

Received: 2013.09.18
Accepted: 2014.02.19
Published: 2014.03.20

Genetyczne i immunologiczne uwarunkowania odpowiedzi na dopęcherzową terapię BCG w raku urotelialnym pęcherza moczowego nienaciekającym błony mięśniowej

Genetic and immunologic determinants of intravesical BCG therapy in non-muscle-invasive urothelial bladder cancer

Wojciech Krajewski, Anna Kołodziej, Janusz Dembowski, Romuald Zdrojowy

Katedra i Klinika Urologii i Onkologii Urologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Streszczenie

Rak pęcherza jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych. W Polsce w 2010 r. zachorowało 6296, a zmarło 3110 osób. Immunoterapia BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) jest obecnie najskuteczniejszą terapią adiuwantową stosowaną w leczeniu tego nowotworu. Do terapii BCG kwalifikowane są zmiany nowotworowe nienaciekające mięśniówki (stadia Ta, Tis oraz T1). Terapia BCG polega na dopęcherzowym podaniu serii wlewków zawierających atenuowany szczep bakterii *Mycobacterium bovis*. Efektywność leczenia BCG w nieinwazyjnym raku pęcherza wynosi 70% 5-letnich przeżyć bez wznowy nowotworu. Leczenie zmniejsza masę guza, ale także opóźnia i/lub zapobiega nawrotowi oraz progresji. Cytokiny jako główne mediatory stanu zapalnego, odgrywają ważną rolę w patogenezie raka pęcherza, którego powstanie jest stymulowane procesem zapalnym. Terapia BCG wywołuje nasiloną odpowiedź immunologiczną i wzrost wytwarzania cytokin. Warianty genetyczne determinują międzyosobnicze różnice w zapadalności, ale także odpowiedź na terapię. Istnieją dowody, że obecność genetycznych wariantów cytokin jest skorelowana z występowaniem tego nowotworu. Uważa się, że stężenia niektórych cytokin w moczu mogą prognozować odpowiedź na terapię.

Zwiększone stężenia cytokin limfocytów Th1 – IFN- γ , IL-2 oraz TNF- α są związane z dłuższym czasem przeżycia bez wznowy nowotworu, natomiast duże stężenia cytokin limfocytów Th2, takich jak IL-10 korelują z gorszą odpowiedzią na terapię BCG.

Słowa kluczowe:

rak pęcherza • terapia BCG • cytokiny • polimorfizmy genów

Summary

Bladder cancer (BCA) is one of the most common cancers. In 2010 in Poland, 6296 people developed bladder cancer and 3110 people died of it. Immunotherapy with BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) is by far the most effective adjuvant therapy. Noninfiltrating muscle membrane changes, that is, stages Ta, Tis and T1 qualify for BCG immunotherapy. BCG immunotherapy comprises series of bladder instillations, containing attenuated strain of *Mycobacterium bovis*. The effectiveness of immunotherapy in non-invasive bladder cancer is 70% 5-year survival without recurrence of the tumor. The treatment leads to a reduction of the residual tumor mass, but also to the delay and/or prevention of relapse, disease progression and ultimately death. Cytokines, as key mediators of immune response, play an important role in the

Key words:	pathogenesis of bladder cancer, which occurrence is stimulated by the inflammatory process. BCG immunotherapy provokes an intensive immunological response by the increase of cytokine production. Genetic variants determine inter-individual differences in the incidence of this cancer, as well as the response to the therapy. This is evidenced by the presence of differences in genetic variants of cytokines correlated with the varied risk of bladder cancer incidence. It is believed that concentrations of particular cytokines in urine after installation of BCG may indicate response to the therapy. Increased levels of Th1 cytokines – IFN- γ , IL-2 and TNF- α are correlated with longer survival time without recurrence, whereas high levels of Th2 cytokines such as IL-10, predict unsuccessful BCG therapy.
	Bladder cancer • BCG therapy • cytokines • gene polymorphism
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1094714
Word count:	3969
Tables:	–
Figures:	–
References:	88

Adres autora: lek. med. Wojciech Krajewski, Katedra i Klinika Urologii i Onkologii Urologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław; e-mail: wk@softstar.pl

RAK PĘCHERZA - ETIOPATOGENEZA, DIAGNOSTYKA, LECZENIE

Rak pęcherza (bladder cancer - BC) jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych. W Polsce w 2010 r. zachorowało 6296, a zmarło 3110 osób [46]. Jest drugim pod względem zapadalności, po raku stercza nowotworem złośliwym układu moczowego [43], a częstość zachorowań wciąż rośnie. Zapadalność na raka pęcherza wzrasta z wiekiem i jest on częściej obserwowany u mężczyzn [4,21]. Prawie 90% guzów wywodzi się z nabłonka urotelialnego wyściełającego moczowody i pęcherz moczowy [5,21,43]. Pozostałe typy histopatologiczne nowotworów pęcherza, to rak płaskonabłonkowy, gruczolakorak, raki niezróżnicowane, mięsaki oraz czerniaki [21].

Etiologia raka pęcherza moczowego jest wieloczynnikowa. Jednym z najlepiej udokumentowanych czynników ryzyka jest zarówno czynne, jak i bierne palenie tytoniu. Dowiedzione znaczenie mają także przewlekłe stany zapalne błony śluzowej pęcherza, w tym te wiążące się z długim utrzymywaniem cewnika. W krajach strefy tropikalnej powstawaniu BCA sprzyja bilharczoza - zakażenie *Schistosoma haematobium* [56]. Ponadto czynnikami ryzyka są: narażenie na związki aromatyczne, stosowanie niektórych leków – np. cyklofosfamid i fenacetyny oraz przebyta radioterapia, a także zawartość metali, takich jak kadm, arsen i ołów w wodzie pitnej [4,5,21,43]. Do czynników predysponujących zaliczana jest również kamica układu moczowego [5] oraz niektóre składniki diety. Rak pęcherza moczowego może również występować rodzinie [5,21].

W patogenezie raka pęcherza moczowego istotną rolę odgrywa proces zapalenia [23,56]. Świadczy o tym m.in. częstsze występowanie nacieków zapalnych w zrębie pęcherza

u chorych na raka w porównaniu ze zdrową populacją [37]. W przebiegu różnych nowotworów środowisko cytokinowe zmienia się, pojawia się przewaga cytokin prozapalnych, czynników wzrostu i chemokin przy zmniejszonych stężeniach cytokin zaangażowanych w ochronę przeciwko nowotworowi [20]. W modelach zwierzęcych wykazano, że częstsza zapadalność na raka pęcherza wiązała się z zaburzeniami równowagi cytokin [52]. Dowody eksperymentalne wskazują, że przewlekłe zapalenie, które może indukować uszkodzenie DNA oraz modyfikować RNA, genów supresorowych i/lub onkogenów sprzyja powstaniu oraz progresji guza [5]. Proces przewlekłego zapalenia promuje także tworzenie guza przez aktywację komórkowych dróg sygnałowych [38,56]. Indukcja stresu oksydacyjnego w przebiegu zapalenia powoduje wytwarzanie nadmiaru tlenu azotu, który hamuje procesy naprawy DNA, a dodatkowo pobudza angiogenezę [84].

