMM(181). U tom slučaju je izrazito važna suradnja urologa i patologa. Klinička informacija i visoka kvaliteta reseciranog i poslanog tkiva je ključna za adekvatnu patološku analizu. Kako bi dobili sve relevantne informacije, prikupljanje uzoraka, njihovo rukovanje i evaluacija se moraju provoditi prema zadanim preporukama (182) (Tablica 5).

Tablica 5.: Potrebni i preporučeni elementi patološkog izvješća za UC -uzorci biopsije i transuretralne resekcije:

Potrebno	Preporučeno
Mjesto uzimanja uzorka	Klinička informacija
Operacijski postupak	Ključ za identifikaciju bloka
Histološki tip	T1 podstupnjevanje
Histološki podtip	Udružene epitelne lezije
Gradus	Koegzistirajuća patologija
Proširenost invazije	Sporedne studije
Status muskularis proprije	
Limfovaskularna invazija	
Neinvazivni karcinom	

Stavke kontrolne liste za TURM (preuzeto i modificirano prema Mostafaïd et al, Suarez-Ibarolla et al (136,183).

Operacijska sala

- Provjera postavki operacijske dvorane i instrumenata (košuljica, resektoskop, eza, monopolar/bipolar) kamera, video, kateter
- Irigacijska otopina: fiziološka otopina, voda, glicin
- Karakteristika bolesti: cistoskopski izgled tumora, prvi ili ponovni TUR, svjetlo (bijelo, fotodimansko ili uskopojasno snimanje), procjena rizika

Cistoskopija/TURM

- Cistoskopija: uretra/prostata (muškarci), ureteralna ušća, divertikli
- Lokacija tumora: broj, veličina, oblik, CIS
- WL/FD/US
- Ispirak mjehura na citologiju
- Tehnika resekcije (standard/en bloc)
- Dubina resekcije
- Kompletne/nekompletne resekcije
- Biopsija prostatične uretre DA/NE
- Dodatne procedure (npr. retrogradna ureteropijelografija)

- Procijenjen gubitak krvi
- Intraoperacijske komplikacije
- Intravezikalna terapija

1.10. Predviđanje povrata bolesti i progresije

Za liječenje KMM, a poglavito Ta i T1 svakako treba uzeti u obzir prognozu i komorbiditete bolesnika. Kako bi se predvidio rizik povrata i/ili progresije bolesti, predstavljeno je nekoliko prognostičkih modela za specifične populacije bolesnika.

1.10.1. Modeli bodovanja sukladno WHO 1973 sustavu klasifikacije

1.10.1.1. 2006 Model bodovanja Europske organizacije za istraživanje i liječenje karcinoma (engl. European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTIC)

Radi lakšeg predviđanja i kratkoročnih i dugoročnih procjena rizika za povrat i progresiju, EORTIC grupa za urološke tumore objavila je 2006. sustav bodovanja i tablice rizika prema klasifikaciji WHO-a iz 1973. Sustav bodovanja temelji se na šest najznačajnijih kliničkih i patoloških faktora u bolesnika uglavnom tretiranih intravezikalnom kemoterapijom: broj tumora, promjer tumora, prethodna stopa ponavljanja, T kategorija, konkomitantni CIS, gradus tumora (WHO 1973).

1.10.1.2. Model za bolesnike s Ta G1/G2 (WHO1973) tumore tretirane kemoterapijom

Taj sustav svrstava bolesnike u tri rizične skupine za recidiv, uzimajući u obzir povijest recidiva, povijest intravezikalne terapije, gradus tumora i adjuvantnu kemoterapiju (184)

1.10.1.3 Model bodovanja za bolesnike liječene BCG-om prema Španjolskom urološkom društvu (Club Urologico Espanol de Tratamiento, CUETO)

Model koji predviđa rizik od povrata i progresije bolesti, baziran na 12 doza intravezikalnog BCG-a kroz 5 - 6 mjeseci praćenja nakon TURM-a. Sustav bodovanja temelji se na sedam prognostičkih čimbenika: dobi, spolu, prijašnjoj stopi recidiva, broju tumora, T statusu, konkomitantnom CISu, G tumora.

Upotrebljavajući taj model, izračunati rizik recidiva je niži nego onaj prema EORTIC scoring modelu. Za progresiju bolesti vjerojatnost je niža samo za bolesnike visokog rizika (185). Niži rizik u CUETO tablicama može biti povezan s uporabom BCG-a u studiji. Prognostička

vrijednost EORTIC bodovnog sustava je potvrđena podacima od CUETO bolesnika liječenih BCG-om i dugotrajnim praćenjem u drugoj populaciji bolesnika (186).

1.10.1.4. EORTIC scoring model za bolesnike tretirane održavanjem BCG-om

U bolesnika intermedijarnog i visokog rizika bez konkomitentnog CISa tretiranih sa 1 do 3 godine održavanja BCGom, nađeno je da su prijašnji stupanj recidiva i broj tumora najvažniji prognostički čimbenik za povratak bolesti, a stupanj i gradus za progresiju i bolest specifično preživljenje, dok su dob i gradus najvažniji čimbenici kod sveukupnog preživljenja. Upotrebljavajući te podatke izrađeni su normogrami kod pacijenta na terapiji održavanja BCGom (187).

1.10.2. Model bodovanja upotrebljavajući WHO 2004/2016 i WHO 1973 klasifikacijski sustav

1.10.2.1 Sustav bodovanja Europskog urološkog društva (engl. European Association of Urology, EAU) za ne-mišićno invazivni KMM 2021.

Navedeni sustav je ažurirao rizik od progresije bolesti i kreirao rizične skupine novih prognostičkih čimbenika upotrijebivši i WHO 1973 i WHO 2004/2016 klasifikacijski sustav. Uključeni su bolesnici liječeni TURM-om sa ili bez intravezikalne kemoterapije, dok su bolesnici liječeni BCG-om isključeni jer BCG može reducirati rizik od progresije bolesti. Iz multivarijantnih analiza nezavisni prediktori progresije bolesti su stupanj, gradus (WHO 1973 i 2004/2022), konkomitantni CIS, broj, veličina tumora i dob (188). To je jedan dostupan model koji uključuje WHO 2004/2022 klasifikacijski sustav kao jedan od parametara uz izračun individualnog bolesnikovog rizika i vjerojatnosti od progresije. Za napomenuti je da EAU sustav bodovanja procjenjuje samo rizik od progresije tumora, ali ne i povrata bolesti, stoga se bilo koji od prije navedenih modela može uporabiti za izračun bolesnikovog individualnog rizika.

1.10.3. Drugi prognostički čimbenici

Drugi (unaprijeđeni) prognostički čimbenici su opisani za selektirane skupine bolesnika:

- Za T1 HG/G3 tumore važni prognostički čimbenici su ženski spol, CIS u prostatičnoj uretri u muškaraca liječenih indukcijskim tretmanom BCG-a, dob, veličina tumora, udruženi CIS u bolesnika liječenih BCG-om (160, 189).
- Osobita pažnja mora biti pridodana bolesnicima sa T1 HG/G3 tumorima u divertiklu mjehura zbog odsustva mišićnog sloja u stijenci divertikla (190).

- U bolesnika s T1G2 tumorima liječenih TURM-om recidiv unutar 3 mjeseca je najvažniji prediktor progresije (191).
- Za uvrštenje molekularnih biljega u normograme za izračun rizika, a da bi se poboljšala njihova prediktivna točnost nužna su daljnja istraživanja (192, 193).

1.10.4 Primarni karcinom in situ

Bez ikakvog liječenja, približno 54% bolesnika sa CIS-om progredira u T2 bolest. Za CIS ne postoje pouzdani prognostički čimbenici, iako su neke studije objavile lošiji ishod u udruženom CIS-u i T1 tumoru u usporedbi sa samim CIS-om, proširenim CIS-om i CIS-om u prostatičnoj uretri. Odgovor na intravezikalnu terapiju BCG-om ili kemoterapiju je važan prognostički čimbenik za naknadnu progresiju i smrt uzrokovanu KMM (185, 186). Kod 10 do 20% bolesnika koji su odgovorili na BCG u usporedbi sa 66% onih koji nisu, bolest će progredirati u T2 stadij (194, 195).

1.10.5 Stratifikacija bolesnika u rizične skupine

Kako bi se omogućilo lakše i jednostavnije provođenje smjernica za liječenje, preporučuje se podijeliti bolesnike u rizične skupine temeljene na vjerojatnosti progresije bolesti u T2 stadij. Definicija rizične skupine prema smjernicama EAU temelji se na individualiziranim podacima bolesnika analiziranih u primarno oboljelih bolesnika i kalkulaciji njihovih bodova za progresiju.

Za računanje rizične skupine u pojedenih bolesnika može se rabiti sustav klasifikacije WHO 1973. ili WHO 2004/2016. Vjerojatnost progresije u 5 godina varira od 1% na više od 40 % među rizičnim skupinama. Za čimbenike gdje podaci za individualne bolesnike nisu skupljeni poput podtipova urotelnog karcinoma, primarnog CIS-a i CIS-a u prostatičnoj uretri literaturni podaci su uzeti za raspodjelu bolesnika u rizične skupine.

Klinički sastav novih skupina rizika prognostičkih čimbenika EAU Ta/T1 KMM na temelju klasifikacijskih sustava ocjenjivanja WHO 1973 ili 2004/2016 (196):

- Samo jedan ili drugi sustav (WHO 1973 ili WHO 2004/2016) se koristi za izračun rizične skupine.
- Ako su oba klasifikacijska sustava dostupna u pojedinog bolesnika, preporučuje se rabiti izračun rizične skupine na temelju WHO 1973 s obzirom da ima bolju prognostičku vrijednost.

- Kategorija tumora nižeg stupnja malignosti (WHO 2004/2016) isto uključuje bolesnike s tumorima klasificiranim kao papilarna urotelna neoplazma niskog stupnja malignosti PUNLMP.
- Dodatni klinički rizični čimbenici su: dob > 70 godina, multipli papilarni tumori i tumori veći od 3 cm u promjeru.

Rizična skupina:

Nizak rizik

Primarni, unilokularan, TaT1
LG/G1 tumor < 3cm bez CIS-a u
bolesnika < 70 godina

Intermedijarni rizik

Bolesnici bez CIS-a koji nisu
uključeni ni u nizak, visok ili vrlo
visok rizik

Visok rizik

Svi T1 HG/G3 bez CISa, osim onih
uključenih u grupu vrlo visokog
rizika

Stadij, G s dodatnim kliničkim

čimbenicima rizika:

Ta LG/G2 ili T1G1, bez
CIS-a sa sva 3 rizična
čimbenika

Ta HG/G3 ili T1LG, bez
CIS-a s najmanje 2 rizična
čimbenika

T1 G2 bez CIS-a s najmanje
jednim rizičnim
čimbenikom

Vrlo visok rizik

Stadij, s dodatnim kliničkim

čimbenicima rizika:

- Ta HG/G3 i CIS sa sva 3 rizična čimbenika
- T1G2 i CIS s najmanje dva rizična čimbenika
- T1 HG/G3 i CIS s najmanje jednim rizičnim čimbenikom
- T1 HG/G3 bez CIS-a sa sva tri rizična čimbenika

Sustav bodovanja temelji se na individualnim podacima bolesnika, ali ne ubraja bolesnike sa primarnim CIS-om (visok rizik) ili recidivirajućim tumorima, kao i patološke parametre kao što su subtipovi karcinoma.

Vjerojatnost progresije bolesti u 1, 5 i 10-godišnjem razdoblju prema EAU rizičnim skupinama (196):

Nove rizične skupine sa WHO 2004/2006 ((Vjerojatnost progresije i 95% interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI))

- Nizak 0,06% (CI: 0,01% – 0,43%) u jednogodišnjem razdoblju 0,93% (CI: 0,49% – 1,7%) u petogodišnjem razdoblju i 3,7% (CI: 2,3% – 5,9%) u desetogodišnjem razdoblju
- Intermedijarni 1,0% (CI: 0,50% – 2,0%) u jednogodišnjem razdoblju 4,9% (CI: 3,4% – 7,0%) u petogodišnjem razdoblju i 8,5% (CI: 5,6% – 13%) u desetogodišnjem razdoblju
- Visok 3,5% (CI: 2,4% – 5,2%) u jednogodišnjem razdoblju, 9,6% (CI: 7,4% – 12%) u petogodišnjem razdoblju i 14% (CI: 11% – 18%) u desetogodišnjem razdoblju
- Vrlo visok 16% (CI: 10%–26%) u jednogodišnjem razdoblju, 40% (CI: 29%–54%) u petogodišnjem razdoblju i 53% (CI: 36%–73%) u desetogodišnjem razdoblju.

Nove rizične skupine sa WHO 1973 (Vjerojatnost progresije i 95% interval pouzdanosti)

- Nizak 0,12% (CI: 0,02% – 0,82%) u jednogodišnjem razdoblju,

0,57% (CI: 0,21% – 1,5%), u petogodišnjem razdoblju i 3,0% (CI: 1,5% – 6,3%) u desetogodišnjem razdoblju

- Intermedijarni 0,65% (CI: 0,36% – 1,2%) u jednogodišnjem razdoblju 3,6% (CI: 2,7% – 4,9%) , u petogodišnjem razdoblju i 7,4% (CI: 5,5% – 10%) u desetogodišnjem razdoblju
- Visok 3,8% (CI: 2,6% – 5,7%) u jednogodišnjem razdoblju, 11% (CI: 8,1% – 14%) u petogodišnjem razdoblju i 14% (CI: 10% – 19%) u desetogodišnjem razdoblju
- Vrlo visok 20% (CI: 12% – 32%) u jednogodišnjem razdoblju, 44% (CI: 30% – 61%) u petogodišnjem razdoblju i 59% (CI: 39% – 79%) u desetogodišnjem razdoblju.

S ciljem dodatne potpodjele heterogene skupine Ta/T1 tumora intermedijarnog rizika troslojni model koji je prvobitno predložila Međunarodna skupina za KMM poboljšana je 2022. On se temelji na pet kliničkih rizičnih čimbenika: broju i veličini tumora, vremenu i učestalosti recidiva te neuspjehu prethodnih intravezikalnih terapija. Taj sustav je validiran multicentričnom kliničkom studijom provedenom na 677 bolesnika s prvom pojavom tumora i recidivom intermedijarnog rizika bolesti tretiranog intravezikalnom terapijom (197).

1.11. Radikalna cistektomija s derivacijom urina kod T2 KMM

Mokraćni mjehur je anatomske smješten u zdjelici u ekstraperitonealnom prostoru iza preponske simfize. Usidren je svojom kupolom na umbilikus preko medijalnog umbilikalnog ligamenta koji je rudiment fetalnog urahusa. Prima urin iz mokraćovoda, a ispraznjava ga putem mokraćne cijevi. Vrat mokraćnog mjehura se u muškaraca nastavlja na prostatu i učvršćen je na zdjeličnu dijafragmu putem medijalnog i lateralnog puboprostatičnog ligamenta u muškaraca te pubovezikalnog ligamenta u žena. Kao organ je koncipiran da omogući pohranu urina pod niskim tlakom tijekom faze punjenja, ali i da se kompletno isprazni tijekom faze mikcije. Slojevit dizajn mjehura i njegova kompleksna neuralna kontrola omogućuju mjehuru da se puni bez voljnih kontrakcija, a da se prazni visoko koordiniranim kontrakcijama mišića detruzora. Najpovršniji sloj mokraćnog mjehura je urotel, debljine 7 - 10 stanica. Ispod urotela se nalazi lamina propria, sadrži vezivno tkivo, limfne žile, živce i krvne žile. Ispod lamine proprije nalazi se muskularis propria, koja sadrži glatki mišić, poznat kao detruzor koji je odgovoran za kontrakcije mjehura. Mišićni fascikli su na tijelu mjehura raspoređeni u slučajnim smjerovima, dok se prema vratu mjehura uslojavaju u cirkularnu konfiguraciju. Navedena značajka omogućava ekspanziju prilikom faze punjenja i kontrakciju

uz relaksaciji sfinktera pri aktu mikcije (198). S obzirom da je mokraćni mjehur najčešće sijelo malignog tumora urinarnog trakta, njegovo kirurško odstranjenje uz regionalne limfne čvorove predstavlja zlatni standard ukoliko se dijagnosticira lokalizirana mišićno invazivna bolest (199). Limfna drenaža mokraćnog mjehura se odvija kroz vanjske ilijačne, obturatone te zajedničke ilijačne limfne čvorove. Daljnja drenaža ide putem presakralnih u retroperitonealne čvorove: parakavalne, interaortokavalne i paraaortalne (200, 201).

Razumijevanje anatomskih i histoloških značajki su važne u razumijevanju liječenja KMM. Jednom kad karcinom proдре u sloj lamine proprije, metastatski potencijal kroz limfne i krvne žile postaje značajan (202). Za tumore koji su mišićno-invazivni, HG rekurirajući unatoč intravezikalnoj terapiji ili nedostupni resekciji endoskopskim metodama, RC tj. odstranjenje mokraćnog mjehura i regionalnih limfnih čvorova je standardna metoda (203). Kod rekonstrukcije urinarnog trakta nakon odstranjenja mokraćnog mjehura nužno je napraviti derivaciju urina. Metode derivacije urina nakon RC se mogu podijeliti u kontinentne i inkontinetne. U kontinentnih mokraća se pohranjuje u rezervoaru čije se pražnjenje provodi voljnim aktom mikcije ili kateterizacijom. To je ortotopična derivacija. Kod inkontinentnih derivacija mokraća je preusmjerena iz mokraćovoda bilo direktno (ureterokutaneostomija) ili preko segmenta crijeva (ileum konduit) na kožu na koju se lijepi urostomska vrećica za sakupljanje mokraće. Kad se konstruira novi mokraćni mjehur ili kontinentni kožni rezervoar, konfiguracija crijeva mora omogućavati pohranu urina pri niskom tlaku da prevenira refluks u gornji urotrakt. Rezervoar također mora održavati sposobnost širenja kako bi se omogućilo voljno pražnjenje u dovoljno kratkim intervalima kako bi se izbjegle pretjerane metaboličke posljedice, dok istovremeno može zadržati urin nekoliko sati za socijalnu kontinenciju (204).

1.11.1. Indikacije i kontraindikacije

RC s derivacijom urina predstavlja najučinkovitiji modalitet liječenja za T2 KMM, s petogodišnjim tumor specifičnim preživljenjem preko 76% (205). Nisu svi bolesnici podobni za sve vrste derivacija urina. Stoga se kod svakog bolesnika kod kojeg se planira zahvat RC mora pojedinačno provesti savjetovanje o različitim oblicima derivacije urina te objasniti njihove rizike i prednosti (206). Čimbenici koji određuju vrstu derivacije urina su jedinstveni za svakog bolesnika i bolest samu, a bitno ih je sve dobro sagledati kako bi se odabrala adekvatna derivacija. Bolesnici koji žele NB derivaciju moraju biti motivirani postići režim mokrenja „na sat“ i moraju posjedovati sposobnost intermitentne samokateterizacije. Naime, kod NB derivacije od tankog crijeva se konstruira novi mokraćni mjehur, stoga bolesnik više nema osjećaj prepunjenosti i nagona na mokrenje. Ti bolesnici se moraju savjetovati o različitim

tehnikama mokrenja, a također, moraju biti svjesni i potencijalne dnevne i noćne inkontinencije. Bolesnici koji se podvrgavaju inkontinentnim derivacijama poput ileum konduita i ureterokutaneostomija moraju razumjeti i biti sposobni voditi brigu i njegu oko urostome na trbušnoj stjenci. Bolesnici kod kojih se razmatra kontinentna derivacija na kožu moraju razumijeti da se drenaža urina mora provoditi intermitentnom samokateterizacijom 4 - 6 puta svaki dan. Ukoliko se kod starijih bolesnika planira NB, moraju biti svjesni kako postoji visok rizik od odgođenog oporavka kontrole urina i dugoročni rizik za noćnu inkontinenciju (207). Ileum konduit (cijev/izvod od terminalnog ileuma) je tehnički manje zahtjevana derivacija za izvesti u usporedbi s ortotopičnom derivacijom i rezultira kraćim trajanjem operacije s manjom manipulacijom crijevima. Ova tehnika je udružena sa smanjenjem kratkoročnih postoperacijskih komplikacija i može biti prikladnija za starije i osobe lošijeg općeg stanja (208). Bolesnici s kognitivnim poremećajima, degenerativnim neurološkim bolestima i općenito lošijeg općeg stanja s komorbiditetima moraju biti savjetovani da kontinentna derivacija zahtijeva spretnost i pažnju povrh one koja se dobiva od članova obitelji, patronažnih sestara ili njegovatelja i stoga je možda bolja opcija za njih ileum konduit (209). Otprilike 10% muškaraca i polovica žena zahtijeva intermitentnu kateterizaciju radi adekvatnog pražnjenja novoga mjehura. Stoga, loša manualna spretnost, često praćena samom nevoljkošću bolesnika za samokateterizacijom, je kontraindikacija za njegovo formiranje (210). Zbog istog razloga postojanje uretralne strikture također kontraindicira formiranje NB. Što se tiče naravi same bolesti u bolesnika u kojih je došlo do propagacije tumora mokraćnog mjehura na mokraćnu cijev bilo makroskopski bilo na intraoperacijskom patohistološkom preparatu je također kontraindikacija za formiranje novoga mjehura. Bolesnici s kroničnom renalnom ili jetrenom insuficijencijom nisu kandidati za NB nakon cistektomije, jer kronična metabolička acidoza može dovesti do progresivnog propadanja bubrežne funkcije. Glavni uzrok metaboličke acidoze je apsorpcija amonijevih iona kroz intestinalnu mukozu NB iz pohranjenog urina (211). Iz istog razloga održana funkcija jetre je bitna kod bolesnika u kojih se planira napraviti NB (199). Terminalni ileum je najčešće korišten segment crijeva za urinarne konduite i NB. Ileum ima relativno mali promjer i prilično je mobilan za optimalno pozicioniranje u abdomenu ili zdjelici zahvaljujući pouzdanoj krvnoj opskrbi od gornje mezenterične arterije. Nadalje, ileum se može saviti i oblikovati na takav način da se omogući rezervacija rezervoara niskog tlaka koji je potreban za novi mjehur. Postoje rijetki slučajevi u kojima mezenterij ileuma bude prekratak pa se ne može pozicionirati nisko u zdjelici za ortotopični mjehur. U takvim slučajevima moraju se izvesti ili ileum konduit ili kontinentna kožna derivacija urina (212).

1.11.2. Tehnika operacije i vrste derivacija

Sama operacija RC s derivacijom mokraćne izvodi se najčešće otvoreno, a opisani su i minimalno invazivni pristupi, bilo laparoskopski ili robotski asistirani. Načela odgovarajuće ekspoziције i mobilizacije crijeva omogućavaju kreiranje adekvatne anastomoze bez tenzije. Potrebno je pažljivo procijeniti vaskularnu opskrbu svakog segmenta crijeva koji se koristi u rekonstrukciji kako bi se osigurala dobra prokrvljenost konduita. Tijekom zahvata vadi se mokraćni mjehur i regionalni limfni čvorovi s obje strane, što nazivamo prednjom egzenteracijom zdjelice. U muškaraca se uz mjehur vadi i prostata, a u žena maternica i jajnici. Po učinjenoj prednjoj egzenteraciji zdjelice radi se derivacije mokraćne.

1.11.2.1 Ureterokutaneostomija

Ovo je najjednostavnija vrsta derivacije urina. Obično se radi u bolesnika u kojih loše opće stanje ne dopušta dulje trajanje operacijskog zahvata ili kada intraoperacijski utvrdimo proširenje maligne bolesti mokraćnog mjehura na potrbušnicu. Ovaj tip zahvata se sastoji od vađenja mokraćnog mjehura i limfnih čvorova te mobilizacije i preparacije mokraćovoda. Mokraćovode premjestimo na desnu stranu, špatuliramo, skupa zašijemo te ih kroz cirkularnu inciziju izvedemo na kožu trbušne stijenke.

Ukoliko zbog konstitucije bolesnika ili intraoperacijskog statusa maligne bolesti ne možemo mobilizirati dovoljnu dužinu mokraćovoda, u bolesnika se izvedu dvije ureterokutane stome, po jedna na svaku stranu trbušne stijenke, za svaki mokraćovod posebno.

Izvedene mokraćovode zašijemo za kožu trbušne stijenke te ih intubiramo ureteralnim JJ protezama koje ostaju trajno, a mijenjaju se svaka 2 mjeseca preko žice vodilice. Svrha proteza je sprječavanje stenoze mokraćovoda na trbušnoj stijenci.

1.11.2.2 Ileum konduit

Za ovu vrstu derivacije odabire se odgovarajući dio ileuma koji bi trebao biti približno duljine 15 cm, a segment se uzima 20-ak cm oralno od ileocekalne valvule. Duljina konduita je odabrana tako da omogući odgovarajuće pozicioniranje anastomoze uretera bez napetosti. Prije resekcije crijeva obvezno se provjeri vaskularna opskrba ciljanog segmenta koja se radi tako da se podigne kompletni terminalni ileum u zrak i kroz mezenterij se uperi operacijsko svjetlo u zamračenju dvorani. Tako se kroz mezenterij mogu točno vizualizirati krvne žile koje opskrbljuju željeni segment crijeva koji ćemo upotrijebiti za konduit. Mezenterij se zatim kroz avaskularni sloj podijeli na dva mjesta, točno ispod mjesta resekcije crijeva. Nakon što resekcijom dobijemo željeni segment crijeva skupa s mezenterijem koji ćemo upotrijebiti za

konduit, radimo gastrointestinalnu anastomozu preostalog reseciranog crijeva za zatvaranje mezenteričnog zjapa. Nakon uspostavljenog kontinuiteta, slijedi konstrukcija samog konduita (slika 14). Oba uretera se premjeste na desnu stranu te se špatuliraju i zašiju jedan za drugi, a zatim na proksimalni dio konduita. Poseban oprez mora se usmjeriti krvnoj opskrbi i uretera i samog segmenta crijeva. Kada se uspostavi kontinuitet oba mokraćovoda s proksimalnim dijelom konduita u mokraćovode se postavljaju privremene proteze koje sprečavaju curenje urina i kasniju strikturu same anastomoze. Nakon formiranja anastomoze konduita i oba mokraćovoda, na desnoj strani kože trbušne stijenke u razini pupka radi se kružna incizija u promjeru koliko je otprilike promjer samog ileuma. Kroz rupu trbušne stijenke provuče se konduit kroz koji prolaze ureteralni stentovi. Distalni dio konduita se zatim zašije pojedinačnim šavima za trbušnu stijenku i time je konstrukcija derivacija urina gotova. Proteze ostaju još 15-ak dana, te se vade na prvom kontrolnom pregledu po otpustu iz bolnice.



Slika 14. Ileum konduit u koji je postavljena ureteralna proteza (bijelo) neposredno prije spajanja na kožu trbuha. Privatna slika autora slikana za vrijeme cistektomije na Klinici za urologiju KBC Zagreb

1.11.2.3 NB derivacija

Do sada su opisane brojne NB derivacije, a zajedničko svakoj od njih je stvaranje rezervoara niskog tlaka na temelju dvostrukog savijanja segmenta ileuma. Segment crijeva za NB izvodi se na identičan način mobilizacijom mezenterija kao za ileum konduit, iako mezenterični dio mora biti dublji kako bi se omogućila veća mobilizacija segmenta crijeva u zdjelicu, a segment crijeva duži. Oko 60 cm ileuma proksimalno od ileocekalne valvule se uzima radi konstrukcije novog mjehura. Kao i za ileum konduit crijevo koje će se koristiti za konstrukciju spušta se u zdjelicu, dok se preostalo resecirano crijevo reanastomozira i zatvara mezenterični zjap.

Segment crijeva uzet za NB se presavije u dva dijela, a njihova stražnja stijenka se poravnava kako bi se napravila W konfiguracija. Učini se zatim incizija crijeva na antimezenterijalnoj strani, a na kranijalnim krajevima NB na svakoj strani se formira po jedan „dimnjak“ za implantaciju mokraćovoda. Mjesto za implantaciju dimnjaka se ne otvara tj. ne detubularizira. U preostalom dijelu detubulariziranog crijeva prešije se stražnja stijenka produžnim šavom sa zaključavanjem. Ureteri se anastomoziraju na anterolateralnu stijenku dimnjaka te se intubiraju ureteralnim protezama zbog prevencije curenja urina i striktura anastomoze. Zatim zatvaramo prednju stijenku NB, počevši od najkaudalnijeg dijela, ostavljajući mjesto za ureteralnu anastomozu otvorenim. Ureteralna anastomoza se radi s nekoliko pojedinačnih šavi uretre i NB te postavljanjem silikonskog katetera kroz mokraćnu cijev. Intaroperacijski se isproba držanje anastomoze instilacijom 50 ccm fiziološke otopine kroz urinarni kateter, a postoperacijski se ispiranje provodi svakih 6 h kako bi se spriječilo stvaranje mukoznih čepova i opstrukcija. Kod zatvaranja operacijske rane ureteralne proteze se izvedu na kožu trbušne stijenke. One se uklanjaju 10 dana nakon, a urinarni kateter 15 dana nakon operacije. Nakon uklanjanja urinarnog katetera bolesnici se educiraju kako mokriti svakih 4 - 5 sati Valsalvinim manevrom (213).

1.11.2.4. Kontinentna kožna derivacija urina

Iako su opisane mnoge verzije kontinentnih kutanih derivacija urina, tehnika koja se najčešće izvodi je rezervoar od uzlaznog debelog crijeva i kateterizirajućeg kanala distalnog ileuma. Mobilizira se približno 30-cm uzlaznog debelog crijeva. Segment od 10 cm terminalnog ileuma je odabran kao kanal koji se može kateterizirati. Kontinuitet preostalog crijeva se uspostavlja anastomozom terminalnog ileuma na poprečni kolon. Izolirani segment kolona se detubularizira duž prednje tenije. Treba paziti kako bi se izbjegao prekid ileocekalne valvule. Kanal za samokateterizaciju može se napraviti korištenjem terminalnog ileuma, a sužava se produžnim šavima preko katetera debljine 14 Ch. Ileocekalna valvula se ojačava kako bi poslužila kao mehanizam za zadržavanje mokraće. Mjesta za ureteroenteralnu anastomozu biraju se na stražnjoj stijenci detubulariziranog kolona. Za svaku ureteralnu anastomozu stvara se mali hiatus debelog crijeva, a svaki ureter prolazi s vanjske na unutarnju stranu rezervoara (engl. *poucha*) debelog crijeva. Segmenti uretera se skraćuju prema potrebi kako bi se osiguralo izrezivanje bilo kojeg suvišnog ili slabo prokrvljenog dijela uretera. Zatim se ureteri spatuliraju i anastomoziraju iz unutarnjeg dijela poucha pojedinačnim ili produžnim šavima, a uretralne proteze se stavljaju prema odluci kirurga. Nakon što se dovrši ureterokolonična anastomoza, otvoreni segment debelog crijeva se presavije i aproksimira u dva sloja resorptivnim šavima.

Kroz prednju stijenku rezervoara može se postaviti cekostoma. Ilealni kanal koji se može kateterizirati se dovodi do označenog mjesta stome i maturira na koži. Kožni rez se radi u obliku slova V s pojedinačnim resorptivnim šavima. Na kraju se postavlja i učvršćuje stoma kateter (198).

1.11.3. Komplikacije

RC s derivacijom urina je kompleksna velika abdominalna operacija, a najviše se radi kod starijih bolesnika koji uz malignu bolest imaju udružene komorbiditete poput dijabetesa, renalne insuficijencije i kardiopulmonalnih bolesti (214). Dvije trećine bolesnika u postoperacijskom periodu tijekom prvih 90 dana dobije neku komplikaciju od kojih je ozbiljnijih oko 20%. Više od pola kirurških komplikacija odnosi se na derivaciju mokraće nego na cistektomiju samu. Najčešće su gastrointestinalne, infektivne ili s ishodištem u urotraktu (215). Postoperacijski ileus se manifestira u otprilike 20% slučajeva (216). Rizični čimbenici za perioperativni tromboembolijski incident uključuju kirurgiju zdjelice, malignu bolest, neoadjuvantnu kemoterapiju i stariju dob (217). Taj rizik se ublažava uzimanjem profilaktične antikoagulantne terapiju prvih mjesec dana iza operacije.

