



# Terapevtski potencial vitamina A, retinoidov in karotenoidov za preprečevanje in zdravljenje raka sečnega mehurja

The therapeutic potential of vitamin A, retinoids, and carotenoids in the prevention and treatment of urinary bladder cancer

Larisa Tratnjek, Daša Zupančič

## Izvleček

Rak sečnega mehurja je v svetovnem merilu 10. najpogostejši rak z izjemno visoko ponovljivostjo. Slovenska incidenca, umrljivost in prevalenca so pri tem raku v primerjavi z drugimi evropskimi državami in svetom nadpovprečne. Epidemiološke študije pa kažejo, da je zadosten vnos vitamina A in karotenoidov s prehrano povezan z zmanjšanim tveganjem, da zbolimo za rakom sečnega mehurja. Poleg tega retinoide, ki so naravni in sintetični derivati vitamina A, ter karotenoide intenzivno raziskujejo zaradi njihovih antioksidativnih lastnosti in zaradi njihove sposobnosti, da uravnavajo celično rast, delitev, diferenciacijo in apoptozo. Raziskave kažejo možnost, da se uporabijo retinoidi ter karotenoidi za preprečevanje raka sečnega mehurja in izboljšanje zdravljenja, čeprav jih v rutinski klinični praksi še niso uporabili. Pregledni članek opisuje metabolizem retinoidov in karotenoidov ter njune spremembe pri raku sečnega mehurja. Povzema rezultate epidemioloških študij z vitaminom A in karotenoidi ter kliničnih študij o zdravljenju raka sečnega mehurja z retinoidi. Opisuje tudi uporabnost novih nanometrskih dostavnih sistemov na področju prehranskih dopolnil in terapevtskih učinkovin pri preprečevanju in zdravljenju raka sečnega mehurja z retinoidi in karotenoidi.

## Abstract

Urinary bladder cancer is the tenth most common cancer worldwide, with a very high recurrence rate. Slovenian incidence, mortality, and prevalence of this cancer are above average compared to other European countries and the world. Epidemiological studies suggest that an adequate intake of vitamin A and carotenoids may be associated with a reduced risk of urinary bladder cancer. In addition, retinoids, natural and synthetic derivatives of vitamin A, and carotenoids are

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

**Korespondenca / Correspondence:** Daša Zupančič, e: [dasa.zupancic@mf.uni-lj.si](mailto:dasa.zupancic@mf.uni-lj.si)

**Ključne besede:** rak sečnega mehurja; preprečevanje; zdravljenje; vitamin A; retinoidi; karotenoidi; signalna pot retinojske kisline; nanomedicina

**Key words:** urinary bladder cancer; prevention; treatment; vitamin A; retinoids; carotenoids; retinoic acid signalling pathway; nanomedicine

**Prispelo / Received:** 12. 5. 2022 | **Sprejeto / Accepted:** 28. 11. 2023

**Citirajte kot/Cite as:** Tratnjek L, Zupančič D. Terapevtski potencial vitamina A, retinoidov in karotenoidov za preprečevanje in zdravljenje raka sečnega mehurja. Zdrav Vestn. 2024;93(3–4):106–20. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravWestn.3362>



Avtorske pravice (c) 2024 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

intensively studied due to their antioxidant properties and the ability to regulate cell growth, proliferation, differentiation, and apoptosis. Studies show great potential for using retinoids and carotenoids in urinary bladder cancer prevention and treatment improvement; however, they are not yet used in routine clinical practice. This review article describes the metabolism of retinoids and carotenoids and its alterations in urinary bladder cancer. Then, we summarise the results of epidemiological studies with vitamin A and carotenoids and clinical studies with retinoids on urinary bladder cancer patients. Finally, we describe the prospects for using retinoids and carotenoids in the prevention and treatment of urinary bladder cancer by exploiting innovative nanoformulations as delivery systems in dietary supplements and therapeutic agents.

## 1 Uvod

Rak sečnega mehurja je pogosta bolezen, saj je 5. najpogostejša rakava bolezen v Evropski uniji in 10. najpogostejša rakava bolezen na svetu (1,2). Ima visoko stopnjo ponovljivosti, trenutni načini zdravljenja pa kažejo nizko učinkovitost, zaradi česar je potrebno že zdravljeni bolnike dolgoročno spremljati. Ker je rak sečnega mehurja velika socialna ter finančna obremenitev družbe in posameznikov (3,4), bi bilo smiselno prihodnje raziskave usmeriti v iskanje preventivnih ukrepov, napovednih dejavnikov ter učinkovitejših metod zdravljenja. Metaanalize epidemioloških študij kažejo, da igrajo vitamin A, retinoidi in karotenoidi pomembno vlogo pri preprečevanju raka sečnega mehurja. Višja vsebnost vitamina A in karotenoidov v prehrani in zato krvni plazmi posameznika namreč sovпада z zmanjšanim tveganjem, da zbolimo za rakom sečnega mehurja (5-8). Vitamin A je v maščobi topni vitamin, ki ga človeško telo ne more sintetizirati, zaradi česar ga moramo pridobiti iz hrane. V človeški prehrani ga najdemo v dveh oblikah; v hrani živalskega izvora je v obliki retinola in retinil estrov, medtem ko se v hrani rastlinskega izvora nahaja prekursor vitamina A oz. provitamin A v obliki karotenoidov, kot so  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten in  $\beta$ -kriptoksantin (9,10). Nekateri karotenoidi v človeški prehrani (likopen, lutein in zeaksantin) pa niso prekursorji vitamina A. Vsi karotenoidi sodijo v skupino fitokemikalij, ki jih v glavnem sintetizirajo rastline in delujejo kot pigmenti ter antioksidanti (11,12).