W patogenezie raka pęcherza uczestniczy również wiele zaburzeń procesów komórkowych. Stwierdzono, że raki agresywnie przebiegające, obarczone dużą śmiertelnością, charakteryzują się zaburzeniami szlaków p53 oraz retinoblastomy. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym o własnościach supresorowych. Jest ono zaangażowane w regulację wielu procesów komórkowych, a zwłaszcza aktywacji mechanizmów naprawy DNA i indukcji apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA [67]. Retinoblastoma, białko kodowane przez gen supresorowy *RB1*, uniemożliwia przejście komórki z uszkodzonym DNA przez fazę G1 i osiągnięcie fazy S, dzięki czemu uszkodzone geny nie są replikowane [24]. Częściej występujące raki, o mniej agresywnym przebiegu, cechują się większą skłonnością do nawrotów i charakteryzuje je aktywacja drogi RAS-MAPK (rat sarcoma virus homologue - mitogen activated protein kinase) [5].

Kryterium służącym do oceny stopnia zaawansowania raka pęcherza moczowego jest głębokość naciekania ściany. W praktyce stosuje się klasyfikację TNM (tumor, noduli, metastases). Zróżnicowanie histopatologiczne ocenia się na podstawie klasyfikacji WHO/ISUP z 2004 r. [31,58].

Głównym objawem klinicznym raka pęcherza moczowego jest obecność krwinkomoczu lub krwimoczu. Często występuje nadwrażliwość, bolesne oddawanie moczu, nawracające zakażenia układu moczowego oraz miejscowa limfadenopatia. W późniejszych stadiach rozwoju nowotworu może się pojawić przeszkoda w odpływie moczu lub palpacyjnie stwierdzany guz. U części pacjentów pierwsze objawy są spowodowane przerzutami.

Do rozpoznawania raka pęcherza stosowane są techniki endoskopowe (cystoskopia) oraz badania radiologiczne, takie jak ultrasonografia, urografia, tomografia komputerowa i tomografia rezonansu magnetycznego. W diagnostyce przydatne są również badania cytologiczne osadu moczu. Pomocne może być też oznaczanie markerów nowotworowych, takich jak antygen guza pęcherza (bladder tumor antigen - BTA), białka jądrowego matrix (nuclear matrix protein - NMP) oraz przeciwciał skierowanych przeciwko niektórym NMP, np. NMP-22 [21].

Leczenie chorych na raka pęcherza zależy od stopnia zaawansowania choroby. W przypadkach raków zaawansowanych niezbędna jest radykalna cystektomia z ewentualną chemioterapią.

W mniej zaawansowanych stadiach (Ta i T1) stosuje się przezcewkową elektroresekcję (transurethral resection of the bladder tumor - TURB) z uzupełniającym leczeniem dopęcherzowym chemioterapią i/lub immunoterapią BCG.

IMMUNOTERAPIA BCG

Immunoterapia BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) od ponad 30 lat niezmiennie pozostaje najefektywniejszym sposobem leczenia adiuwantowego w rakach pęcherza nienaciekających mięśniówki (non muscle invasive bladder cancer - NMIBC). Jak wynika z doniesień literaturowych jest to leczenie skuteczniejsze niż dopęcherzowa chemioterapia np. podawanie tiotepy i doksyrubicyny [63].

Do immunoterapii BCG kwalifikują się pacjenci, u których stwierdzane są zmiany nienaciekające błony mięśniowej, czyli w stopniu Ta (nieinwazyjny guz brodawczakowaty), Tis (carcinoma *in situ* - guzy ograniczone do nabłonka) oraz T1 (guzy naciekające *lamina propria* błony śluzowej) [21,43].

Według wytycznych EAU (European Association of Urology), a także IBCG (International Bladder Cancer Group) leczenie wlewkami BCG powinno być stosowane u pacjentów z rakami urotelialnymi pęcherza moczowego NMIBC (non-muscle invasive bladder cancer) z grupy o pośrednim i wysokim stopniu ryzyka. Grupy te obejmują nowotwory o stopniu zaawansowania TaG2/PUCALG, TaG3/PUCAHG oraz wszystkie nowotwory T1 i Tis [11].

Immunoterapia BCG polega na serii dopęcherzowych wlewk zawierających atenuowany szczep prątków gruźlicy *Mycobacterium bovis*. Mimo wielu lat stosowania tej metody nie zostały ustalone formalne standardy postępowania oraz dawki [32]. Obecnie w praktyce stosuje się dwa podstawowe schematy. Obydwa rozpoczynane są najczęściej w 14 dniu po zabiegu TURB. Opóźnienie ma na celu uniknięcie działań niepożądanych, w tym przedostawanie się prątków do krwiobiegu, co może prowadzić do rozwoju posocznicy, a także ciężkich reakcji immunologicznych. Pierwszy schemat immunoterapii BCG obejmuje sześciotygodniowy kurs indukcyjny, ewentualnie z zastosowaniem wlewk uzupełniających po półrocznej przerwie [60]. Drugi - nazywany „6+3” polega na zastosowaniu cyklu indukcyjnego składającego się z 6 cotygodniowych wlewk, a następnie kursów uzupełniających. Pierwszy z nich podawany jest po 3 miesiącach od zakończenia indukcji i obejmuje 3 cotygodniowe wlewki. Następne, podtrzymujące kursy, również złożone z 3 cotygodniowych wlewk podawane są co pół roku. W czasie całej trzyletniej terapii pacjent otrzymuje 27 wlewk BCG [48,49,50].

Immunoterapia BCG jest leczeniem dobrze tolerowanym przez większość pacjentów. W praktyce trudno jest jednak czasem rozróżnić objaw niepożądany, od związanego jeszcze ze skuteczną terapią objawu odpowiedzi immunologicznej. Po leczeniu często pojawiają się częstomocz, krwimocz, dysuria oraz objawy ogólne: stany podgorączkowe lub gorączka, uczucie rozbicia, osłabienia, wysypka, bóle stawów, zapalenie spojówek. Zdarzają się też cięższe powikłania, takie jak zapalenie najądrza, stercza, wątroby, płuc, kości, ropnie gruźlicze oraz posocznica i niewydolność wielonarządowa wymagające terapii tuberkulostatykami. Objawy niepożądane są zwykle dobrze tolerowane przez chorych. Badania przeprowadzone w ostatnim dziesięcioleciu wskazują, że najcięższe objawy, często wymagające przerwania leczenia zdarzają się, nie jak uprzednio sądzono, podczas terapii podtrzymującej, ale w czasie pierwszego cyklu inicjującego i pierwszego półrocza leczenia [43,44,82]. Bez względu na przeciwwskazania do leczenia BCG są czynna gruźlica oraz zaburzenia odporności (dotyczy to także pacjentów poddawanych immunosupresji lub chemioterapii systemowej).

Celem immunoterapii jest usunięcie zmian nowotworowych, które mogły pozostać po zabiegu TURB - zmniejszenia masy resztkowego guza, zapobieganie nawrotowi i progresji choroby.

Mechanizm działania terapii BCG nie jest całkowicie wyjaśniony. Udowodniono, że zasadnicze znaczenie ma uruchomienie miejscowej reakcji immunologicznej. Prątki gruźlicze, po wnikięciu do światła zdrowych komórek nabłonka, jak i komórek nowotworowych, indukują reakcję zapalną.

Podane dopęcherzowo żywe bakterie masowo przywierają do komórek nabłonka pęcherza. W zjawisku tym uczestniczy fibronektyna, glikoproteina adhezyjna, występująca szczególnie obficie na powierzchni komórek nabłonka uszkodzonego podczas wcześniejszych zabiegów TURB.

Podanie przeciwciał antyfibronektynowych hamuje przyleganie BCG do ściany pęcherza co wykazano w modelach doświadczalnych [40].

Następnie kompleksy fibronektyna-BCG ulegają internalizacji. Antygeny sfagocytowanych prątków po przetworzeniu i zaprezentowaniu na powierzchni nabłonka urotelialnego komórek guza, a także komórek prezentujących antygen są rozpoznawane swoiście przez limfocyty T CD4⁺ (BCG-specific CD4⁺ T cells). Badania eksperymentalne dowodzą ważnej roli limfocytów T CD4⁺ w odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wykazano, że deplecja tych komórek skraca czas przeżycia bez nawrotu [23,25].