Ureteroenterične striktуре prate se u 3% do 17% slučajeva, a stopa raste s duljinom praćenja bolesnika. Rizični čimbenici za strikturu uključuju preoperacijsku hidronefrozu, postoperacijsko curenje (engl.*leak*) urina, perioperacijske urinarne infekcije, prijašnje abdominalne operacije ili zračenje. Urinarni *leak* iz ureteralnih anastomoza u perioperacijskom periodu može inducirati kemijski peritonitis i doprinijeti prolongiranom ileusu (218).

U dužem periodu praćenja moguće je formiranje kamenaca i to u 4 - 6% NB i do 42% kontinentnih kutanih diverzija. Kronična acidoza i staza urina doprinosi formiranju litijaze (219). Parastomalne hernije koje okružuju ileum konduit pojavljuju se u 5 do 65% slučajeva, sa otprilike jednom trećinom koji zahtijevaju kiruršku korekciju (220).

Stope metaboličke acidoze variraju između 5 do 15% za ileum konduite, 6 do 13% za ortotopičnu derivaciju te 26 do 45 % za kontinentne kutane diverzije. Kronična acidoza dovodi do demineralizacije kostiju i osteopenije. Bolesnici s preoperacijskom renalnom insuficijencijom su u još većem riziku (221). Redovna evaluacija elektrolita s korekcijom acidoze i suplemenata kalcija s vitaminom D samim ili u kombinaciji s bifosfonatima prevenirana nastanak acidoze inducirane demineralizacijom kostiju.

Terminalni ileum je mjesto apsorpcije vitamina B12 i u bolesnika kod koji se rabi taj segment za derivaciju mokraće imaju rizik od deficijencije B12. Simptomi deplecije B12 nisu specifični i uključuju letargiju, ekstremni umor, slabost, lupanje srca, otežano disanje, vrtoglavicu, izrazito blijedu kožu, neuropatiju, poremećaje vida, ulceracije u ustima. Manjak B12 se manifestira oko tri godine nakon operacije. Godišnja reevaluacija i suplementacija prema potrebi mogu spriječiti posljedice nedostaka vitamina B12 (222).

1.11.4. Klinički značaj

Mokraćni mjehur igra ključnu ulogu u pohranjivanju i otpuštanju urina. Kada je indicirana, RC s derivacijom urina je učinkovita metoda za liječenje raka mokraćnog mjehura uz održavanje dobre kvalitete života. Međutim, uklanjanje mokraćnog mjehura je događaj koji iz temelja mijenja život i svakodnevne navike kada se temeljni problem raka mokraćnog mjehura anulira kako je isplanirano. Nakon RC dostupne su različite mogućnosti derivacije urina, a za svaku od njih se rade jedinstvena razmatranja za i protiv koji su sastavni dio preoperacijske pripreme bolesnika.

Ankete o kvaliteti života i ispunjenju očekivanja koje su bolesnici postoperacijski ispunjavali pokazale su značajno poboljšanje ukoliko se vodilo računa o informiranosti bolesnika te sudjelovanju u zajedničkom planiranju operacije i odlučivanju o vrsti derivacije zajedno sa svojim medicinskim timom (223).

Bolesnici u kojih je napravljena RC s derivacijom urina danas žive značajno duže nego prije, stoga su vrlo važni dugoročni ishodi same operacije. Medicinski timovi koji se bave liječenjem bolesnika kod kojih se planira cistektomija moraju biti svjesni i kratkoročnih i dugoročnih posljedica varijanti različitih vrsta derivacije urina pa se mora optimizirati liječenje za svakog bolesnika ponaosob.

Pokazalo se kako su i kratkoročni i dugoročni ishodi liječenja poboljšani u centrima u kojima se izvodi velik broj takvih zahvata te imaju zdravstvene timove osposobljene za specijaliziranu skrb potrebnu ovim bolesnicima (224). Sam postupak optimizacije kirurških ishoda nakon zahvata cistektomije i urinarne derivacije počinje već prije operacije s preoperativnim savjetovanjem i pripremom bolesnika. Perioperativno upravljanje sa standardiziranim smjernicama tj. kliničkim putovima poboljšanog opravka poboljšava ishode uz skraćivanje hospitalizacije s jednog tjedna i više na 3 do 4 dana (225). Uobičajene komponente navedenog puta uključuju perioperativno liječenje boli koje štedi opioidne narkotike: preoperacijsku epiduralnu anesteziju ili regionalni blok. Uz to, rano enteralno hranjenje, optimizacija crijeva

opioidnim antagonistima, rano postoperacijsko ustajanje, uključivanje fizikalne terapije, kao i enterostomalnih terapeuta, dokazano utječu na poboljšanje perioperativnih ishoda i skraćuju vrijeme hospitalizacije.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Moderna urologija nalazi se pred izazovima koji, pored liječenja bolesti kao i malignih tumora, zahtijevaju i pronalazak poveznica koje bi se mogle identificirati kao rizični čimbenici u njihovu nastanku. Mnogi biljezi se proučavaju kao čimbenici rizika u nastanku malignih bolesti, a jedan od njih je i sustav ABO. Unatoč nastojanjima mnogih studija u traženju poveznica ABO s rizikom od nastanka tumorskih bolesti, do danas su ostala nerazjašnjena. Sekvenciranjem gena sustava ABO i ispitivanjem polimorfizama istraživanja su se proširila s razine fenotipova na razinu genotipova i alela. Tema ovog istraživanja je analiza fenotipa, genotipa i alela ABO kao čimbenika rizika za pojavnost KMM u odnosu na kontrolnu skupinu i čimbenika rizika za kliničke i patohistološke stadije bolesti.

2.1 Hipoteza

Ne-O genotipovi (AA, OA, AB, BO i BB i aleli A i B), tj. oni koji se fenotipski manifestiraju ispoljavanjem antigena na membrani eritrocita ABO, predstavljaju čimbenik rizika za pojavnost, proširenost, stupanj malignosti i recidiviranje KMM

2.2. Ciljevi rada

Glavni je cilj istraživanja utvrditi povezanost fenotipova i genotipova ABO kod pojavnosti, proširenosti, stupnja malignosti i recidiviranja KMM.

Specifični ciljevi:

1. Odrediti fenotip i genotip ABO u:
 - a) skupini bolesnika s KMM koji će biti podvrgnuti operativnom zahvatu uz određivanje kliničkog i patohistološkog stadija bolesti
 - b) zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi
2. Usporediti fenotipove, genotipove i alele bolesnika sa zdravom populacijom
3. Ispitati povezanost kliničkog, patohistološkog stadija te učestalost recidiva bolesti unutar nositelja pojedinih fenotipova, genotipova i alela ABO.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Skupinu ispitanika čini 326 bolesnika (246 muškarca i 80 žena) koji su podvrgnuti operacijskom zahvatu KMM na Klinici za urologiju KBC Zagreb od 2020. do 2023. godine. Kontrolnu skupinu čine 142 asimptomatska i zdrava dobrovoljna darivatelja krvi oba spola (96 muškaraca i 46 žena), bez tumorskih oboljenja u anamnezi i urednim nalazom sedimenta urina. Prosjek godina sudionika u kontrolnoj skupini bio 51 godina, a svi sudionici kontrolne skupine su iz iste zemljopisne regije te stariji od 40 godina. Uključni kriteriji za bolesnike su : patohistološki nalaz UC mokraćnog mjehura i sposobnost davanja informiranog pristanka. Isključni kriteriji su: autoimuna bolest, loš opći status bolesnika ili terminalna bolest i nemogućnost davanja informiranog pristanka. S obzirom da kontrolnu skupinu čine dobrovoljni darivatelji krvi uključni kriteriji su definirani prema standardima transfuzijske medicine za darivanje krvnih pripravaka. Isključni kriterij za kontrolnu skupinu je patološki sediment urina i dob mlađa od 40 godina.

Istraživanje su odobrili: Etička povjerenstva KBC Zagreb (No: 02/21 AG 2. studenog 2020. godine), Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) i Povjerenstvo za etičnost i eksperimentalni rad Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu, a svi postupci su izvedeni u skladu s relevantnim zakonima i institucionalnim smjernicama. Svi sudionici istraživanja dali su potpisani informirani pristanak za genotipizaciju krvne grupe i sudjelovanje u istraživanju. Laboratorijska analiza genotipova ABO rađena je u Odjelu za molekularnu dijagnostiku (OMD) HZTM. Odredili smo alelne *gene* *O1*, *O2*, *A1*, *B* i *A2*, i to genotipizacijom genskih regija: *rs5076666* (intron A/T) kao surogat za alel *A1*, *rs687289* (intron A/G/G) za *O* alel, *rs8176746* (kodirajuća G>A,T sinonimni) za *B* alel i *rs8176704* (intron) za *A2* alel (226).

U skupini bolesnika uzorci za histopatološku analizu uzeti su TURMom ili RC (142, 227). Uzorci su obrađeni prema standardnim histopatološkim postupcima i analizirani od strane iskusnih uropatologa centra velikog volumena. Tumori su histološki stupnjevani kao HG i LG, a zatim podijeljeni u četiri skupine: površinski (Ta), ne-mišićno invazivni (T1), mišićno invazivni (T2) i metastaski tumori (M). Klinički stadij bolesti smo odredili prema TNM sustavu klasifikacije (228).

Svim ispitanicima iz skupina bolesnika i iz kontrolne skupine uzet je uzorak od 4,5 mL periferne krvi u epruvetu Vacutainer® Plastic PPT (BD Vacutainer, UK) s aditivom poliesterskim

polimernim gelom sa suhim K2 EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA*). Iz uzorka pune krvi izolira se genomska DNA pomoću kita.

Testiranje je provedeno u više navrata po dvadesetak uzoraka.

3.2. Uređaji i kemikalije

Cjelokupno laboratorijsko ispitivanje provedeno je u OMD sa standardno korištenim priborom i na postojećim uređajima.

3.2.1. Laboratorijski uređaji

U provođenju ispitivanja korišteni su laboratorijski uređaji koji su uredno validirani sukladno sustavu osiguranja kvalitete, a nabrojeni su u slijedećoj tablici 6.

Tablica 6. Popis korištenih uređaja, njihove namjene i ime proizvođača

UREĐAJ	NAMJENA	PROIZVOĐAČ
QIAcube	uređaj za izolaciju nukleinskih kiselina	Qiagen, Njemačka
PCR uređaji AB 2720 i AB 9700	uređaji za PCR umnožavanje ulomaka	Applied Biosystems, SAD
Elchrom sustav	izvođenje elektroforeze	Elchrom, Švicarska
Kodak kamera	slikanje gelova nakon elektroforeze	Kodak, SAD
Transiluminator	obasjavanje UV svjetlosti	
Sterilni kabineti s laminarnim protokom zraka	odvajanje uzoraka i izrada reakcijske smjese za PCR-SSP	Hereaus i Iskra pio LFVP 9

3.2.2. Kemikalije i ostala pomoćna sredstva

Za izolaciju nukleinskih kiselina korišteni su kitovi:

QIAamp DNA Blood DNA mini kit (Qiagen, Njemačka)

Za amplifikaciju je korištena:

AmpliTaq polimeraza (250U),
dNTP (100 mM) (Applied Biosystems, SAD)

Za elektroforezu umnoženih PCR produkata uporabljen je komercijalni gel:

Clearose ELC- 3304 EB,
PCR Check/T Wide Mini 4X 25 s EtBr (Elchrom, Švicarska)

Za kontrolu veličine PCR produkta korišten je:

molekularni biljeg od 100 pb (Invitrogen, 1 µg/mL)

Od standardnog laboratorijskog pribora korišteni su:

Vacutainer epruvete s K₂EDTA (BD Vacutainer, UK) za uzimanje uzoraka krvi,
filter tipsovi od 10, 100 i 1000 µL (Eppendorf, Njemačka),
tipsovi bez filtera za nanošenje za elektroforezu 100 µL (Sarstedt, Njemačka),
epruvete od 2 mL za izradu PCR smjese,

PCR epruvetice od 500 µL za pojedinačni uzorak,

stripovi od po 8 jažica i poklopaca (Applied Biosystems, SAD).

3.2.3. Otopine

Otopine koje su korištene u ispitivanju i njihovi proizvođači:

Bidestilirana voda, Aqua pro injectione, HZTM, Hrvatska

Etanol, 100%, Kemika, Hrvatska

Etidij bromid 10mg/mL, Sigma, Austrija

Pufer za nanošenje uzoraka na gel 5X, Elchrom, Švicarska

Pufer za elektroforezu 1xTAE sadrži 2% 50XTAE, 100 µL etidij bromida (0,005%)

3.3. METODE

3.3.1 Izolacija genomske DNA

3.3.1.1. Izolacija genomske DNA iz leukocita periferne krvi pomoću uređaja QIA cube silikatnih gel membrana

Svim ispitanicima, bolesnicima i kontrolnoj skupini, uzet je uzorak periferne krvi u volumenu od 8,5 mL sa suhim antikoagulansom K2EDTA. Za izolaciju genomske DNA iz trombocitno-leukocitnog međusloja korišteni su komercijalni kitovi QIAamp DNA Blood Mini QIAcube kita (Qiagen, Njemačka) na uređaju QIAcube, (Qiagen, Njemačka). Silika-gel membrane služe za razdvajanje DNA od drugih komponenti kao što su polisaharidi i proteini. Izolacija DNA temelji se na postupku vezanja-ispiranja-eluiranja, a u našem istraživanju je za njeno izdvajanje korišteno oko 200 µL pune krvi. Nukleinske kiseline se adsorbiraju na silika-gel membranu u prisutnosti kaotropnih soli koje uklanjaju vodu iz hidratiziranih molekula u otopini. Nakon ispiranja s dva različita pufera (AW1 i AW2), nukleinska kiselina se eluira s 200 µL pufera za eluciju, pripremljena za uporabu bez daljnjeg ukoncentriravanja. Tako izolirana genomska DNA visokog je stupnja čistoće i zadovoljavajućeg prinosa za izvođenje PCR u stvarnom vremenu

3.3.2. PCR-SSP metoda

U svrhu određivanja ABO genotipova darivatelja krvi i bolesnika korištena je PCR-SSP metoda modificirana u laboratoriju OMD. PCR je lančana reakcija sinteze DNA uporabom enzima DNA polimeraze, tj. postupak umnažanja DNA *in vitro*, u tijeku kojeg se u ciklusima denaturacije, vezanja početnih oligonukleotida i produljenja lanca, umnažaju ciljni sljedovi gena. Preduvjet za izvođenje reakcije je poznavanje slijeda nukleotida rubnih dijelova odsječka DNA koji se želi umnožiti, na temelju kojeg se konstruiraju početnice i postojanje barem jedne početne molekule DNA koja u reakciji ima ulogu kalupa tj. predloška za lanac u nastanku. PCR-SSP metoda je inačica lančane reakcije polimerazom, a zasniva se na nemogućnosti Taq polimeraze da popravi neslaganje u jednoj bazi na 3' kraju DNA početnice. Dakle, kada je nukleotid na 3' kraju početnice komplementaran sekvenciji na kraju alela, doći će do umnožavanja (amplifikacije) sekvencije. Kada 3' nukleotid početnice nije komplementaran kalupu, neće doći do umnožavanja sekvence ili će se umnožiti u vrlo maloj količini. Svim ispitanicima doktorskog rada određivani su glavni ABO alelni geni: O¹, O², A¹, A² i B pomoću lančane reakcije polimerazom sa sekvencijski specifičnim ishodnicama, uz uporabu 8 parova oligonukleotidnih početnica specifičnih za određene sekvence pojedinih ABO alela u osam paralelnih PCR ishodnica. U svakoj SSP reakciji istodobno je napravljena amplifikacija ulomka

gena za humani hormon rasta (engl. *human growth hormon, HGH*) kao interna pozitivna kontrola, kako bi se potvrdila prisutnost DNA u reakcijskoj smjesi. Korištene početnice i veličine produkata ili parova baza (pb) navedene su u tablici 7.

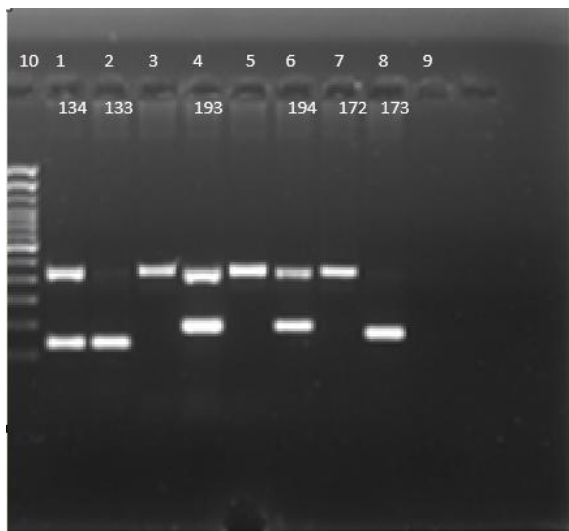
Tablica 7. Početnice korištene za ABO genotipizaciju

Alel	Oligo- Nukleotid	Sekvenca početnice	Br. Smjese/PCR produkt (pb)
01	01-r	5'-ATA TAT ATG GCA AAC ACA GTT AAC CCA ATG -3'	
	01-a	5'-TTA AGT GGA AGG ATG TCC TCG TCG TA-3';	1/139
	01-b	5'-TAA GTG GAA GGA TGT CCT CGT CGT G -3'	2/137
02	02-r	5'-AGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC -3'	
	02-a	5'-TCG ACC CCC CGA AGA AGC T - 3'	3/194
	02-b	5'-CGA CCC CCC GAA GAA GCC - 3'	4/193
B	B-r	5'-AGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC - 3'	
	B-a	5'-ATC GAC CCC CCG AAG AGC G - 3'	5/195
	B-b	5'-CCG ACC CCC CGA AGA GCC - 3'	6/194

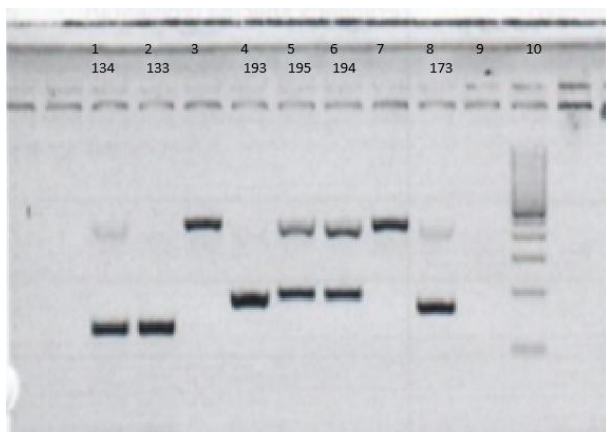
A ²	A2-r/2	5'-GTG TGT GTG ATT TGA GGT GGG GAC -3'	
	A2-7	5'-CAG GCG GTC CGG AAG CG - 3'	7/169
	A2-8	5'-CAG GCG GTC CGG AAC ACG - 3'	8/170
	HGH-a	5'-TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A- 3'	434
	HGH-b	5'-CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC- 3'	

3.3.3 Elektroforeza PCR-SSP produkata

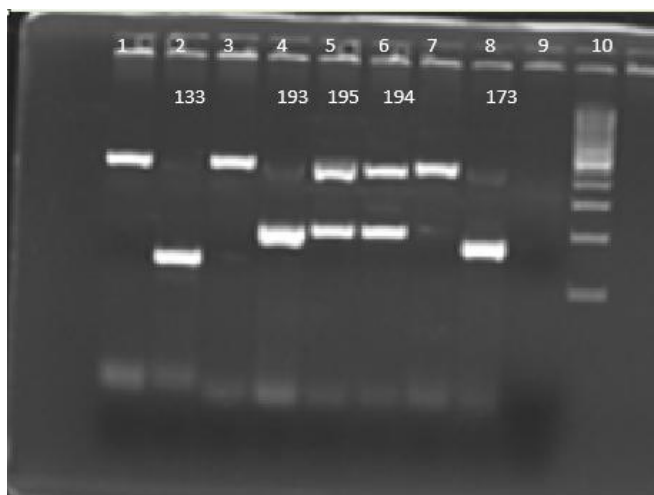
Nakon umnožavanja, detekcija produkata PCR-SSP amplifikacije izvršena je pomoću elektroforeze na gelovima s etidij bromidom, pri naponu 60 - 100 V. (229) Etidij bromid je supstanca koja se umrežava u niti DNA, a obasjana ultraljubičastim svjetlom svijetli. Nakon završene elektroforeze, gel se obasjava pod UV transiluminatorom, svjetlošću valne duljine 254 nm, pri čemu se specifični umnoženi ulomci DNA vide kao svijetle vrpce, koje se dokumentiraju pomoću fotografiranja kamerom (slike 15-18). Dobivene kombinacije alel-specifičnog PCRa (prisutnost ili odsutnost umnožene DNA-vrpce za pojedini ABO genotip) očitane su iz tablice 8. ABO aleli i genotipovi imenovani su po nomenklaturi prema podacima Yamamota (5).



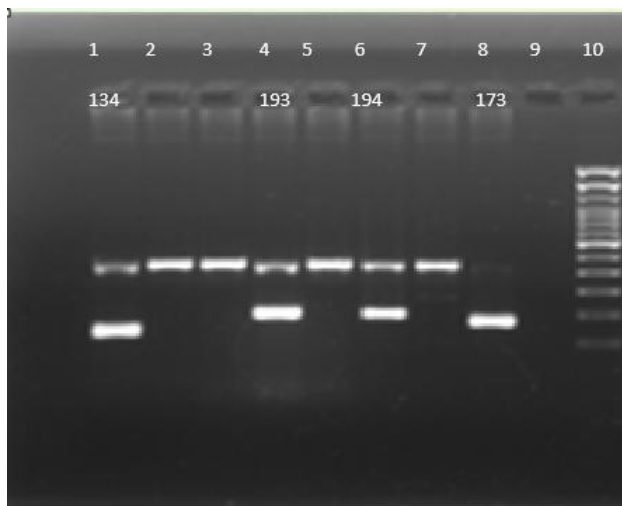
Slika 15. Krvna grupa A, genotip O1A1, PCR-SSP metoda, 1,5% agarozni gel. Linije: 1-134 pb , 2-133 pb, 4-193 pb, 6-194 pb, 7-172 pb 8-173 pb. Pozitivna interna kontrola 434 pb. Linija 9-molekularni biljeg 100 pb. Izvor: OMD HZTM



Slika 16. Krvna grupa B, genotip O1B, PCR-SSP metoda, 1,5% agarozni gel. Linije: 1-134 pb, 2-133 pb, 4-193 pb, 5-195 pb, 6-194 pb, 8-173 pb. Pozitivna interna kontrola 434 pb. Linija 9-molekularni biljeg 100 pb. Izvor: OMD HZTM



Slika 17. Krvna grupa AB, genotip A2B, PCR-SSP metoda, 1,5% agarozni gel. Linije: 2133 pb, 4-193 pb, 5-195 pb, 6-194 pb, 8-173 pb. Pozitivna interna kontrola 434 pb. Linija 9-molekularni biljeg 100 pb. Izvor: OMD HZTM



Slika 18. Krvna grupa O, genotip O1O1, PCR-SSP metoda, 1,5% agarozni gel. Linije: 1-134 pb, 4-193 pb, 6-194 pb, 8-173 pb. Pozitivna interna kontrola 434 pb. Linija 9-molekularni biljeg 100 pb. Izvor: OMD HZTM

Tablica 8. Tablica za očitavanje ABO genotipa

Reakcija br.	1	2	3	4	5	6	7	8		
PCR produkt (pb)	134	133	194	193	195	194	172	173		
Specifičnost	O ¹	O ¹	O ²	O ²	B	B	A ²	A ²		
Rezultati:									Genotip:	Fenotip:
Pozicija 1-pozitivna (O ¹)	+	-	-	+	-	+	-	+	O1O1	O
	+	+	+	+	-	+	-	+	O1O2	O
	+	+	-	+	+	+	-	+	O ¹ B	B
	+	+	-	+	-	+	-	+	O ¹ A	A
	+	+	-	+	-	+	+	+	O1A2	A
Pozicija 3-pozitivna (O ²)	-	+	+	-	-	+	-	+	O ² O ²	O
	-	+	+	-	+	+	-	+	O ² B	B
	-	+	+	+	-	+	-	+	O ² A	A
	-	+	+	+	-	+	+	+	O ² A ²	A
Pozicija 5-pozitivna (B)	-	+	-	-	+	-	-	+	BB	B
	-	+	-	+	+	+	-	+	AB	AB
	-	+	-	+	+	+	+	+	A ² B	AB
Pozicije 2/4/6 poz. (non O ¹ /O ² /B)	-	+	-	+	-	+	-	+	AA	A
	-	+	-	+	-	+	+	+	A A ²	A
	-	+	-	+	-	+	+	-	A ² A ²	A

3.4. Statistička analiza

Podaci su prikazani u tablicama i dijagramima. Kontinuirane varijable su prikazane su kao srednja vrijednost ili standardna devijacija za vrijednosti s Gaussovom distribucijom odnosno kao medijani ili interkvartilni raspon za podatke koji ne slijede normalnu distribuciju. Normalnost distribucije procijenjena je Shapiro-Wilkovim testom. Kategoričke varijable prikazane su kao postotci i brojevi. Statistička značajnost razlika u nezavisnim varijablama između dviju skupina testirana je Studentovim t-testom za neovisne uzorke ili Wilcoxonovim testom zbroja rangova (Mann-Whitney U), ovisno o raspodjeli podataka. Za tri ili više skupina rabili smo ANOVA ili Kruskal-Wallisov test. Statistička značajnost razlika u kategoričkim varijablama testirana je Pearsonovim χ^2 testom. Za analizu pojavnosti pojedinih alela korišten je i test proporcija. P-vrijednosti $< 0,05$ smatrane su statistički značajnim, a programski paket korišten za statističku analizu bio je Jamovi v2.3.

4. REZULTATI

U istraživanju smo međusobno uspoređivali fenotipove, genotipove i alele skupine bolesnika s dijagnosticiranim KMM (bolesnici), skupine zdravih dobrovoljnih davatelja krvi koji u obiteljskoj anamnezi nemaju malignih bolesti (kontrolna skupina) i opće populacije RH(OP). Unutar skupine bolesnika analizirali smo povezanost kliničkog, patohistološkog stadija i G te učestalost recidiva KMM unutar nositelja pojedinih fenotipova, genotipova i alela ABO.

4.1. Rezultati usporedbe skupine bolesnika i kontrolne skupine

Tablica 9. Podaci o spolu i dobi bolesnika i kontrolne skupine

Bolesnici	Žene broj (%)	Muškarci broj (%)	medijan godina*
	80 (24,5)	246 (75,5)	72 (43-95)
Kontrolna skupina	46 (32,4)	96 (67,6)	51 (41-76)

*podaci opisani kao medijan (interkvartilni raspon)

Raspodjela sudionika istraživanja prikazana je u tablici 9.

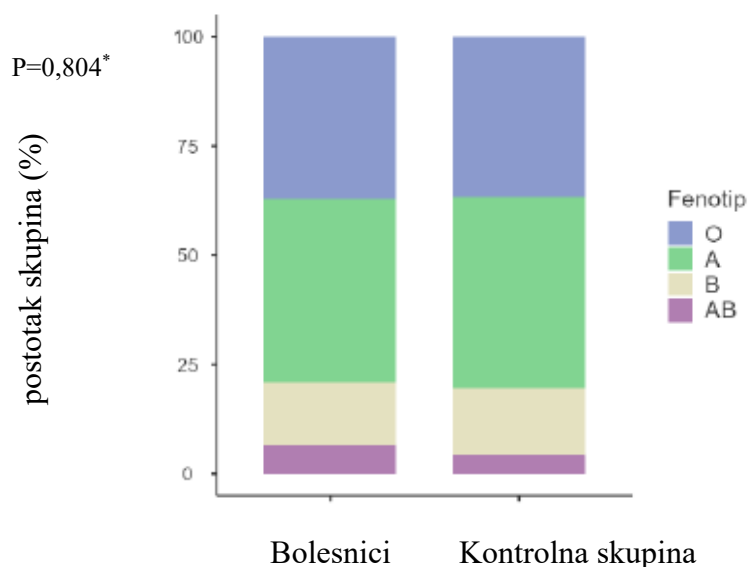
U skupini bolesnika broj (N) muškaraca je 246 sa udjelom od 75,5%, dok je N žena 80 sa udjelom 24,5%. Medijan godina u skupini bolesnika iznosi 72 sa rasponom od 43 do 95. Ova raspodjela ukazuje da je KMM bolest koja pretežito pogađa starije muškarce.

U kontrolnoj skupini također prevladavaju muškarci, N=96 ili 67,6%, ali je udio žena nešto veći nego u skupini bolesnika N=46 ili 32,4%. Medijan godina u kontrolnoj skupini je 51 sa rasponom od 41 do 76 . U obje skupine postoji dominacija muškaraca, a razlika između spolova je izraženija u skupini bolesnika.

4.2. Raspodjela krvnih grupa bolesnika i kontrole prema fenotipu i genotipu

Tablica 10. Raspodjela ABO bolesnika i kontrola prema fenotipu

		Fenotip				
Grupa		O	A	B	AB	Total
Bolesnici	Broj	121	137	47	21	326
	%	37,1	42,0	14,4	6,5	100
Kontrolna skupina	Broj	52	62	22	6	142
	%	36,6	43,7	15,5	4,2	100
Ukupno	Broj	173	199	69	27	468
	%	37,0	42,5	14,9	5,6	100



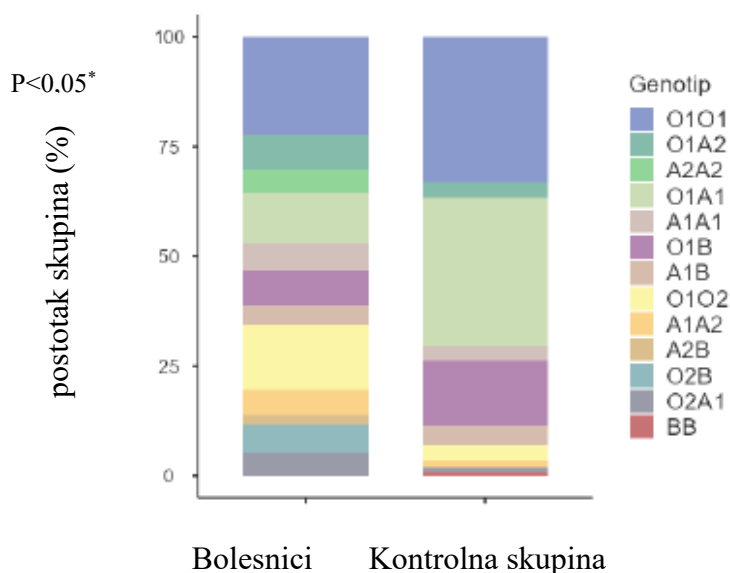
*testirano Pearsonovim χ^2 testom

Slika 19. Raspodjela fenotipova bolesnika i kontrolne skupine

Tablica 10 i slika 19 prikazuju raspodjelu fenotipova (O, A, B, AB) među bolesnicima i kontrolnoj skupini. U skupini bolesnika je najzastupljeniji fenotip krvne grupe A (42%), zatim O (37,1%), B (14,4%), dok je AB najmanje zastupljena (6,4%). U kontrolnoj skupini fenotip A također dominira (43,7%), slijedi O (36,6%), B (15,5%), dok AB ima najmanju učestalost (4,2%). U ukupnoj populaciji ispitanika fenotip A ima najveću učestalost (42,5%), a zatim slijede O (37%), B (14,9%) i AB (5,8%). Raspodjela fenotipova pokazuje sličan obrazac u obje skupine, s blagim razlikama u učestalosti krvne grupe AB, koja je nešto češća među bolesnicima nego u kontrolnoj skupini.