Retinoidi kot naravni in sintetični derivati vitamina A se v medicini že uspešno uporabljajo za zdravljenje predvsem kožnih bolezni (luskavica, pitiriaz, lihen, staranje kože, akne) in določenih rakavih bolezni (promieloična levkemija pri odraslih in nevroblastom pri otrocih) (13-15). Retinoidi so edinstvena farmakološka učinkovina zaradi svojih vplivov na diferenciacijo celic, ker zavirajo celične delitve, spodbujajo apoptozo in imajo antioksidativne lastnosti, zaradi njihove selektivnosti, visoke afinitete za vezavo na receptorje ter neposrednega uravnavanja genske ekspresije (14,16).

Raziskovalci predpostavljajo, da imajo vitamin A in karotenoidi zaščitno vlogo pred rakom sečnega mehurja

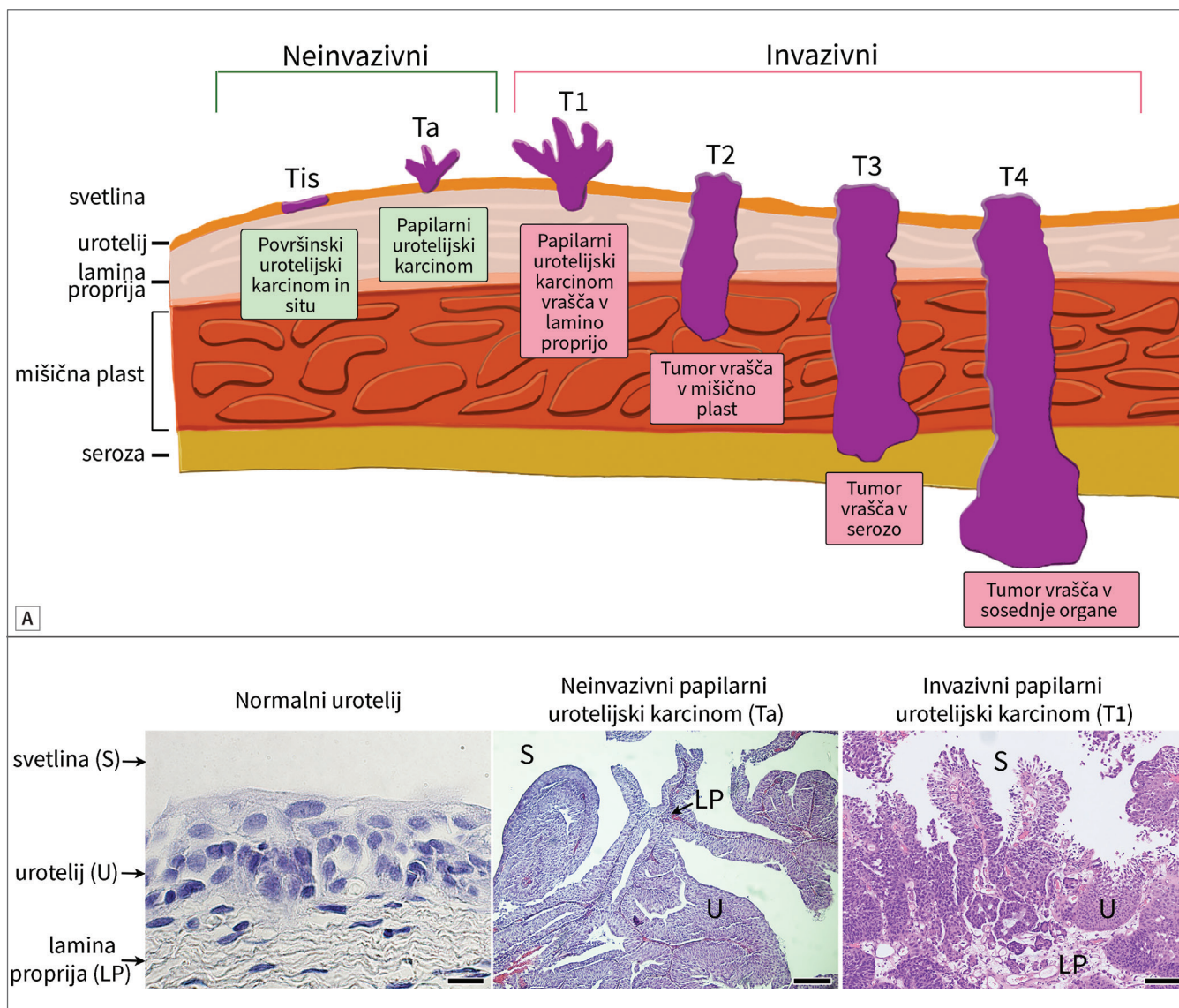
zaradi vpletenosti vitamina A v uravnavanje celičnih delitev in diferenciacije ter z antioksidativno funkcijo karotenoidov, ki zavirajo celične delitve in transformacijo celic, v razvoj predrakavih sprememb ter ker uravnavajo celično komunikacijo in delovanje imunskega sistema (5,6,8). Predklinične študije nakazujejo, da bi poleg preprečevanja raka sečnega mehurja vitamin A oz. retinoidi lahko služili tudi za zdravljenje raka sečnega mehurja (16-18), a je do uporabe v klinični praksi potrebno najprej optimizirati predvsem način priprave in aplikacije, nato pa povečati velikost skupin bolnikov v kliničnih študijah.

## 2 Urotelij in rak sečnega mehurja

V letu 2020 je bilo zabeleženih 600.000 novih primerov raka sečnega mehurja, kar je okrog 3 % vseh primerov raka v svetu (1,2). Incidenca, umrljivost in prevalenca v Sloveniji so pri raku sečnega mehurja v primerjavi z drugimi evropskimi državami in svetom nadpovprečne (19-21). Zaradi staranja in večanja prebivalstva se pričakuje, da bo število novih primerov raka sečnega mehurja in z njim povzročenih smrti v prihodnosti še narastlo. Pretežni delež na novo odkritih primerov raka sečnega mehurja se namreč odkrije pri ljudeh, starejših od 60 let, kar bo sčasoma vodilo v vse večjo obremenitev zdravstvenega sistema in celotne družbe (2).