W wyniku rozpoznania antygeny przez limfocyty T CD4⁺, pod wpływem terapii BCG, inicjowana jest głównie odpowiedź immunologiczna typu Th1, z wytwarzaniem interleukin 2 i 12, IFN- γ i TNF- β . Dochodzi do aktywacji limfocytów cytotoksycznych, makrofagów i komórek NK, a w konsekwencji do nasilonej odpowiedzi immunologicznej i eradykacji guza [88]. Jednocześnie, choć w mniejszym stopniu aktywowana jest odpowiedź Th2, co wiąże się ze zwiększonym wytwarzaniem cytokin IL-4, -5, -6, -10 oraz IL-13 [88]. Indukcji ulega wytwarzanie chemokin, w tym IL-8, a także zwiększa się ekspresja molekuł adhezyjnych [42]. Wykazano, że IL-8 wydzielana przez komórki nabłonka pod wpływem BCG stymuluje rekrutację granulocytów wielojądrowych i powoduje ich masowy napływ do pęcherza. Oceniono, że po podaniu wlewki BCG stanowią one 75% wszystkich leukocytów. Dowodzi to ich istotnej roli w odpowiedzi na terapię BCG. Leukocyty wydzielane są do moczu, a wielkość leukocyturii, choć nie jest to objaw swoisty, pozytywnie koreluje z dobrą odpowiedzią na terapię BCG [71]. Doniesienia literaturowe wskazują, że przed leczeniem BCG, w okolicy guza stwierdza się mniejszą liczbę makrofagów niż w zdrowej ścianie pęcherza. Terapię BCG normalizuje liczbę makrofagów, rośnie też liczba limfocytów pomocniczych, limfocytów B, komórek NK i komórek dendrytycznych. Nasila się ekspresja antygenów zgodności tkankowej klasy I, molekuł adhezyjnych i kostymulujących na komórkach immunologicznie kompetentnych [70].

Wzmocnienie lokalnej odpowiedzi immunologicznej w świetle pęcherza po wlewkach BCG może wynikać z długotrwałej obecności DNA BCG w komórkach rakowych, a także z trwającego nawet 2 lata okresu zwiększenia ekspresji MHC klasy II w komórkach nabłonka urotelialnego [30].

Jak wykazują badania kliniczne w moczu pacjentów po terapii BCG wzrasta stężenie cytokin, m.in. TNF- α , IFN- γ , IL-1, -2, -5, -6, -8, -10 i -12 oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (granulocyte colony stimulating factor - G-CSF) [1,42]. Większość z tych cytokin zaangażowanych jest w komórkową odpowiedź przeciwnowotworową.

Aktywacja odpowiedzi immunologicznej prowadzi do reakcji cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych, w której udział biorą przede wszystkim komórki NK (natural killers). Dostępne są doniesienia opisujące subpopulację aktywowanych komórek NK swoistych tylko dla terapii BCG

nazywanych komórkami BAK (BCG activated killer cells). Komórki te przez wytwarzanie perforyn uszkodzających ścianę komórki nowotworowej uruchamiają mitochondrialny szlak apoptozy niezależnie od mechanizmów apoptozy związanych z TRIAL czy Fas [19]. Udowodniono również aktywację apoptozy bezpośrednio przez receptory Fas i TRIAL [53,55,65]. Dowiedzono także, że w komórkach nowotworowych poddanych ekspozycji na szczepionkę BCG następuje zwiększona ekspresja antygenów zgodności tkankowej (MHC I i II), co umożliwia ich rozpoznanie i eliminację przez limfocyty cytotoksyczne [5].

Ponieważ zwiększenie wytwarzania cytokin, głównie Th1, stanowi istotny element mechanizmu działania BCG, podejmowane są próby łączenia terapii BCG z dopęcherzowym podawaniem cytokin w celu osiągnięcia większej skuteczności, przy mniejszej liczbie działań niepożądanych. Po pozytywnych wynikach badań doświadczalnych pierwsze kliniczne sukcesy pojawiły się po zastosowaniu IFN- γ i IL-12 [54,77,86]. W ostatnich latach wiele cytokin, w tym interferony α , β i γ , TNF- α , IL-2, -3, -4, -6 i -12, GM-CSF testowano w badaniach klinicznych, ale jedynie IL-2, IFN- α i TNF- α zarejestrowano w Europie i USA do immunoterapii nowotworów [13]. Nadal trwają badania z zastosowaniem kombinacji IL-15 i -21 [34].

Próby wykorzystania metod alternatywnych dla szczepionki BCG, takich jak zastosowanie komponentów bakteryjnych lub bakterii modyfikowanych genetycznie nie powiodły się. Wstępne wyniki były obiecujące, jednak w toku badań okazało się, że żywotność bakterii, a także aktywne zakażenie mają podstawowe znaczenie w indukowaniu efektywnej odpowiedzi immunologicznej w tym leczeniu [5].

CZYNNIKI ROKOWNICZE W TERAPII BCG

Guzy pęcherza są potencjalnie śmiertelne, dlatego identyfikacja pacjentów kwalifikujących się do terapii BCG oraz takich, którym bezwzględnie należy wykonać cystektomię ma podstawowe znaczenie. Wiadomo, że wywiad rodzinny raka pęcherza, starszy wiek, współwystępowanie nowotworu ograniczonego do nabłonka (carcinoma *in situ*), mnogie guzy, duży rozmiar guza, czy wreszcie guzy niskorzędnościowe (high grade tumors) wiążą się z większym ryzykiem nawrotu i progresji [88]. Istnieją jednak także doniesienia, niepotwierdzające tych zależności [72], co oznacza, że dostępne obecnie parametry kliniczno-patologiczne nie identyfikują pacjentów w sposób dostatecznie swoisty. Trwa poszukiwanie wczesnych markerów skuteczności leczenia, dzięki którym możliwe będzie zastosowanie najbardziej efektywnej i najmniej okaleczającej terapii.

Skuteczność immunoterapii w raku pęcherza nienaciekającym mięśniówki wynosi 70% 5-letnich przeżyć bez wznowy nowotworu i nie u wszystkich pacjentów reakcja na zastosowane leczenie jest zadowalająca. U części chorych nie stwierdza się odpowiedzi na leczenie, pojawiają się nawroty, dochodzi do nacieczenia mięśniówki i powstają przerzuty. Na brak skuteczności leczenia mogą mieć wpływ m.in. niecałkowite usunięcie guza podczas zabiegu przezcewkowej

elektroresekcji, ale także odstępstwa od obowiązującego harmonogramu wlewek, wynikające np. z wystąpienia objawów niepożądanych [88].

Czynniki rokownicze dla terapii BCG mogą być rozpatrywane w różnych punktach czasowych. Po pierwsze, przed leczeniem, oznaczane są m.in. zarówno we krwi, jak i w moczu, a także w tkankach guza ekspresja p53, Ki-67, retinoblastoma, ezriny oraz profil ekspresji genów guza.

Ocena efektywności odpowiedzi immunologicznej podczas terapii obejmuje liczbę komórek dendrytycznych, granulocytów wielojądrzastych, stężenia interelukin 2, 8, 18, a także TRAIL [88].

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się genetycznym uwarunkowaniom osobniczej odpowiedzi na terapię BCG. W tym celu badane były przede wszystkim polimorfizmy genów kodujących cytokiny, a także genów należących do szlaku apoptozy oraz szlaku naprawy DNA. Metaanaliza opublikowanych w ciągu ostatnich 25 lat badań wykazała jednak, że żaden z ocenianych wskaźników nie jest niezależnym czynnikiem predykcyjnym powodzenia terapii BCG [88].