Tablica 11. Raspodjela krvnih grupa skupina bolesnika i kontrole prema genotipu

		Genotip													
Grupa		O1O1	O1A2	A2A2	O1A1	A1A1	O1B	A1B	O1O2	A1A2	A2B	O2B	O2A1	BB	Total
Bolesnici	Broj %	73 22,4	25 7,7	18 5,5	37 11,3	21 6,4	26 8,0	14 4,3	48 14,7	19 5,8	7 2,1	21 6,4	17 5,2	0 0,0	326 100
Kontrola skupina	Broj %	47 33,1	5 3,5	0 0,0	48 33,8	5 3,5	21 14,8	6 4,2	5 3,5	2 1,4	0 0,0	0 0,0	2 1,4	1 0,7	142 100
Ukupno	Broj %	120 25,6	30 6,4	18 3,8	85 18,2	26 5,6	47 10,0	20 4,3	53 11,3	21 4,5	7 1,5	21 4,5	19 4,1	1 0,2	468 100

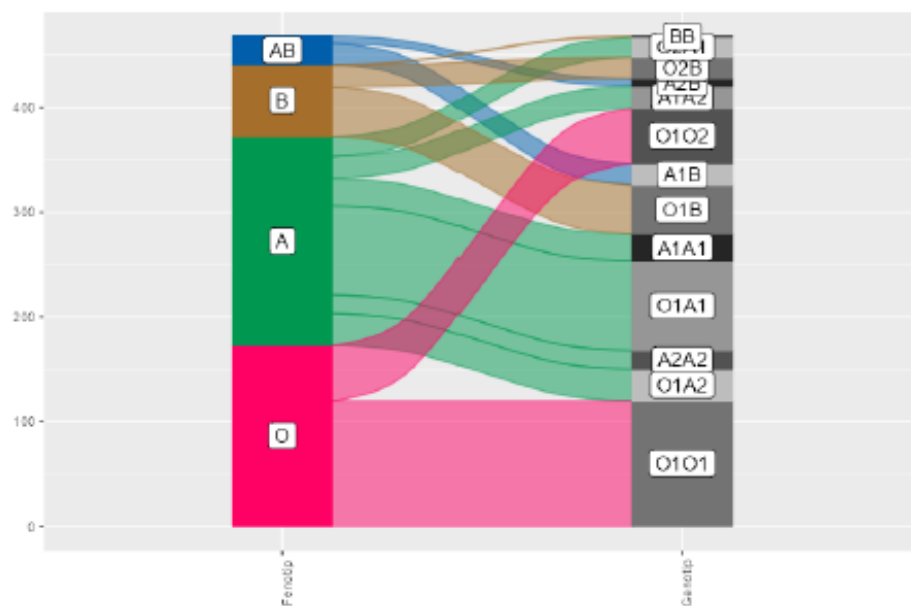


*testirano Pearsonovim χ^2 testom

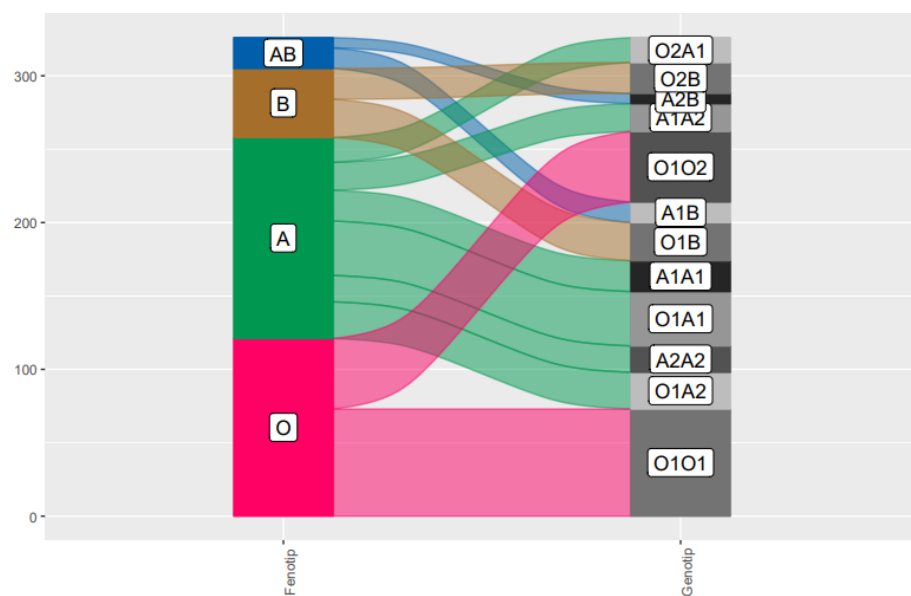
Slika 20. Raspodjela genotipova krvne grupe bolesnika i kontrolne skupine

Tablica 11 i slika 20 prikazuju raspodjelu skupina bolesnika i kontrolne skupine u ovisnosti o genotipovima ABO. U skupini bolesnika najzastupljeniji genotipovi su O1O1 (22,4%) i O1A1 (11,3%). Ostali, poput A1A1 (6,4%) i O1B (8%), imaju nižu učestalost. Genotipovi povezani s AB krvnom grupom, poput A1B, također imaju manju zastupljenost (4,3%). U kontrolnoj skupini genotipovi O1O1 i A1A1 također dominiraju, s učestalošću od 33,1% i 33,8%. Ostali genotipovi, poput O1A2 ili O2A2, imaju vrlo nisku zastupljenost. U ukupnoj populaciji ispitanika genotipovi O1O1 (25,6%) i A1A1 (18,2%) su najčešći. Budući da je p-vrijednost manja od 0,05, ova raspodjela može ukazivati na potencijalnu povezanost određenih genotipova krvnih grupa s KMM.

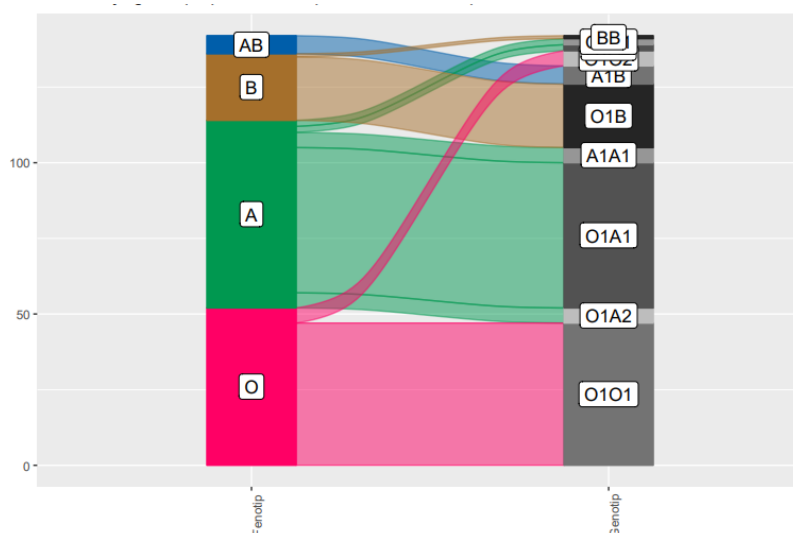
4.3 Raspodjela genotipova prema fenotipu u svih ispitanika , bolesnika i kontrolne skupine



Slika 21. Raspodjela fenotipa prema genotipu - svi ispitanici



Slika 22. Raspodjela fenotipa prema genotipu - bolesnici



Slika 23. Raspodjela fenotipa prema genotipu - kontrolna skupina

U sve tri skupine (svi sudionici, bolesnici i kontrolna skupina) fenotip O je najčešće povezan s genotipom O1O1. Ovo je očekivano jer je O1O1 homozigotni genotip za O krvnu grupu. Fenotip A pokazuje raznolikost genotipova, uključujući A1A1, A1A2 i O1A1. Distribucija se malo razlikuje između skupina. Fenotip B je povezan s genotipovima kao što su BB i O1B, što je također očekivano. Fenotip AB povezan je s genotipovima kao što su A1B i A2B.

Slika 21 predstavlja sliku opće distribucije genotipova i fenotipova u populaciji koja je obuhvaćena istraživanjem. Iz njega vidimo da je fenotip O najzastupljeniji, a slijede ga fenotipovi A, B i AB, dok razdioba genotipova unutar svakog fenotipa pokazuje određenu varijabilnost, što je očekivano zbog različitih alela koji mogu tvoriti određeni fenotip.

U skupini bolesnika (slika 22) uočava se sličan opći trend kao i kod svih sudionika, ali s mogućim razlikama u relativnim proporcijama.

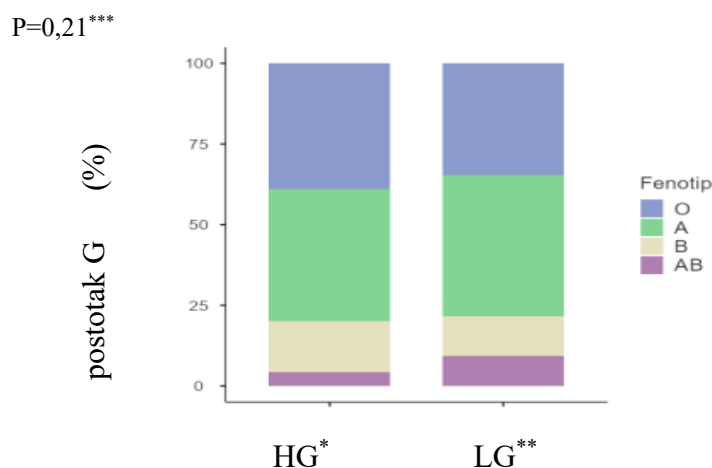
Usporedbom dijagrama sa slika 22 i 23 utvrdili smo da postoje blage razlike u distribuciji genotipova unutar fenotipa. Ove razlike bi mogle biti relevantne za buduće istraživanje povezanosti genotipova ABO s rizikom od nastanka KMM.

4.4 Rezultati usporedbe G tumora s fenotipom i genotipom u skupini bolesnika

Tablica 12. Raspodjela G tumora prema fenotipu

		Fenotip				
Grupa		O	A	B	AB	Total
HG*	Broj	73	77	30	8	188
	%	38,8	41	16	4,3	100
LG**	Broj	48	60	17	13	138
	%	34,8	43,5	12,3	9,4	100
Ukupno	Broj	121	137	47	21	326
	%	37,1	42	14,4	6,4	100

*visoki gradus (engl.*high grade*) **niski gradus(engl.*low grade*)



*visoki gradus (engl.*high grade*) **niski gradus(engl.*low grade*) ***testirano Pearsonovim χ^2 testom

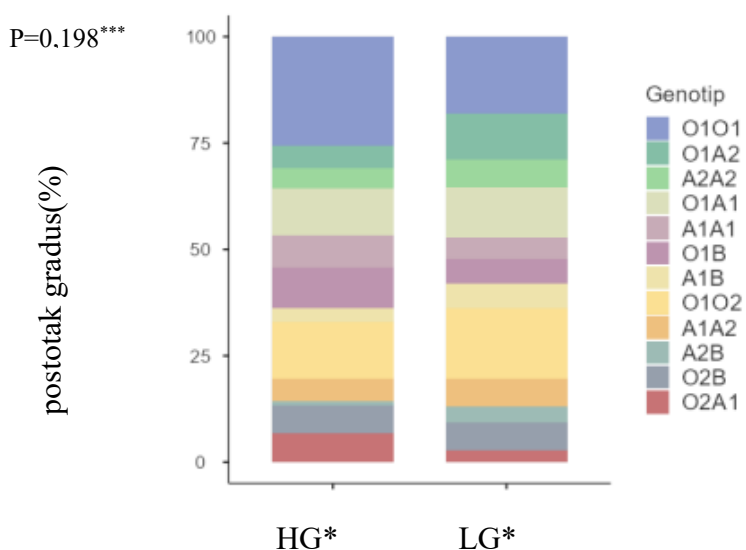
Slika 24. Raspodjela G tumora prema fenotipu

Analiza raspodjele fenotipova krvnih grupa prema G tumora je rađena prema podacima iz tablice 12 i sa slike 24. Fenotip O u skupini HG je zastupljen s 38,8% , a u skupini LG s 34,8% bolesnika . Ukupno, fenotip O čini 37,1% svih bolesnika. Fenotip A je najzastupljeniji u obje grupe. U HG skupini ga ima 41% , a u LG skupini 43,5% bolesnika. Ukupno 42% svih bolesnika ima fenotip A. Fenotip B u HG skupini ima 16% bolesnika, u LG skupini 12,3% . U HG skupini ga ima 4,3% , a u LG 9,4% . Fenotip A je najčešći u obje grupe tumora, dok je fenotip AB najmanje zastupljen. Razdioba fenotipa pokazuje blagu razliku između HG i LG grupa, pri čemu LG grupa ima nešto veću zastupljenost fenotipa A i AB.

Tablica 13. Raspodjela G tumora prema genotipu

		Genotip													
Grupa		O1O1	O1A2	A2A2	O1A1	A1A1	O1B	A1B	O1O2	A1A2	A2B	O2B	O2A1	BB	Total
HG*	Broj %	48 25,5	10 5,3	9 4,8	21 11,2	14 7,4	18 9,6	6 3,2	25 13,3	10 5,3	2 1,1	12 6,4	13 7,1	0 0,0	188 100
LG**	Broj %	25 18,1	15 10,9	9 6,5	16 11,6	7 5,1	8 5,8	8 5,8	23 16,7	9 6,5	5 3,6	9 6,5	4 2,9	0 0,0	138 100
Ukupno	Broj %	73 22,4	25 7,7	18 5,5	37 11,3	21 6,4	26 8,0	14 4,3	48 14,7	19 5,8	7 2,1	21 6,4	17 5,2	0 0,0	326 100

*visoki gradus (engl.*high grade*) **niski gradus (engl.*low grade*)



*visoki gradus (engl.*high grade*) **niski gradus (engl.*low grade*) ***testirano Pearsonovim χ^2 testom

Slika 25. Raspodjela G tumora prema genotipu

Raspodjelu G tumora prema genotipu analizirali smo prema tablici 13 i slici 25. Genotip O1O1 je najzastupljeniji genotip u obje skupine bolesnika ; u HG skupini sa 25,5% , a u LG sa 18,1% . Genotip O1O1 čini 22,4% skupine bolesnika. Genotipovi povezani s fenotipom A poput A1A1 i A1A2 su češći u HG grupi nego u LG grupi. Genotip A1A1 je u HG skupini zastupljen sa 11,2%, a u LG sa 11,6%. Genotip A1A2 je u HG skupini zastupljen sa 5,3%, a LG sa 6,5%. Genotipovi povezani s fenotipom B i AB poput O1B i A2B imaju manju zastupljenost. O1B genotip je u HG skupini zastupljen sa 9,6%, a LG sa 5,8%. Genotip A2B je u HG skupini zastupljen sa 2%, a u LG sa 3%. Genotipovi poput O2O2 i BB su vrlo rijetki ili potpuno odsutni. Raspodjela pokazuje da je genotip O1O1 dominantan u obje grupe tumora

(HG i LG). Razlike između grupa su manje izražene na razini genotipova nego na razini fenotipova.

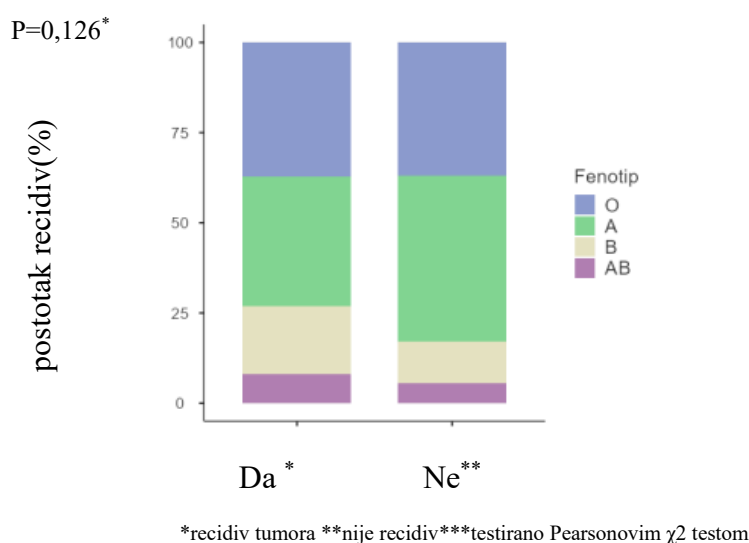
4.5. Rezultati usporedbe recidiva tumora s fenotipom i genotipom u skupini bolesnika

Na osnovi podataka iz tablice 14 i slike 26 analizirali smo raspodjelu fenotipova, a potom i genotipova (tablica 15 i dijagram 27) ABO s obzirom na prisutnost recidiva bolesti: recidiv (DA) i nije recidiv (NE).

Tablica 14. Raspodjela fenotipova prema recidivu tumora

		Fenotip				
Grupa		O	A	B	AB	Total
DA*	Broj	47	45	24	10	188
	%	37,3	35,7	19,0	7,9	100
NE**	Broj	74	92	23	11	138
	%	37,0	46,0	11,5	5,5	100
Ukupno	Broj	121	137	47	21	326
	%	37,1	42	14,4	6,4	100

*recidiv tumora **nije recidiv

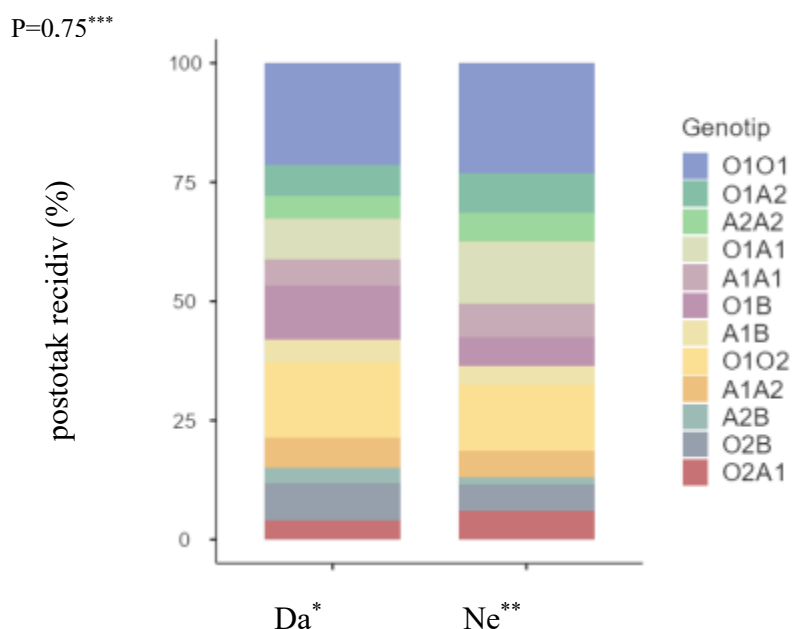


Slika 26. Raspodjela fenotipa prema recidivu tumora

Raspodjela fenotipa prema recidivu tumora je opisana u tablici 14 i slici 26. Najčešći fenotip kod bolesnika s recidivom je O (37,3%), a zatim slijede A (35,7%), B (19,0%) i AB (7,9%). Fenotipovi O i A zajedno čine 73% bolesnika s recidivom. Najzastupljeniji fenotip kod bolesnika bez recidiva (NE) je A (46,0%), dok su ostali raspoređeni slijedom: O (37,0%), B (11,5%) i AB (5,5%). Bolesnici s recidivom imaju nešto veću učestalost fenotipa O u usporedbi s onima bez recidiva, dok je fenotip A dominantniji kod bolesnika bez recidiva.

Tablica 15. Raspodjela genotipa prema recidivu tumora

		Genotip													
Recidiv		O1O1	O1A2	A2A2	O1A1	A1A1	O1B	A1B	O1O2	A1A2	A2B	O2B	O2A1	BB	Total
Da	Broj %	27 21,4	8 6,3	6 4,8	11 8,7	7 5,6	14 11,1	6 4,8	20 15,9	8 6,3	4 3,2	10 7,9	5 4,0	0 0,0	126 100
Ne	Broj %	46 23,0	17 8,5	12 6,0	26 13,0	14 7,0	12 6,0	8 4,0	28 14,0	11 5,5	3 1,5	11 5,5	12 6,0	0 0,0	200 100
Ukupno	Broj %	73 22,4	25 7,7	18 5,5	37 11,3	21 6,4	26 8,0	14 4,3	48 14,7	19 5,8	7 2,1	21 6,4	17 5,2	0 0,0	326 100



*recidiv tumora **nije recidiv***testirano Pearsonovim χ^2 testom

Slika 27. Raspodjela genotipa prema recidivu tumora

Najčešći genotipovi kod bolesnika s recidivom (DA) su: O1O1 (21,4%), O1O2 (15,9%), A1B (11,1%). Ostali genotipovi imaju manju zastupljenost (<10%). Najčešći genotipovi kod bolesnika bez recidiva (NE) su O1O1 (23,0%) i O1O2 (14,0%). Genotipovi A1A2 i A2A2 su također značajno prisutni. Genetska raznovrsnost je veća u ovoj grupi. Genotipovi koji uključuju alel O su najzastupljeniji u ukupnoj populaciji bolesnika: O1O1 čini 22,4%, a O1O2 čini 14,7%. Genotipovi koji uključuju alel O pojavljuju se češće kod svih bolesnika, ali nema značajne razlike između grupa DA i NE u njihovoj distribuciji (tablica 15 i slika 27).

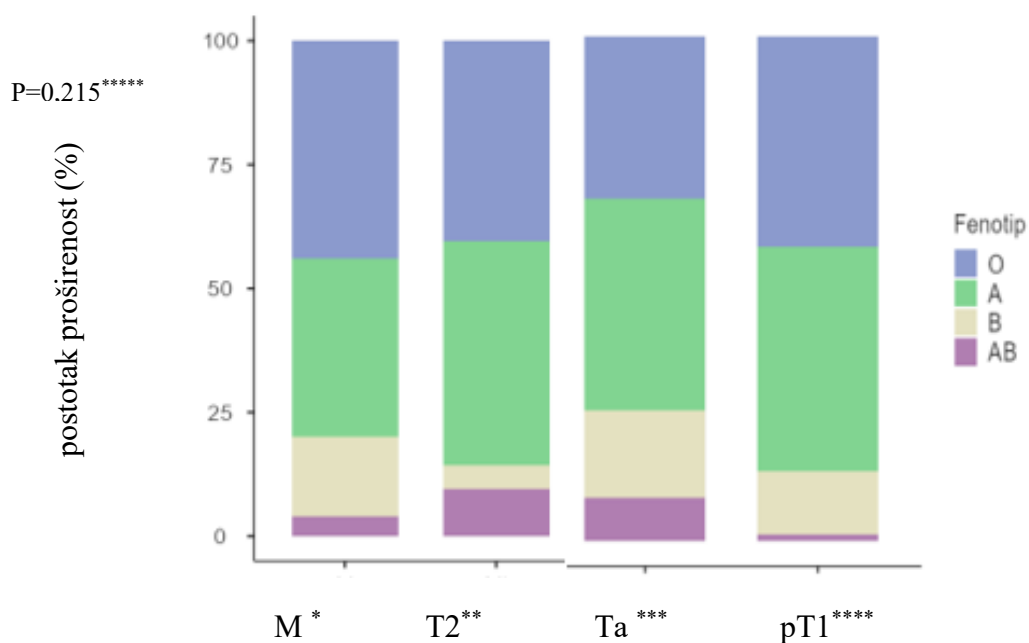
4.6 Rezultati proširenosti bolesti za fenotip i genotip

Rezultati prikazani u tablici 16 i na slici 28 ukazuju na distribuciju fenotipova kod različitih stadija bolesti (Ta, T1, T2, M) za ukupno 326 ispitanika.

Tablica 16. Raspodjela fenotipova prema proširenosti bolesti

		Fenotip				
Grupa		O	A	B	AB	Total
Ta*	Broj	52	68	28	14	162
	%	32,1	42,0	17,3	8,6	100
T1**	Broj	30	32	9	1	72
	%	41,7	44,4	12,5	1,4	100
T2***	Broj	17	19	2	4	42
	%	40,5	45,2	4,8	9,5	100
M****	Broj	22	18	8	2	50
	%	44,0	36,0	16,0	4,0	100
Ukupno	Broj	121	137	47	21	326
	%	37,1	42,0	14,4	6,4	100

* neinvazivni; ** ne-mišićno invazivni; *** mišićno-invazivni; **** metastatski



*metastatski **mišićno invazivni *** neinvazivni ****ne-mišićno invazivni

***** testirano Pearsonovim χ^2 testom

Slika 28. Raspodjela fenotipova prema proširenosti bolesti

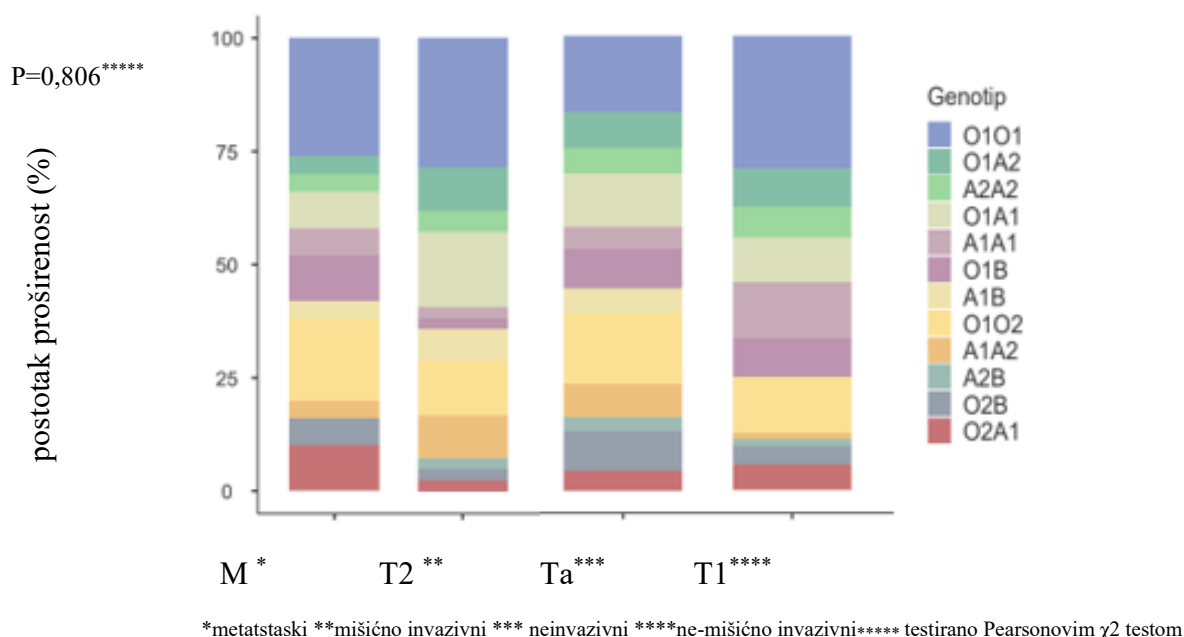
Najzastupljeniji fenotip kod tumora Ta stadija je A (42%), dok su O (32,1%), B (17,3%) i AB (8,6%) manje zastupljeni. S obzirom da fenotip A dominira u ovoj grupi, može ukazivati na specifičnu povezanost s ovim stadijem bolesti. KMM stadija T1 je najčešći u fenotipu A

(44,4%), dok su O (41,7%), B (12,5%) i AB (1,4%) manje zastupljeni. Slična raspodjela kao kod Ta, ali s nešto većom zastupljenošću fenotipa O. T2 stadij je najzastupljeniji kod fenotipa A (45,2%), dok su O (40,5%), B (4,8%) i AB (9,5%) manje prisutni. Uočava se povećanje fenotipa AB u odnosu na T1 i Ta stadij, što može biti značajno za progresiju bolesti. M stadij je najzastupljeniji u fenotipu O (44%) , dok su A (36%), B (16%), i AB (4%) manje zastupljeni. Dominacija fenotipa O ovdje može ukazivati na potencijalnu povezanost s metastatskom fazom bolesti.

Tablica 17. Raspodjela genotipova prema proširenosti bolesti

Genotip															
Grupa		O1O1	O1A2	A2A2	O1A1	A1A1	O1B	A1B	O1O2	A1A2	A2B	O2B	O2A1	BB	Total
Ta*	Broj %	27 16,7	13 8,0	9 5,6	19 11,7	8 4,9	14 8,6	9 5,6	25 15,4	12 7,4	5 3,1	14 8,6	7 4,3	0 0,0	162 100
T1**	Broj %	21 29,2	6 8,3	5 6,9	7 9,7	9 12,5	6 8,3	0 0,0	9 12,5	1 1,4	1 1,4	3 4,2	4 5,6	0 0,0	72 100
T2***	Broj %	12 28,6	4 9,5	2 4,8	7 16,7	1 2,4	1 2,4	3 7,1	5 11,9	4 9,5	1 2,4	1 2,4	1 2,4	0 0,0	42 100
M****	Broj %	13 26,0	2 4,0	2 4,0	4 8,0	3 6,0	5 10,0	2 4,0	9 18,0	2 4,0	0 0,0	3 6,0	5 10,0	0 0,0	50 100
Ukupno	Broj %	73 22,4	25 7,7	18 5,5	37 11,3	21 6,4	26 8,0	14 4,3	48 14,7	19 5,8	7 2,1	21 6,4	17 5,2	0 0,0	326 100

* neinvazivni; ** ne-mišićno invazivni; *** mišićno-invazivni; **** metastatski



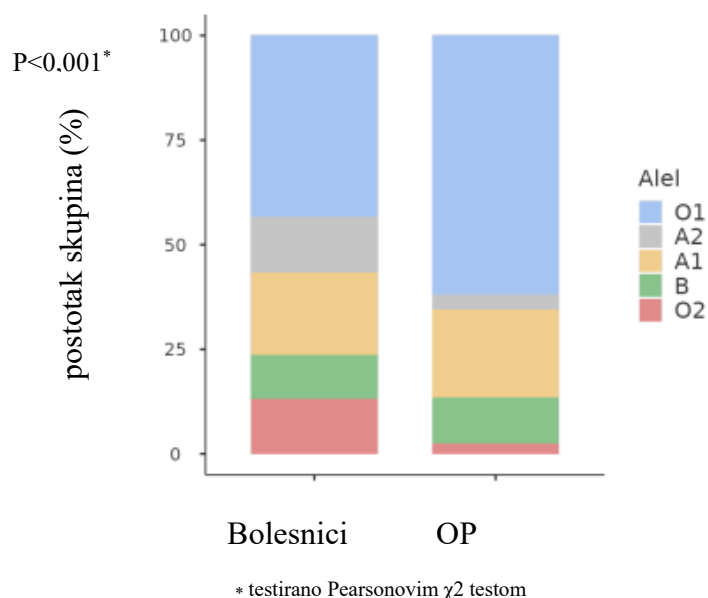
Slika 29. Raspodjela genotipova prema proširenosti bolesti

Rezultati prikazani u tablici 17 i na slici 29 ukazuju na distribuciju genotipova kod različitih stadija bolesti (Ta, T1, T2, M) za ukupno 326 ispitanika. Kod Ta stadija tumora najčešći genotipovi su O1O1 (16,7%), A1A1 (11,7%), i O1A1 (9%). Ostali genotipovi su manje zastupljeni. Genotipovi povezani s fenotipom A čine značajan udio u ovoj grupi. Kod T1 tumora genotipovi O1O1 (29,2%) i A1A1 (12,5%) dominiraju, dok ostali genotipi imaju manju zastupljenost. Uočava se povećanje genotipa O1O1 u odnosu na Ta. Kod T2 tumora genotipovi O1O1 (28,6%) i A1A1 (16,7%) su najzastupljeniji, dok su ostali genotipovi prisutni u manjim postocima. Genetska distribucija pokazuje sličnosti s T1 stadijem, ali s manjom raznolikošću genotipova. M tumori su najzastupljeniji kod genotipovi O1O1 (26%) i A1A1 (18%), dok ostali genotipovi imaju manju zastupljenost. Genetska distribucija naglašava značaj genotipa O1O1 kod metastatske bolesti.