Sečni mehur je votel organ z debelo mišično steno. Ima nalogo zbirati urin. Notranjo površino svetline sečnega mehurja pokriva specializiran večplastni prehodni epitel, imenovan urotelij, ki tvori krvno-urinsko pregrado. Ta pregrada preprečuje vračanje toksičnih snovi iz urina nazaj v kri (22,23). Urotelij in pod njim ležeče vezivno tkivo, ki se imenuje lamina proprija, skupaj tvorita sluznico (Slika 1). Steno sečnega mehurja tvorijo še gladke mišice, ki omogočajo iztis urina iz sečnega mehurja ob mikciji, ter seroza iz rahlega vezivnega tkiva, ki prekriva zunanjo površino mehurja (24-26) (Slika 1).

Rak sečnega mehurja v večini primerov izvira iz urotelija, kjer se najprej pojavi morfološko razpoznavna



**Slika 1:** Shematski prikaz klasifikacije raka sečnega mehurja glede na obseg vraščanja v steno sečnega mehurja (A). Histološke rezine človeškega normalnega urotelija (B), neinvazivnega papilarnega urotelijskega karcinoma Ta (C) in invazivnega papilarnega urotelijskega karcinoma T1 (D) obarvane s hematoksilinom in eozinom. Merilo: A 20 µm; B in C 100 µm.

atipičnost urotelijskih celic. Je heterogena bolezen s širokim spektrom patoloških stanj z različnim kliničnim izidom (27). Po obsegu vraščanja v steno sečnega mehurja delimo rak sečnega mehurja na skupini neinvazivnih in invazivnih vrst raka, ki jih lahko razvrstimo tudi po kliničnopatološki klasifikaciji TNM, pri kateri se ocenjuje razsežnost tumorja na lokalni (T – Tumor), regionalni (N – Nodus, bezgavke) in sistemski ravni (M – Metastaze) (28). V skupino neinvazivnih vrst raka sodijo papilarni urotelijski karcinom nizke ponovljivosti (*angl.* low grade – l.g.) ali visoke ponovljivosti (*angl.* high grade – h.g.), ko gre za večjo verjetnost za ponovno rast, širjenje in napredovanje raka stopnje (Ta), ki rastejo v svetlino sečnega mehurja, in površinski urotelijski karcinom *in*

*situ* (CIS, stadij Tis), ta pa se omejuje na tkivo sluznice (Slika 1). Med invazivne oblike sodijo tumorji, ki se vraščajo v lamino proprijo (T1) ali v mišično plast (T2) ter tumorji, ki se vraščajo preko mišične plasti sečnega mehurja v serozo (T3) ali sosednje organe (T4) (29) (Slika 1). Za terapevtske namene se tumorji Tis, Ta in T1 skupaj uvrščajo v kategorijo mišično neinvazivnih rakov sečnega mehurja, predstavljajo pa 75 % vseh primerov raka sečnega mehurja, medtem ko se T2, T3 in T4 skupaj uvrščajo v kategorijo mišično invazivnih rakov (30).

Najobičajnejša metoda pri diagnosticiranju in zdravljenju raka sečnega mehurja je cistoskopija, s katero urolog pregleda sluznico sečnice in sečnega mehurja ter odstrani vse vidne rakave tvorbe s transuretrno resekcijo.

S tem pridobi tudi vzorce rakavega tkiva za diagnosticiranje. Glede na tveganje za napredovanje raka se bolniki z mišično neinvazivnim rakom po potrebi dodatno zdravijo s citostatiki (mitomicin C, epirubicin) ali imunoterapijo s suspenzijo bacilov tuberkuloze Calmette Guerin (BCG), kar se vnaša v svetlino sečnega mehurja (31). Ponovljivost mišično neinvazivnega raka sečnega mehurja je visoka (50–70 %) in zahteva sistematično spremljanje bolnikov še več desetletij po začetnem zdravljenju (32). Toda napredovanje neinvazivnega raka je redko (10–15 %), 5-letno preživetje pa visoko (90 %) (33). Za mišično invazivne oblike raka sečnega mehurja je zlati standard zdravljenja radikalna cistektomija z odstranitvijo območnih bezgavk in sistemska kemoterapija, kadar je potrebna in je bolnik zanj primeren (34). Pri moških se poleg sečnega mehurja kirurško odstranijo tudi prostata, semenski mešički in distalni del sečevodov, pri ženskah pa celotna sečnica in del nožnice, maternica in distalni del sečevodov (34). Kljub invazivnemu posegu je mišično invazivni rak sečnega mehurja povezan z visoko stopnjo metastaziranja in s 5-letnim preživetjem, nižjim od 50 % (33,34). Potencialni inovativni načini preprečevanja in zdravljenja raka sečnega mehurja z vitaminom A, retinoidi ter karotenoidi bi morda lahko prispevali k zmanjšanju incidence, prevalence in umrljivosti zaradi raka sečnega mehurja.

### 3 Vitamin A, retinoidi in karotenoidi

Vitamin A je generično ime za skupino lipofilnih molekul, med katerimi so glavne biološko aktivne molekule retinol, retinal in retinojska kislina (RA) (35). Vitamin A skupaj s 4.000 molekulami naravnega in sintetičnega izvora s podobno strukturo ali funkcijo sestavlja skupino retinoidov (18,36,37). Retinoide razvrščamo v 4 generacije glede na to, kdaj so bili odkriti oziroma sintetizirani in glede na njihove strukturne značilnosti: 1. prva generacija (nearomatski retinoidi, naravno prisotni v organizmu): retinol, retinal, vse-*trans* retinojska kislina (ATRA), alitretionin (9-*cis*-retinojska kislina), isotretinoin (13-*cis*-retinojska kislina); 2. druga generacija (monoaromatski retinoidi): etretinat, acitretin; 3. tretja generacija (poliaromatski retinoidi): adapalen, tazaroten, beksaroten, fenretinid; 4. četrta generacija: setinoid G (13,38). Vitamin A je vpleten v številne procese v človeškem telesu, kot so uravnavanje celične diferenciacije, celičnega cikla, apoptoze, embriogeneze, razmnoževanja, vzdrževanja epitelnih celic in imunskega sistema (35,39,40). Pomemben je za vid, saj je nujen za tvorbo rodopsina, ki je na svetlobo občutljiv receptorski protein. Pomanjkanje vitamina A vodi v nočno slepoto.