Reakcja zapalna będąca wynikiem działania szczepionki BCG, jest częścią nie do końca poznanego procesu prowadzącego do eradykacji guza. Wartość niektórych stosowanych obecnie wskaźników związanych z procesem zapalnym została opisana na niedużych grupach pacjentów, dlatego potrzebne są badania potwierdzające. Jednym z tych wskaźników jest duża liczba komórek dendrytycznych w moczu, pozytywnie skorelowana z dobrym wynikiem leczenia. Duża liczba makrofagów naciekających guz (tumor infiltrating macrophages - TAMs) jest niekorzystnym markerem rokowniczym w terapii BCG, przeciwnie niż w większości nowotworów, gdzie obecność makrofagów wiąże się z dobrą prognozą [9].

ZNACZENIE CYTOKIN I ICH UWARUNKOWANIA GENETYCZNEGO JAKO MARKERÓW PROGNOSTYCZNYCH ROZWOJU RAKA PĘCHERZA I ODPOWIEDZI NA TERAPIĘ BCG

Cytokiny to główne mediatory procesu zapalnego stanowiącego element patogenezy raka pęcherza, a zaburzenia równowagi cytokin sprzyjają jego rozwojowi [52]. Wiadomo także, że istnieje związek między indukcją wytwarzania cytokin i odpowiedzią na immunoterapię BCG [27].

Międzyosobnicze różnice w ekspresji cytokin będące skutkiem różnych wariantów genetycznych mogą modyfikować zarówno zapadalność na raka pęcherza, jak i sposób odpowiedzi na stosowane leczenie, na co dowodem są m.in. różnice genetycznych wariantów cytokin korelujące z różnym ryzykiem rozwoju tego nowotworu [5].

Podobnie jak w innych nowotworach litych, w przebiegu raka pęcherza wytwarza się stan niedoboru odpowiedzi immunologicznej typu Th1 skierowanej przeciwko nowotworowi, natomiast stężenie cytokin Th2 jest podwyższone [1,2]. Z tego powodu polimorfizmy genetyczne białek szla-

ków metabolicznych regulujących syntezę cytokin, które zmieniają równowagę Th1/Th2 są szczególnie ważne z punktu widzenia patogenezy.

Rodzina IL-1 odgrywa główną rolę immunoregulacyjną. Razem z innymi cytokinami prozapalnymi, takimi jak TNF- α , uczestniczy w przekazywaniu sygnałów przez aktywowanie czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach nowotworu [8,11]. Jak wynika z danych literaturowych polimorfizm typu zmiennej liczby tandemowych powtórzeń (variable number tandem repeats – VNTR) genu kodującego IL-1Ra o działaniu przeciwzapalnym jest związany z ryzykiem zachorowania na raka pęcherza [15].

Interleukina 2 – wydzielana przez aktywowane limfocyty T CD4⁺ jest cytokiną zapalną odpowiedzi Th1, pobudzającą wzrost i różnicowanie limfocytów cytotoksycznych. Ukazały się publikacje, w których wykazano, że duże stężenie IL-2 w moczu po podaniu BCG jest związane z dłuższym czasem przeżycia bez nawrotu choroby [83], a zwiększona ekspresja genu IL-2 w jednojądrzastych komórkach z krwi obwodowej jest niezależnym czynnikiem rokowniczym terapii BCG [39]. Jednak, jak wynika z doniesień, przedłużone podawanie BCG u niektórych pacjentów, po wstępnym okresie nadmiernego wytwarzania IL-2, prowadzi do aktywowania niekorzystnej w tym wypadku odpowiedzi Th2 ze zwiększeniem ekspresji IL-10. Wskazuje to, że część pacjentów nie odnosi korzyści z przedłużania leczenia BCG, a badanie stężenia IL-2 i -10 w moczu może być pomocne w identyfikacji tej grupy chorych [69].

Interleukina 4 to podstawowa cytokina funkcjonująca jako autokryny czynnik różnicowania komórek Th2, indukująca aktywację i różnicowanie limfocytów B. Podobnie jak inne cytokiny typu Th2 – IL-6 i IL-10 – IL-4 aktywizuje wytwarzanie przeciwciał. IL-4 antagonizuje dodatkowo aktywujący makrofagi działanie IFN- γ i hamuje komórkową odpowiedź immunologiczną, co sprzyja rozwojowi nowotworu [45]. Jak potwierdzono w wielu badaniach u pacjentów z rakiem pęcherza stwierdzone są wysokie stężenia tej cytokiny w moczu [13]. Wykazano również znaczenie tej cytokiny w patomechanizmie odpowiedzi na terapię BCG. Badania genetycznego uwarunkowania odpowiedzi na szczepionkę BCG wskazują, że genotyp (-1098 GG) IL-4 jest związany z brakiem odpowiedzi na leczenie [13].

Interleukina 8 jest wydzielana przez aktywowane makrofagi i rekrutuje oraz aktywuje granulocyty wielojądrzaste. W moczu pojawia się jako jedna z pierwszych po podaniu wlewek BCG, a wysoka ekspresja tej cytokiny jest związana z lepszą odpowiedzią na terapię BCG. Duże stężenia tej interleukiny w 6 godzin po podaniu BCG wiązały się z dłuższym czasem przeżycia bez nawrotu choroby, ale kryteria różniły się znacznie w poszczególnych badaniach [47,66,68,80]. Wykazano natomiast związek polimorfizmu IL-8 (-251A/T) z mniejszym ryzykiem nawrotu po terapii BCG [7].

Aktywowane przez BCG makrofagi wydzielają także IL-18, która następnie aktywuje komórki NK i limfocyty cytotoksyczne. Duże stężenia IL-18 w moczu w 12 godzin po poda-

niu BCG prognozowały dłuższy czas przeżycia bez nawrotu choroby [81].

Interleukina 10, podobnie jak IL-4, jest cytokiną przeciwzapalną, ale także czynnikiem proliferacji limfocytów B. Uczestniczy w procesach autoimmunologicznych i tolerancji transplantacyjnej. Osłabia prezentację antygenów guza przez spadek ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy I i II. Wpływa ponadto na regulację apoptozy zależnej od szlaku Fas/FasL. Interleukina 10 hamuje także wytwarzanie IFN- γ przez komórki NK, T CD4⁺ i CD8⁺ [59]. Jak wynika z doniesień literaturowych do aktywacji komórek BAK uczestniczących w lizie guza wymagane są IFN- γ , IL-2 i -12 [17,18]. Zmniejszenie wydzielania IFN- γ regulowane przez IL-10 osłabia efektywność terapii BCG.

Zwiększona ekspresja IL-10 hamuje też wytwarzanie TNF- α – cytokiny odgrywającej główną rolę w odpowiedzi Th1 [61] i w konsekwencji zmniejsza efektywność leczenia BCG. Badania nad związkiem polimorfizmów genu IL-10 z odpowiedzią na terapię BCG wykazały, że genotyp (-1082GG) i genotyp GCC IL-10 (-1082A/G, -819C/T i -592C/A) GCC/GCC – związane ze zwiększonym wytwarzaniem IL10 wiążą się z brakiem odpowiedzi na szczepionkę BCG [13].