4.7. Usporedba raspodjele alela bolesnika i OP

Tablica 18. Raspodjela alela bolesnika i OP

		alel					
skupina		O1	A2	A1	B	O2	Total
Bolesnici	%	43,3	13,3	19,8	10,4	13,2	100
OP	%	62,0	3,5	21,0	11,0	2,5	100
Ukupno	%	47,7	11,0	20,1	10,6	10,7	100



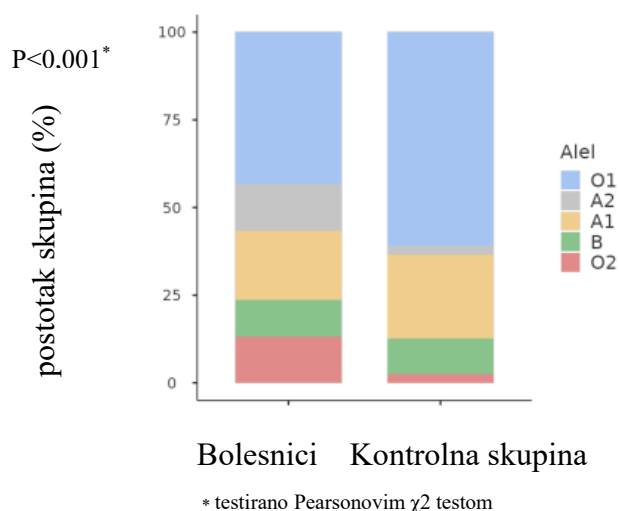
Slika 30. Raspodjela alela bolesnika i OP

Tablica 18 i slika 30 prikazuju raspodjelu alela ABO između skupine bolesnika i OP (229). Za O1 alel je nađena znatno veća zastupljenost u OP (62%) nego kod bolesnika (43,3%). A2 alel je znatno češći kod bolesnika (13,3%) nego u OP (3,5%). O2 alel ima višu učestalost kod bolesnika (13,2%) u usporedbi s OP (2,5%). Za A1 i B alele su utvrđene slične vrijednosti u obje skupine, uz blage razlike. Dijagram jasno pokazuje da su aleli O1 i O2 ključni za razliku između skupina, dok su A2 i O2 češći kod bolesnika nego u OP. Zaključno, raspodjela alela krvnih grupa značajno varira između bolesnika s tumorima i OP, što može biti relevantno za daljnja istraživanja genetskih predispozicija za tumore. P-vrijednost je $< 0,001$ što ukazuje na statistički značajnu razliku u distribuciji alela krvnih grupa između skupine tumora i opće populacije.

4.8. Raspodjela alela u bolesnika i kontrolne skupine

Tablica 19. Raspodjela alela u bolesnika i kontrolne skupine

		alel					
skupina		O1	A2	A1	B	O2	Total
Bolesnici	%	43,3	13,3	19,8	10,4	13,2	100
Kontrolna skupina	%	60,9	2,5	23,9	10,2	2,5	100
Ukupno	%	48,6	10,0	21,0	10,4	9,9	100



Slika 31. Raspodjela alela u bolesnika i kontrolne skupine

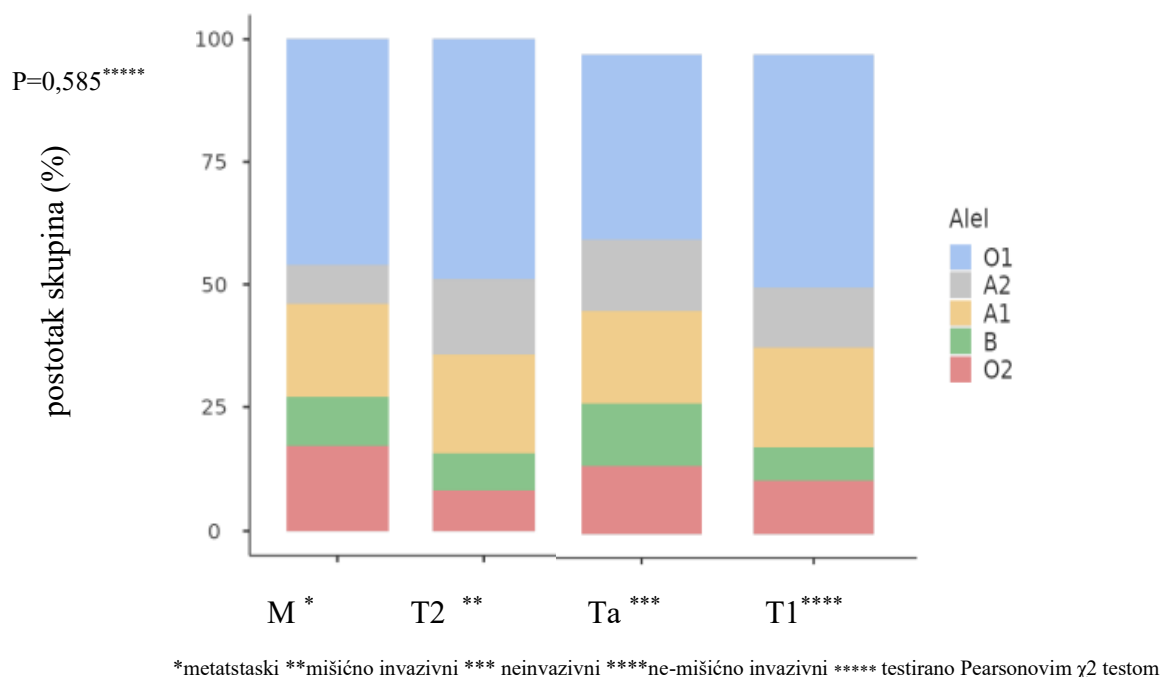
Raspodjela alela između skupine bolesnika i kontrolne skupine prema tablici 19 i slici 31 pokazuje značajne razlike. Aleli O1 je zastupljen u skupini bolesnika sa 43,3%, a u kontrolnoj 60,9% što ukazuje da je Alel O1 značajno češći u kontrolnoj skupini nego u skupini bolesnika. Aleli A2 je u skupini bolesnika zastupljen sa 13,3%, a u kontrolnoj sa 2,5%. Alel A2 je znatno češći u skupini bolesnika nego u kontrolnoj skupini. Aleli A1 je u skupini bolesnika zastupljen sa 19,8%, a u kontrolnoj sa 23,9% što ukazuje na nešto češću učestalost alela A1 kontrolnoj skupini. Aleli B je zastupljen u bolesničkoj skupini sa 10,4%, a u kontrolnoj 10,2% što govori da je distribucija alela B je gotovo jednaka u obje skupine. Aleli O2 je zastupljen u bolesničkoj skupini sa 13,2%, a u kontrolnoj sa 2,5%. Alel O2 je značajno češći u skupini bolesnika. P-vrijednost < 0,001, ukazuje na statistički značajnu razliku u distribuciji alela između dvije skupine. Dijagram jasno pokazuje da kontrolna skupina ima veću prevalenciju alela O1, dok su aleli A2 i O2 znatno češći u skupini bolesnika što može ukazivati na potencijalnu povezanost određenih alela s prisutnošću bolesti.

4.9 Raspodjela alela ovisno o proširenosti bolesti

Tablica 20. Raspodjela alela ovisno o proširenosti bolesti

		alel					
proširenost		O1	A2	A1	B	O2	Total
M*	%	46,0	8,0	19,0	10,0	17,0	100
T2**	%	48,8	15,5	20,2	7,1	8,3	100
T1****	%	48,6	12,5	20,8	6,9	11,1	100
Ta***	%	38,6	14,8	19,4	13,0	14,2	100
Ukupno	%	43,3	13,3	19,8	10,4	13,2	100

*metastatski **mišićno invazivni ***neinvazivni ****ne-mišićno invazivni



Slika 31. Raspodjela alela ovisno o proširenosti bolesti

Analiza raspodjele alela krvnih grupa ovisno o proširenosti bolesti (M, T2, T1, Ta) temelji se na podacima iz tablice 20 i sa slike 31. U M stadiju je najzastupljeniji alel O1 s udjelom od 46%, Slijedi alel A1 (19%), dok su aleli A2, B, i O2 manje zastupljeni (8%, 10%, i 17%). Kod T2 stadija alel O1 dominira s udjelom od 48,8%. Alel A1 je drugi najzastupljeniji (20,2%), dok su A2, B, i O2 relativno manje prisutni (15,5%, 7,1%, i 8,3%). Kod stadij pT1stadija alel O1 ima najveći udio (48,6%). Alel A1 je drugi po zastupljenosti (20,8%), dok su preostali aleli manje zastupljeni (A2: 12,5%, B: 6,9%, O2: 11,1%). Kod stadija Ta alel O1 ima nešto manji udio u odnosu na prethodne kategorije (38,6 %). Aleli A1 i O2 imaju slične udjele (A1: 19,4%, O2: 14,2%), dok su aleli A2 i B nešto manje zastupljeni (A2: 14,8%, B: 13%). Alel O1 je najdominantniji u svim kategorijama proširenosti bolesti. Alel A1 je dosljedno drugi najzastupljeniji. Zastupljenost alela A2, B, i O2 varira, ali su općenito manje prisutni u svim stadijima. Graf potvrđuje ove trendove, prikazujući dominaciju alela O1 u svim kategorijama proširenosti bolesti, dok ostali aleli zauzimaju manjinske udjele. Zaključno, postoji jasna dominacija alela O1 u svim stadijima proširenosti bolesti, dok ostali aleli imaju raznoliku, ali nižu zastupljenost.

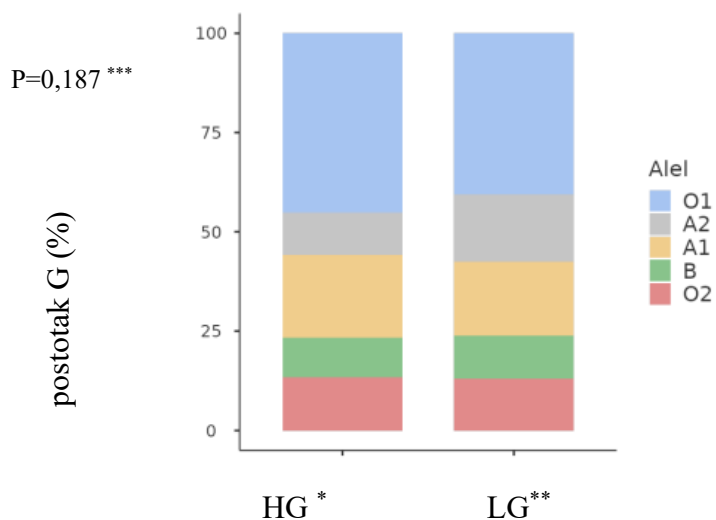
4.10 Raspodjela alela u ovisnosti o G tumora

Na temelju priloženih podataka (tablica 21 i slika 32), može se analizirati distribucija alela krvnih grupa (O1, A2, A1, B, O2) u odnosu na G tumora (HG ,LG).

Tablica 21. Raspodjela alela u ovisnosti o G tumora

		alel					
Gradus		O1	A2	A1	B	O2	Total
HG *	%	45,2	10,6	20,7	10,1	13,3	100
LG **	%	40,6	17,0	18,5	10,9	13,0	100
Ukupno	%	43,3	13,3	19,8	10,4	13,2	100

*visoki gradus (engl.*high grade*) **niski gradus(engl.*low grade*)



*visoki gradus (engl.*high grade*) **niski gradus(engl.*low grade*) *** testirano Pearsonovim χ^2 testom

Slika 32. Raspodjela alela u ovisnosti o G tumora

Tablica 21 i slika 32 opisuju raspodjele alela prema G tumora utvrdili smo da je HG najzastupljeniji kod O1 alela sa 45,2%, a zatim slijede A2 alel sa 10,6%, A1 alel sa 20,7%, B alel sa 10,1% i O2 alel sa 13,3%. LG tumor je najzastupljeniji kod O1 alela sa 40,6%, a zatim slijede A2 alel sa 17,0%, A1 alel sa 18,5%, B alel sa 10,9% i O2 alel sa 13,0%, Alel O1 dominira u oba gradusa. Aleli A2 i A1 pokazuju blage razlike između HG i LG. Aleli B i O2 imaju slične postotke u oba gradus. Iako postoje male razlike u postotcima pojedinih alela između HG i LG, one nisu dovoljno velike da bi bile statistički značajne.

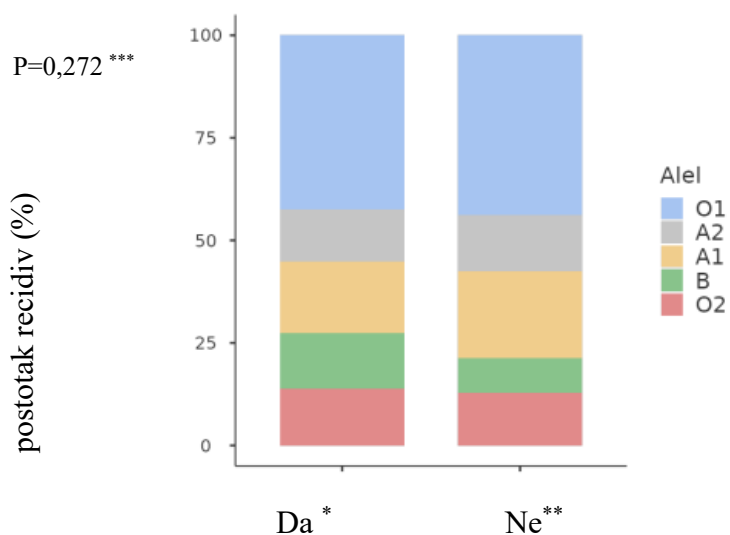
4.11. Raspodjela alela u odnosu na recidiv bolesti

Prema tablici 22 i slici 33 analizirali smo raspodjelu alela krvnih grupa u odnosu na recidiv bolesti.

Tablica 22. Raspodjela alela krvnih grupa u ovisnosti o pojavnosti recidiva bolesti

Recidiv		alel					Total
		O1	A2	A1	B	O2	
DA *	%	42,5	12,6	17,5	13,5	13,9	100
NE **	%	43,8	13,8	21,1	8,5	12,8	100
Ukupno	%	43,3	13,3	19,8	10,4	13,2	100

*recidiv tumora **nije recidiv



*recidiv tumora **nije recidiv *** testirano Pearsonovim χ^2 testom

Slika 33. Raspodjela alela krvnih grupa u ovisnosti o pojavnosti recidiva bolesti

Najzastupljenija prisutnost recidiva je kod O1 alela sa 42,5%, zatim slijede A2 sa 12,7%, A1 sa 17,5%, B sa 13,5% i O2 sa 13,9%. Odsutnost pojave recidiva („Ne“) je najzastupljenija u O1 alelu sa 43,8%, A2 alelu sa 13,8%, A1 alelu sa 21,3%, B alelu sa 8,5% i O2 alelu sa 12,8%. Vidljivo je da su postotci za alel O1 slični u obje grupe, dok su aleli A1 i B nešto različiti raspoređeni.

5. RASPRAVA

Istraživanja koja su proučavala ABO kao čimbenik rizika u nastanku zloćudnih bolesti provode se još od pedesetih godina 20. stoljeća. Među prvima je ono kojim je utvrđena povezanost krvne grupe A s većom učestalošću obolijevanja od karcinoma želuca (230). Kasnije tijekom godina ona su proširena i na sva ostala sijela, a između ostalog i na KMM i u njima je uglavnom analiziran utjecaj antigena ABO na karcinogenezu. Među prvim studijama koje su pokazale vezu između ABO i karcinoma na razini gena je GWAS brojnih koautora iz 2009. godine koja je identificirala genske regije među njih 558542 na 1896 ispitanika s tumorom, a koje bi mogle biti potencijalno povezane s rizikom od razvoja raka gušterače. Jedna od regija je smještena unutar prvog introna gena ABO, određena SNP-om rs 505922 koji je nazvan zaštitnim T alelom, a u neravnoteži je vezanosti gena s brisanjem parova baza, što ima za posljedicu nekodiranje enzima GT i posljedično izostanak sinteze antigena, a što je karakteristika O krvne grupe. Zaključak navedenog istraživanja sugerira da nositelji krvne grupe A i B imaju povišen rizik, a nositelji krvne grupe O imaju niži rizik za obolijevanja od raka gušterače (231). Znači, da bismo analizirali krvnu grupu kao potencijalni biljeg za pojavnost zloćudnih novotvorina, pa tako i KMM, u prvom redu moramo napraviti distinkciju između tipizacije krvne grupe imunohistokemijski na razini antigena ili genotipizacije na razini alela. Osvrnuvši se na rezultate našeg istraživanja u prvom redu na razini antigena utvrđeno je postojanje neravnoteže u spolu među bolesnicima što može ukazivati na razlike u prevalenciji bolesti ili na specifične čimbenike rizika koji su češći kod muškaraca. Viša dob bolesničke skupine također može biti jedan od čimbenika koji doprinosi razvoju bolesti, što bi svakako trebalo dodatno istražiti. Raspodjela krvnih grupa u bolesničkoj i kontrolnoj skupini pokazuje vrlo slične postotke za sve fenotipove, s time da je krvna grupa A najzastupljenija u obje skupine, dok su grupe B i AB najmanje zastupljene. Raspodjela fenotipova prema genotipu ukazuje na malu razliku između bolesničke i kontrolne skupine, uz dominaciju krvne grupe O prema homozigotnom genotipu O1O1 u bolesničkoj, kontrolnoj i skupini OP. Analiza povezanosti određenih fenotipova krvnih grupa i stadija bolesti je ukazala da fenotip A pokazuje najveću učestalost u Ta, T1 i T2 stadijima bolesti, dok je kod metastatskog stadija dominantan fenotip O. Niža zastupljenost fenotipa B i AB kroz sve stadije bolesti može sugerirati slabiju povezanost ovih fenotipova s progresijom bolesti, pogotovo na račun nižeg udjela navedenih krvnih grupa među fenotipovima. Raspodjela fenotipova krvnih grupa između HG i LG je pokazala dominaciju krvne grupe A u obje skupine što ukazuje da je navedeni fenotip općenito povezan s pojavnosti bolesti, ali nije specifičan za pojedini G, dok kod pojave recidiva tumora dominira krvna grupa O. Potencijalne biološke osnove za ove razlike mogu uključivati genetske ili imunološke

faktore povezane s antigenima krvnih grupa. Primjerice, prema dobro poznatoj metodi određivanja glikoproteinskog antigena krvne grupe pomoću serologije, postavljena je hipoteza patogenetskih mehanizama u kojoj antigeni krvnih grupa sudjeluju kao signalne molekule u procesu stanične adhezije i prepoznavanju (232). Cartron i sur. utvrdili su da se osim na eritrocitima antigeni krvnih grupa nalaze i na drugim tkivima u različitim formama, što rezultira velikom funkcionalnom raznolikošću (233). ABO predstavlja sustav s najizraženijim imunološkim odgovorom u ljudskom organizmu, stoga su ranija istraživanja temeljena na teoriji izbjegavanja imunološkog odgovora utvrdila da je za određene tumore mokraćnog mjehura karakterističan manjak ekspresije antigena A i B na tumorskim stanicama u usporedbi s normalnim urotelom (234). Osim njihove uloge u imunološkoj regulaciji, proizvodi GT imaju i druge implikacije. Određeni mehanizmi analizirani za različite tumore sugeriraju da antigeni ABO stimuliraju unutarstaničnu signalizaciju u smjeru tumorske angiogeneze ili pak igraju ulogu u upalnom procesu utječući na serumsku razinu cirkulirajućih upalnih biljega, solubilnog vaskularnog endotelnog čimbenika rasta za receptore 2 i 3 i topljivog glikoproteina 130 čime se utječe na nadzor malignih stanica (235, 236). Srinvas i sur. su utvrdili da bolesnici s KMM, a nositelji krvne grupe A imaju tendenciju niže smrtnosti i povoljniji histološki oblik, dok bolesnici nositelji krvne grupe O imaju lošiji histološki tip i višu smrtnost (237). S obzirom da ABO predstavlja nasljednu osobinu ljudi, u Kini je provedena studija u kojoj je kroz 25 godina počevši od 1986. godine utvrđivana pojava i raspodjela zloćudnih tumora različitih sijela među ispitanicima različitih krvnih grupa. Među 18,244 ispitanika utvrđena je i pojava 172 slučajeva KMM. Među njima je utvrđen statistički značajno niži rizik za obolijevanje među nosiocima krvne grupe B u usporedbi sa krvnom grupom A, dok su nosioci krvnih grupa AB i O imali rizik za obolijevanje usporediv sa krvnom grupom A (238). Istraživanje koje je provedeno na 494 bolesnika s Ta KMM je utvrdilo da nositelji krvne grupe O imaju rizik za progresiju i povrat bolesti (239). Pregledni članak iz 2022. je obuhvatio 10 studija koje su istraživale povezanost između fenotipova ABO sustava i KMM. Povezanost s ishodom liječenja utvrđena je u bolesnika koji su bili podvrgnuti RC kod bolesnika različitih krvnih grupa. Također je utvrđeno kako u bolesnika s T1 KMM koji su bili podvrgnuti TURM-u, krvna grupa A može utjecati na ishod liječenja, dok je niža incidencija recidiva i progresije bolesti utvrđena za krvnu grupu B (48). Prema nizu drugih autora koji su proučavali povezanost KMM i fenotip, antigeni ABO nisu identificirani kao potencijalni biljeg u prognozi i ishodu bolesti (49, 240). Iako na razini fenotipova nismo dobili statistički značajan rezultat, navedeni podaci ovog istraživanja mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja s većim brojem ispitanika, a s ciljem pronalaženja uzročne veze između antigena krvnih grupa i pojavnosti bolesti te rizičnih čimbenika za njezinu

progresiju. Povezanost fenotipova krvnih grupa s različitim stadijima KMM može u perspektivi imati kliničke implikacije u smislu predviđanja rizika ili personalizacije terapije s obzirom da se radi o metodi koja se svakodnevno upotrebljava u kliničkoj praksi, a analiza samih antigena mora u prvom redu biti temelj za daljnje istraživanje genotipova i alela. Prema meta analizi iz 2014. utvrđena je statistički značajna sveukupna pojava KMM u nosioca krvne grupe A u usporedbi sa ne-A nosiocima (241). Novija meta analiza Koirala i sur. sintetizira rezultate iz različitih studija koje su istraživale povezanost krvnih grupa s incidencijom i agresivnošću KMM, pri čemu je svako istraživanje provedeno na različitim populacijama. Višestruke studije izvještavaju o statistički značajnoj povezanosti krvne grupe B s povećanim rizikom za KMM, pri čemu se učestalost ove krvne grupe u oboljelih istraživala na različitim populacijama. Primjerice, u litavskoj populaciji identificirana je značajno viša prevalencija krvne grupe B kod muškaraca s KMM, dok kod žena nije utvrđena takva povezanost. Druga istraživanja na odvojenim kohortama također ističu da krvna grupa B nosi povišen rizik, dok krvna grupa O ne pokazuje statističku značajnost glede rizika za nastanak KMM. U nekim populacijskim skupinama utvrđeno je da krvna grupa O korelira s agresivnijim tumorskim karakteristikama, uključujući viši stupanj i češće recidive u odnosu na krvnu grupu A, dok drugi radovi navode da O krvna grupa nosi lošije izgleda za recidiv i progresiju u usporedbi s A ili B krvnim grupama. Važno je naglasiti da su ove analize provedene na različitim istraživačkim populacijama: litavska, kineska i europska populacija, što doprinosi heterogenosti rezultata i mogućem utjecaju genetskih i epidemioloških razlika pri interpretaciji povezanosti krvnih grupa i rizika/prognoze KMM. Time se može objasniti nesklad u rezultatima i potreba za daljnjim multicentričnim, populacijski definiranim studijama. (242).

Poznato je kako učestalosti gena tj. frekvencije gena za polimorfizme krvnih grupa uglavnom služe kao biljezi pojedinih populacija i rasa. Rezultati ispitivanja populacijske genetike za ABO utvrdili su najvišu učestalost O gena ($> 0,7$) u Americi i nekim dijelovima Afrike dok učestalost O gena nije bila tako velika na europskom i azijskom kontinentu. Učestalost gena ili alela se mjeri kao proporcija ili postotak svih alela na određenom genskom lokusu u populaciji. Na primjer, ako je učestalost određenog alela 0,7, to znači da je taj alel prisutan u 70% svih alela na tom lokusu u populaciji. Frekvencija O2 alela iznosi u Europi od 0,017 do 0,033, a uopće ga nema u istočnoj Aziji. Učestalost alela A je relativno visoka u Europi (0,25 - 0,55), zastupljenost je veća od 0,45 kod Aboridžina na jugu Australije, a do 0,35 kod američkih starih plemena. Alel A2 uglavnom se nalazi u Europi i Africi, gdje ne prelazi učestalost od 0,1 a drugdje u svijetu je vrlo rijedak. Frekvencija B alela u Europi varira od 0,15 na istoku do $< 0,005$ na

zapadu, u Nizozemskoj i Francuskoj. Najviša frekvencija alela B je u Aziji (0,2 - 0,3), dok ga gotovo nema kod američkih starosjedilaca i australskih Aboridžina (243). Godine 2017. provedeno je istraživanje raspodjela krvnih grupa i alela u hrvatskoj populaciji. Najčešća je krvna grupa A (41%), zatim slijede krvne grupe O (39%), B (15%), a najmanje je zastupljena krvna grupa AB (5%). ABO genotipizacijom hrvatske populacije je utvrđeno 12 genotipova od 15 mogućih: O1O1 (37,2%), pa slijede O1A1 (27,1%), O1B (15,8%), A1B (4,3%), A1A1 (4,0%), O1A2 (3,6%) i O1O2 (2,6%), A1A2 (1,7%), O2A1 (1,7%), A2B (1,0%), BB (0,7%), O2O2 (0,3%). Nisu bila utvrđena 3 rijetka ABO genotipa: A2A2, O2A2, O2B. U navedenom istraživanju izračunata je i alelna frekvenciju za 5 osnovnih alela i rezultati su: O1 – 0,63; O2 – 0,025; A1 – 0,21; A2 – 0,035 i B – 0,11. Najveća je bila frekvencija O1 alela, slijedi A1, a najmanja je pojavnost O2 alela u hrvatskoj populaciji. Kada to usporedimo s prethodno navedenim frekvencijama ABO alela u svijetu, razdioba alela u RH je usporediva s drugim europskim narodima. Prema učestalosti B alela, više se ipak priklanjamo istoku Europe, a možemo pretpostaviti da je to najviše uslijed migracija stanovništva u prošlosti (229). Ako usporedimo raspodjelu navedenih genotipova s bolesničkom skupinom i kontrolama, dobili smo da je genotip O1O1 najzastupljeniji, ali je njegov udio najveći u hrvatskoj populaciji među skupinama. Hrvatska populacija ima najveći udio univerzalnog donorskog genotipa O1O1. Genotip A2A2 ima izrazito visok udio u kontrolnoj skupini u usporedbi s bolesnicima i OP. Genotipovi poput BB, A2B i O2A1 su rijetki u svim skupinama. U kontrolnoj skupini je veći udio genotipova povezanih s krvnim grupama A i B (A2A2, O1B) u usporedbi s bolesnicima. Raspodjela genotipova pokazuje značajne razlike između bolesnika i kontrola što ćemo analizirati malo kasnije, dok između kontrolne skupine i OP pokazuje vrlo male razlike, koje nisu statistički značajne. To upućuje na zaključak da kontrolna skupina dobro reprezentira OP u kontekstu učestalosti alela ABO . Stoga se kontrolna skupina može smatrati valjanim referentnim uzorkom za usporedbu s grupom bolesnika s tumorom. Genotipizacija ABO u našem istraživanju je provedena PCR-SSP metodom kojom smo identificirali SNP-ove koji predstavljaju surogat za pojedini alel krvne grupe. SNP-ove odlikuje specifičnost za određenu gensku regiju i određenu zemljopisnu populaciju, a u principu predstavljaju genomsku varijantu na jednoj baznoj poziciji DNA. U našem istraživanju koristili smo ih za identifikaciju alela ABO. SNPovi predstavljaju jednu od najčešćih genetskih varijacija u ljudskom genomu. Osim za identifikaciju i određivanje frekvencije gena u populaciji postoje i SNP-ovi koji se nalaze u genima koji reguliraju popravak DNA, stanični ciklus, metabolizam i imunost, a udruženi s povišenom osjetljivošću za nastanak raka. Razumijevanje tih mehanizama od ključne je važnosti za proučavanje molekularne patogeneze raznih vrsta zloćudnih novotvorina povezanih

sa SNP-om (244, 245). SNP-ovi prvenstveno služe kao biljezi za označavanje specifične regije gena i karakteristični su za određenu populaciju, a s vremenom je utvrđena njihova uloga kao potencijalnih biljega u zloćudnim bolestima (246). Oni se mogu nalaziti u kodirajućoj regiji DNA što će rezultirati promjenom u rasporedu amino kiselina sintetiziranog proteina. Također se mogu nalaziti unutar regulirajućeg genskog područja, rezultirajući promjenom u ekspresiji ili se mogu nalaziti u području između gena (247). Stoga učinak i patogenetski mehanizam karcinogeneze prvenstveno ovisi o njihovoj lokaciji. SNP-ovi su smješteni na različitim dijelovima gena i modificiraju njihovu ekspresiju, a što u konačnici može imati značajnu ulogu u karcinogenezi. U našem istraživanju odredili smo alele *gene* O1, O2, A1, B i A2 i to genotipizacijom genskih regija: *rs5076666* (intron A/T) kao surogat za alel A1, *rs687289* (intron A/G/G) za O alel, *rs8176746* (kodirajuća G > A,T sinonimni) za B alel i *rs8176704* (intron) za A2. Iz analize genotipova krvnih grupa naši rezultati ukazuju na statistički značajne razlike u njihovoj raspodjeli između bolesničke skupine i kontrolne skupine. Prema tome genotipovi **O1A2**, **A2A2** i **O1O2** predstavljaju čimbenike povišenog rizika za nastanak bolesti, dok se genotip **O1O1** ističe unutar kontrolne skupine, što može upućivati na njegovu zaštitnu ulogu. Na temelju usporedbe podataka analizirali smo i povezanost pojedinih alela s nastankom tumora u odnosu na opću populaciju i kontrolnu skupinu te smo također dobili statistički značajne razlike. Rezultati analize su pokazali da aleli O2 i A2 mogu predstavljati čimbenik rizika za nastanak tumora, dok alel O1 može pokazivati zaštitni učinak. Aleli A1 i B ne pokazuju značajne razlike koje bi ukazivale na njihovu ključnu ulogu u patogenezi bolesti. Ako u isti kontekst stavimo analizu i genotipova i alela, dobit ćemo da alel A2 ima značajan učinak na razvoj bolesti, poglavito ako je uklopljen u homozigotni genotip A2A2. S druge strane, genotip O1O1 se ističe među kontrolama, što sugerira da alel O1 ima zaštitnu ulogu u sprečavanju razvoja bolesti, također u homozigotnom obliku gena. Heterozigotni genotipovi kao što su O1A2 i O1O2 su također udruženi s povećanim rizikom za oboljenje od KMM. U slučaju genotipa O1A2, prisustvo alela A2 vjerojatno prevladava zaštitni učinak alela O1. Slično tome, genotip O1O2, iako sadrži zaštitni alel O1, predstavlja rizičan čimbenik, što sugerira da prisustvo alela O2 ili drugih faktora prevladava zaštitni učinak alela O1. Iz analize genotipova i alela prema proširenosti bolesti je vidljivo da je genotip O1O1 najzastupljeniji u svim stadijima, a najviše kod stadija T1, bolesti visokog gradusa i u bolesnika koji nisu imali recidiv bolesti, dok je alel O1 gotovo podjednako zastupljen kod T1 i T2 bolesti. Alel A1 kod T1 i T2 bolesti je drugi najzastupljeniji što može ukazivati na predispoziciju i ovog alela kao čimbenika rizika. Ostali genotipovi, poput A2A2 i BB, te aleli A2, B i O2 pokazuju vrlo nisku zastupljenost ili su potpuno odsutni u nekim stadijima, što može sugerirati njihovu slabiju

povezanost kao potencijalnog biljega za stupnjevanje bolesti. Alel O1 je najzastupljeniji kod tumora visokog i niskog gradusa što može značiti da općenito predstavlja povišen rizik za razvoj bolesti bez obzira na stupanj maligniteta. Također je najzastupljeniji i u bolesnika sa i bez recidiva bolesti što bi moglo ukazivati na njegovu nespecifičnost za recidiv. SNP-ove koje smo određivali kao surogat za alele krvnih grupa su intronalni (A1, O i A2) i egzonalni (B). GWAS studija koja je analizirala neposredan utjecaj SNP-ova na nastanak KMM ovisno o lokaciji na genu identificirala je egzonalni SNP rs 12615669 (kromosom 2) i rs 2989734 (kromosom 9) te intronalni SNP rs 4976845 (kromosom 13) kao čimbenike rizika za nastanak agresivnije forme ne-mišićno invazivnog KMM, s povišenim rizikom za njegovu progresiju (100). Druga studija je utvrdila da pušenje predstavlja rizičan čimbenik za nastanak KMM u nositelja određenih alela (248). GWAS studije koje su identificirale SNP-ove kao čimbenike rizika u pojavnosti KMM u dovoljno velikom uzorku populacije utvrdile su omjer izgleda manji od 1,5, pa su ti SNP-ovi nazvani umjerenog rizika(249). Iz svega navedenog proizlazi da ulogu SNP-ova ne treba promatrati samo iz aspekta njihovog direktnog utjecaja, već u obzir treba uzeti i njihovu posrednu ulogu u karcinogenezi populacije izložene rizičnim čimbenicima. Primjerice, valja razmotriti utječu li polimorfizmi na izloženost pojedinca vanjskim i okolišnim čimbenicima kao što su pušenje, prehrana ili konzumacija alkohola. SNP-ovi se nalaze na različitim dijelovima gena te putem različitih mehanizama reguliraju gensku ekspresiju i stanični ciklus. U ekstenzivnim istraživanjima o ulozi SNP-ova u genetskoj predispoziciji za karcinogenezu utvrđeni su vrlo kompleksni patogenetski mehanizmi koji nisu do kraja razjašnjeni. Na primjer, dok je dobro istražen utjecaj SNP-ova promotorske regije na metilaciju gena i modifikaciju histona, međudjelovanje između genetskih i epigenetskih mehanizama ostaje nerazjašnjeno. Štoviše, iako postoje dokazi za povezanost egzonalnih polimorfizama i rizika za rak, biokemijski i stanični biološki ishodi nsSNP-ova nisu poznati. Također, detalji koji se tiču učinaka sSNP-ova na kinetiku translacije zahtijevaju detaljnije proučavanje. Učinak metilacije DNA koji se uglavnom događa u regiji promotora i prvom egzonu treba proučavati u odnosu na sami SNP. Dok su funkcije intronalnih polimorfizama dobro poznate, njihovi utjecaj na spajanje, cis-regulirajuće elemente i lncRNA zahtijevaju daljnje proučavanje. Također, prepoznata je i uloga polimorfizama unutar neprevađajućih, regija u genskoj ekspresiji kroz epigenetsku regulaciju translacije, iako se utjecaj SNP-ova na 5' i 3' UTR na translaciju, DNA metilaciju, miRNA vezanje, i tkivno-specifičnu gensku ekspresiju mora još dodatno utvrditi. Polimorfizmi unutar pri-, pre- i zrele miRNA utječu na probir ciljanih miRNA i na ekspresiju brojnih proteina i signalnih puteva. Stoga možemo zaključiti da su mehanizmi povezani s polimorfizmima gena i rizikom za rak vrlo kompleksni. Oni također mogu promijeniti prostornu

strukturu, što utječe na stabilnost mRNA, metilaciju i alel specifičnu ekspresiju, čime se bave bazična istraživanja. S obzirom na navedeno, ulogu SNP-ova u karcinogenezi prvenstveno treba sagledati kroz prizmu genetskih i epigenetskih mehanizama koji su temelj razumijevanja rizika za nastanak raka. Istraživanja koja su proučavala utjecaj SNP-ova na tumorogenezu utvrdila su i njihovu ulogu preko gena koji su uključeni u regulaciju rasta stanica, popravak DNK, apoptozu ili putem imunološkog odgovora. Primjer su SNP-ovi u genima povezani s povećanim rizikom od raka dojke i jajnika (250). SNP-ovi mogu i utjecati na način na koji pojedinci reagiraju na okolišne čimbenike, poput pušenja, prehrane ili izloženosti kemikalijama. Primjerice, neki SNP-ovi mogu utjecati na metabolizam kancerogenih tvari, kroz regulaciju enzimske aktivnosti koja djeluje u metabolizmu ksenobiotika, što može povećati ili smanjiti rizik od raka kod osoba koje su njima izložene. Otkrivanje specifičnih SNP-ova može pomoći u identifikaciji osoba s povećanim rizikom za maligno oboljenje, omogućujući rano otkrivanje i preventivne mjere. Njihova analiza može pomoći u personalizaciji terapije jer neki od njih mogu utjecati na odgovor na liječenje. SNP-ovi koji se nalaze u genima koji su uključeni u popravak DNA mogu smanjiti sposobnost stanica da poprave oštećenja DNA, što može dovesti do akumulacije mutacija i razvoj raka, dok SNP-ovi u genima koji reguliraju signalne puteve koji upravljaju rastom stanica mogu rezultirati neurednim rastom i razvojem tumora. Neki SNP-ovi mogu imati različite učinke u kombinaciji s okolišnim čimbenicima kao što su prehrana, izloženost kemikalijama ili virusnim infekcijama. Ove interakcije mogu igrati ključnu ulogu u razvoju raka i mogu pomoći u razumijevanju kompleksnosti karcinogeneze. SNP-ovi su važan alat za razumijevanje genetskih aspekata karcinogeneze, omogućujući identifikaciju genetskih predispozicija za rak, proučavanje mehanizama razvoja tumora i personalizaciju pristupa liječenju i prevenciji. Njihovo proučavanje doprinosi boljem razumijevanju nastanka tumora i može dovesti do unaprijeđenja u dijagnostici i terapiji.