Nedavne študije kažejo celo, da je vitamin A vpleten v uravnavanje interakcij med evkariontskimi celicami in simbiotskimi mikrobi ter v uravnavanje kompleksnosti mikrobioma pri človeku (41,42). Vitamin A igra tudi zaščitno vlogo pred oksidativnim stresom in vnetjem, saj ima tudi antioksidativne lastnosti (35,43,44).

Karotenoidi so heterogena skupina lipofilnih barvnih pigmentov rumene, oranžne ali rdeče barve, ki imajo antioksidativne lastnosti. Do leta 2018 je bilo opisanih približno 850 naravnih karotenoidov (45). Razdelimo jih v dve skupini: a) ksantofili, ki vsebujejo oksigenirane skupine, in b) karoteni, ki so manj polarne molekule in ne vsebujejo kisika (46). V običajni človeški prehrani je približno 50 različnih karotenoidov, od katerih se jih približno 20 vrst vsrka iz hrane in jih lahko najdemo tudi v krvi. Med temi so najpogostejši  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, likopen,  $\beta$ -kriptoksantin, lutein in zeaksantin (47). V človeškem organizmu igrajo karotenoidi pomembno vlogo kot prekursorji vitamina A, fotoprotektorji, spodbujevalci imunskega sistema in pri razmnoževanju (45). Najpogosteje omenjena je vloga karotenoidov kot antioksidantov, predvsem kot lovilcev prostih radikalov v membranah in lipoproteinih (48). Antioksidativna aktivnost karotenoidov lahko namreč zmanjša peroksidacijo lipidov in s tem zmanjša oksidativni stres ter vnetne odzive v celicah in tkivih (49,50).

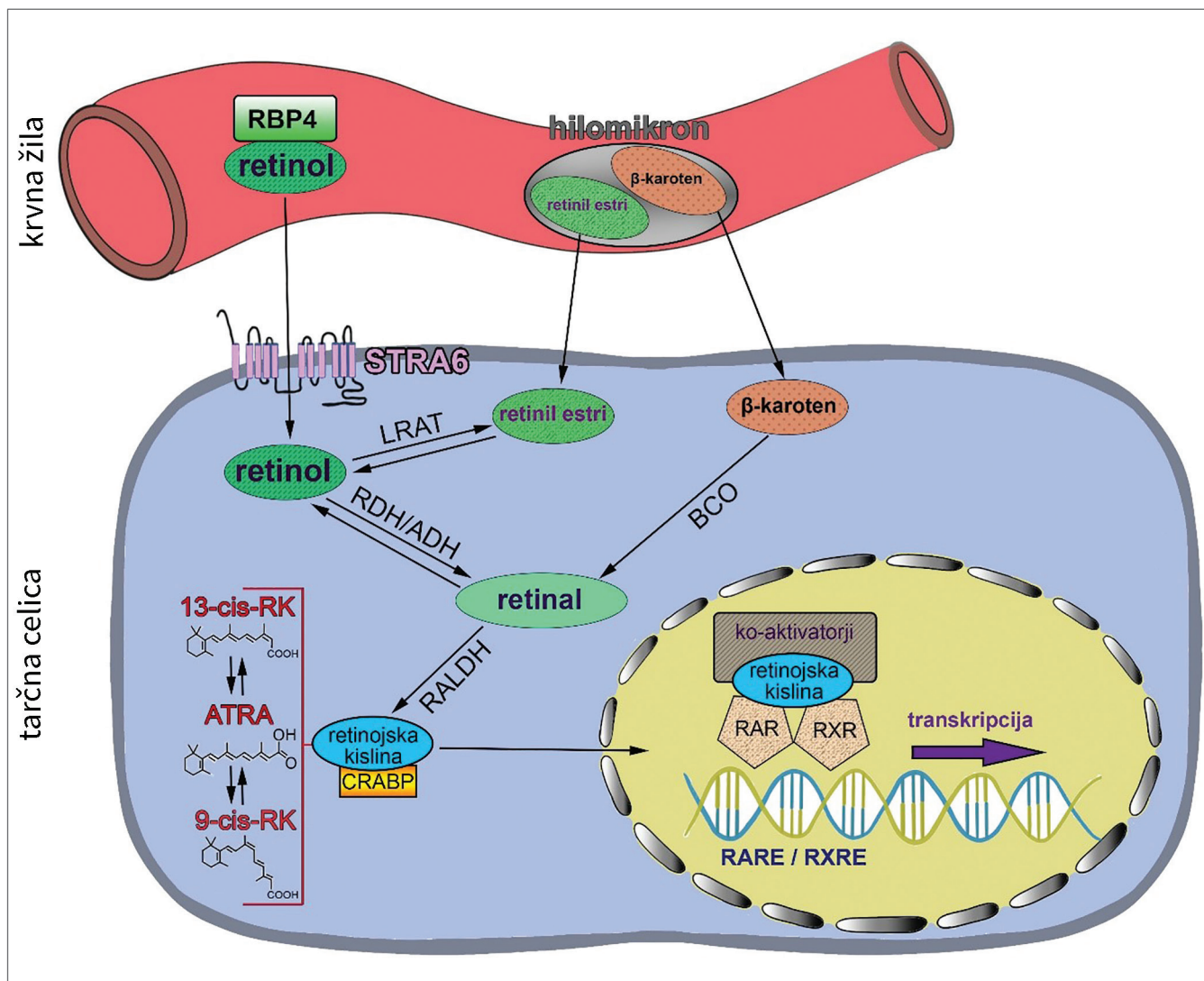
V človeškem organizmu ne poteka sinteza vitamina A ali karotenoidov, zato jih moramo pridobiti iz hrane. Med hranila z visoko vsebnostjo vitamina A spadajo ribje olje, jetra, jajca, korenje, zelje, marelice, ohrovt, bučke, špinača, paprika, melona itd. Dnevne potrebe za odraslo osebo znašajo 1,0 mg vitamina A za ženske in 0,8 mg za moške (51,52). Na primer, 100 g govejih jeter vsebuje okoli 3,2 mg vitamina A, 100 g korenja pa 0,6 mg (53). V človeški prehrani je prisotnih približno 50 karotenoidov, ker pa niso klasificirani kot vitamini, dnevne potrebe po karotenoidih niso opredeljene. Najdemo jih predvsem v oranžnem, rdečem in rumenem sadju, zeleni listnati zelenjavi, rumenjaku in nekaterih ribah (11,54). Absorpcija karotenoidov iz prehrane je pri ljudeh zelo slaba. Kljub temu, da kuhanje hrane, bogate s karotenoidi skupaj z olji poveča učinkovitost njihove absorpcije, se v tankem črevesju absorbira le 10–50 % zaužite količine (11,55).