Interleukina 6 należy do prozapalnych cytokin wydzielanych przez makrofagi i limfocyty T. Jej wpływ na rozwój różnych komórek raka może być odmienny – zwiększający lub hamujący proliferację. W układzie moczowo-płciowym funkcjonuje jako autokryny czynnik wzrostu komórek raka nerki i stercza. Wyniki badań dotyczące wpływu polimorfizmu tej cytokiny na rokowanie w raku pęcherza są przeciwstawne w różnych populacjach. Genotyp IL-6 (-174C/C) u rasy kaukaskiej wiązał się ze zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby [51], przeciwnie niż w populacji północno-indyjskiej, gdzie był związany z dłuższym czasem wolnym od nawrotu choroby (recurrence free survival - RFS) [4].

TNF- α jest jednym z najważniejszych mediatorów stanu zapalnego i uczestniczy we wszystkich stadiach rozwoju nowotworu - transformacji komórkowej, promocji, proliferacji, inwazji, angiogenezie oraz powstawaniu przerzutów [74,78]. Dodatkowo komórki nowotworu autokrynnie wydzielają TNF- α , co zwiększa ekspresję czynników wzrostowych, takich jak TGF- α (transforming growth factor alpha) czy receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor - EGFR) [73]. Dowiedziono, że istnieje związek genetycznych wariantów TNF- α z ryzykiem zachorowania na wiele nowotworów [57,64], ale nie wykazano takiej zależności dla raka pęcherza. TNF- α - cytokina aktywująca makrofagi to jedna z ważniejszych cytokin Th1 wydzielana w odpowiedzi na terapię BCG. W ciągu 24 godzin po dopęcherzowym podaniu BCG istotnie wzrasta sekrecja tego czynnika w moczu pacjentów. Zwiększone wytwarzanie TNF- α związane z genotypem CC (T-1031C) zmniejsza ryzyko nawrotu po terapii BCG [6], a poziom sekrecji związany jest z efektywnością leczenia [14].

TGF- β to czynnik ułatwiający inwazję komórek nowotworowych w ścianie pęcherza przez nasilenia różnicowania

fibroblastów do miofibroblastów [28,79]. Do parakrynnych działań TGF- β 1 należy także stymulacja angiogenezy [35]. W wielu komórkach działa on jak hamujący czynnik wzrostu i wpływa na wytwarzanie macierzy pozakomórkowej i immunosupresję. Jest zewnątrzkomórkowym ligandem wiążącym receptory inicjując sygnały regulujące wzrost, różnicowanie i apoptozę [12]. Wykazano, że TGF- β 1 ma zdolność hamowania ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy I, ICAM-1, kostymulującej molekuly B7 na komórkach prezentujących antygen [85]. TGF- β 1 pełni również istotną rolę w odpowiedzi na BCG. Indukowanie wytwarzania IgA przez TGF- β 1 zwiększa tzw. „śluzówkową obronę” a przez to zmniejsza skuteczność terapii BCG [16]. Wykazano również, że TGF- β 1 hamuje wytwarzanie TNF- α przez komórki stymulowane BCG. Badanie wpływu polimorfizmu genu TGF- β 1 wykazało, że genotyp TGF- β 1 (codon 25G/G) wiąże się z brakiem odpowiedzi na terapię BCG, a genotyp (+28T/T) zwiększający syntezę białka, z lepszą odpowiedzią na leczenie [3,13].

Wskaźniki wewnątrzkomórkowe

Do markerów cyklu komórkowego należy m.in. ezryna, białko zaangażowane w takie procesy, jak przeżycie komórki, adhezja i migracja. Odgrywa ono również kluczową rolę w regulowaniu adhezji i polaryzacji komórek. Małe stężenia ezryny wiążą się z większym ryzykiem naciekania błony mięśniowej i złym rokowaniem [22,36]. Można więc uznać, że ten wskaźnik identyfikuje pacjentów wymagających agresywniejszej terapii niż BCG.

Do tej grupy wskaźników zaliczane jest też p53, białko supresorowe cyklu komórkowego oraz indukujące apoptozę w odpowiedzi na uszkodzenie DNA i inne czynniki stresu komórkowego. Niestety dowody na użyteczność tego wskaźnika w ocenie przewidywania odpowiedzi na leczenie BCG są w literaturze sprzeczne [33,62]. Ki-67 - marker proliferacji komórkowej to kolejny wskaźnik, dla którego wyniki badań oceniających jego przydatność też okazały się przeciwstawne [62,87]. Badania innego wskaźnika - retinoblastoma mają charakter wstępny i chociaż są obiecujące, wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach klinicznych [22].

Karcynogeneza jest złożonym procesem, dlatego logiczne wydaje się, że do oceny rokowania ryzyka zachorowania, a także potencjalnej odpowiedzi na leczenie powinno się używać zestawu wskaźników, np. białek supresorowych guza. Niedawno podjęto próbę zbadania jednoczasowej ekspresji p53 i retinoblastoma w rakach powierzchniowych pęcherza po zastosowaniu łącznej terapii BCG i IFN- α . Badany zestaw wskaźników nie spełnił jednak pokładanych w nim nadziei [33].

Ligand czynnika martwicy nowotworów wywołującego apoptozę (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand - TRAIL) jest prezentowany na błonie komórkowej, ale występuje także w postaci rozpuszczalnej. Sugeruje się, że właściwości przeciwnowotworowe granulocytów obojętnochnych są związane z jego uwalnianiem [76]. Wyniki badań dotyczących znaczenia TRAIL jako czynnika ryzyka

są obiecujące i wydaje się, że czynnik ten powinien być brany pod uwagę jako potencjalny wskaźnik odpowiedzi na leczenie BCG [26,53].

Polimorfizmy innych genów

Polimorfizmy genetyczne wpływają na podatność na zachorowanie na raka pęcherza, wrażliwość na toksyny, w tym palenie papierosów i stanowią klucz do tzw. personalizowanej medycyny. Zmiana ekspresji genów, która może być wynikiem polimorfizmu, wpływa także na odpowiedź na terapię BCG [88].

Poza polimorfizmami genów cytokin istotne dla rozwoju raka pęcherza i powodzenia terapii są polimorfizmy genów odpowiedzialnych za naprawę przez wycięcie nukleotydu (nucleotide excision repair - NER). Jest to mechanizm naprawy DNA mający na celu usuwanie uszkodzeń DNA spowodowanych czynnikami chemicznymi lub fizycznymi. W mechanizmie NER uczestniczą takie białka jak XPA, XPC, TFIIH: XPB, helikazy, XPG, ERCC2 i ERCC6, polimeraza DNA δ lub ϵ i ligaza. Mechanizm NER usuwa uszkodzenia DNA zniekształcające strukturę podwójnej helisy. Ważną rolę tego mechanizmu u człowieka potwierdzają takie choroby genetyczne, jak *xeroderma pigmentosum*, spowodowana mutacjami w genach kodujących XPA-XPG. Polimorfizmy białek XPA, XPC, ERCC2 i ERCC6 są związane z krótszym czasem bez wznowy raka pęcherza po leczeniu BCG. Badań określających potencjalny panel alleli, który charakteryzowałby rodzaj odpowiedzi na terapię BCG jest na razie niewiele i wymagają walidacji [88].

Makrofagowe białko 1 związane naturalną odpornością (natural resistance-associated macrophage protein 1 – NRAM), kodowane przez gen *SLC11A1* kontroluje odpowiedź na leczenie BCG wpływając na wewnątrzkomórkową proliferację prątków i odpowiedź zapalną makrofagów. Wykazano, że polimorfizmy zlokalizowane w obrębie genu *SLC11A1* korelują z czasem wolnym od nawrotu choroby po leczeniu BCG [29].

Polimorfizmy typu SNP genów kodujących PPARG (peroxisome proliferator-activated receptor γ) były związane ze zmniejszonym ryzykiem nawrotu u nieleczonych pacjentów [51].