Nakon svega navedenog, a vrativši se na tvrdnju s početka rasprave, možemo iz naših rezultata i literature zaključiti da je za istraživanje povezanosti ABO i KMM, tipizacija krvne grupe na razini alela adekvatnija nego imunohistokemijska metoda na razini antigena. Prvenstveno, otvara se potpuno novi pogled na patogenetske mehanizme u karcinogenezi koji su do sada bili utvrđeni samo na razini antigena. Drugo, a obzirom da su krvne grupe kodominantne, iz podatka o antigenu određenog imunohistokemijom ne možemo odrediti haplotip specifične genske regije, a upravo je alel tj. njegovi sastavni dio SNP-a nositelj rizika za nastanak tumora. Treće, uloga SNP-ova ne mora biti usko vezana kroz direktan utjecaj na stanični ciklus i proliferaciju, već može djelovati i kroz enzimsku aktivnost koja može utjecati na metabolizam karcinogenih

spojeva. Primarna uloga ABO je imunološka u smislu antigene determinacije krvnih grupa individualca. Ona nije izravno povezana s karcinogenezom, ali su mnoga istraživanja proučavala njezinu povezanost zadnjih nekoliko desetljeća. Iako smo se potrudili objasniti naše rezultate pomoću potencijalnih patogenetskih mehanizama objavljenih u ranijim istraživanjima, važno je napomenuti da oni nisu još do kraja istraženi. Ostaje otvoreno pitanje igra li ključnu ulogu interakcija s imunološkim sustavom, ekspresija glikokonjugata ili varijacije unutar genske regije. Rezultati dosadašnjih istraživanja nisu dali uvjerljiv dokaz glede specifičnog patogenetskog mehanizma. Naše istraživanje je prvo koje je obuhvatilo analizu povezanosti ABO i KMM na razini genotipa i alela. Dok na razini antigena nije utvrđena povezanost, povezanost smo utvrdili između pojedinih genotipova i alela ABO i pojavnosti KMM. Ta saznanja sugeriraju potencijalnu ulogu ABO alela u nastanku i progresiji tumora i nalažu daljnja istraživanja s većim brojem ispitanika kako bi potvrdili naša preliminarna istraživanja. Ograničenje naše studije je relativno mali broj uzoraka bolesnika iz hrvatske populacije s obzirom na studije koje se bave istraživanjem polimorfizama, ali smo dobili vrijedne informacije vezane uz pojedine alele kao moguće čimbenike rizika. Razumijevanje genetske osnove nastanka KMM može pridonijeti poboljšanju dijagnostike, stratifikaciji rizika i ciljanim terapijskim intervencijama.

6. ZAKLJUČAK

- Prvo istraživanje koje je obuhvatilo analizu povezanosti ABO sustava krvnih grupa i KMM na razini ABO genotipa i alela
- Genotipovi **O1A2**, **A2A2** i **O1O2** predstavljaju čimbenike povišenog rizika za nastanak bolesti čime smo potvrdili hipotezu, dok je genotip **O1O1** češći među kontrolama, što može upućivati na njegovu zaštitnu ulogu tj. upućuje da nekodiranje/neaktivnost glikoziltransferaza može imati zaštitnu ulogu u tumorskoj transformaciji
- Aleli **A2** i **O2** imaju značajan učinak na razvoj bolesti, a alel **O1** u homozigotnom genotipu ima zaštitnu ulogu čime smo potvrdili hipotezu da ne-O genotipovi (AA, OA, AB, BO i BB) i aleli (A i B) predstavljaju čimbenik rizika u pojavnosti tumora mokraćnog mjehura i time otvorili vrata daljnjih istraživanja o ulozi i patogenetskim mehanizmima intronalnih i egzonalnih SNP-ova kao čimbenika rizika za nastanak tumora
- U istraživanju povezanosti ABO sustava krvnih grupa i KMM, genotipizacija krvne grupe na razini alela je adekvatnija i pouzdanija nego imunohistokemijska metoda na razini antigena.

7. LITERATURA

1. Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfusion Medicine* 2001;11:243–65.
2. Yamamoto FI, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori SI. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990;345:229–33.
3. Daniels G. Human blood groups, 3rd ed. West Sussex: John Wiley and Sons, 2013;17.
4. Oriol R. Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. *J Immunogenet* 1990;17:235–45.
5. Yamamoto FI, McNeill PD, Hakomori SI. Genomic organization of human histo-blood group ABO genes. *Glycobiology* 1995 ;5:51–8.
6. Yamamotos FI, Hakomori SI. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions*. *J Biol Chem* 1990;265:19257–62.
7. Yamamoto F -i. Molecular genetics of the ABO histo-blood group system. *Vox Sang* 1995 ;69:1–7.
8. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *J Med Invest* 2008 ;55:174–82.
9. Bennett EP, Steffensen R, Clausen H, Weghuis DO, Van Kessel AG. Genomic cloning of the human histo-blood group ABO locus. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 ;206:318–25.
10. Chester MA, Olsson ML. The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev* 2001;15:177–200.
11. Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A, Blasczyk R. The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood* 2003 ;102:3035–42.
12. Calafell F, Roubinet F, Ramírez-Soriano A, Saitou N, Bertranpetit J, Blancher A. Evolutionary dynamics of the human ABO gene. *Hum Genet* 2008 ;124:123–35.
13. MedlinePlus Genetics. What are the different ways a genetic condition can be inherited? Preuzeto s <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/inheritance/inheritancepatterns/> (pristupljeno: 1.studenog 2024.)
14. Yamakami K. The individuality of semen, with reference to its property of inhibiting specifically isohemoagglutination. *The Journal of Immunology* 1926 ;12:185–9.
15. Schiff F, Sasaki H. Der ausscheidungstypus, ein auf serologischem wege nachweisbares mendelndes merkmäl. *Klin Wochenschr* 1932;11:1426–9.
16. Harmening D. Modern blood banking and transfusion practices, 5th ed. Philadelphia: F.A. Davis, 2005:187.

17. Gene-NCBI.FUT3 fucosyltransferase 3 (Lewis blood group) [Homo sapiens (human)]. Preuzeto s : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>. (pristupljeno: 24. studenog 2024.)
18. Gooi HC, Feizi T, Kapadia A, Knowles BB, Solter D, Evans MJ. Stage-specific embryonic antigen involves alpha 1 goes to 3 fucosylated type 2 blood group chains. *Nature* 1981 ;292:156–8.
19. Hu D yuan, Shao X xiao, Xu C long, Xia S long, Yu L qin, Jiang L jia, et al. Associations of FUT2 and FUT3 gene polymorphisms with Crohn's disease in Chinese patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2014;29:1778–85.
20. Isshiki S, Togayachi A, Kudo T, Nishihara S, Watanabe M, Kubota T, et al. Cloning, expression, and characterization of a novel UDP-galactose:-N-Acetylglucosamine 1,3-Galactosyltransferase (3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom. *J Biol Chem* 1999; 274:12499–507
21. Yamamoto M, Yamamoto F, Luong TT, Williams T, Kominato Y, Yamamoto F. Expression profiling of 68 glycosyltransferase genes in 27 different human tissues by the systematic multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction method revealed clustering of sexually related tissues in hierarchical clustering algorithm analysis. *Electrophoresis* 2003; 24:2295–307
22. Cooling L. Blood groups in infection and host susceptibility. *Clin Microbiol Rev* 2015 ;28:801–70.
23. Goodwin WE, Mims MM, Kaufmann JJ. Human renal transplantation III. Technical problems encountered in six cases of kidney homotransplantation. *J Urol* 1963 ;89:349–56.
24. Nakagoe T, Fukushima K, Tuji T, Sawai T, Nanashima A, Yamaguchi H, et al. Immunohistochemical expression of ABH/Lewis-related antigens in primary breast carcinomas and metastatic lymph node lesions. *Cancer Detect Prev* 1998 ;22:499–505.
25. Franchini M, Liumbruno GM. ABO blood group: old dogma, new perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1545–53.
26. Kaffenberger SD, Morgan TM, Stratton KL, Boachie AM, Barocas DA, Chang SS, et al. ABO blood group is a predictor of survival in patients undergoing surgery for renal cell carcinoma. *BJU Int* 2012 Dec;110:E 641-6.
27. Liu X, Chen X, Yang J, Guo R. Association of ABO blood groups with von Willebrand factor, factor VIII and ADAMTS-13 in patients with lung cancer. *Oncol Lett* 2017 ;14:3787.
28. Omae K, Fukuma S, Ikenoue T, Kondo T, Takagi T, Ishihara H, et al. Effect of ABO blood type on the outcomes of patients with metastatic renal cell carcinoma treated with first-line tyrosine kinase inhibitors. *Urol Oncol* 2017 ;35:540.
29. Rahbari NN, Bork U, Hinz U, Leo A, Kirchberg J, Koch M, et al. AB0 blood group and prognosis in patients with pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2012 ;12:319

30. Akin S, Altundag K. Clinical Associations with ABO Blood Group and Rhesus Blood Group Status in Patients with Breast Cancer: A nationwide retrospective study of 3,944 breast cancer patients in turkey. *Med Sci Monit* 2018 ;24:4698.
32. Wang Z, Liu L, Ji J, Zhang J, Yan M, Zhang J, et al. ABO blood group system and gastric cancer: A case-control study and meta-analysis. *Int J Mol Sci* 2012 ;13:13308.
32. Hakomori SI. Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473:247–66.
33. Hakomori SI. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: Basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol* 2001;491:369–402.
34. Franchini M, Liumbruno GM, Lippi G. The prognostic value of ABO blood group in cancer patients. *Blood Transfus* 2016 ;14:434–40.
35. Brandley BK, Swiedler SJ, Robbins PW. Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules. *Cell* 1990 ;63:861–3.
36. Brooks CL, Schietinger A, Borisova SN, Kufer P, Okon M, Hiramata T, et al. Antibody recognition of a unique tumor-specific glycopeptide antigen. *Proc Natl Acad Sci* 2010 ;107:10056–61.
37. Guo J, Jiang W, Li Q, Jaiswal M, Guo Z. Comparative immunological studies of tumor-associated Lewis X, Lewis Y, and KH-1 antigens. *Carbohydr Res* 2020 ;492.
38. Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, Moe CL, Baric RS. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J Virol* 2002 ;76:12335–43.
39. Miyake M, Hakomori SI. A specific cell surface glycoconjugate controlling cell motility: evidence by functional monoclonal antibodies that inhibit cell motility and tumor cell metastasis. *Biochemistry* 1991 ;30:3328–34.
40. Parker J, Spiess PE. Current and emerging bladder cancer urinary biomarkers. *ScientificWorldJournal* 2011 ;11:1103–12.
41. Shigyo M, Sugano K, Fukayama N, Taniguchi T, Tobisu KI, Fujimoto H, et al. Allelic Loss on chromosome 9 in bladder cancer tissues and urine samples detected by blunt-end single-strand DNA conformation polymorphism. *J Cancer* 1998 ;78:425–9.
42. Yamada T, Fukui I, Kobayashi T, Sekine H, Yokogawa M, Yamada T, et al. The relationship of ABH(0) blood group antigen expression in intraepithelial dysplastic lesions to clinicopathologic properties of associated transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1991;67:1661-6.
43. Chihara Y, Sugano K, Kobayashi A, Kanai Y, Yamamoto H, Nakazono M, et al. Loss of blood group A antigen expression in bladder cancer caused by allelic loss and/or methylation of the ABO gene. *Lab Invest* 2005 ;85:895–907.

44. Iodice S, Maisonneuve P, Botteri E, Sandri MT, Lowenfels AB. ABO blood group and cancer. *Eur J Cancer* 2010 Dec ;46(18):3345–50.
45. Barbalic M, Dupuis J, Dehghan A, Bis JC, Hoogeveen RC, Schnabel RB, et al. Large-scale genomic studies reveal central role of ABO in sP-selectin and sICAM-1 levels. *Hum Mol Genet* 2010 ;19:1863.
46. Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw* 2004 ;15:91–8.
47. Freire-de-Lima L. Sweet and Sour: the impact of differential glycosylation in cancer cells undergoing epithelial–mesenchymal transition. *Front Oncol* 2014 ;4:59.
48. Yang H, Yan J. A systematic review of prognosis of ABO blood group and rhesus factor on outcomes in patients with bladder cancer. *Medicine* 2022 Sep 9 ;101:E30893.
49. Engel O, Soave A, Peine S, Kluth LA, Schmid M, Shariat SF, et al. The impact of the ABO and the Rhesus blood group system on outcomes in bladder cancer patients treated with radical cystectomy. *World J Urol* 2015;33:1769–76.
50. Gershman B, Moreira DM, Tollefson MK, Frank I, Cheville JC, Thapa P, et al. The association of ABO blood type with disease recurrence and mortality among patients with urothelial carcinoma of the bladder undergoing radical cystectomy. *Urol Oncol* 2016;34:4.e1-4.e1-4. e9.
51. Cheng L, Li SH, Cheng QS, et al.. The influence of ABO blood type on prognosis of primary non-muscle invasive bladder cancer in a region in East China. *J Qiqihar Med Univ.* 2019;40:1914–6.
52. Wang XJ. The correlation between ABO blood type and prognosis of primary non-muscle invasive bladder cancer. Tianjin: Tianjin Medical University, 2019 .
52. He LL, Wei W, Yang MZ, et al.. Value of ABO blood group on prognosis of primary non-muscle-invasive bladder cancer. *J Contemp Urol Reprod Oncol.* 2017;9:334–7.
54. Hakomori S. Blood group ABH and Ii antigens of human erythrocytes: chemistry, polymorphism, and their developmental change. *Semin Hematol.* 1981; 18:39-62
55. Velliquette RW, Aeschlimann J, Kirkegaard J, Shakarian G, Lomas-Francis C, Westhoff CM. Monoclonal anti-CD47 interference in red cell and platelet testing. *Transfusion* 2019;59:730–7.
56. Gerbal A, Maslet C, Salmon C. Immunological aspects of the acquired B antigen. *Vox Sang* 1975 ;28:398–403.
57. Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, Hellberg Å, Moulds MK, Sareneva H, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: Identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* 2001 ;98:1585–93.

58. Mizuno N, Ohmori T, Sekiguchi K, Kato T, Fujii T, Fujii K, et al. Alleles responsible for ABO phenotype-genotype discrepancy and alleles in individuals with a weak expression of A or B Antigens. *J Forensic Sci* 2004 ;49:1–8.
59. Nelson PW, Landreneau MD, Luger AM, Pierce GE, Ross G, Shield CF, et al. Ten-year experience in transplantation of A2 kidneys into B and O recipients. *Transplantation* 1998 ;65:256–60.
60. Olsson ML, Chester MA. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O² versus A/O² discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox Sang* 1995;69:242–7.
61. Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A, Burkhart J, Blasczyk R. Systematic analysis of the ABO gene diversity within exons 6 and 7 by PCR screening reveals new ABO alleles. *Transfusion* 2003 ;43:428–39.
62. Yip SP. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. *Blood* 2000 ;95:1487–92.
63. Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, Saitou N, Bannai M, Nakata K, et al. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood* 1996 ;88:2732–7.
64. Montgomery RA, Locke JE, King KE, Segev DL, Warren DS, Kraus ES, et al. ABO incompatible renal transplantation: A paradigm ready for broad implementation. *Transplantation* 2009 ;87:1246–55.
65. Usmani A, Morris GP, Murphey C. The increasing need for ABO blood group genotyping and quality assurance implications for laboratory implementation. *Hum Immunol* 2024 ;85:110766.
66. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009 ;461:1071–8.
67. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010 Dec ;23:213–27.
68. Chouinard-Watkins R, Plourde M. Fatty acid metabolism in carriers of apolipoprotein E epsilon 4 allele: is it contributing to higher risk of cognitive decline and coronary heart disease? *Nutrients* 2014;6:4452–71.
69. Chiarella P, Capone P, Sisto R. Contribution of genetic polymorphisms in human health. *Int J Environ Res Public Health* 2023 ;20:912.
70. Nasr H Ben, Hamrita B, Batbout M, Gabbouj S, Bouaouina N, Chouchane L, et al. A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter -160 C/A is associated with risk of nasopharyngeal cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411:1253–7.
71. Stirzaker C, Song JZ, Davidson B, Clark SJ. Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells. *Cancer Res* . 2004;64:3871–7.

72. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar S V., Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol* . 2009 ;578:23–39.
73. Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, Fu W, Kenny EE, Gravel S, et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science*. 2012;337:64.
74. Pagenstecher C, Wehner M, Friedl W, Rahner N, Aretz S, Friedrichs N, et al. Aberrant splicing in MLH1 and MSH2 due to exonic and intronic variants. *Hum Genet*. 2006;119:9–22.
75. Xu Q, Liu JW, He CY, Sun LP, Gong YH, Jing JJ, et al. The interaction effects of pri-let-7a-1 rs10739971 with PGC and ERCC6 gene polymorphisms in gastric cancer and atrophic gastritis. *PLoS One*. 2014 Feb 25 ;9(2).
76. He H, Li W, Liyanarachchi S, Srinivas M, Wang Y, Akagi K, et al. Multiple functional variants in long-range enhancer elements contribute to the risk of SNP rs965513 in thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2015;112:6128–33.
77. Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, Fu W, Kenny EE, Gravel S, et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science* . 2012;337:64–9.
78. Tsirka T, Boukouvala S, Agianian B, Fakis G. Polymorphism p.Val231Ile alters substrate selectivity of drug-metabolizing arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) isoenzyme of rhesus macaque and human. *Gene*. 2014;536:65–73.
79. Shan Y, Eastwood MP, Zhang X, Kim ET, Arkhipov A, Dror RO, et al. Oncogenic mutations counteract intrinsic disorder in the EGFR kinase and promote receptor dimerization. *Cell* . 2012;149:860–70.
80. Koehn J, Fountoulakis M, Krapfenbauer K. Multiple drug resistance associated with function of ABC-transporters in diabetes mellitus: molecular mechanism and clinical relevance. *Infect Disord Drug Targets* . 2008;8:263–84.
81. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar S V., Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol* . 2009;578:23–39.
82. Nielsen KB, Sørensen S, Cartegni L, Corydon TJ, Doktor TK, Schroeder LD, et al. Seemingly neutral polymorphic variants may confer immunity to splicing-inactivating mutations: a synonymous SNP in exon 5 of MCAD protects from deleterious mutations in a flanking exonic splicing enhancer. *Am J Hum Genet* . 2007 ;80:416–32.
83. Shen LX, Basilion JP, Stanton J. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 1999;96(14):7871–6.
84. Zhang X, Bailey SD, Lupien M. Laying a solid foundation for Manhattan--'setting the functional basis for the post-GWAS era'. *Trends Genet* . 2014;30(4):140–9.

85. Robbez-Masson LJ, Bödör C, Jones JL, Hurst HC, Fitzgibbon J, Hart IR, et al. Functional analysis of a breast cancer-associated FGFR2 single nucleotide polymorphism using zinc finger mediated genome editing. *PLoS One*. 2013 Nov 12;8(11).
86. Campbel TM, Castro MAA, De Santiago I, Fletcher MNC, Halim S, Prathalingam R, et al. FGFR2 risk SNPs confer breast cancer risk by augmenting oestrogen responsiveness. *Carcinogenesis* . 2016;37:741–50.
87. Tran HTT, Takeshima Y, Surono A, Yagi M, Wada H, Matsuo M. A G-to-A transition at the fifth position of intron-32 of the dystrophin gene inactivates a splice-donor site both in vivo and in vitro. *Mol Genet Metab* . 2005 ;85:213–9.
88. Broen K, Levenga H, Vos J, van Bergen K, Fredrix H, Greupink-Draaisma A, et al. A polymorphism in the splice donor site of ZNF419 results in the novel renal cell carcinoma-associated minor histocompatibility antigen ZAPHIR. *PLoS One* . 2011;6(6).
89. Chung S, Nakagawa H, Uemura M, Piao L, Ashikawa K, Hosono N, et al. Association of a novel long non-coding RNA in 8q24 with prostate cancer susceptibility. *Cancer Sci* . 2011 Jan ;102:245–52.
90. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 2005 ;5:6–13.
91. Sud A, Kinnersley B, Houlston RS. Genome-wide association studies of cancer: current insights and future perspectives. *Nat Rev Cancer* 2017 ;17:692–704.
92. Cancer Today . Available from: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table/> (pristupljeno 6.studenoga 2024)
93. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013;63:234–41.
94. Teoh JYC, Huang J, Ko WYK, Lok V, Choi P, Ng CF, et al. Global trends of bladder cancer incidence and mortality, and their associations with tobacco use and gross domestic product per capita. *Eur Urol* 2020;78:893–906.
95. Compérat E, Larré S, Roupret M, Neuzillet Y, Pignot G, Quintens H, et al. Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old. *Virchows Arch* 2015; 466:589–94.
96. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 2011 ;306:737–45.
97. Kayyal-Tarabeia I, Blank M, Zick A, Agay-Shay K. Residence near industrial complex and cancer incidence: A registry-based cohort of 1,022,637 participants with a follow-up of 21 years, Israel. *Environ Res* 2023 ;216:114471.

98. van Osch FHM, Jochems SHJ, Schooten FJ van, Bryan RT, Zeegers MP. Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies. *Int J Epidemiol* 2016 ;45:857–70.
99. Bjurlin MA, Matulewicz RS, Roberts TR, Dearing BA, Schatz D, Sherman S, et al. Carcinogen biomarkers in the urine of electronic cigarette users and implications for the development of bladder cancer: A systematic review. *Eur Urol Oncol* 2021 ;4:766–83.
100. Lenfant L, Cancel-Tassin G, Gazut S, Compérat E, Roupr  t M, Cussenot O. Genetic variability in 13q33 and 9q34 is linked to aggressiveness patterns and a higher risk of progression of non-muscle-invasive bladder cancer at the time of diagnosis. *BJU Int* 2021;127:375–83.
101. Buckland G, Ros MM, Roswall N, Bueno-De-Mesquita HB, Travier N, Tjonneland A, et al. Adherence to the Mediterranean diet and risk of bladder cancer in the EPIC cohort study. *Int J Cancer* 2014; 134:2504–11.
102. Rossi M, Strikoudi P, Spei ME, Parpinel M, Serraino D, Montella M, et al. Flavonoids and bladder cancer risk. *Cancer Causes Control* 2019;30:527-35.
103. Minami T, Fujita K, Hashimoto M, Nishimoto M, Adomi S, Banno E, et al. External beam radiotherapy combination is a risk factor for bladder cancer in patients with prostate cancer treated with brachytherapy. *World J Urol* 2023;41:1317–21.
104. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 2016; 70:93–105.
105. Otto W, Breyer J, Herdegen S, Eder F, Bertz S, May M, et al. WHO 1973 grade 3 and infiltrative growth pattern proved, aberrant E-cadherin expression tends to be of predictive value for progression in a series of stage T1 high-grade bladder cancer after organ-sparing approach. *Int Urol Nephrol* 2017; 49:431–7.
106. Van Rhijn BWG, Van Der Kwast TH, Alkhateeb SS, Fleshner NE, Van Leenders GJLH, Bostrom PJ, et al. A new and highly prognostic system to discern T1 bladder cancer substage. *Eur Urol* 2012; 61:378–84.
107. Compérat E, Amin MB, Berney DM, Cree I, Menon S, Moch H, et al. What’s new in WHO fifth edition - urinary tract. *Histopathology* 2022;81:439-446.
108. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. WHO Classification of Tumours of the urinary system and male genital organs, 4th ed. Lyon: IARC press, 2005: 177–9.
109. Soukup V,   apoun O, Cohen D, Hernández V, Babjuk M, Burger M, et al. 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. *Eur Urol* 2017;72:801–13.

110. Van Rhijn BWG, Henschel AE, Bründl J, Compérat EM, Hernández V, Čapoun O, et al. Prognostic value of the WHO1973 and WHO2004/2016 classification systems for grade in primary Ta/T1 non-muscle-invasive bladder cancer: a multicenter european association of urology non-muscle-invasive bladder cancer guidelines panel study. *Eur Urol Oncol* 2021;4:182–91.
111. Andersson M, Berger M, Zieger K, Malmström PU, Bläckberg M. The diagnostic challenge of suspicious or positive malignant urine cytology findings when cystoscopy findings are normal: an outpatient blue-light flexible cystoscopy may solve the problem. *Scand J Urol* 2021;55:263–7.
112. Lamm D, Herr H, Jakse G, Kuroda M, Mostofi FK, Okajima E, et al. Updated concepts and treatment of carcinoma in situ. *Urol Oncol* 1998; 4:130–8.
113. Veskimäe E, Espinos EL, Bruins HM, Yuan Y, Sylvester R, Kamat AM, et al. What Is the prognostic and clinical importance of urothelial and nonurothelial histological variants of bladder cancer in predicting oncological outcomes in patients with muscle-invasive and metastatic bladder cancer? A European association of urology muscle invasive and metastatic bladder cancer guidelines panel systematic review. *Eur Urol Oncol* 2019; 2:625–42.
114. Jimenez RE, Gheiler E, Oskanian P, Tiguert R, Sakr W, Wood DP, et al. Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progression-free survival. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:980–7.
115. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., UICC. TNM classification of malignant tumours, 8th ed. Wiley Blackwell 2016:204.
116. Varma M, Srigley JR, Brimo F, Compérat E, Delahunt B, Koch M, et al. Dataset for the reporting of urinary tract carcinoma—biopsy and transurethral resection specimen: recommendations from the international collaboration on cancer reporting (ICCR). *Modern Pathology* 2020; 33:700–12.
117. Kim HS, Kim M, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Presence of lymphovascular invasion in urothelial bladder cancer specimens after transurethral resections correlates with risk of upstaging and survival: a systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol* 2014; 32:1191–9.
118. Tan WS, Sarpong R, Khetrapal P, Rodney S, Mostafid H, Cresswell J, et al. Can renal and bladder ultrasound replace computerized tomography urogram in patients investigated for microscopic hematuria? *J Urol* 2018 ;200:973–80.
119. Del Giudice F, Pecoraro M, Vargas HA, Cipollari S, De Berardinis E, Bicchetti M, et al. Systematic review and meta-analysis of vesical imaging-reporting and data system (VI-RADS) inter-observer reliability: an added value for muscle invasive bladder cancer detection. *Cancers (Basel)* 2020; 12:1–17.
120. Spiessl B, Beahrs OH, Hermanek P, Hutter RVP, Scheibe O, Sobin LH, et al. Urological Tumours. TNM Atlas, 3rd ed. Heidelberg: Springer Verlag, 1989;220–71.