#### 3.1 Metabolizem retinoidov in karotenoidov ter signalna pot retinojske kisline

V človeški prehrani se vitamin A nahaja v obliki retinola in retinilnih estrov ter v obliki karotenoidov – kot provitamin A (npr.  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten in

$\beta$ -kriptoksantin) (9,10). Glavni vir retinoidov za človeško telo je  $\beta$ -karoten, ki se v črevesju najprej presnavlja v retinal in nato v retinol, nato pa se prenaša po krvi v druge dele telesa, vezan na retinol – vezavni protein (*angl.* retinol binding protein 4, RBP4) (10,18) (Slika 2). Retinoidi, kot so retinilni estri in karotenoidi, kot je  $\beta$ -karoten, se lahko absorbirajo neposredno iz hrane v črevesju tako, da se »zapakirajo« v hilomikrone, ki so sestavljeni iz trigliceridov, fosfolipidov, holesterola in lipoproteinov (15) (Slika 2). V hilomikrone se vključujejo tudi neprocesirani karoteinoidi in drugi lipidi iz prehrane. Hilomikroni se preko limfnega sistema sprostijo v

krvni obtok (15). Glavno mesto shranjevanja retinoidov v telesu so jetra, kjer se retinoidi hranijo v obliki retinilnih estrov (56,57). Esterifikacijo retinola v založni retinilni ester omogoča encim lecitin retinol aciltransferaza (*angl.* lecithin retinol acyltransferase, LRAT) (58). Ko jih celice potrebujejo, se retinoidi preko krvi prenašajo iz jetra do tarčnih celic v obliki retinola, vezanega na RBP4 (Slika 2). Tarčne celice izražajo transmembranski receptor, imenovan z retinojsko kislino stimulirani receptor 6 (*angl.* stimulated by retinoic acid 6, STRA6). Uravnava privzem retinola v celice (58,59) (Slika 2). Celice lahko privzemajo retinilne estre in  $\beta$ -karoten tudi neposredno



**Slika 2:** Shematski prikaz molekularnih poti retinoidov in karotenoidov s provitaminsko A aktivnostjo od krvne žile do tarčne celice.

Legenda: RBP4 – retinol-vezavni protein; STRA6 – z retinojsko kislino stimuliran receptor 6; LRAT – lecitin retinol aciltransferaza; RDH – retinol dehidrogenaza; ADH – alkohol dehidrogenaza; BCO –  $\beta$ -karoten oksigenaza; RALDH – retinal dehidrogenaza; CRABP – celični vezavni protein za retinojsko kislino; 9-*cis*-RK – 9-*cis*-retinojska kislina; 13-*cis*-RK – 13-*cis*-retinojska kislina; ATRA – vse-trans retinojska kislina; RAR – receptor retinojske kisline; RXR – retinoidni X receptor; RARE – odzivni element za retinojsko kislino; RXRE – odzivni element za retinoid X. Predelano po Tratnjek in sodelavci, 2021 (17).

iz hilomikronov preko specifičnih lipoproteinskih receptorjev (60) (Slika 2). Retinol se v celici veže na celični vezavni protein za retinol (*angl.* cellular retinol binding protein, CRBP), ki dostavi retinol do ustreznih encimov, da se bodisi pretvori v retinilne estre (s pomočjo encima LRAT) ali pa se pretvori v biološko aktivno retinojsko kislino s pomočjo oksidacij (61) (Slika 2). In sicer, kakor sledi: retinol se najprej pretvori v retinal s pomočjo encima retinol dehidrogenaza (*angl.* retinol dehydrogenase, RDH) ali alkohol dehidrogenaza (*angl.* alcohol dehydrogenase, ADH) (Slika 2). Tudi  $\beta$ -karoten se pretvori v retinal z encimom  $\beta$ -karoten oksigenaza 1 (*angl.*  $\beta$ -carotene oxygenase 1, BCO1) (Slika 2). Retinal pa se lahko nato pretvori z encimoma retinal dehidrogenaza (*angl.* retinal dehydrogenase, RALDH) oziroma aldehid dehidrogenaza (*angl.* aldehyde dehydrogenase, ALDH) v retinojsko kislino (15,62) (Slika 2). Karotenoidi se v celici lahko presnavljajo tudi s pomočjo mitohondrijskega encima BCO2 v bolj polarne presnovke, imenovane apokaroteinodi (49). Za razliko od BCO1 lahko BCO2 metabolizira tudi karotenoide, ki niso prekurzorji vitamina A (63).