PÍSMIENICTWO

- [1] Agarwal A., Agrawal U., Verma S., Mohanty N.K., Saxena S.: Serum Th1 and Th2 cytokine balance in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder pre- and post-intravesical combination immunotherapy. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2010; 32: 348-356
- [2] Agarwal A., Verma S., Burra U., Murthy N.S., Mohanty N.K., Saxena S.: Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006; 55: 734-743
- [3] Ahirwar D.K., Agrahari A., Mandhani A., Mittal R.D.: Cytokine gene polymorphisms are associated with risk of urinary bladder cancer and recurrence after BCG immunotherapy. *Biomarkers*, 2009; 14: 213-218

PODSUMOWANIE

Na leczenie immunomodulujące BCG nie odpowiada prawie 30-35% zakwalifikowanych pacjentów. Tych niepowodzeń nie da się wytłumaczyć jedynie czynnikami środowiskowymi - różnicami w stylu życia, wieku pacjentów, *compliance* czy wpływem dodatkowego leczenia. Polimorfizmy genów zmieniające ekspresję białek mogą wpływać na genetycznie uwarunkowaną skłonność do zapadania na różne choroby, w tym również raka pęcherza oraz na indywidualny przebieg schorzenia. Ich identyfikacja pozwala na optymalizację terapii i zastosowanie leczenia przeciwnowotworowego, którego siła oparta o testy identyfikujące ryzyko, zmniejsza liczbę niepowodzeń terapeutycznych [41].

Mechanizmy przeciwnowotworowego działania prątków nie są dokładnie poznane, ale z pewnością znaczenie ma miejscowa nieswoista reakcja immunologiczna, w przebiegu której dochodzi do aktywacji komórek immunologicznie kompetentnych i wytwarzania cytokin. Określenie cech genetycznych pacjenta może ułatwić klinicyście przewidywanie odpowiedzi na terapię i zastosowanie tzw. personalizowanej medycyny (tailored therapy). Wiedza na temat znaczenia genetycznych wariantów w molekularnych i komórkowych mechanizmach immunoterapii BCG jest ciągle niewystarczająca, a dostępne publikacje są nieliczne i dotyczą w większości jednej populacji – północno-indyjskiej. Do potwierdzenia znaczenia genetycznego zróżnicowania cytokin w raku pęcherza potrzebne są badania w innych grupach etnicznych.

Uważa się obecnie, że stężenia poszczególnych cytokin w moczu po wdrożeniu BCG mogą być czynnikiem rokowniczym odpowiedzi na terapię. Wyższe stężenia cytokin Th1 – IFN- γ , IL-2 i TNF- α są związane z dłuższym przeżyciem bez nawrotu choroby, natomiast wysokie stężenia cytokin Th2, takich jak IL-10, prognozują nieskuteczność leczenia BCG [75].

Najbardziej użytecznym markerem w immunoterapii w raku pęcherza wydają się stężenia IL-2 w moczu. Jej wysokie stężenia po terapii BCG są skorelowane z dobrym wynikiem.

Obiecujące są również wskaźniki, takie jak ezryna, ale wymaga to potwierdzenia w dalszych badaniach.

- [4] Ahirwar D., Kesarwani P., Manchanda P.K., Mandhani A., Mittal R.D.: Anti- and proinflammatory cytokine gene polymorphism and genetic predisposition: association with smoking, tumor stage and grade, and bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2008; 184: 1-8
- [5] Ahirwar D.K., Manchanda P.K., Mittal R.D., Bid H.K.: BCG response prediction with cytokine gene variants and bladder cancer: where we are? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2011; 137: 1729-1738
- [6] Ahirwar D.K., Mandhani A., Dharaskar A., Kesarwani P., Mittal R.D.: Association of tumour necrosis factor- α gene (T-1031C, C-863A, and C-857T) polymorphisms with bladder cancer susceptibility and outcome after bacille Calmette-Guérin immunotherapy. *BJU Int.*, 2009; 104: 867-873