121. Trinh TW, Glazer DI, Sadow CA, Sahni VA, Geller NL, Silverman SG. Bladder cancer diagnosis with CT urography: test characteristics and reasons for false-positive and false-negative results. *Abdom Radiol (NY)* 2018;43:663–71.
122. Nolte-Ernsting C, Cowan N. Understanding multislice CT urography techniques: Many roads lead to Rome. *Eur Radiol* 2006 ;16:2670–86.
123. Kim B, Semelka RC, Ascher SM, Chalpin DB, Carroll PR, Hricak H. Bladder tumor staging: comparison of contrast-enhanced CT, T1- and T2-weighted MR imaging, dynamic gadolinium-enhanced imaging, and late gadolinium-enhanced imaging. *Radiology* 1994 ;193:239–45.
124. Barentsz JO, Engelbrecht MRW, Witjes JAM, De La Rosette JJMCH, Van Der Graaf M. MR imaging of the male pelvis. *Eur Radiol* 1999;9:1722–36.
125. Palou J, Rodríguez-Rubio F, Huguet J, Segarra J, Ribal MJ, Alcaraz A, et al. Multivariate analysis of clinical parameters of synchronous primary superficial bladder cancer and upper urinary tract tumor. *J Urol* 2005;174:859–61.
126. Millán-Rodríguez F CTGSBJHPJVRJ. Upper urinary tract tumors after primary superficial bladder tumors: prognostic factors and risk groups. *J Urol* 2000;164:1183-7.
127. Girvin F, Ko JP. Pulmonary nodules: detection, assessment, and CAD. *AJR Am J Roentgenol* 2008;191:1057–69.
128. Heidenreich A, Albers P, Classen J, Graefen M, Gschwend J, Kotzerke J, et al. Imaging studies in metastatic urogenital cancer patients undergoing systemic therapy: recommendations of a multidisciplinary consensus meeting of the Association of urological oncology of the German cancer society. *Urol Int* 2010 Jul;85:1–10.
129. Panebianco V, Narumi Y, Altun E, Bochner BH, Efstathiou JA, Hafeez S, et al. Multiparametric Magnetic Resonance Imaging for Bladder Cancer: Development of VI-RADS (Vesical Imaging-Reporting And Data System). *Eur Urol* 2018; 74: 294–306.
130. Huang L, Kong Q, Liu Z, Wang J, Kang Z, Zhu Y. The diagnostic value of MR imaging in differentiating T staging of bladder cancer: a meta-analysis. *Radiology* 2018 ;286:502–11.
131. Panebianco V, Briganti A, Boellaard TN, Catto J, Comperat E, Efstathiou J, et al. Clinical application of bladder MRI and the vesical imaging-reporting and data system. *Nat Rev Urol* 2024 ;21:243–51.
132. Compérat EM, Burger M, Gontero P, Mostafid AH, Palou J, Rouprêt M, et al. Grading of urothelial carcinoma and the new “World Health Organisation classification of tumours of the urinary system and male genital organs 2016.” *Eur Urol Focus* 2019 ;5:457–66.
133. Soria F, Droller MJ, Lotan Y, Gontero P, D’Andrea D, Gust KM, et al. An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *World J Urol* 2018 ;36:1981–95.

134. Wojcik EM, Kurtycz DFI, Rosenthal DL. The Paris system for reporting urinary cytology, 2nd ed. Springer International Publishing, 2022:1–329.
135. Moulavasilis N, Stravodimos K, Meletis E, Levis P, Leftheriotis V, Lazaris A, et al. The Paris system classification for urinary cytology in patients under bacillus Calmette-Guerin treatment. *Diagn Cytopathol* 2022 Jun 1; 50:289–94.
136. Suarez-Ibarrola R, Soria F, Abufaraj M, D’Andrea D, Preto M, Gust KM, et al. Surgical checklist impact on recurrence-free survival of patients with non-muscle-invasive bladder cancer undergoing transurethral resection of bladder tumour. *BJU Int* 2019;123:646–50.
137. Mariappan P, Lavin V, Phua CQ, Khan SAA, Donat R, Smith G. Predicting grade and stage at cystoscopy in newly presenting bladder cancers-a: prospective double-blind clinical study. *Urology* 2017 ;109:134–9.
138. Burger M, Grossman HB, Droller M, Schmidbauer J, Hermann G, Drăgoescu O, et al. Photodynamic diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer with hexaminolevulinate cystoscopy: a meta-analysis of detection and recurrence based on raw data. *Eur Urol* 2013 ;64:846–54.
139. Weiner AB, Desai AS, Meeks JJ. Tumor location may predict adverse pathology and survival following definitive treatment for bladder cancer: a national cohort study. *Eur Urol Oncol* 2019 ;2(3):304–10.
140. Varinot J, Camparo P, Roupret M, Bitker MO, Capron F, Cussenot O, et al. Full analysis of the prostatic urethra at the time of radical cystoprostatectomy for bladder cancer: impact on final disease stage. *Virchows Arch* 2009 ;455:449–53.
141. von Rundstedt FC, Mata DA, Shen S, Li Y, Godoy G, Lerner SP. Transurethral biopsy of the prostatic urethra is associated with final apical margin status at radical cystoprostatectomy. *J Clin Urol* 2016 ;9:404–8.
142. Teoh JYC, MacLennan S, Chan VWS, Miki J, Lee HY, Chiong E, et al. An international collaborative consensus statement on en bloc resection of bladder tumour incorporating two systematic reviews, a two-round delphi survey, and a consensus meeting. *Eur Urol* 2020 ;78:546–69.
143. Richterstetter M, Wullich B, Amann K, Haeberle L, Engehausen DG, Goebell PJ, et al. The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer. *BJU Int* 2012 ;110: 76-9
144. Chai YM, Cui YS, Zhang XY, Zong HT, Zhou ZB, Zhang Y. Systematic review the efficacy and safety of thulium laser resection of bladder tumor versus standard transurethral resection in patients with non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Mens Health* 2021 ;17:32–42.
145. Yanagisawa T, Mori K, Motlagh RS, Kawada T, Mostafaei H, Quhal F, et al. En bloc resection for bladder tumors: an updated systematic review and meta-analysis of its differential effect on safety, recurrence and histopathology. *J Urol* 2022 ;207:754–68.

146. Gallioli A, Diana P, Fontana M, Territo A, Rodriguez-Faba Ó, Gaya JM, et al. En bloc versus conventional transurethral resection of bladder tumors: A single-center prospective randomized noninferiority trial. *Eur Urol Oncol* 2022 ;5:440–8.
147. D’Andrea D, Soria F, Hurle R, Enikeev D, Kotov S, Régnier S, et al. En bloc versus conventional resection of primary bladder tumor (eBLOC): a prospective, multicenter, open-label, phase 3 randomized controlled trial. *Eur Urol Oncol* 2023 ;6:508–15.
148. Teoh JYC, Mayor N, Li KM, Lo KL, Ng CF, Mostafid H. En-bloc resection of bladder tumour as primary treatment for patients with non-muscle-invasive bladder cancer: routine implementation in a multi-centre setting. *World J Urol* 2021; 39:3353–8.
149. Mariappan P, Zachou A, Grigor KM. Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker of resection quality, predicts risk of early recurrence, and is dependent on operator experience. *Eur Urol* 2010 ;57:843–9.
150. Neumann E, Mayer J, Russo GI, Amend B, Rausch S, Deininger S, et al. Transurethral resection of bladder tumors: next-generation virtual reality training for surgeons. *Eur Urol Focus* 2019 ;5:906–11.
151. Bebane S, Denize J, Goujon A, Meria P, Verine J, Mongiat-Artus P, et al. Perioperative outcomes of transurethral resection for T1 bladder tumors: quality evaluation based on patient, tumor and surgeon criteria. *World J Urol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2024 May 31];39(11):4159–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34160681/>
152. Janke G, Rosell J, Jahnson S. Impact of surgical experience on recurrence and progression after transurethral resection of bladder tumour in non-muscle-invasive bladder cancer. *Scand J Urol* [Internet]. 2014 [cited 2024 May 31];48(3):276–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24286506/>
153. Wettstein MS, Pham S, Qadri SR, Li K, Fankhauser CD, Kranzbühler B, et al. Association between surgical case volume and survival in T1 bladder cancer: A need for centralization of care? *Canadian Urological Association Journal* 2020 ;14:394.
154. Xie K, Cao D, Wei Q, Ren Z, Li J, Li Y, et al. Bipolar versus monopolar transurethral resection of non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Urol* 2021;39:1177–86.
155. Mao X, Zhou Z, Cui Y, Zhang Y, Yang M. Outcomes and complications of bipolar vs. monopolar energy for transurethral resection of bladder tumors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Surg* 2021 Jun 2 ;8:e 583806.
156. Picozzi SCM, Ricci C, Gaeta M, Casellato S, Bozzini G, Ratti D, et al. Is it oncologically safe performing simultaneous transurethral resection of the bladder and prostate? A meta-analysis on 1,234 patients. *Int Urol Nephrol* 2012 ;44:1325–33.

157. Laukhtina E, Moschini M, Krajewski W, Teoh JYC, Ploussard G, Soria F, et al. Oncological and safety profiles in patients undergoing simultaneous transurethral resection (TUR) of bladder tumour and TUR of the prostate. *BJU Int* 2023;131:571–80.
158. Van der Meijden A, Oosterlinck W, Brausi M, Kurth KH, Sylvester R, de Balincourt C. Significance of bladder biopsies in Ta,T1 bladder tumors: a report from the EORTC genito-urinary tract cancer cooperative group. EORTC-GU group superficial bladder committee. *Eur Urol* 1999;35:267–71.
159. Hara T, Takahashi M, Gondo T, Nagao K, Ohmi C, Sakano S, et al. Risk of concomitant carcinoma in situ determining biopsy candidates among primary non-muscle-invasive bladder cancer patients: retrospective analysis of 173 Japanese cases. *Int J Urol* 2009 ;16:293–8.
160. Palou J, Sylvester RJ, Faba OR, Parada R, Peña JA, Algaba F, et al. Female gender and carcinoma in situ in the prostatic urethra are prognostic factors for recurrence, progression, and disease-specific mortality in T1G3 bladder cancer patients treated with bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol* 2012 ;62:118–25.
161. Mungan MU, Canda AE, Tuzel E, Yorukoglu K, Kirkali Z. Risk factors for mucosal prostatic urethral involvement in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2005 ;48:760–3.
162. Kausch I, Sommerauer M, Montorsi F, Stenzl A, Jacqmin D, Jichlinski P, et al. Photodynamic diagnosis in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and cumulative analysis of prospective studies. *Eur Urol* 2010 ;57:595–606.
163. Mowatt G, N'Dow J, Vale L, Nabi G, Boachie C, Cook JA, et al. Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care* 2011 Jan ;27:3–10.
164. Draga ROP, Grimbergen MCM, Kok ET, Jonges TN, van Swol CFP, Bosch JLHR. Photodynamic diagnosis (5-aminolevulinic acid) of transitional cell carcinoma after bacillus Calmette-Guérin immunotherapy and mitomycin C intravesical therapy. *Eur Urol* 2010 ;57:655–60.
165. Chou R, Selph S, Buckley DI, Fu R, Griffin JC, Grusing S, et al. Comparative effectiveness of fluorescent versus white light cystoscopy for initial diagnosis or surveillance of bladder cancer on clinical outcomes: systematic review and meta-analysis. *J Urol* 2017 ;197:548–58.
166. Maisch P, Koziarz A, Vajgrt J, Narayan V, Kim MH, Dahm P. Blue vs white light for transurethral resection of non-muscle-invasive bladder cancer: an abridged Cochrane Review. *BJU Int* 2022 ;130:730–40.
167. Heer R, Lewis R, Vadiveloo T, Yu G, Mariappan P, Cresswell J, et al. A randomized trial of PHOTodynamic surgery in non-muscle-invasive bladder cancer. *NEJM Evidence* 2022 ;1:10.
168. Zheng C, Lv Y, Zhong Q, Wang R, Jiang Q. Narrow band imaging diagnosis of bladder cancer: systematic review and meta-analysis. *BJU Int* ; 110:680-7.

169. Naito S, Algaba F, Babjuk M, Bryan RT, Sun YH, Valiquette L, et al. The clinical research office of the endourological society (CROES) multicentre randomised trial of narrow band imaging-assisted transurethral resection of bladder tumour (TURBT) versus conventional white light imaging-assisted TURBT in orimary non-muscle-invasive bladder cancer patients: trial Protocol and 1-year results. *Eur Urol* 2016 ;70:506–15.
170. Russo GI, Sholklapper TN, Cocci A, Broggi G, Caltabiano R, Smith AB, et al. Performance of narrow band imaging (NBI) and photodynamic diagnosis (PDD) fluorescence imaging compared to white light cystoscopy (WLC) in detecting non-muscle invasive bladder cancer: a systematic review and lesion-level diagnostic meta-analysis. *Cancers* 2021;13:4378.
171. Sari Motlagh R, Mori K, Laukhtina E, Aydh A, Katayama S, Grossmann NC, et al. Impact of enhanced optical techniques at time of transurethral resection of bladder tumour, with or without single immediate intravesical chemotherapy, on recurrence rate of non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and network meta-analysis of randomized trials. *BJU Int* 2021 ;128:280–9.
172. de la Rosette J, Martov A, Hurle R, Favre G, Mamoulakis C, Castanheira de Oliveira M, et al. Conventional white light imaging-assisted transurethral resection of bladder tumour (TURBT) versus IMAGE1S-assisted TURBT in non-muscle-invasive bladder cancer patients: trial protocol and 18 months results. *World J Urol* 2022 ;40:727–38.
173. Brausi M, Collette L, Kurth K, Van Der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, et al. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: A combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol* 2002 ;41:523–31.
174. Cumberbatch MGK, Foerster B, Catto JWF, Kamat AM, Kassouf W, Jubber I, et al. Repeat Transurethral Resection in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol* 2018 ;73:925–33.
175. Naselli A, Hurle R, Paparella S, Buffi NM, Lughezzani G, Lista G, et al. Role of restaging transurethral resection for T1 non-muscle invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol Focus* 2018 ;4:558–67.
176. Grimm MO, Steinhoff C, Simon X, Spiegelhalder P, Ackermann R, Vögeli TA. Effect of routine repeat transurethral resection for superficial bladder cancer: a long-term observational study. *J Urol* 2003 ;170:433–7.
177. Hashine K, Ide T, Nakashima T, Hosokawa T, Ninomiya I, Teramoto N. Results of second transurethral resection for high-grade T1 bladder cancer. *Urol Ann* 2016 ;8:10–5.
178. Gontero P, Sylvester R, Pisano F, Joniau S, Oderda M, Serretta V, et al. The impact of re-transurethral resection on clinical outcomes in a large multicentre cohort of patients with T1 high-grade/Grade 3 bladder cancer treated with bacille Calmette-Guérin. *BJU Int* 2016;118:44–52.

179. Hensley PJ, Bree KK, Brooks N, Matulay J, Li R, Nogueras-Gonzalez GM, et al. Implications of guideline-based, risk-stratified restaging transurethral resection of high-grade Ta urothelial carcinoma on bacillus Calmette-Guérin therapy outcomes. *Eur Urol Oncol* 2022 Jun 1;5:347–56.
180. Baltaci S, Bozlu M, Yildirim A, Gökçe MI, Tinay I, Aslan G, et al. Significance of the interval between first and second transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer treated with maintenance intravesical Bacillus Calmette-Guérin. *BJU Int* 2015 ;116:721–6.
181. Paner GP, Montironi R, Amin MB. Challenges in pathologic staging of bladder cancer: proposals for fresh approaches of assessing pathologic stage in light of recent studies and observations pertaining to bladder histoanatomic variances. *Adv Anat Pathol* 2017;24:113–27.
182. Urinary tract carcinomas - biopsy and transurethral resection specimen - ICCR. Preuzeto s: <https://www.iccr-cancer.org/datasets/published-datasets/urinary-male-genital/ut-biopsy-and-tr/> (Pristupljeno 26. svibnja 2024.)
183. Mostafid H, Kamat AM, Daneshmand S, Palou J, Taylor JA, McKiernan J, et al. Best practices to optimise quality and outcomes of transurethral resection of bladder tumours. *Eur Urol Oncol* 2021;4:12–9.
184. Lammers RJM, Hendriks JCM, Rodriguez Faba ORF, Witjes WPJ, Palou J, Witjes JA. Prediction model for recurrence probabilities after intravesical chemotherapy in patients with intermediate-risk non-muscle-invasive bladder cancer, including external validation. *World J Urol* 2016; 34:173–80.
185. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Gonzalez M, et al. Predicting nonmuscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guerin: the CUETO scoring model. *J Urol* 2009 ;182:2195–203.
186. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Ojea A, et al. The EORTC tables overestimate the risk of recurrence and progression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guérin: external validation of the EORTC risk tables. *Eur Urol* 2011 ;60:423–30.
187. Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, Gontero P, Brausi MA, Van Andel G, et al. EORTC nomograms and risk groups for predicting recurrence, progression, and disease-specific and overall survival in non-muscle-invasive stage Ta-T1 urothelial bladder cancer patients treated with 1-3 years of maintenance bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol* 2016 ;69:60–9.
188. Sylvester RJ, Rodríguez O, Hernández V, Turturica D, Bauerová L, Bruins HM, et al. European Association of Urology (EAU) Prognostic factor risk groups for non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) incorporating the WHO 2004/2016 and WHO 1973 classification systems for grade: an update from the EAU NMIBC guidelines panel. *Eur Urol* 2021 ;79:480–8.

189. Gontero P, Sylvester R, Pisano F, Joniau S, Vander Eeckt K, Serretta V, et al. Prognostic factors and risk groups in T1G3 non-muscle-invasive bladder cancer patients initially treated with Bacillus Calmette-Guérin: results of a retrospective multicenter study of 2451 patients. *Eur Urol* 2015 Jan 1 ;67:74–82.
190. Dalbagni G, Vora K, Kaag M, Cronin A, Bochner B, Donat SM, et al. Clinical outcome in a contemporary series of restaged patients with clinical T1 bladder cancer. *Eur Urol* 2009 ;56:903–10.
191. Palou J, Rodríguez-Rubio F, Millán F, Algaba F, Rodríguez-Faba O, Huguet J, et al. Recurrence at three months and high-grade recurrence as prognostic factor of progression in multivariate analysis of T1G2 bladder tumors. *Urology* 2009 ;73:1313–7.
192. Van Rhijn BWG, Zuiverloon TCM, Vis AN, Radvanyi F, Van Leenders GJLH, Ooms BCM, et al. Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2010 ;58:433–41.
193. Alkhateeb SS, Neill M, Bar-Moshe S, Rhijn B Van, Kakiashvili DM, Fleshner N, et al. Long-term prognostic value of the combination of EORTC risk group calculator and molecular markers in non-muscle-invasive bladder cancer patients treated with intravesical Bacille Calmette-Guérin. *Urol Ann* 2011 ;3:119–26.
194. van Gils-Gielen RJM, Debruyne FMJ, Witjes WPJ, Witjes JA, Caris CTM, Oosterhof GON. Risk factors in carcinoma in situ of the urinary bladder. Dutch South East Cooperative Urological Group. *Urology* 1995 ;45:581–6.
195. Solsona E, Iborra I, Dumont R, Rubio-Briones J, Casanova J, Almenar S. The 3-month clinical response to intravesical therapy as a predictive factor for progression in patients with high risk superficial bladder cancer. *J Urol* 2000;164:685–9.
196. Babjuk M, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, Dominguez Escrig JL, et al. European Association of Urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1, and carcinoma in situ). *Eur Urol* 2022 ;81:75–94.
197. Soria F, Rosazza M, Livoti S, Moschini M, De Angelis M, Giudice F Del, et al. Clinical validation of the intermediate-risk non-muscle-invasive bladder cancer scoring system and substratification model proposed by the International bladder cancer group: a multicenter young academic urologists urothelial working group collaboration. *Eur Urol Oncol* 2024 ;7:1497-503.
198. Chesnut GT RRLSW. Urinary Diversions and Neobladders. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.
199. Almassi N, Bochner BH. Ileal conduit or orthotopic neobladder: selection and contemporary patterns of use. *Curr Opin Urol* 2020;30:415–20.
200. Hwang EC, Sathianathen NJ, Imamura M, Kuntz GM, Risk MC, Dahm P. Extended versus standard lymph node dissection for urothelial carcinoma of the bladder in patients undergoing radical cystectomy. *Cochrane Database Syst Rev* 2019 ;5:CD013336 .

201. Moschini M, Arbelaez E, Cornelius J, Mattei A, Shariat SF, Dell'Oglio P, et al. Pattern of node metastases in patients treated with radical cystectomy and extended or superextended pelvic lymph node dissection due to bladder cancer. *Urol Oncol* 2018 ;36: 307.
202. Crawford JM. The origins of bladder cancer. *Lab Invest* 2008 ;88:686–93.
203. Briganti A, Gandaglia G, Scuderi S, Gallina A, Colombo R, Fossati N, et al. Surgical safety of radical cystectomy and pelvic lymph node dissection following neoadjuvant pembrolizumab in patients with bladder cancer: prospective assessment of perioperative outcomes from the PURE-01 trial. *Eur Urol* 2020;77:576–80.
204. Pietzak EJ, Donahue TF, Bochner BH. Male neobladder. *Urol Clin North Am* 2018 ;45:37–48.
205. Almassi N, Cha EK, Vertosick EA, Huang C, Wong N, Dason S, et al. Trends in management and outcomes among patients with urothelial carcinoma undergoing radical cystectomy from 1995 to 2015: the memorial sloan kettering experience. *J Urol* 2020 ;204:677–83.
206. Daneshmand S, Bartsch G. Improving selection of appropriate urinary diversion following radical cystectomy for bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011;11:941–8.
207. Pearce SM, Daneshmand S. Continent cutaneous diversion. *Urologic Clinics of North America*. 2018 ;45:55–65.
208. Gupta A, Atoria CL, Ehdaie B, Shariat SF, Rabbani F, Herr HW, et al. Risk of fracture after radical cystectomy and urinary diversion for bladder cancer. *J Clin Oncol* 2014 ;32:3291–8.
209. Nagele U, Anastasiadis AG, Stenzl A, Kuczyk M. Radical cystectomy with orthotopic neobladder for invasive bladder cancer: a critical analysis of long-term oncological, functional, and quality of life results. *World J Urol* 2012 ;30:725–32.
210. Zlatev D V., Skinner EC. Orthotopic Urinary Diversion for Women. *Urol Clin North Am* 2018 ;45:49–54.
211. Lockhart JL, Davies R, Persky L, Figueroa TE, Ramirez G. Acid-base changes following urinary tract reconstruction for continent diversion and orthotopic bladder replacement. *J Urol* 1994 ;152:338–42.
212. Chang SS, Alberts GL, Smith JA, Cookson MS. Ileal conduit urinary diversion in patients with previous history of abdominal/pelvic irradiation. *World J Urol* 2004 ;22:272–6.
213. Seong Lee Y, Bum Jung H, Kyoung Choi D, Tae Cho S, Kyung Kim K, Goo Lee Y. Functional assessment of the hautmann ileal neobladder with chimney modification using uroflowmetry and a questionnaire. *Biomed Res Int* 2016:2016:8209589
214. Lamb BW, Tan WS, Eneje P, Bruce D, Jones A, Ahmad I, et al. Benefits of robotic cystectomy with intracorporeal diversion for patients with low cardiorespiratory fitness: A prospective cohort study. *Urol Oncol* 2016;34:417

215. Nazmy M, Yuh B, Kawachi M, Lau CS, Linehan J, Ruel NH, et al. Early and late complications of robot-assisted radical cystectomy: a standardized analysis by urinary diversion type. *J Urol* 2014 ;191:681–7.
216. Lawrentschuk N, Colombo R, Hakenberg OW, Lerner SP, Månsson W, Sagalowsky A, et al. Prevention and management of complications following radical cystectomy for bladder cancer. *Eur Urol* . 2010 ;57:983–1001.
217. Schomburg J, Krishna S, Soubra A, Cotter K, Fan Y, Brown G, et al. Extended outpatient chemoprophylaxis reduces venous thromboembolism after radical cystectomy. *Urol Oncol* 2018 ;36:77.
218. Desai MM, Simone G, de Castro Abreu AL, Chopra S, Ferriero M, Guaglianone S, et al. Robotic Intracorporeal Continent Cutaneous Diversion. *J Urol* 2017 ;198:436–44.
219. Bricker EM. Bladder substitution after pelvic evisceration. 1950. *J Urol* 2002 ;167:1140-5
220. Lee DJ, Tyson MD, Chang SS. Conduit urinary diversion. *Urol Clin North Am* 2018 ;45:25–36.
221. Reddy M, Kader K. Follow-up Management of Cystectomy Patients. *Urol Clin North Am* 2018;45:241–7.
222. Roth JD, Koch MO. Metabolic and nutritional consequences of urinary diversion using intestinal segments to reconstruct the urinary tract. *Urol Clin North Am* 2018 ;45:19–24.
223. Check DK, Leo MC, Banegas MP, Bulkley JE, Danforth KN, Gilbert SM, et al. Decision regret related to urinary diversion choice among patients treated with cystectomy. *J Urol* 2020 ;203:159–63.
224. Udovicich C, Perera M, Huq M, Wong LM, Lenaghan D. Hospital volume and perioperative outcomes for radical cystectomy: a population study. *BJU Int* 2017 ;119 :26–32.
225. Cerantola Y, Valerio M, Persson B, Jichlinski P, Ljungqvist O, Hubner M, et al. Guidelines for perioperative care after radical cystectomy for bladder cancer: Enhanced recovery after surgery (ERAS®) society recommendations. *Clin Nutr* 2013;32:879–87.
226. Home - SNP - NCBI [Internet]. [cited 2025 Apr 13]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
227. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* 2001 ;19:666–75.
228. Brierley J, Gospodarowicz MD, Wittekind CT. TNM Classification of malignant tumors international union against cancer, 8th ed. Oxford, England: Wiley, 2017:57-62.
229. Jukić I, Bingulac-Popović J, Samardžija M, Lampalo M, Hećimović A, Đogić M et al. Raspodjela glavnih alela sustava ABO krvnih grupa u hrvatskoj populaciji. *Acta Med Croatica*. 2017;71:235–40.

230. Aird I, Bentall HH, Roberts JAF. A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups. *Br Med J* 1953;1:799–801.
231. Amundadottir L, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, Fuchs CS, Petersen GM, Arslan AA, et al. Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet* 2009 ;41:986–90.
232. Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem* 2011 ;113:236–47.
233. Cartron JP, Colin Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin Biol* 2001;8:163–99.
234. Orlow I, Lacombe L, Pellicer I, Rabbani F, Delgado R, Zhang ZF, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the histoblood group ABO(H) in primary bladder tumors. *Int J Cancer* 1998 ;75:819–24.
235. Joh HK, Cho E, Choueiri TK. ABO blood group and risk of renal cell cancer. *Cancer Epidemiol* 2012 Dec ;36:528–32.
236. Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, Chanock SJ, Kraft P, Hunter DJ, et al. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:424–31.
237. Srinivas V, Khan SA, Hoisington S, Varma A, Gonder MJ. Relationship of blood groups and bladder cancer. *J Urol* 1986 ;135:50–2.
238. Huang JY, Wang R, Gao YT, Yuan JM. ABO blood type and the risk of cancer - Findings from the Shanghai Cohort Study. *PloS One* 2017;12: e0184295.
239. Orihuela E, Shahon RS. Influence of blood group type on the natural history of superficial bladder cancer. *J Urol* 1987 ;138:758–9.
240. D'andrea D, Moschini M, Soria F, Gust KM, Briganti A, Karakiewicz PI, et al. ABO blood group and rhesus factor are not associated with outcomes after radical cystectomy for non-metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Anticancer Res.* 2017 ;37:5747–53.
241. Zhang BL, He N, Huang YB, Song FJ, Chen KX. ABO blood groups and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:4643-50.
242. Koirala P, Sherpa C, Dangol R, Hona S, Nepal S, Dawadi P. ABO blood type and cancer susceptibility: Unraveling the complex relationship. *Microbes & Immunity.* 2025;2:45-58.
243. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet* 2009 ;126:729–42.
244. Devilee P, Rookus MA. A tiny step closer to personalized risk prediction for breast cancer. *N Engl J Med* 2010 ;362:1043–5.
245. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015;526:525–30.

- 246. Deng N, Zhou H, Fan H, Yuan Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget* 2017;8:110635–49.
- 247. Brody T. Biomarkers. *Clinical Trials*, 2nd ed. Academic press, 2016;377–419.
- 248. Xiong J, Yang L, Deng YQ, Yan SY, Gu JM, Li BH, et al. The causal association between smoking, alcohol consumption and risk of bladder cancer: A univariable and multivariable Mendelian randomization study. *Int J Cancer* . 2022 ;151:2136–43.
- 249. Golka K, Selinski S, Lehmann ML, Blaszkewicz M, Marchan R, Ickstadt K, et al. Genetic variants in urinary bladder cancer: collective power of the “wimp SNPs.” *Arch Toxicol* 2011;85:539–54.
- 250. Barnes DR, Rookus MA, McGuffog L, Leslie G, Mooij TM, Dennis J, et al. Polygenic risk scores and breast and epithelial ovarian cancer risks for carriers of BRCA1 and BRCA2 pathogenic variants. *Genet Med* 2020 ;22:1653–66.

8. PRILOZI

8.1. Kvalificirajući rad 1

ARTICLE PUBLISHED ONLINE: 2024-07-22



Original Article 233

ABO Blood Type and Urinary Bladder Cancer: Phenotype, Genotype, Allelic Association with a Clinical or Histological Stage and Recurrence Rate

Ivan Milas¹ Željko Kaštelan^{1,2} József Petrik³ Jasna Bingulac-Popović⁴ Bojan Čikić¹ Andrej Šribar⁵
Irena Jukić^{4,6}

¹ Department of Urology, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia

² Department of Medical Sciences, Croatian Academy of Sciences and Art, Zagreb, Croatia

³ Department of Medical Biochemistry and Hematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

⁴ Medical Department, Croatian Institute of Transfusion Medicine, Zagreb, Croatia

Address for correspondence Ivan Milas, MD, Department of Urology, University Hospital Centre Zagreb, Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb, Croatia (e-mail: ivmilas@gmail.com).

⁵ Clinical Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Dubrava University Hospital, Zagreb, Croatia

⁶ Faculty of Medicine, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia

Glob Med Genet 2024;11:233–240.

Abstract

Background Previous research on connection between the ABO blood group and bladder cancer has been based on determining the ABO phenotype. This specific research is extended to the molecular level, providing more information about particular ABO alleles.

Aim To investigate the impact of the ABO blood group genotype or phenotype as a risk factor for urinary bladder cancer.

Materials and Methods In the case–control study, we included 74 patients who underwent surgery for a urinary bladder tumor at the Urology Clinic, Clinical Hospital Centre Zagreb, in 2021 and 2022. The control group comprised 142 asymptomatic and healthy blood donors. ABO genotyping to five basic alleles was done using a polymerase chain reaction with sequence-specific primers. We compared ABO phenotypes, genotypes, and alleles between patients and the healthy controls and investigated their distribution according to the clinical and histological stage and recurrence rate.

Results No statistically significant difference was found among the groups, nor for the observed disease stages in terms of the phenotype and genotype. At the allele level, the results show a significantly lower proportion of malignancy in O1 ($p < 0.001$), A1 ($p < 0.001$), and B ($p = 0.013$), and a lower proportion of metastatic disease in A2 (0%, $p = 0.024$). We also found significantly higher proportions of high-grade tumors in patients with O1 (71.4%, $p < 0.001$), A1 (70.1%, $p = 0.019$), of nonmuscle invasive tumors in patients with O1 (55.1%, $p < 0.001$), O2 (100%, $p = 0.045$), and recurrent tumors in patients with O1 (70.2%, $p < 0.001$) and A1 (74.2%, $p = 0.007$) alleles.

Conclusion We did not find an association between the ABO blood group genotype or phenotype as a genetic risk factor for urinary bladder cancer. However, an analysis at the allelic level revealed a statistically significant association between certain alleles of the ABO blood group system and urinary bladder tumors, clinical or histological stage, and recurrence rate, respectively.

Keywords

- ▶ ABO blood groups
- ▶ urinary bladder cancer
- ▶ ABO phenotype
- ▶ ABO genotype
- ▶ ABO allele
- ▶ case–control study

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0044-1788614>.
ISSN 2699-9404.