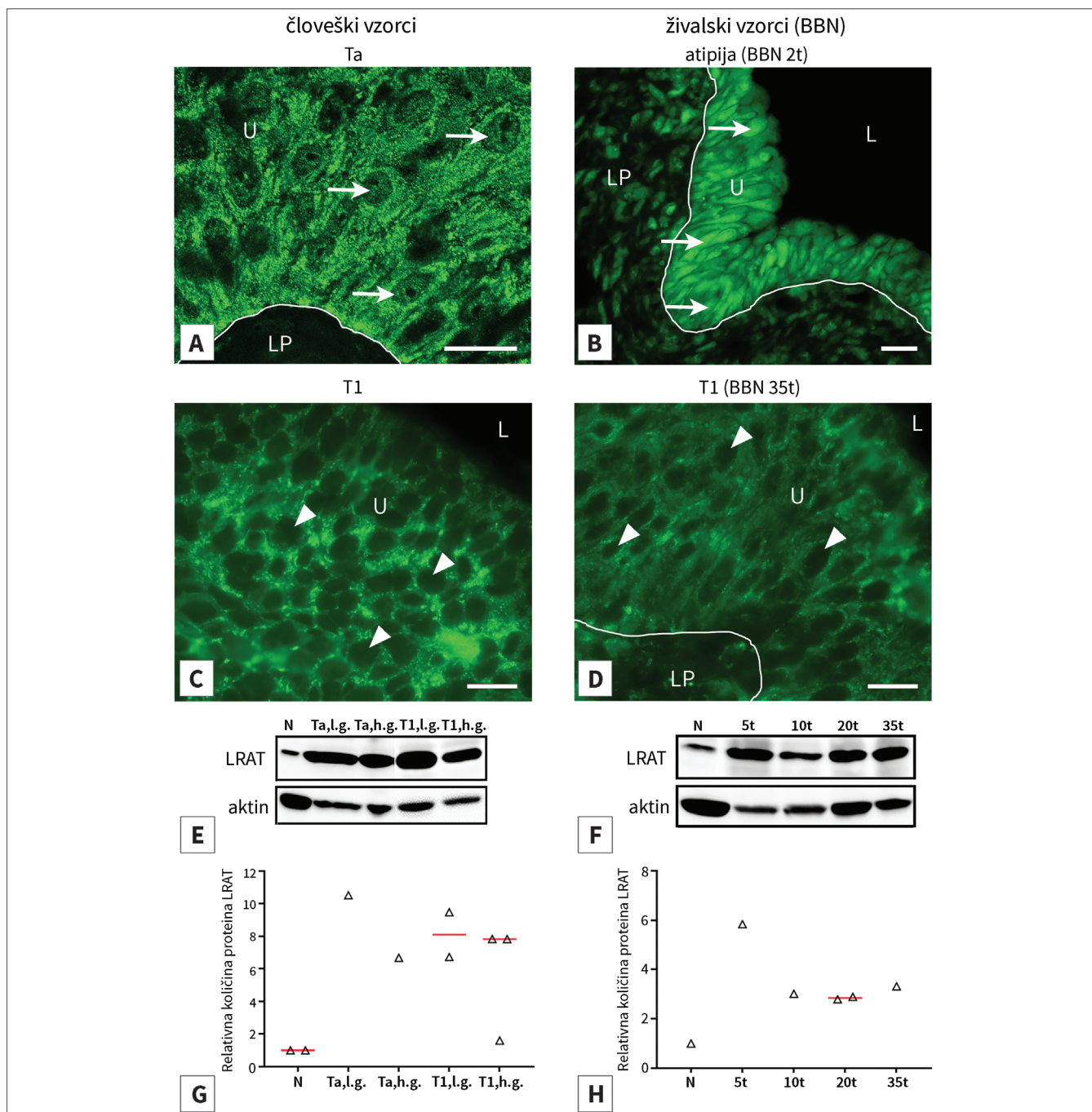
Biološko aktivna retinojska kislina ima več izooblik, kot so vse-*trans* retinojska kislina (*angl.* all-trans retinoic acid, ATRA), 9-*cis*-retinojska kislina, 11-*cis*-retinojska kislina in 13-*cis*-retinojska kislina (64). Retinojska kislina se s pomočjo celičnih vezavnih proteinov za retinojsko kislino (*angl.* cellular retinoic acid binding protein, CRABP) prenese v jedro do receptorjev retinojske kisline (*angl.* retinoic acid receptors, RAR), retinoidnih receptorjev X (*angl.* retinoid X receptors, RXR) (Slika 2) ali receptorjev PPAR $\beta/\delta$  (*angl.* peroxisome proliferator-activated receptor) (15). Retinojska kislina z vezavo na jedrne receptorje sproži transkripcijo preko 500 genov (65), ki uravnavajo pomembne celične procese (18). Receptorji retinojske kisline po vezavi liganda tvorijo homo- ali heterodimere, ki se vežejo na svoje odzivne elemente RARE (*angl.* retinoic acid responsive element) ali RXRE (*angl.* retinoid X responsive element) v regulatorni regiji tarčnega gena in sprožijo njegovo transkripcijo (66) (Slika 2).

### 3.2 Spremembe v izražanju proteinov metabolizma retinoidov pri raku sečnega mehurja

Številne raziskave različnih vrst raka so pokazale, da imajo proteini, vključeni v signalne poti retinojske kisline, spremenjeno izražanje in lokalizacijo v rakavih celicah v primerjavi z normalnimi celicami (67). Okvarjena signalna pot retinojske kisline je torej zanimiva tarča

študij, ki proučujejo možnosti preprečevanja, zaviranja napredovanja in zdravljenja raka. Povezavo med znižanim prehranskim vnosom vitamina A in povešano incidenco različnih spontanih tumorjev so raziskovalci odkrili že med letoma 1920 in 1930 s poskusi na živalih (49,50,56,57). Kasnejše študije na človeških vzorcih raka sečnega mehurja so potrdile, da je signalna pot retinojske kisline spremenjena tudi pri raku sečnega mehurja. Spremeni se namreč raven izražanja številnih proteinov, kot so LRAT, CRBP1, ALDH1A1 in drugi (68-72).