- [7] Ahirwar D.K., Mandhani A., Mittal R.D.: IL-8 -251 T > A polymorphism is associated with bladder cancer susceptibility and outcome after BCG immunotherapy in a northern Indian cohort. *Arch. Med. Res.*, 2010; 41: 97-103
- [8] Arend W.P., Malyak M., Guthridge C.J., Gabay C.: Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998; 16: 27-55
- [9] Ayari C., LaRue H., Hovington H., Decobert M., Harel F., Bergeron A., Tetu B., Lacombe L., Fradet Y.: Bladder tumor infiltrating mature dendritic cells and macrophages as predictors of response to bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Eur. Urol.*, 2009; 55: 1386-1395
- [10] Babjuk M., Burger M.: Guidelines on non-muscle invasive bladder cancer. European Association of Urology, 2013 edition.
- [11] Balkwill F., Charles K.A., Mantovani A.: Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 2005; 7: 211-217
- [12] Banu N., Mozes M.M., Kopp J.B., Ziyadeh F.N., Meyers C.M.: Regulation of inducible class II MHC, costimulatory molecules, and cytokine expression in TGF- β 1 knockout renal epithelial cells: effect of exogenous TGF- β 1. *Exp. Nephrol.*, 2002; 10: 320-331
- [13] Basturk B., Yavascaoglu I., Oral B., Göral G., Oktay B.: Cytokine gene polymorphisms can alter the effect of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy. *Cytokine*, 2006; 35: 1-5
- [14] Bekker L.G., Freeman S., Murray P.J., Ryffel B., Kaplan G.: TNF- α controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *J. Immunol.*, 2001; 166: 6728-6734
- [15] Bid H.K., Manchanda P.K., Mittal R.D.: Association of interleukin-1Ra gene polymorphism in patients with bladder cancer: case control study from North India. *Urology*, 2006; 67: 1099-1104
- [16] Biet F., Kremer L., Wolowczuk I., Delacre M., Lochet C.: Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing the cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.*, 2003; 71: 2933-2937
- [17] Böhle A., Thanhäuser A., Ulmer A.J., Ernst M., Flad H.D., Jocham D.: Dissecting the immunobiological effects of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) *in vitro*: evidence of a distinct BCG-activated killer (BAK) cell phenomenon. *J. Urol.*, 1993; 150: 1932-1937
- [18] Böhle A., Thanhäuser A., Ulmer A.J., Mattern T., Ernst M., Flad H.D., Jocham D.: On the mode of action of intravesical bacillus Calmette-Guerin: *in vitro* characterization of BCG-activated killer cells. *Urol. Res.*, 1994; 22: 185-190
- [19] Brandau S., Böhle A.: Activation of natural killer cells by Bacillus Calmette-Guérin. *Eur. Urol.*, 2001; 39: 518-524
- [20] Burke F., Relf M., Negus R., Balkwill F.: A cytokine profile of normal and malignant ovary. *Cytokine*, 1996; 8: 578-585
- [21] Campbell-Walsh Urology, 10th Edition, Philadelphia, Elsevier, 2012
- [22] Cormio L., Tolve I., Annese P., Saracino A., Zamparese R., Sanguedolce F., Bufo P., Battaglia M., Selvaggi F.P., Carrieri G.: Altered p53 and pRb expression is predictive of response to BCG treatment in T1G3 bladder cancer. *Anticancer Res.*, 2009; 29: 4201-4204
- [23] Coussens L.M., Werb Z.: Inflammation and cancer. *Nature*, 2002; 420: 860-867
- [24] Das S.K., Hashimoto T., Shimizu K., Yoshida T., Sakai T., Sowa Y., Komoto A., Kanazawa K.: Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; 1726: 328-335
- [25] De Boer E.C., De Jong W.H., Van der Meijden A.P., Steerenberg P.A., Witjes J.A., Vegt P.D., Debruyne F.M., Ruitenberg E.J.: Presence of activated lymphocytes in the urine of patients with superficial bladder cancer after intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1991; 33: 411-416
- [26] De Boer E.C., Rooijackers S.J., Schamhart D.H., Kurth K.H.: Cytokine gene expression in a mouse model: the first instillations with viable bacillus Calmette-Guerin determine the succeeding Th1 response. *J. Urol.*, 2003; 170: 2004-2008
- [27] de Reijke T.M., de Boer E.C., Kurth K.H., Schamhart D.H.: Urinary cytokines during intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: processing, stability and prognostic value. *J. Urol.*, 1996; 155: 477-482
- [28] De Wever O., Mareel M.: Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J. Pathol.*, 2003; 200: 429-447
- [29] Decobert M., Larue H., Bergeron A., Harel F., Pfister C., Rousseau F., Lacombe L., Fradet Y.: Polymorphisms of the human NRAMP1 gene are associated with response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J. Urol.*, 2006; 175: 1506-1511
- [30] Durek C., Richter E., Basteck A., Rüscher-Gerdes S., Gerdes J., Jocham D., Böhle A.: The fate of bacillus Calmette-Guerin after intravesical instillation. *J. Urol.*, 2001; 165: 1765-1768
- [31] Eble J., Sauter G., Epstein J., Sesterhenn I.: *Patology and Genetics of Tumor of the Urinary System and Male Genital Organs*, IARC Press, Lyon, 2004
- [32] Ehdaie B., Sylvester R., Herr H.W.: Maintenance bacillus Calmette-Guérin treatment of non-muscle-invasive bladder cancer: a critical evaluation of the evidence. *Eur. Urol.*, 2013; 64: 579-585
- [33] Esuvaranathan K., Chiong E., Thamboo T.P., Chan Y.H., Kamaraj R., Mahendran R., Teh M.: Predictive value of p53 and pRb expression in superficial bladder cancer patients treated with BCG and interferon-alpha. *Cancer*, 2007; 109: 1097-1105
- [34] Ganesan P.L., Alexander S.I., Watson D., Logan G.J., Zhang G.Y., Alexander I.E.: Robust anti-tumor immunity and memory in Rag-1-deficient mice following adoptive transfer of cytokine-primed splenocytes and tumor CD80 expression. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007; 56: 1955-1965
- [35] Goggins M., Shekher M., Turnacioglu K., Yeo C.J., Hruban R.H., Kern S.E.: Genetic alterations of the transforming growth factor β receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 1998; 58: 5329-5332
- [36] Grau L., Luque-García J.L., González-Peramato P., Theodorescu D., Palou J., Fernandez-Gomez J.M., Sánchez-Carbayo M.: A quantitative proteomic analysis uncovers the relevance of CUL3 in bladder cancer aggressiveness. *PLoS One*, 2013; 8: e53328
- [37] Groah S.L., Weitzenkamp D.A., Lammertse D.P., Whiteneck G.G., Lezotte D.C., Hamman R.F.: Excess risk of bladder cancer in spinal cord injury: evidence for an association between indwelling catheter use and bladder cancer. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 2002; 83: 346-351
- [38] Hussain S.P., Hofseth L.J., Harris C.C.: Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 276-285
- [39] Kaempfer R., Gerez L., Farbstein H., Madar L., Hirschman O., Nussinovich R., Shapiro A.: Prediction of response to treatment in superficial bladder carcinoma through pattern of interleukin-2 gene expression. *J. Clin. Oncol.*, 1996; 14: 1778-1786
- [40] Kavoussi L.R., Brown E.J., Ritchey J.K., Ratliff T.L.: Fibronectin-mediated Calmette-Guerin bacillus attachment to murine bladder mucosa. Requirement for the expression of an antitumor response. *J. Clin. Invest.*, 1990; 85: 62-67
- [41] Kim Y.J., Ha Y.S., Kim S.K., Yoon H.Y., Lym M.S., Kim M.J., Moon S.K., Choi Y.H., Kim W.J.: Gene signatures for the prediction of response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in primary pT1 bladder cancers. *Clin. Cancer Res.*, 2010; 16: 2131-2137
- [42] Kitamura H., Tsukamoto T.: Immunotherapy for urothelial carcinoma: current status and perspectives. *Cancers*, 2011; 3: 3055-3072
- [43] Kołodziej A.: Immunoterapia BCG raków pęcherza moczowego z uwzględnieniem własnego systemu czynników rokowniczych –

Rozprawa na stopień doktora habilitowanego, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, 2007