© 2024, The Author(s).
This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution License, permitting unrestricted use, distribution, and reproduction so long as the original work is properly cited. (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14, 70469 Stuttgart, Germany

Introduction

Tumors treated in urology as a clinical branch of medicine cover a wide range of mostly malignant diseases within the human urinary and male reproductive systems. Tumors affecting the urinary system can be found in the adrenal gland, kidney, ureter, bladder, and urethra, and in the male reproductive system, such as tumors of the testicles, prostate, and penis. Management of genitourinary malignancy is likely to demand a large portion of the urologist's time and practice, and the challenge for modern urology is not only in understanding the management of commonly seen genitourinary malignancies but also in identifying significant associations that can be risk factors in the development of malignant tumors.¹ Many biomarkers have been studied as assessors of outcomes in the development and treatment of malignant diseases, and one of them is the ABO blood group. Despite a multitude of studies attempting to correlate the ABO phenotype with cancer risk, the link between the expression of histoblood group antigens and tumorigenesis has remained unclear for most evaluated tumor types.²

Bladder cancer (BC) is ranked tenth among the most commonly diagnosed cancers for both genders and appears more often in men.³ Histologically, in 90% of cases, it involves urothelial carcinoma.⁴ The most common symptom that indicates the presence of a bladder tumor is painless macrohematuria. In some cases, they are asymptomatic and are detected when diagnosing other diseases. Several risk factors associated with BC have been identified, and the main risk is active and passive tobacco smoking.⁵ The main diagnostic and therapeutic procedure of BC is cystoscopy and transurethral resection (TUR) or cold punch biopsy of the tumor.⁶ Tumor staging with multislice computed tomography and histopathological evaluation are used to guide treatment and determine a prognosis for BC.⁷ The important clinical approach is to confirm whether it is a superficial (nonmuscle invasive, NMI), muscle-invasive (MI), or metastatic (M) disease. Another important factor in predicting risks of disease progression in NMI tumors is the tumor grade and recurrence rate.⁸ Traditionally, radical cystectomy is recommended in MI tumors without distant metastases, an extensive papillary disease that cannot be controlled with TUR, or in M disease together with systemic chemotherapy as a salvage procedure in preventing blood loss (hematuria).⁹

Thanks to Karl Landsteiner, the ABO blood type system was identified in the early 20th century using serological methods that have remained the standard.¹⁰ As new technologies have refined the ability to identify genome sequences, a single gene on chromosome 9q34 was finally found to define a person's blood group and its nucleotide sequence was elucidated in the year 1990.^{11,12} Today, we know that the gene that determines the blood type encodes a glycosyltransferase with three main allelic forms: A, B, and O.¹³ The A, B, and O glycosyltransferases transfer N-acetylgalactosamine, D-galactose, and no sugar residue, to a protein known as H antigen, which is expressed on the surface of red blood cells and other tissues through the body.¹⁴

Since 1999, the BGMUT (Blood Group antigen gene MUTation) Database has been documenting genes of human blood group systems using single-nucleotide polymorphisms (SNPs).¹⁵ SNP or RS represents a single base substitution present at a specific location of the gene, which we can use to identify a specific gene region. The advantages of using SNPs in genotyping are their abundance in genomes, stability at a low mutation rate, and short fragment amplification.¹⁶ For the purpose of ABO blood group genotyping, the following sequences of SNPs have been identified: rs 507666 as the perfect surrogate for type A1, rs687289 as a marker for the O allele, rs8176746 for the B allele, and rs8176704 for the A2 allele according to BGMUT Database (www.ncbi.nlm.nih.gov). Today, DNA-based genotyping is used as an alternative to the serological antibody-based method to determine a person's blood group, such as in patients with multiple antigens in blood sample, in patients with recent transfusion treatment (masked antigens), and in obstetrics for identifying D phenotype due to use of anti-D immunoglobulin.¹⁷

Aim

The aim of our research is to evaluate the association between the ABO blood group genotype/phenotype and the risk for urinary BC. In addition, we examined the association between the ABO blood group and tumor grade, clinical stage of disease (NMI, MI, M), and incidence of disease recurrence in NMI tumors.

Materials and Methods

Study Participants

The study group comprised 74 patients who underwent surgery for a urinary bladder tumor at the Urology Clinic, University Clinical Hospital Centre Zagreb, in 2021 or 2022. The study received approval from the Ethics Committee of the University Clinical Hospital Center Zagreb number: 02/21 AG from November 2, 2020, and all procedures were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines. Preoperative blood samples were taken from the patients who had given signed consent. Laboratory analysis of the ABO blood group genotype was analyzed by the Department of Molecular Diagnostics at the Croatian Institute of Transfusion Medicine. The control group comprised 142 asymptomatic and healthy (female and male) blood donors without a medical history of tumors. The median age of the participants in the control group was 51 years. All participants in the control group resided in the same geographic region.

A TUR or radical cystectomy was performed in patients with a urinary bladder tumor.^{18,19} Specimens were processed according to standard histopathological procedures and evaluated by experienced uropathologists in a high-volume center. The tumors were histologically graded as high grade (HG) and low grade²⁰ and then divided into three groups: NMI (superficial), MI, and M tumors. The clinical stage of the disease was tagged according to the Tumor Node Metastasis classification system.²¹

ABO Genotyping

Genomic DNA isolation from EDTA blood samples was performed using the commercial QIAmp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). ABO genotyping to given basic ABO alleles (O1, O2, A1, A2, B) and 15 genotypes was done by using the sequence-specific primer (SSP) method (polymerase chain reaction [PCR] with SSPs) in 8 parallel PCR-SSP reactions to amplify exons 6 and 7 of the ABO blood group gene.²²

The presence of a gene fragment of the human growth hormone (as an internal control) in each SSP reaction showed that amplification was successful. The ABO alleles and genotypes were named according to the nomenclature used by Yamamoto.²³

Statistical Analysis

The data are presented in tables. Continuous variables are displayed as either mean or standard deviation for values with a Gaussian distribution or median and interquartile range (IQR) for data that does not follow the normal distribution. The normality of the distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. Categorical variables are displayed as counts and percentages.

Differences in independent continuous variables between the two groups were tested for statistical significance using the Student's *t*-test for independent samples or the Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney *U*) test, depending on the distribution of data.

Differences in categorical variables were tested for statistical significance using the Pearson's χ^2 test.

p-Values < 0.05 were considered statistically significant, and the software package used for statistical analysis was jamovi v2.3.

Results

Healthy Controls

There were 142 healthy controls over 40 years of age, 96 males and 46 females. The median age was 51 years (IQR: 46–57). According to the blood type phenotypes, 52 (36.6%) were blood type O, 62 (43.7%) were type A, 22 (15.5%) were type B, and 6 (4.2%) were type AB. According to the genotypes, 48 (33.8%) were O1A1, 47 (33.1%) were O1O1, 21 (14.8%) were O1B, 6 (4.2%) were A1B, 5 (3.5%) were of O1O2, O1A2, and A1A1 genotype, 2 (1.4%) were O2A1 and A1A2, and 1 patient (0.7%) was of BB genotype (–Table 1).

Bladder Cancer

There were 74 patients with BC in the cohort, of which 62 were males (83.8%), significantly more compared with the healthy controls (83.8 vs. 59.4%, $p < 0.001$). There was incomplete data on four patients, and they were excluded from further analyses. There was no statistically significant difference between the groups regarding the ABO phenotype ($p = 0.948$) or genotype ($p = 0.347$) distribution (–Table 1).

In patients with cancer, there was no significant association between histological grades, invasiveness or the occurrence of relapse and phenotypes, grade ($p = 0.710$), invasiveness ($p = 0.210$), relapse ($p = 0.145$, –Table 2), or genotypes, grade ($p = 0.529$), invasiveness ($p = 0.830$), relapse ($p = 0.747$, –Table 3).

Alleles

While there is a higher incidence of malignant disease in patients with the A2 allele (58.8%) compared with O1 (30.8%), O2 (30%), A1 (31.3%), and B (30.9%), no significant

Table 1 Comparison of ABO phenotypes and genotypes between healthy controls and patients with bladder cancer, χ^2 test, $p = 0.948, 0.347$

ABO phenotype	Bladder cancer, n (%)	Control group, n (%)	ABO genotype	Bladder cancer, n (%)	Control group, n (%)
O			O1O1	24 (34.3)	47 (33.1)
	25 (35.8)	52 (36.6)	O1O2	1 (1.4)	5 (3.5)
			O2O2		
A			A1A1	4 (5.7)	5 (3.5)
			O1A1	19 (27.1)	48 (33.8)
	33 (47.2)	62 (43.7)	O2A1	0	2 (1.4)
			A1A2	2 (2.9)	2 (1.4)
			O1A2	5 (7.1)	5 (3.5)
			O2A2		
			A2A2	2 (2.9)	0
B			BB	0	1 (0.7)
	9 (12.6)	22 (15.5)	O1B	7 (10)	21 (14.8)
			O2B	1 (1.4)	0
AB	3 (4.3)	6 (4.2)	A1B	4 (5.7)	6 (4.2)
			A2B	1 (1.4)	0
Total	70 (99.9)	142 (100.0)		70 (100.0)	142 (100.0)

Table 2 Comparison of ABO phenotypes between histological grades, invasiveness, and occurrence of relapse

Phenotype	Grade		Invasiveness			Relapse	
	HG (%)	LG (%)	M (%)	MI (%)	NMI (%)	No (%)	Yes (%)
O	17 (68)	8 (32)	5 (20)	5 (20)	15 (60)	18 (72)	7 (28)
A	23 (69.7)	10 (30.3)	4 (12.1)	14 (42.4)	15 (45.5)	26 (78.8)	7 (21.2)
B	6 (66.7)	3 (33.3)	2 (22.2)	1 (11.1)	6 (66.7)	4 (44.4)	5 (55.6)
AB	3 (100)	0 (0)	1 (33.3)	2 (66.7)	0 (0)	3 (100)	0 (0)
Total	49 (70)	21 (30)	12 (17.1)	22 (31.4)	36 (51.4)	51 (72.9)	19 (27.1)

Abbreviations: HG, high grade; LG, low grade; M, metastatic; MI, muscle invasive; NMI, nonmuscle invasive.
 Note: χ^2 test, grade $p = 0.710$, invasiveness $p = 0.210$, relapse $p = 0.145$.

Table 3 Comparison of ABO genotypes between histological grades, invasiveness, and occurrence of relapse

Genotype	Grade		Invasiveness			Relapse	
	HG (%)	LG (%)	M (%)	MI (%)	NMI (%)	No (%)	Yes (%)
O1O1	16 (66.7)	8 (31.6)	5 (21.7)	5 (21.7)	13 (56.5)	17 (70.8)	7 (29.2)
O1A1	13 (68.4)	6 (31.6)	3 (15.8)	7 (36.8)	9 (47.4)	15 (78.9)	4 (21.1)
O1A2	4 (80)	1 (20)	0 (0)	3 (60)	2 (40)	4 (80)	1 (20)
O1B	6 (85.7)	1 (14.3)	2 (28.6)	1 (14.3)	4 (57.1)	4 (57.1)	3 (42.9)
A1A1	3 (75)	1 (25)	1 (25)	1 (25)	2 (50)	3 (75)	1 (25)
O1O2	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	0 (0)
A1A2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
A1B	3 (75)	1 (25)	1 (25)	2 (50)	1 (25)	3 (75)	1 (25)
A2B	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
A2A2	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
O2B	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
O1A2	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	0 (0)
Total	49 (70)	21 (30)	12 (17.1)	22 (31.4)	36 (51.4)	51 (72.1)	19 (27.9)

Abbreviations: HG, high grade; LG, low grade; M, metastatic; MI, muscle invasive; NMI, nonmuscle invasive.
 Note: χ^2 test, grade $p = 0.529$, invasiveness $p = 0.830$, relapse $p = 0.747$.

difference was found ($\chi^2 = 5.84$, $p = 0.211$). However, these results are still underpowered ($1 - \beta = 0.72$), and a larger sample is required to confirm the null hypothesis that there is no association between alleles and the incidence of malignant disease.

A test of proportion has shown that a significantly lower proportion of patients with malignancy is present in patients with O1 ($p < 0.001$), A1 ($p < 0.001$), and B ($p = 0.013$). In contrast, no statistical significance was present in patients with O2 ($p = 0.20$) and A2 ($p = 0.468$, **Fig. 1**).

In terms of tumor grade, no significant association was found between tumor grade (high and low) and alleles ($\chi^2 = 0.45$, $p = 0.978$), whereas HG tumors are more frequent in patients with O1 (71.4%, $p < 0.001$) and A1 (70.1%, $p = 0.019$) alleles. No significant difference in tumor grade distribution was found in patients with O2, A2, and B alleles (**Fig. 2**).

No association was found between tumor invasiveness (NMI, MI, M) and ABO alleles ($\chi^2 = 10.29$, $p = 0.245$). NMI tumors were found to be in significantly higher proportion in patients with O1 (55.1%, $p < 0.001$) and O2 (100%, $p = 0.045$)

alleles, whereas M tumors were in a significantly lower proportion in patients with A2 allele (0%, $p = 0.024$). No significant difference in the proportion of tumor invasiveness types was found in patients with A1 and B alleles (**Fig. 3**).

In terms of tumor relapse, a significantly higher proportion of relapse was found in patients with O1 (70.2%, $p < 0.001$) and A1 (74.2%, $p = 0.007$) alleles. No significant difference was found in patients with O2, A2, and B alleles. A statistically significant result using a test of proportions strongly suggests that the proportion of one categorical variable differs significantly from the proportion of another categorical variable. In other words, it indicates that the observed difference in proportions is unlikely to have occurred due to random chance alone.

Discussion

To analyze the potential of blood group as an adequate biomarker in the incidence of BC, distinguishing whether we type blood group immunohistochemically at the antigen

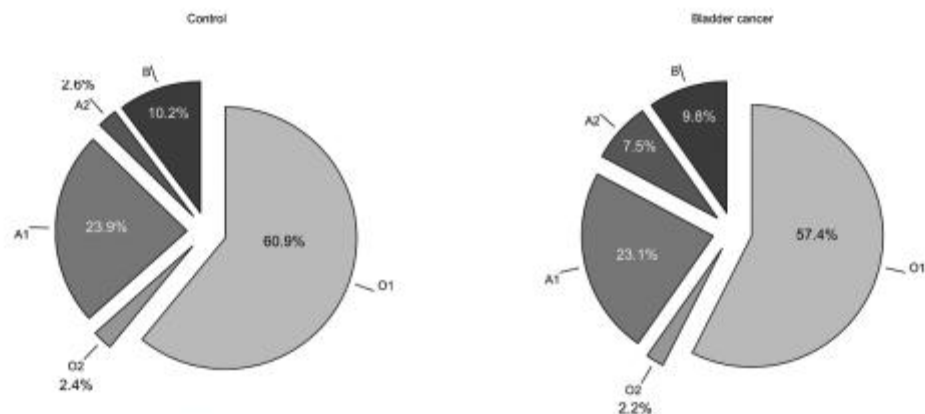


Fig. 1 Distribution of ABO alleles in patients with bladder cancer and healthy controls.

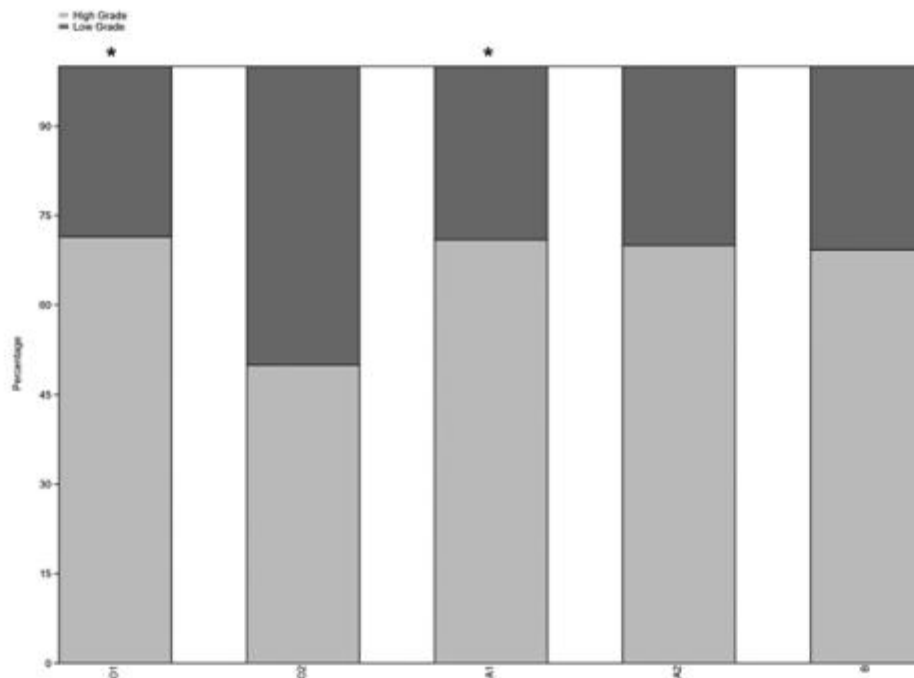


Fig. 2 Allele distribution between high and low cancer grades.

level or genotyping at the allele level is necessary. Since the mid-20th century, the role of ABO in carcinogenesis has been intensively researched. The first research revealed that stomach cancer has been more frequent in bearers of the A blood group.²⁴ Based on the well-known method of determining a glycoprotein antigen of a blood group using serology, the

hypotheses of pathogenetic mechanisms have also established that blood group antigens probably act as signaling molecules in the cell adhesion and cell recognition process.²⁵ Cartron et al determined that in addition to red blood cells, blood group antigens are also expressed on other tissues in various forms, resulting in wide functional diversity.²⁶ ABO is

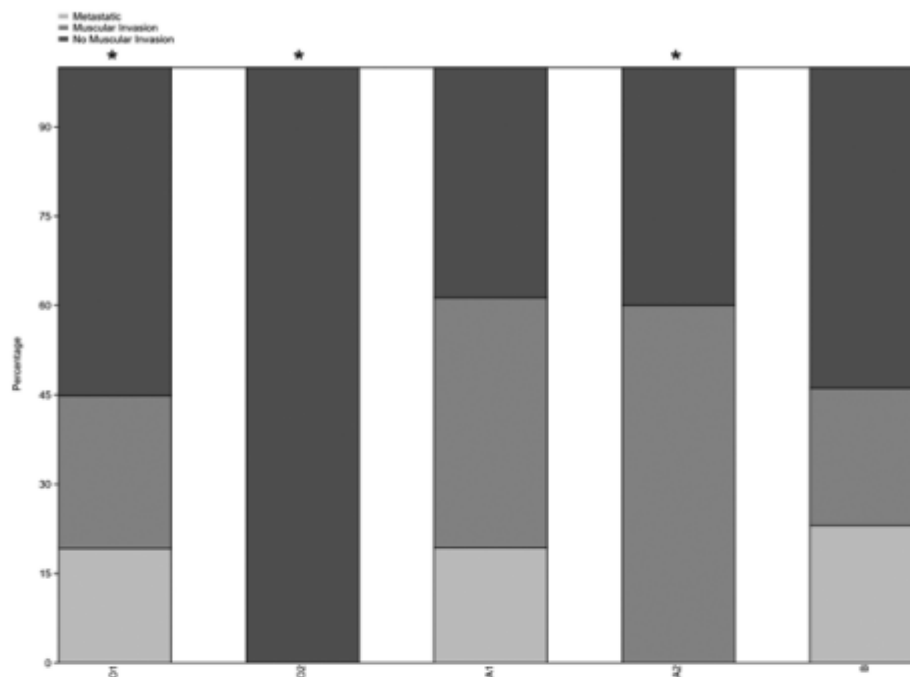


Fig. 3 Allele distribution between nonmuscular invasive, muscular invasive, and metastatic cancer.

a system with the most immunogenic response in the human body, and based on the theory of avoiding immunologic responses, earlier research proved that for certain bladder tumors, a lack of A and B antigen expression on tumor cells when compared with the normal urothelium is a characteristic trait.^{27,28} Beyond their role in immunogenic regulation, glycosyltransferase products have broad implications. Certain possible mechanisms analyzed for various tumors suggest that ABO antigens stimulate intracellular signaling in the direction of tumor angiogenesis or play a role in the inflammatory process by affecting the serum level of circulating inflammatory markers, soluble vascular endothelial growth factor for receptors 2 and 3, and soluble glycoprotein 130, thereby affecting the surveillance of malignant cells.^{29,30} Srinivas et al found that BC patients with blood group A tend to have lower mortality and a more favorable histological cancer grade, whereas patients with blood group O have a worse histological type and higher mortality.³¹ A study conducted on 494 patients with superficial BC indicated that blood group O carries the risk of disease recurrence and progression.³² A meta-analysis from 2022 summarized 10 studies investigating the association between ABO system phenotypes and BC. An association with the treatment outcome was established in patients who had undergone radical cystectomy. Also discovered in patients with NMI carcinomas who had undergone TUR was that blood group A could affect the treatment outcome,

whereas a lower incidence of disease recurrence and progression was found for blood group B.³³ According to a number of other authors, when bound on BC and ABO phenotype only, ABO antigens are not identified as appropriate biomarkers in BC outcome prognostication.^{34,35}

Our research did not find an association between ABO and BC at the phenotype (antigen) level. However, intriguing associations were found between specific blood group alleles and tumor grades, invasiveness, and relapse. We observed a lower risk as statistically significant in the appearance of BC among carriers O1, A1, and B alleles, whereas at the same time, a higher risk of HG and recurrent tumors in O1 and A1. We also determined the statistically significant lower proportion for M potential of A2 allele carriers and the statistically significant presence of superficial (NMI) tumors in carriers of noncoding O1 and O2 alleles.

As we already mentioned, blood group genotyping was performed using SNPs, which represent a genomic variant at a single base position of DNA. They are characteristic of a particular gene region, and in our research, we used them to identify alleles of the ABO blood system. In addition to determining a specific gene region, SNPs are also potential biomarkers in many cancer types.³⁶ SNP can occur in the coding region with or without a change in the amino acid. It can also occur in the regulatory gene region, where the result is a change in gene expression, or it can occur in the region between genes.³⁷ Therefore, their effect and pathogenetic

mechanism on cancer susceptibility depends on the location of the SNPs. For example, SNPs in the promoter region decrease gene transcription by inhibiting transcription factor binding while promoting tumorigenesis in prostate, breast, colon, and pancreatic cancer or making an impact using epigenetic mechanisms through DNA methylation.^{38,39}

The classification of SNPs as exons is based on their ability to replace the encoded amino acid, i.e., nonsynonymous SNP change to the protein structure, and synonymous SNP alter protein structure indirectly by modulating mRNA stability. These changes affect cell signaling and levels of oncogenic and tumor suppressor proteins.^{40,41}

Research from 2009 identified 558,542 gene regions that may be potentially associated with the risk of developing pancreatic cancer, SNP rs 505922 located within the first intron of the ABO gene. It is called the protective allele (T), and its existence is evident in the linkage disequilibrium upon the deletion of the base pairs, which is responsible for noncoding the glycosyltransferase product of the O allele. It is among the first studies that has shown the link between the ABO system and cancer at the gene level. It also identified a significant association between SNPs, suggesting that the A and B antigens can be associated with an increased risk of pancreatic cancer, i.e., blood group O carries a lower risk of the disease.⁴² Returning to the question from the beginning of the discussion, we can conclude from our results and literature that for the research on the link between the ABO system and the incidence of BC, blood group typing at the gene level is more appropriate than an immunohistochemical analysis at the antigen level. Blood groups are codominant, and we cannot determine the haplotype only from antigen data, where the specific genetic region, i.e., the allele and its constituent parts, pose a risk factor for the occurrence of cancer.

The ABO system is primarily involved in determining different blood types in individuals. It is not directly linked to carcinogenesis, but many studies have investigated potential associations over the last few decades. Although we have endeavored to explain our results using potential mechanisms published in previous research papers, it is important to note that they are not still fully understood. Is it a crucial role in interacting with the immune system, the expression of glycoconjugates or a variation of the gene region? Previous findings are inconsistent, and more research is needed to establish conclusive evidence regarding the specific mechanisms involved.

Conclusion

This study provides an analysis of the association between ABO phenotype, genotype, and blood group alleles in patients with BC. While no significant differences were observed in ABO phenotype or genotype distribution, associations were found between specific blood group alleles and tumor grade, invasiveness, and relapse. These findings suggest a potential role for ABO alleles in BC progression and warrant further investigation with larger cohorts to validate these preliminary results.

The limitation of our study could possibly be the small number of samples. However, our study is among the first to assess the risk factors for BC at the level of ABO genotypes and alleles, which can provide more detailed information related to individual alleles as possible hereditary factors for the occurrence of BC. Understanding the genetic basis of BC can contribute to improving diagnostics, risk stratification, and targeted therapeutic interventions.

Funding

None.

Conflict of Interest

None declared.

Acknowledgments

We wish to thank the friends and supporters who helped by reviewing, typing, general support activities, and all individuals that participated in study.

References

- McCormick B, Dahmen A, Antar A, Baumgarten A, Dhillon J, Spiess PE. Rare urologic tumors. *Curr Opin Urol* 2017;27(01):68–75
- Rummel SK, Ellsworth RE. The role of the histoblood ABO group in cancer. *Future Sci OA* 2016;2(02):FSO107
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(06):394–424
- Veskimäe E, Espinos EL, Bruins HM, et al. What is the prognostic and clinical importance of urothelial and nonurothelial histological variants of bladder cancer in predicting oncological outcomes in patients with muscle-invasive and metastatic bladder cancer? A European Association of Urology Muscle Invasive and Metastatic Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur Urol Oncol* 2019;2(06):625–642
- Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 2011;306(07):737–745
- Kurth KH, Schellhammer PF, Okajima E, et al. Current methods of assessing and treating carcinoma in situ of the bladder with or without involvement of the prostatic urethra. *Int J Urol* 1995;2 (Suppl 2):8–22
- American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. American Joint Committee on Cancer; 2017
- Sylvester RJ, van der Meijden APM, Oosterlinck W, et al. 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. *Eur Urol* 2006;49(03):466–5, discussion 475–477
- Hautmann RE, Abol-Enein H, Hafez K, et al; World Health Organization (WHO) Consensus Conference on Bladder Cancer. Urinary diversion. *Urology* 2007;69(1, Suppl):17–49
- Owen R. Karl Landsteiner and the first human marker locus. *Genetics* 2000;155(03):995–998
- Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990;345(6272):229–233
- Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, White T, Clausen H, Hakomori S. Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc α 1–2Gal α 1–3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J Biol Chem* 1990;265(02):1146–1151
- Reid ME, Mohandas N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin Hematol* 2004;41(02):93–117

- 14 Hakomori S. Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473(01):247-266
- 15 Patnaik SK, Helmberg W, Blumenfeld OO. BGMUT database of allelic variants of genes encoding human blood group antigens. *Transfus Med Hemother* 2014;41(05):346-351
- 16 Pereira V, Gusmão L. X-chromosome markers. *Encyclopedia of Forensic Sciences*, 2nd ed January 1, 2013:257-263. Doi: 10.1016/B978-0-12-382165-2.00047-7
- 17 Westhoff CM. Blood group genotyping. *Blood* 2019;133(17):1814-1820
- 18 Teoh JYC, MacLennan S, Chan VWS, et al. An International Collaborative Consensus Statement on en bloc resection of bladder tumour incorporating two systematic reviews, a two-round Delphi survey, and a consensus meeting. *Eur Urol* 2020;78(04):546-569
- 19 Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* 2001;19(03):666-675
- 20 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 2017
- 21 Brierley J, Gospodarowicz MD, Wittekind CT. TNM Classification of Malignant Tumors International Union Against Cancer, 8th ed. Oxford, England: Wiley; 2017:57-62
- 22 Gassner C, Schmarda A, Nussbaumer W, Schönlitz D. ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 1996;88(05):1852-1856
- 23 Yamamoto F. Molecular genetics of the ABO histo-blood group system. *Vox Sang* 1995;69(01):1-7
- 24 Yu H, Xu N, Li ZK, et al. Association of ABO blood groups and risk of gastric cancer. *Scand J Surg* 2020;109(04):309-313
- 25 Ghazarian H, Ildoni B, Oppenheimer SB. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem* 2011;113(03):236-247
- 26 Cartron JP, Colin Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin Biol* 2001;8(03):163-199
- 27 Orloff I, Lacombe L, Pellicer I, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the histoblood group ABO(H) in primary bladder tumors. *Int J Cancer* 1998;75(06):819-824
- 28 Foresto P, Biondi C, Brufman A, et al. Deleción antigénica ABH en células de sedimento urinario de pacientes con adenoma de próstata. *Arch Esp Urol* 2000;53(09):770-773
- 29 Joh HK, Cho E, Choueiri TK. ABO blood group and risk of renal cell cancer. *Cancer Epidemiol* 2012;36(06):528-532
- 30 Wolpin BM, Kraft P, Gross M, et al. Pancreatic cancer risk and ABO blood group alleles: results from the pancreatic cancer cohort consortium. *Cancer Res* 2010;70(03):1015-1023
- 31 Srinivas V, Khan SA, Hoisington S, Varma A, Gonder MJ. Relationship of blood groups and bladder cancer. *J Urol* 1986;135(01):50-52
- 32 Orihuela E, Shahon RS. Influence of blood group type on the natural history of superficial bladder cancer. *J Urol* 1987;138(04):758-759
- 33 Yang H, Yan J. A systematic review of prognosis of ABO blood group and rhesus factor on outcomes in patients with bladder cancer. *Medicine (Baltimore)* 2022;101(39):e30893
- 34 D'Andrea D, Moschini M, Soria F, et al. ABO blood group and rhesus factor are not associated with outcomes after radical cystectomy for non-metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Anticancer Res* 2017;37(10):5747-5753
- 35 Engel O, Soave A, Peine S, et al. The impact of the ABO and the Rhesus blood group system on outcomes in bladder cancer patients treated with radical cystectomy. *World J Urol* 2015;33(11):1769-1776
- 36 Deng N, Zhou H, Fan H, Yuan Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget* 2017;8(66):110635-110649
- 37 Brody T. Biomarkers. *Clin Trials* 2016;377-419. Doi: 10.1016/B978-0-12-804217-5.00019-9
- 38 Ben Nasr H, Hamrita B, Batbout M, et al. A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter -160 C/A is associated with risk of nasopharyngeal cancer. *Clin Chim Acta* 2010;411(17-18):1253-1257
- 39 Stirzaker C, Song JZ, Davidson B, Clark SJ. Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells. *Cancer Res* 2004;64(11):3871-3877
- 40 Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol* 2009;578:23-39
- 41 Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, et al; Broad GO Seattle GO NHLBI Exome Sequencing Project. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science* 2012;337(6090):64-69
- 42 Amundadottir L, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, et al. Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet* 2009;41(09):986-990



LAPAROSCOPIC ADRENAL-SPARING SURGERY CASE SERIES: PARTIAL ADRENALECTOMY AND CYST RESECTION

Nikola Knežević^{1,3}, Luka Penezić¹, Ivan Milas¹, Darko Kaštelan^{2,3}, Tomislav Kuliš^{1,3}, Toni Zekulić¹, Bojan Čikić¹ and Željko Kaštelan^{1,3}

¹Department of Urology, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia;

²Department of Endocrinology, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia;

³University of Zagreb School of Medicine, Zagreb, Croatia

SUMMARY – The aim is to present our case series documenting indications, laparoscopic technique, surgical and endocrinologic outcomes of laparoscopic partial adrenalectomy. In the period from April 2011 until October 2021, we performed 39 procedures. The patients were divided into three groups: unilateral adrenal gland tumor with a normal contralateral gland (group 1), tumor of the solitary adrenal gland (group 2), and adrenal cysts (group 3). There were 20 patients in group 1, 6 patients in group 2, and 13 patients in group 3. The most common histology in group 1 was adenoma (40%), all tumors in group 2 were renal cell carcinoma metastases, and all cysts in group 3 were benign. There were no major complications (Clavien Dindo grade ≥ 2) in the whole cohort. All patients in groups 1 and 3 had favorable endocrinologic outcomes, and 50% of group 2 patients required lifelong hydrocortisone replacement therapy. The procedure is safe and feasible with favorable outcomes in the hands of a high volume adrenal surgeon.

Key words: *Laparoscopy; Adrenalectomy; Organ sparing treatments; Minimally invasive surgery*

Introduction

More than a century passed from the first reported total adrenalectomy performed by Thornton in 1889¹ to the first reported laparoscopic total adrenalectomy (LTA) by Higashihara in 1992², and then less than a decade for laparoscopy to establish itself as the standard in adrenal surgery³. Further advancement in surgical technique led to organ sparing adrenal surgery and the first retroperitoneoscopic partial adrenalectomy by Walz *et al.* in 1996⁴ and then laparoscopic by Janetchek *et al.* in 1997⁵. Adrenal function preservation increases the quality of life and decreases the need

for supplementation therapy⁶. Laparoscopic partial adrenalectomy (LPA) has been proposed as a feasible option not only in bilateral and solitary adrenal gland tumors, but also for monolateral small adrenal tumors⁶ and metastases⁷.

The first LTA in our institution was performed in January 1997⁸ and the first LPA in January 2008. In this study, we present our case series documenting indications, laparoscopic technique, surgical and endocrinologic outcomes.