Na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete v Ljubljani proučujemo signalno pot retinojske kisline tako na človeških vzorcih raka sečnega mehurja, pridobljenih z biopsijami, kot tudi na predkliničnih živalskih modelih raka sečnega mehurja, inducirane z BBN (N-butyl-(4-hidroksibutil)nitrozamin) (72). BBN je namreč kemijsko soroden karcinogenom, ki jih najdemo v cigaretnem dimu in so glavni povzročitelji raka sečnega mehurja pri ljudeh, ter kaže visoko specifičnost za sečni mehur. Naši rezultati kažejo, da se tako v človeških vzorcih kot tudi v vzorcih živali, tretiranih z BBN, količina encima LRAT, ki omogoča esterifikacijo retinola v založni retinil ester, poveča (Slika 3). To je sicer v nasprotju z rezultati študije Boorjiana s sod., ki so pokazali znižano izražanje LRAT (mRNA in proteina), ki je bilo obratno sorazmerno s stadijem raka sečnega mehurja (69). Naši rezultati sovpadajo z ugotovitvami študije na mišji melanomski celični liniji, v kateri se je izražanje LRAT v rakavih celicah povešalo (73). Prav to povešano izražanje LRAT predstavlja nov mehanizem, preko katerega lahko rakave celice obidejo negativno uravnavanje celične rasti preko zaviralnih genov za tumor, kar je odvisno od retinojske kisline (73). V melanomskih celicah je utišanje gena za LRAT povečalo raven ATRA in povrnilo občutljivost rakavih celic na zdravljenje z retinoidi (74). Zato je farmakološko zaviranje aktivnosti encima LRAT ena od možnih in obetavnih strategij za premagovanje odpornosti na retinoide (retinoidna rezistenca, opisana v 5. poglavju) pri zdravljenju melanomskega kožnega raka (73,74). Naše predklinične študije zgodnje kancerogeneze sečnega mehurja na miših kažejo tudi, da dieta, obogatena z vitaminom A, poveča izražanje gena za LRAT in hkrati zmanjša atipijo ter apoptozo urotelijskih celic (72). Poleg tega smo dokazali, da se med zgodnjo kancerogenezo pri miših, ne glede na količino vitamina A v dieti, LRAT translocira iz citoplazme urotelijskih celic v njihova jedra (72). Pred kratkim smo LRAT dokazali v citoplazmi in tudi v jedrih človeških rakavih urotelijskih celic, in sicer v vzorcih biopsij papilarnih urotelijskih karcinomov nizkega stadija (Ta) (Slika 3).



**Slika 3:** Prisotnost in lokalizacija encima LRAT v vzorcih sečnega mehurja.

Imunofluorescenca LRAT (zeleno) na parafinskih rezinah vzorcev bolnikov s histopatološko diagnozo neinvazivni papilarni urotelijski karcinom Ta (A) in invazivni papilarni urotelijski karcinom T1 (C) ter na parafinskih rezinah podgan, ki so bile tretirane z BBN 2 tedna (BBN 2t – histopatološka diagnoza atipija) (B) in 35 tednov (BBN 35t – histopatološka diagnoza T1) (D). V vseh rezinah je vidna pozitivna reakcija v citoplazmi urotelijskih celic (zeleno), v jedrih urotelijskih celic pa le v vzorcih z diagnozo neinvazivni papilarni urotelijski karcinom Ta (A) in atipijo (B). Bele puščice prikazujejo jedra urotelijskih celic s pozitivno reakcijo (A, B) in bele glave puščic jedra z negativno reakcijo (C, D). Prenos western s protitelesi proti LRAT v vzorcih normalnega urotelija (N), vzorcih bolnikov z diagnozami neinvazivni papilarni uroteljni karcinom Ta nizke stopnje oz. low grade (l.g.) in Ta visoke stopnje oz. high grade (h.g.) in invazivni papilarni urotelijski karcinom T1, l.g. in T1, h.g. (E) ter v vzorcih netretiranih podgan (N) in podgan, tretiranih z BBN 5 tednov (5t), 10 tednov (10t), 20 tednov (20t) in 35 tednov (35t) (F). Razsevana točkovna grafa prikazujeta relativne vrednosti količine proteina LRAT, izražene glede na normalne vzorce (N), in normalizirane na referenčni protein aktin (G, H). Vsak trikotnik predstavlja en biološki vzorec, rdeče črte predstavljajo mediane. U – urotelij; LP – lamina proprija; L – lumen (svetlina); bela črta – potek bazalne lamine na meji med urotelijem in lamino proprijo. Merilo: 20 μm.

Jedro umestitev LRAT-a delno pojasnjuje študija Simmonsa in sodelavcev. Ugotovili so, da proteini iz družine LRAT-u podobnih proteinov vsebujejo homologno DNA vezavno zaporedje, preko katerega aktivirajo izražanje transkripcijskih faktorjev. Ti zaustavijo celični cikel (75). Izgleda torej, da bi lahko igral LRAT dvojno vlogo. V citoplazmi, kjer deluje kot encim, pretvarja aktivno obliko retinola v neaktivne retinil estre in na ta način lahko povzroča retinoidno rezistenco (opisano v 5. poglavju). Po drugi strani pa bi lahko imel LRAT po translokaciji v jedro celice tam dodatno funkcijo, ki bi vodila v zaviranje celičnih delitev in morda tudi zmanjšanje atipije celic. V začetnih fazah razvoja in ponovitvi raka sečnega mehurja bi morda translokacija LRAT-a iz citoplazme v jedro celice omogočila signaliziranje, ki bi zavrlo ali vsaj upočasnilo rakavo preobrazbo.