- [44] Kolodziej A., Dembowski J., Zdrojowy R., Wozniak P., Lorenz J.: Treatment of high-risk superficial bladder cancer with maintenance bacille Calmette-Guérin therapy: preliminary results. *BJU Int.*, 2002; 89: 620-622
- [45] Konwar R., Chaudhary P., Kumar S., Mishra D., Chattopadhyay N., Bid H.K.: Breast cancer risk associated with polymorphisms of IL-1RN and IL-4 gene in Indian women. *Oncol. Res.*, 2009; 17: 367-372
- [46] Krajowa Baza Danych Nowotworowych, Centrum Onkologii – instytut w Warszawie. <http://85.128.14.124/krn> (19.10.2013)
- [47] Kumar A., Dubey D., Bansal P., Mandhani A., Naik S.: Urinary interleukin-8 predicts the response of standard and low dose intravesical bacillus Calmette-Guérin (modified Danish 1331 strain) for superficial bladder cancer. *J. Urol.*, 2002; 168: 2232-2235
- [48] Lamm D.L., Blumenstein B.A., Crissman J.D., Montie J.E., Gottesman J.E., Lowe B.A., Sarosdy M.F., Bohl R.D., Grossman H.B., Beck T.M., Leimert J.T., Crawford E.D.: Maintenance bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. *J. Urol.*, 2000; 163: 1124-1129
- [49] Lamm D.L., Blumenstein B.A., David Crawford E., Crissman J.D., Lowe B.A., Smith J.A. Jr., Sarosdy M.F., Schellhammer P.F., Sagalowsky A.I., Messing E.M., Loehrer P., Barton Grossman H.: Randomized intergroup comparison of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy and mitomycin C chemotherapy prophylaxis in superficial transitional cell carcinoma of the bladder a southwest oncology group study. *J. Urol. Oncol.*, 1995; 1: 119-126
- [50] Lamm D.L., Blumenstein J.D., Sarosdy M.J., Brent A.L., Crawford E.D.: Significant long-term patient benefit with BCG maintenance therapy. *J. Urol.*, 1997; 157: 831-832
- [51] Leibovici D., Grossman H.B., Dinney C.P., Millikan R.E., Lerner S., Wang Y., Gu J., Dong Q., Wu X.: Polymorphisms in inflammation genes and bladder cancer: from initiation to recurrence, progression, and survival. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 5746-5756
- [52] Lin W.W., Karin M.: A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 1175-1183
- [53] Ludwig A.T., Moore J.M., Luo Y., Chen X., Saltgaver N.A., O'Donnell M.A., Griffith T.S.: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel mechanism for bacillus Calmette-Guérin-induced antitumor activity. *Cancer Res.*, 2004; 64: 3386-3390
- [54] Luo Y., Chen X., Downs T.M., DeWolf W.C., O'Donnell M.A.: IFN- α 2B enhances Th1 cytokine responses in bladder cancer patients receiving *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *J. Immunol.*, 1999; 162: 2399-2405
- [55] Mehmüt M., Takeda K., Abe M., Ogata H., Hirose S., Okumura K., Fujime M.: Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand induction on infiltrating lymphocytes in bladder carcinoma by bacillus Calmette-Guérin treatment. *Urol. Int.*, 2005; 75: 80-87
- [56] Michaud D.S.: Chronic inflammation and bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 2007; 25: 260-268
- [57] Mittal R.D., Manchanda P.K., Bid H.K., Ghoshal U.C.: Analysis of polymorphisms of tumor necrosis factor- α and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in inflammatory bowel disease: study from northern India. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2007; 22: 920-924
- [58] Montironi R., Lopez-Beltran A.: The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *Int. J. Surg. Pathol.*, 2005; 13: 143-153
- [59] Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A.: Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001; 19: 683-765
- [60] Morales A., Eidinger D., Bruce A.W.: Intracavitary Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.*, 2002; 167: 891-893
- [61] Nadler R., Luo Y., Zhao W., Ritchey J.K., Austin J.C., Cohen M.B., O'Donnell M.A., Ratliff T.L.: Interleukin 10 induced augmentation of delayed-type hypersensitivity (DTH) enhances *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) mediated antitumor activity. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003; 131: 206-216
- [62] Palou J., Algaba F., Vera I., Rodriguez O., Villavicencio H., Sanchez-Carbayo M.: Protein expression patterns of ezrin are predictors of progression in T1G3 bladder tumours treated with nonmaintenance bacillus Calmette-Guérin. *Eur. Urol.*, 2009; 56: 829-836
- [63] Pawinski A., Sylvester R., Kurth K.H., Bouffieux C., van der Meijden A., Parmar M.K., Bijnens L.: A combined analysis of European organization for research and treatment of cancer, and medical research council randomized clinical trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer. *J. Urol.*, 1996; 156: 1934-1940
- [64] Pooja S., Francis A., Bid H.K., Kumar S., Rajender S., Ramalingam K., Thangaraj K., Konwar R.: Role of ethnic variations in TNF- α and TNF- β polymorphisms and risk of breast cancer in India. *Breast Cancer Res Treat.*, 2011; 126: 739-747
- [65] Przybylski G., Wielikdzień J., Kosiński P.: Mechanisms of programmed cell death of effector T lymphocytes. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 1374-1390
- [66] Rabinowitz R., Smith D.S., Tiemann D.D., Hudson M.A.: Urinary interleukin-8/creatinine level as a predictor of response to intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy in bladder tumor patients. *J. Urol.*, 1997; 158: 1728-1731
- [67] Reznikoff C.A., Sarkar S., Jülicher K.P., Burger M.S., Puthenveetil J.A., Jarrard D.F., Newton M.A.: Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol. Oncol.*, 2000; 5: 191-203
- [68] Sagnak L., Ersoy H., Ozok U., Senturk B., Ercil H., Bahar G., Ozturk E.: Predictive value of urinary interleukin-8 cutoff point for recurrences after transurethral resection plus induction bacillus Calmette-Guérin treatment in non-muscle-invasive bladder tumors. *Clin. Genitourin. Cancer*, 2009; 7: E16-E23
- [69] Saint F., Kurth N., Maille P., Vordos D., Hoznek A., Soyeux P., Patard J.J., Abbou C.C., Chopin D.K.: Urinary IL-2 assay for monitoring intravesical bacillus Calmette-Guérin response of superficial bladder cancer during induction course and maintenance therapy. *Int. J. Cancer*, 2003; 107: 434-440
- [70] Saint F., Patard J.J., Groux Muscatelli B., Lefrere Belda M.A., Gil Diez de Medina S., Abbou C.C., Chopin D.K.: Evaluation of cellular tumour rejection mechanisms in the peritumoral bladder wall after bacillus Calmette-Guérin treatment. *BJU Int.*, 2001; 88: 602-610
- [71] Saint F., Patard J.J., Irani J., Salomon L., Hoznek A., Legrand P., Debois H., Abbou C.C., Chopin D.K.: Leukocyturia as a predictor of tolerance and efficacy of intravesical BCG maintenance therapy for superficial bladder cancer. *Urology*, 2001; 57: 617-621
- [72] Saint F., Salomon L., Quintela R., Cicco A., Hoznek A., Abbou C.C., Chopin D.K.: Do prognostic parameters of remission versus relapse after Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy exist?: analysis of a quarter century of literature. *Eur. Urol.*, 2003; 43: 351-360
- [73] Schmiegel W., Roeder C., Schmielau J., Rodeck U., Kalthoff H.: Tumor necrosis factor α induces the expression of transforming growth factor α and the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 863-867
- [74] Sethi G., Sung B., Aggarwal B.: TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci.*, 2008; 13: 5094-5107
- [75] Shintani Y., Sawada Y., Inagaki T., Kohjimoto Y., Uekado Y., Shinaka T.: Intravesical instillation therapy with Bacillus Calmette-Guérin

for superficial bladder cancer: study of the mechanism of Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Int. J. Urol.*, 2007; 14: 140-146

[76] Simons M.P., O'Donnell M.A., Griffith T.S.: Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 2008; 26: 341-345

[77] Stricker P., Pryor K., Nicholson T., Goldstein D., Golovsky D., Ferguson R., Nash P., Ehsman S., Rumma J., Mammen G., Penny R.: Bacillus Calmette-Guérin plus intravesical interferon alpha-2b in patients with superficial bladder cancer. *Urology*, 1996; 48: 957-961

[78] Suganuma M., Okabe S., Marino M.W., Sakai A., Sueoka E., Fujiki H.: Essential role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice. *Cancer Res.*, 1999; 59: 4516-4518

[79] Talar B., Czyż M.: TGF- β signaling pathways in cancers. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 1008-1017

[80] Thalmann G.N., Dewald B., Baggolini M., Studer U.E.: Interleukin-8 expression in the urine after bacillus Calmette-Guerin therapy: a potential prognostic factor of tumor recurrence and progression. *J. Urol.*, 1997; 158: 1340-1344

[81] Thalmann G.N., Sermier A., Rentsch C., Möhrle K., Cecchini M.G., Studer U.E.: Urinary interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin. *J. Urol.*, 2000; 164: 2129-2133

[82] van der Meijden A.P., Sylvester R.J., Oosterlinck W., Hoeltl W., Bono A.V.; EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Group: Maintenance Bacillus Calmette-Guerin for Ta T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: results from a European Organisation for

Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial. *Eur. Urol.*, 2003; 44: 429-434

[83] Watanabe E., Matsuyama H., Matsuda K.: Urinary interleukin-2 may predict clinical outcome of intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for carcinoma in situ of the bladder. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2003; 52: 481-486

[84] Xu W., Liu L.Z., Loizidou M., Ahmed M., Charles I.G.: The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res.*, 2002; 12: 311-320

[85] Yamaguchi Y., Tsumura H., Miwa M., Inaba K.: Contrasting effects of TGF- β 1 and TNF α on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells*, 1997; 15: 144-153

[86] Zaharoff D.A., Hoffman B.S., Hooper H.B., Benjamin C.J.Jr., Khurana K.K., Hance K.W., Rogers C.J., Pinto P.A., Schlom J., Greiner J.W.: Intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer with chitosan/interleukin-12. *Cancer Res.*, 2009; 69: 6192-6199

[87] Zlotta A.R., Noel J.C., Fayt I., Drowart A., Van Vooren J.P., Huygen K., Simon J., Schulman C.C.: Correlation and prognostic significance of p53, p21WAF1/CIP1 and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J. Urol.*, 1999; 161: 792-798

[88] Zuiverloon T.C., Nieuweboer A.J., Vékony H., Kirkels W.J., Bangma C.H., Zwarthoff E.C.: Markers predicting response to bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in high-risk bladder cancer patients: a systematic review. *Eur. Urol.*, 2012; 61: 128-145

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.