Materials and Methods

We performed a retrospective case series study of 39 LPA performed in our center from April 2011 until October 2021. The patients were divided into three groups: unilateral adrenal gland tumor with a normal contralateral gland (group 1), tumor of the solitary

Correspondence to: *Luka Penezić, MD*, Department of Urology, Zagreb University Hospital Center, Kišpatićeva 12, HR-10000 Zagreb, Croatia
E-mail: penezic.luka@gmail.com

adrenal gland (group 2), and adrenal cysts (group 3). In our center, every patient with an adrenal tumor is discussed at a multidisciplinary tumor board meeting consisting of endocrinology, urology, oncology and radiology specialists. The optimal treatment modality, based on the best available evidence, is proposed for each patient. The standard diagnostic workup of adrenal pathology consists of patient history, physical examination and radiological examination (computed tomography or magnetic resonance imaging scan) and biochemical tests (such as serum cortisol and plasma adrenocorticotropic hormone (ACTH) levels, urinary free cortisol, catecholamine concentrations, 1 mg overnight or high-dose dexamethasone suppression, renin and aldosterone levels, saline suppression test and ambulatory salt loading test). The decision on LPA in group 1 was based on favorable anatomic tumor location within the adrenal gland preoperatively. This was reevaluated intraoperatively, and if the anatomic relations were still favorable as judging by visual appearance, LPA was carried out. For patients in group 2, LPA was the only option because of the solitary adrenal gland, and for patients in group 3, once the intraoperative diagnosis of a cyst was visually confirmed, LPA was carried out. Contraindication for LPA was high radiological and clinical suspicion of malignancy. All patients underwent endocrinologic reevaluation and follow-up after the procedure. Perioperative and postoperative parameters were recorded and assessed, including postoperative complications. Data were collected from patient medical records. Descriptive statistics were used to analyze and represent the results using Microsoft Excel.

The study was conducted following ethical principles of the Declaration of Helsinki.

Surgical technique and perioperative management

We use a conventional laparoscopic lateral transperitoneal approach. Patient positioning, pneumoperitoneum achievement, trocar placement and the initial steps are identical as that of LTA, as we have previously published⁴, up to the point of adrenal gland dissection. With the use of minimal dissection, we expose the adrenal vein. Vascular control of the adrenal vein is very important for LPA because if uncontrolled bleeding starts from the edge of resection, it is necessary to double clip and cut the vein and perform total adrenalectomy. The next step is tumor differentiation from normal tissue so that only the part of the gland where the tumor is situated can be dissected. This step is taken for the preservation of blood supply for the remnant of the adrenal gland. Resection of the tumor is done with an ultrasonic dissector (SonoSurg, Olympus), the resected surface of the gland is first cauterized with bipolar, then sutured with Vicryl 4-0, and in the end, oxycellulose hemostatic agent is applied if needed (Fig. 1). The specimen is removed using a laparoscopic retrieval bag by extending one trocar incision, usually the one in the lower lateral abdominal quadrant. All patients had a drain that was removed when the secretion was less than 100 mL, usually on the second postoperative day.

Perioperative endocrinologic management depends on the underlying pathology. Patients with a solitary adrenal gland require perioperative manage-



Fig. 1. Preoperative diagnostic magnetic resonance imaging, photographs of intraoperative anatomic relations and adrenal gland after partial adrenalectomy for right-sided adrenal tumor.

(A) T1 weighted MR image showing favorable anatomic position (white circle); (B) tumor (black circle), adrenal vein (black lines), normal adrenal tissue (white lines), inferior vena cava (pink line), renal vein (purple lines); (C) resected tumor (black oval), adrenal gland remnant (purple area), liver held with a retractor (white line), inferior vena cava (pink line).

ment of intravenous corticosteroid administration one day before and after surgery. Oral corticosteroids are administered on the second day after surgery, tapered and discontinued after the ACTH stimulation test which determines the need for lifelong hormonal substitution therapy. Patients with pheochromocytoma are given phenoxybenzamine *per os* (p.o.) for 7 days before surgery. The need for subsequent therapy depends on postoperative metanephrine values. Patients with aldosterone-producing adenomas (APA) are followed-up clinically and antihypertensive drugs were discontinued in case of blood pressure normalization, and biochemically with a saline suppression test.

Results

Demographic and perioperative data are shown in Table 1. There were no conversions to either LTA or open surgical approach. There were no major complications (Clavien Dindo grade ≥ 2) during the early and late postoperative period in the whole cohort. Median hospital stay was 4 days (interquartile range (IQR) 3–5) for the whole cohort.

Detailed histology of the resected tumors in group 1 is presented in Table 2. There were 12 hormonally active tumors, 6 APA, 4 pheochromocytomas and 2 adenomas causing Cushing syndrome.

All tumors in group 2 were renal cell carcinoma (RCC) metastases after contralateral radical nephrectomy and adrenalectomy.

In group 3, six patients had incidental cyst diagnosis (46.1%), five patients had nonspecific abdominal pain (38.5%) and two patients had cyst recurrence after laparoscopic marsupialization (15.4%). All cysts were histologically confirmed as simple adrenal cysts.

The median follow-up in group 1 was 36 months (IQR 13.75–61.25). Two patients died, one due to non-small-cell lung carcinoma and the other from sarcoma progression, at 18 and 12 months after LPA, respectively. Two patients with APA were lost to follow-up, and the remaining four had clinical and biochemical remission, as did two patients with Cushing syndrome. Three patients with pheochromocytoma had clinical and biochemical remission, and one had the disease as part of the MEN2 syndrome, who underwent ipsilateral adrenalectomy due to tumor recurrence 4 years after LPA. One patient with lymphoma received chemoradiotherapy and is in remission during 5 years of follow-up. Three patients with hemangioma, myelolipoma and lymphangioma had normal endocrinologic function, while the myelolipoma patient had nonfunctional recurrence of 8 mm in diameter in the adrenal remnant, which has been under surveillance. One patient with renal cell carcinoma metastasis later underwent contralateral adrenalectomy due to disease recurrence, and subsequently developed partial adrenal insufficiency, requiring glucocorticoid supplementation only during stress, and is still alive after 3 years of follow-up. The patient with adrenal cell carcinoma

Table 1. Demographic and perioperative data

	Group 1	Group 2	Group 3	Total
Patients	n=20	n=6	n=13	N=39
Male/ Female	4/16 (20%/80%)	3/3 (50%/50%)	4/9 (30.7%/69.3%)	11/28 (28.2%/72.8%)
Age (years)	Median 50.5 (IQR 41.75–59.75)	Median 65 (IQR 62.25–70.75)	Median 38 (IQR 36–44)	Median 47 (38–63.5)
Side, left/right	12/8 (60%/40%)	3/3 (50%/50%)	7/6 (53.8%/46.2%)	22/17 (56.4%/43.6%)
Tumor size (mm)	Median 25.5 (IQR 22.25 – 36.5)	Median 19.5 (IQR 18–27.75)	Median 100 (IQR 70–120)	Median 35 (IQR 23–71.5)
Procedure duration (min)	Median 90 (IQR 71.25–107.5)	Median 107.5 (IQR 87.5–126.25)	Median 75 (IQR 60–85)	Median 82.5 (IQR 70–100)
Estimated blood loss (mL)	Median 35 (IQR 25–50)	Median 45 (IQR 35–52.5)	Median 17.5 (IQR 13.75–20)	Median 27 (IQR 20–47.5)

IQR = interquartile range

Table 2. Histology in group 1

Histology report	
Adenoma	n=8 (40%)
Pheochromocytoma	n=4 (20%)
Non-small-cell lung carcinoma metastasis	n=1 (5%)
Renal cell carcinoma metastasis	n=1 (5%)
Lymphoma	n=1 (5%)
Sarcoma	n=1 (5%)
Hemangioma	n=1 (5%)
Lymphangioma	n=1 (5%)
Myelolipoma	n=1 (5%)
Adrenal cell carcinoma, Weiss score 4	n=1 (5%)

(ACC) did not receive any adjuvant treatment and is recurrence-free after 6 years of follow-up.

The median follow-up in group 2 was 35.5 months (IQR 30-53.75). Two (33.3%) patients died due to disease progression. Three (50%) patients required lifelong hydrocortisone replacement therapy because of adrenal insufficiency.

The median follow-up in group 3 was 6 months (IQR 1-19.25) and one patient was lost to follow-up. The remaining patients had normal endocrinologic function, and one patient had a minor cyst residue, 3 cm in diameter (preoperatively it was 10 cm), with no progression during 83 months of follow-up.

Discussion

Laparoscopic total adrenalectomy is the standard procedure in benign adrenal surgery because of the minimally invasive surgery benefits with excellent surgical and clinical outcomes. LTA can also be performed using a robotic approach with similar results^{9,10}. However, LPA has gained popularity in the era of organ sparing surgery because of the potential of independence from chronic steroid replacement therapy. The indication for LPA in cases with a solitary adrenal gland and bilateral tumors, especially in familial pheochromocytoma, is unquestionable if we want to avoid the morbidity associated with chronic steroid substitution therapy. The controversy has always been whether LPA is indicated for tumors in patients with normal contralateral adrenal gland^{6,11}. Two arguments support LPA in this setting. First, it has been reported that patients with a solitary adrenal gland after adrenalectomy do not respond equally to stress as normal controls¹².

Second, there are a multitude of potential threats to the remaining adrenal gland, such as the need for surgery, infections, idiopathic and other etiologic factors of acquired adrenal insufficiency⁶. LPA has proven to be safe and feasible in the treatment of nonhereditary unilateral functional adrenal adenomas¹³, and there is a proposition to use it as the first-line treatment for small adrenal masses⁶. In our case series, the most common tumor in group 1 was APA, reflecting an overall higher incidence of this pathology compared to other adrenal tumors. The debate over LPA indication for the APA treatment is ongoing, mainly regarding its endocrinologic effectiveness because it is questionable whether the detected adenoma really is the source of excessive aldosterone, even after confirmation of the side with adrenal vein sampling. There can be multiple adenomas in the same gland in 10.1%¹⁴ and APA can coexist with adrenal hyperplasia in 10% of cases¹⁵. Although therapeutic noninferiority of LPA compared to LTA has been reported in several publications^{13,15,16}, LTA is still considered the standard for APA. In our case series, of the 6 APA patients in group 1, four underwent LPA because of inconclusive adrenal vein sampling results, and two because they were younger than 35 years with serious primary aldosteronism and radiologically confirmed small adenoma and for such patients, surgery is the reasonable option without adrenal vein sampling¹⁷. All our APA patients had clinical and biochemical remission, which is in concordance with the previously mentioned series of LPA noninferiority^{13,15,16}. LPA is contraindicated if there is suspicion of malignancy¹¹. One of the radiological criteria for malignant potential in incidentalomas is tumor size, and

4 cm was proposed as the appropriate cut-off¹⁸. The median tumor diameter in our group 1 was 2.5 cm, which implies a low risk of ACC, but still we encountered one case in our series, which is extremely rare⁶. Ko *et al.* also report on one case of incidental ACC in their LPA group of 54 patients, and their patient was recurrence free after 24 months¹⁹, while our patient has been recurrence free without any adjuvant therapy for 60 months. This is an outlier and exception that proves the rule that LTA must be performed in case of ACC suspicion²⁰. All other tumors in group 1 are sporadic and rare, but the favorable endocrinologic and surgical outcomes concur with the proposal that LPA could be the first-line treatment for small adrenal masses⁶.

The preferred treatment for adrenal RCC metastases is total adrenalectomy because it can prolong survival²¹. Adrenal sparing metastasectomy is generally rarely performed, let alone laparoscopically, since bilateral synchronous or metachronous adrenal RCC metastasis is extremely rare²². The first minimally invasive adrenal sparing surgery for RCC metastasis was done by robot-assisted procedure, published by Kumar *et al.* in 2009²³, and there is only one more reported case of retroperitoneoscopic partial adrenalectomy by Kaneko *et al.* 2019⁷. Kaneko reports a recurrence-free survival after 9 months of follow-up and both cases reported no need for cortisol supplementation therapy after surgery^{7,23}. To the best of our knowledge, our case series is the largest yet published LPA series for adrenal RCC metastasis treatment published in English literature. We performed the procedure for metachronous contralateral solitary adrenal RCC metastasis after previous radical nephrectomy and adrenalectomy in 6 cases (group 2) and 1 for metachronous ipsilateral adrenal RCC metastasis after previous radical nephrectomy (group 1). In the solitary adrenal group, 50% of cases required supplementation therapy and during the median follow-up of 36 months, the survival rate was 66.7%. One patient from group 2 later developed RCC metastasis in the contralateral adrenal gland and had to undergo LTA, after which he developed partial adrenal insufficiency. In the light of these results, we can conclude that LPA should be performed in patients with RCC metastasis in the adrenal gland to preserve adrenal function and prolong survival.

Cysts present a rare adrenal pathology, with an incidence of 5.4%–8.7% of all adrenal masses^{24–26}, and in around 60% of cases, they are diagnosed after non-specific abdominal complaints²⁶. In 15% of cases, they

accompany hormonally active adrenal syndromes²⁴. Malignant potential increases with size and is reported in up to 7% of cases²⁷. The preferred treatment is resection/partial adrenalectomy because this way a part of adrenal tissue can be sent for pathologic evaluation to exclude malignancy²⁸. Total adrenalectomy was advocated in the past, but in the era of organ-sparing surgery, this is too aggressive for a lesion that is mostly benign. The median size of cysts in the case series was 10 cm and the pathology report confirmed benign characteristics in every case, reflecting the low incidence of malignancy and justifying the LPA approach. Besides that, in our experience, partial adrenalectomy had almost no recurrences, as opposed to marsupialization, with which we had 2 recurrences in 2 cases (100%), which we then treated with LPA and included in group 3.

We use a multidisciplinary approach in treating patients with adrenal tumors and our department is a high-volume center for laparoscopic adrenalectomy. We performed more than 900 laparoscopic adrenalectomies since starting this program in 1997. The guidelines on the treatment of adrenal incidentaloma propose laparoscopic adrenalectomy to be performed in high-volume, experienced centers²⁹. The surgeon's volume and experience become even more important for LPA since it is a technically demanding procedure. There are a few technical aspects that need to be pointed out. The location of the tumor within the gland has a major influence on the ability to perform partial adrenalectomy. Tumors anterior to and on the margin of the gland are generally more amenable for LPA than those on the posterior surface³⁰ and those centrally located³¹. The arterial supply of the gland consists of small arteries, accompanied by small veins, originating from three sources, i.e., the aorta, the inferior phrenic and the renal artery. That is why the remnant of the adrenal gland must not be mobilized off the surrounding retroperitoneal tissue, especially if the adrenal vein cannot be preserved, to ensure adequate arterial supply and venous drainage³¹. Another important aspect is the residual adrenal volume. It has been suggested that at least 15% to 30% of adrenal tissue is necessary for normal gland function^{32–34}, although some report steroid-independence with less than 15% tissue³⁵. Nevertheless, there is an unanimous agreement that if the proposed minimal remnant tissue cannot be achieved, LTA should be performed³⁶. When talking about the remnant volume, the resection margin should also be

taken into account. The proposed 3–5 mm margin is considered enough for an adequate outcome³⁴. The final aspect is preservation of the adrenal vein. It has been shown that preservation is not essential either for the safety of the procedure or the functional outcome^{30,37}. But we believe that the intraoperative preparation and preservation of the adrenal vein is mandatory for several reasons. First, venous drainage of the adrenal stump contributes to better cortical remnant function^{38,39}. Second, preservation of the adrenal vein leads to better venous drainage with less congestion and less bleeding⁴⁰. Third, in the case of uncontrolled bleeding during tissue resection, the exposed vein can be instantly clipped for hemostasis.

One of the major concerns of LPA compared to LTA is the potential for more bleeding because of the rich adrenal vascular supply, but numerous studies have shown that the perioperative outcomes of LPA are as good as of LTA⁶. Estimated blood loss, operative time and complication rates do not differ significantly between LPA and LTA, and the procedure is considered safe and feasible⁶. Our cohort shows minimal blood loss, reasonable operative time and no complications, the same as other published series, confirming the safety and feasibility of the procedure.

This is a case series of a heterogeneous LPA cohort including patients with different adrenal pathology, limiting conclusions to low levels of evidence, but reflecting real-life situations. The major limiting factor of this study was the lack of randomization and control group, but most of the published reports have the same bias. The debate on LPA indications is still ongoing³¹, but from our experience, we can conclude that, although technically challenging, the procedure can easily and safely be performed in a variety of indications, especially by a high-volume adrenal surgeon.

References

1. Welbourn B, Friesen SR, Johnston IDA, Sellwood RA. The History of Endocrine Surgery. New York: Praeger; 1990.
2. Higashihara E, Tanaka Y, Horie S, Aruga S, Nutahara K, Homma Y, Minowada S, Aso Y. [A case report of laparoscopic adrenalectomy]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*. 1992 Jul;83(7):1130–3. (in Japanese) doi: 10.5980/jpnjurol1989.83.1130. PMID: 1387181.
3. Smith CD, Weber CJ, Amerson JR. Laparoscopic adrenalectomy: new gold standard. *World J Surg*. 1999 Apr;23(4):389–96. doi: 10.1007/pl00012314. PMID: 10030863.
4. Walz MK, Peitgen K, Hoermann R, Giebler RM, Mann K, Eigler FW. Posterior retroperitoneoscopy as a new minimally invasive approach for adrenalectomy: results of 30 adrenalectomies in 27 patients. *World J Surg*. 1996 Sep;20(7):769–74. doi: 10.1007/s002689900117. PMID: 8678949.
5. Janetschek G, Lhotka K, Gasser R, Finkenshtadt G, Jaschke W, Bartsch G. Adrenal-sparing laparoscopic surgery for aldosterone-producing adenoma. *J Endourol*. 1997 Apr;11(2):145–8. doi: 10.1089/end.1997.11.145. PMID: 9107590.
6. Kaye DR, Storey BB, Pacak K, Pinto PA, Linehan WM, Bratslavsky G. Partial adrenalectomy: underused first line therapy for small adrenal tumors. *J Urol*. 2010 Jul;184(1):18–25. doi: 10.1016/j.juro.2010.03.052. PMID: 20546805; PMCID: PMC3164765.
7. Kaneko G, Katsui M, Orikasa H, Hattori S, Hara S. Retroperitoneoscopic partial adrenalectomy for metachronous renal cell carcinoma metastasis to solitary adrenal gland. *Int Cancer Conf J*. 2019 Jul 23;9(1):1–4. doi: 10.1007/s13691-019-00383-5. PMID: 31950008; PMCID: PMC6942610.
8. Kulis T, Knezevic N, Pekoz M, Kastelan D, Grkovic M, Kastelan Z. Laparoscopic adrenalectomy: lessons learned from 306 cases. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2012 Jan-Feb;22(1):22–6. doi: 10.1089/lap.2011.0376. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22166088.
9. Kastelan Z, Hudolin T, Kulis T, Knezevic N, Penezic L, Maric M, Zekulic T. Upper urinary tract surgery and radical prostatectomy with Senhance® robotic system: single center experience – first 100 cases. *Int J Med Robot*. 2021 Aug;17(4):e2269. doi: 10.1002/rcs.2269. Epub 2021 May 2. PMID: 33900026.
10. Yiannakopoulou E. Robotic assisted adrenalectomy: surgical techniques, feasibility, indications, oncological outcome and safety. *Int J Surg*. 2016 Apr;28:169–72. doi: 10.1016/j.ijsu.2016.02.089. Epub 2016 Feb 27. PMID: 26926087.
11. Perysinakis I, Aggeli C, Kaltsas G, Zografos GN. Adrenal-sparing surgery: current concepts on a theme from the past. *Hormones (Athens)*. 2020 Sep;19(3):317–27. doi: 10.1007/s42000-020-00202-0. Epub 2020 May 9. PMID: 32388629.
12. Nakada T, Kubota Y, Sasagawa I, Yagisawa T, Watanabe M, Ishigooka M. Therapeutic outcome of primary aldosteronism: adrenalectomy versus enucleation of aldosterone-producing adenoma. *J Urol*. 1995 Jun;153(6):1775–80. doi: 10.1016/s0022-5347(01)67303-8. PMID: 7752314.
13. Balci M, Tuncel A, Aslan Y, Aykanat C, Berker D, Guzel O. Laparoscopic partial versus total adrenalectomy in nonhereditary unilateral adrenal masses. *Urol Int*. 2020;104(1–2):75–80. doi: 10.1159/000501216. Epub 2019 Jun 26. PMID: 31242477.
14. Imai T, Tanaka Y, Kikumori T, Ohiwa M, Matsuura N, Mase T, Funahashi H. Laparoscopic partial adrenalectomy. *Surg Endosc*. 1999 Apr;13(4):343–5. doi: 10.1007/s004649900986. PMID: 10094744.
15. Fu B, Zhang X, Wang GX, Lang B, Ma X, Li HZ, Wang BJ, Shi TP, Ai X, Zhou HX, Zheng T. Long-term results of a prospective, randomized trial comparing retroperitoneoscopic partial versus total adrenalectomy for aldosterone producing adenoma. *J Urol*. 2011 May;185(5):1578–82. doi: 10.1016/j.juro.2010.12.051. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21419437.
16. Meria P, Kempf BF, Hermieu JF, Plouin PF, Duclos JM. Laparoscopic management of primary hyperaldosteronism: clinical experience with 212 cases. *J Urol*. 2003 Jan;169(1):32–5. doi: 10.1097/01.ju.0000041281.22237.97. PMID: 12478096.

17. Young WF Jr. Diagnosis and treatment of primary aldosteronism: practical clinical perspectives. *J Intern Med.* 2019 Feb;285(2):126-48. doi: 10.1111/joim.12831. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30255616.
18. Angeli A, Osella G, Ali A, Terzolo M. Adrenal incidentaloma: an overview of clinical and epidemiological data from the National Italian Study Group. *Horm Res.* 1997;47(4-6):279-83. doi: 10.1159/000185477. PMID: 9167965.
19. Ko OS, Kim YJ, Kim HJ, Jeong YB. Laparoscopic partial adrenalectomy: surgical technique and outcome. *Korean J Urol Oncol.* 2019;17(2):103-9. doi: 10.22465/kjuo.2019.17.2.103.
20. Fassnacht M, Dekkers OM, Else T, Baudin E, Berruti A, de Krijger R, Haak HR, Mihai R, Assie G, Terzolo M. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol.* 2018 Oct 1;179(4):G1-G46. doi: 10.1530/EJE-18-0608. PMID: 30299884.
21. Kessler OJ, Mukamel E, Weinstein R, Gayer E, Konichevsky M, Servadio C. Metachronous renal cell carcinoma metastasis to the contralateral adrenal gland. *Urology.* 1998 Apr;51(4):539-43. doi: 10.1016/s0090-4295(97)00698-5. PMID: 9586603.
22. Öztürk H. Bilateral synchronous adrenal metastases of renal cell carcinoma: a case report and review of the literature. *Oncol Lett.* 2015 Apr;9(4):1897-901. doi: 10.3892/ol.2015.2915. Epub 2015 Jan 28. PMID: 25789064; PMCID: PMC4356352.
23. Kumar A, Hyams ES, Stifelman MD. Robot-assisted partial adrenalectomy for isolated adrenal metastasis. *J Endourol.* 2009 Apr;23(4):651-4. doi: 10.1089/end.2008.0440. PMID: 19358687.
24. Wedmid A, Palase M. Diagnosis and treatment of the adrenal cyst. *Curr Urol Rep.* 2010 Feb;11(1):44-50. doi: 10.1007/s11934-009-0080-1. PMID: 20425637.
25. Salemis NS, Nisotakis K. Giant adrenal pseudocyst: laparoscopic management. *ANZ J Surg.* 2011 Mar;81(3):185-6. doi: 10.1111/j.1445-2197.2010.05655.x. PMID: 21342395.
26. Pogorzelski R, Toutoumchi S, Krajewska E, Fiszler P, Pachucki J, Bednarczyk T, Łoń I, Gaciong Z, Marek B, Skórski M. Laparoscopic treatment of adrenal cysts – own research and literature review. *Endokrynol Pol.* 2015;66(5):469-72. doi: 10.5603/EP.2015.0057. PMID: 26457502.
27. Ujam AB, Peters CJ, Tadrous PJ, Webster JJ, Steer K, Martinez-Isla A. Adrenal pseudocyst: diagnosis and laparoscopic management – a case report. *Int J Surg Case Rep.* 2011;2(8):306-8. doi: 10.1016/j.ijscr.2011.10.002. Epub 2011 Oct 12. PMID: 22096761; PMCID: PMC3215227.
28. Pogorzelski R, Toutoumchi S, Krajewska E, Ambrozjak U, Koperski E, Wołoszko T, Celejewski K, Szostek MM, Jakuczun W, Gałązka Z. Adrenal cysts – optimal laparoscopic treatment. *Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne.* 2018 Sep;13(3):288-91. doi: 10.5114/wiitm.2018.75872. Epub 2018 May 21. PMID: 30302140; PMCID: PMC6174168.
29. Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, Dralle H, Newell-Price J, Sahdev A, Tabarin A, Terzolo M, Tsagaraki S, Dekkers OM. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol.* 2016 Aug;175(2):G1-G34. doi: 10.1530/EJE-16-0467. PMID: 27390021.
30. Stefanidis D, Goldfarb M, Kercher KW, Hope WW, Richardson W, Fanelli RD; Society of Gastrointestinal and Endoscopic Surgeons. SAGES guidelines for minimally invasive treatment of adrenal pathology. *Surg Endosc.* 2013 Nov;27(11):3960-80. doi: 10.1007/s00464-013-3169-z. Epub 2013 Sep 10. PMID: 24018761.
31. Jeschke K, Janetschek G, Peschel R, Schellander L, Bartsch G, Henning K. Laparoscopic partial adrenalectomy in patients with aldosterone-producing adenomas: indications, technique, and results. *Urology.* 2003 Jan;61(1):69-72; discussion 72. doi: 10.1016/s0090-4295(02)02240-9. PMID: 12559268.
32. Brauckhoff M, Gimm O, Thanh PN, Bär A, Ukkat J, Brauckhoff K, Bönsch T, Dralle H. Critical size of residual adrenal tissue and recovery from impaired early postoperative adrenocortical function after subtotal bilateral adrenalectomy. *Surgery.* 2003 Dec;134(6):1020-7; discussion 1027-8. doi: 10.1016/j.surg.2003.08.005. PMID: 14668736.
33. Walz MK, Peitgen K, Diesing D, Petersenn S, Janssen OE, Philipp T, Metz KA, Mann K, Schmid KW, Neumann HP. Partial versus total adrenalectomy by the posterior retroperitoneoscopic approach: early and long-term results of 325 consecutive procedures in primary adrenal neoplasias. *World J Surg.* 2004 Dec;28(12):1323-9. doi: 10.1007/s00268-004-7667-y. Epub 2004 Nov 11. PMID: 15517476.
34. Otto M, Dzwonkowski J. Adrenal-preserving surgery of adrenal tumours. *Endokrynol Pol.* 2015;66(1):80-96. doi: 10.5603/EP.2015.0012. PMID: 25754286.
35. Alesina PF, Hinrichs J, Meier B, Schmid KW, Neumann HP, Walz MK. Minimally invasive cortical-sparing surgery for bilateral pheochromocytomas. *Langenbecks Arch Surg.* 2012 Feb;397(2):233-8. doi: 10.1007/s00423-011-0851-2. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21935702.
36. Brauckhoff M, Nguyen Thanh P, Bär A, Dralle H. Subtotale bilaterale Adrenalektomie mit adrenokortikalem Funktionserhalt [Subtotal bilateral adrenalectomy preserving adrenocortical function]. *Chirurg.* 2003 Jul;74(7):646-51. (in German) doi: 10.1007/s00104-002-0608-0. PMID: 12883792.
37. Walz MK. Extent of adrenalectomy for adrenal neoplasm: cortical sparing (subtotal) versus total adrenalectomy. *Surg Clin North Am.* 2004 Jun;84(3):743-53. doi: 10.1016/j.suc.2004.01.003. PMID: 15145232.
38. van Heerden JA, Sizemore GW, Carney JA, Brennan MD, Sheps SG. Bilateral subtotal adrenal resection for bilateral pheochromocytomas in multiple endocrine neoplasia, type IIa: a case report. *Surgery.* 1985 Aug;98(2):363-6. PMID: 2862712.
39. Hamberger B, Telenius-Berg M, Cedermarck B, Grondal S, Hansson BG, Werner S. Subtotal adrenalectomy in multiple endocrine neoplasia type 2. *Henry Ford Hosp Med J.* 1987;35(2-3):127-8. PMID: 2891644.
40. Sasagawa I, Suzuki Y, Itoh K, Izumi T, Miura M, Suzuki H, Tomita Y. Posterior retroperitoneoscopic partial adrenalectomy: clinical experience in 47 procedures. *Eur Urol.* 2003 Apr;43(4):381-5. doi: 10.1016/s0302-2838(03)00087-3. PMID: 12667719.

Sažetak

LAPAROSKOPSKA PARCIJALNA ADRENALEKTOMIJA: SERIJA SLUČAJEVA

N. Knežević, L. Penzić, I. Milas, D. Kaštelan, T. Kulii, T. Zekulić, B. Čikić i Ž. Kaštelan

Cilj je predstaviti našu seriju slučajeva koja dokumentira indikacije, laparoskopsku tehniku, kirurške i endokrinološke ishode laparoskopske parcijalne adrenalectomije (LPA). U razdoblju od travnja 2011. do listopada 2021. godine učinili smo 39 zahvata. Bolesnici su podijeljeni u tri skupine: jednostrani tumor nadbubrežne žlijezde s normalnom kontralateralnom žlijezdom (skupina 1.), tumor solitarne nadbubrežne žlijezde (skupina 2.) i ciste nadbubrežne žlijezde (skupina 3.). U skupini 1. bilo je 20, u skupini 2. šest i u skupini 3. trinaest bolesnika. Najčešća patohistološka dijagnoza u skupini 1. bio je adenom (40%), svi tumori u skupini 2. bili su metastaze karcinoma bubrega, a sve ciste u skupini 3. su bile benigne. U cijeloj kohorti nije bilo značajnijih komplikacija (Clavien Dindov stupanj ≥ 2). Svi bolesnici u skupinama 1. i 3. imali su povoljan endokrinološki ishod, a 50% bolesnika u skupini 2. zahtijevalo je doživotnu nadomjesnu terapiju hidrokortizonom. LPA je učinkovit i siguran zahvat s povoljnim ishodima u rukama urologa s iskustvom u kirurgiji nadbubrežne žlijezde.

Ključne riječi: *Laparoskopija; Adrenalectomija; Zahvati i pošteđom organa; Minimalno invazivna kirurgija*

9. ŽIVOTOPIS

Rođen 4. travnja 1983. u Koprivnici. Osnovnu školu i Opću gimnaziju završio u Križevcima, a 2008. diplomirao na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Pripravnički staž odradio u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu, a nakon položenog državnog ispita godinu dana radio kao liječnik u HMP Vrbovec. Specijalističko usavršavanje iz urologije u Klinici za urologiju, KBC Zagreb započeo 2011., a specijalistički ispit je položio 2016. godine. Od tada radi kao specijalist urolog na Zavodu za onkološku i renovaskularnu urologiju i u Dnevnoj bolnici s jednodnevnom kirurgijom Klinike za urologiju KBC Zagreb. Subspecijalist je urološke onkologije od 2021. godine.

Godine 2020. je upisao poslijediplomski doktorski studij „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. U više navrata je sudjelovao na domaćim i međunarodnim stručnim i znanstvenim skupovima. Kao autor ili koautor do sada je objavio 3 znanstvena članka u indeksiranim časopisima. Član je Hrvatskog urološkog društva. Oženjen je i otac dvoje djece!

Popis znanstvenih radova (WoS):

Milas I, Kaštelan Ž, Petrik J, Bingulac-Popović J, Čikić B, Šribar A, et al. ABO blood type and urinary bladder cancer: phenotype, genotype, allelic association with a clinical or histological stage and recurrence rate. *Glob Med Genet* 2024;11:233-40.

Knežević N, Penezić L, Milas I, Kaštelan D, Kuliš T, Zekulić et al. Laparoscopic adrenal-sparing surgery case series: partial adrenalectomy and cyst resection. *Acta Clin Croat* 2023;62:60-7.

Karlović K, Kuliš T, Lukić I, Kolarić D, Milas I, Miškić B, et al. Scrotal thermography in the evaluation of surgical outcome after varicocele repair: a case report. *Acta Clin Croat* 2022;61:359-63.