#### 4 Pomen retinoidov in karotenoidov pri preprečevanju raka sečnega mehurja

Številne epidemiološke raziskave prejšnjega stoletja so kazale, da prehrana, bogata z vitaminom A, in karotenoidi zmanjša tveganje za nastanek raka sečnega mehurja, a so bili rezultati nekonsistentni (76). Leta 2014 so Tang in sodelavci izvedli metaanalizo, ki je vključevala 25 študij, ki so preučevale kvantitativni vpliv vitamina A in karotenoidov na tveganje za razvoj te oblike raka. Ugotovili so, da so povečani vnos vitamina A s prehrano in višje vrednosti retinola v krvi povezane z zmanjšanim tveganjem za nastanek raka sečnega mehurja (5). Zmanjšano tveganje je povezano tudi z višjimi skupnimi vrednostmi karotenoidov kot tudi z višjimi vrednostmi posameznih karotenoidov (za  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, lutein in zeaksantin, ne pa za  $\beta$ -kriptoksantin in likopen) v krvi. Podobne zaključke je predstavila kasnejša metaanaliza, ki so jo izvedli Wu in sodelavci leta 2020 in je zajemala 22 študij, izvedenih v Severni Ameriki, Evropi in na Japonskem (6). Wu in sodelavci so preučili povezavo med količino vnesenih karotenoidov s prehrano ter ravni karotenoidov v krvi in tveganjem za nastanek raka sečnega mehurja. Pokazali so, da se tveganje za raka sečnega mehurja zmanjša za 76 % za vsak 1  $\mu\text{mol/L}$  višje koncentracije  $\alpha$ -karotena v krvi, za 27 % za vsak 1  $\mu\text{mol/L}$  višje koncentracije  $\beta$ -karotena v krvi, za 42 % na vsak mg večjega dnevnega vnosa  $\beta$ -kriptoksantina in za 56 % za vsak 1  $\mu\text{mol/L}$  luteina in zeaksantina v krvi. Visoka količina vseh vnesenih karotenoidov s prehrano je bila povezana s 15-odstotnim zmanjšanim tveganjem za raka sečnega mehurja pri moških. Kljub negativni korelaciji med vitaminom A in karotenoidi ter rakom sečnega mehurja pa avtorji metaanaliz opozarjajo, da gre

zaenkrat zgolj za opazovalne študije, ki bi jih bilo potrebno potrditi z izvedbo velikih randomiziranih kliničnih študij (6). Poleg študij vpliva povečanega vnosa vitamina A in karotenoidov na raka sečnega mehurja so pomembne tudi študije prenizkega vnosa in pomanjkanja vitamina A ter karotenoidov v človeškem organizmu. Retrospektivna študija, izvedena leta 1979, je pokazala, da imajo ljudje z nizkim vnosom vitamina A povečano tveganje za raka sečnega mehurja (77). Prehrana je eden spremenljivih dejavnikov tveganja in bi zato lahko prispevala k preprečevanju raka sečnega mehurja (7,78). Čeprav so vitamin A in karotenoidi prisotni v različnih virih hrane, ljudje pogosto ne zaužijejo zadostnih količin predvsem zaradi podhranjenosti in selektivnih diet (49). Informiranje ljudi o pomenu zadostnega vnosa vitamina A in karotenoidov s prehrano bi morda prispevalo k učinkovitejšemu preprečevanju raka sečnega mehurja.

#### 5 Uporaba retinoidov za zdravljenje raka sečnega mehurja

Trenutno najučinkovitejša klinična uporaba retinoidov je zdravljenje akutne promielocitne levkemije z ATRA, ki sproži dozorevanje levkemičnih promielocitov vse do stopnje zrelih nevtrofilnih granulocitov (79). Številni naravni in sintetični retinoidi so v fazi kliničnih raziskav za preprečevanje ter zdravljenje številnih vrst raka, vključno z limfomom, levkemijo, melanomom, nemelanomskim rakom kože, rakom pljuč, jeter, ledvic, sečnega mehurja, materničnega vratu, prostate, nevroblastomom in glioblastomom (14,80). Žal pa klinične študije z retinoidi pogosto ne pokažejo primerljivih rezultatov s protirakavim učinkom retinoidov v predkliničnih *in vitro* in v *in vivo* študijah. Tak primer je tudi rak sečnega mehurja.

*In vitro* raziskave raka sečnega mehurja v kombinaciji z retinoidi, kot so ATRA, 13-*cis*-retinojska kislina in fenretinid, kažejo, da imajo le-ti citostatični in proapoptotski učinek in da uravnavajo gensko ekspresijo (81-88). Študije na živalskih modelih raka sečnega mehurja so pokazale, da tretiranje z retinoidi, kot so ATRA, 13-*cis*-retinojska kislina, fenretinid, etritinat, N-(etil)-*vse-trans*-retinamid in N-(2-hidroksietil)-*vse-trans*-retinamid zmanjšata velikost in število tumorjev ter njihovo incidenco (89-97). Vendar pa klinične raziskave, ki so bile izvedene do danes, zaenkrat niso zanesljivo dokazale protirakavega učinka retinoidov pri bolnikih z rakom sečnega mehurja (Tabela 1). Multicentrična randomizirana klinična raziskava faze III s fenretinidom npr. ni pokazala preventivnega učinka pri bolnikih s tumorji stadija Ta (98,99). Je pa raziskava pokazala, da so



**Tabela 1:** Ključne ugotovitve kliničnih raziskav z retinoidi pri bolnikih z rakom sečnega mehurja.

Retinoid	Vrsta in/ali faza raziskave (literatura)	Ugotovitve
4-HPR <sup>1</sup>	Faza IIa (115)	Zdravljenje bolnikov (stadij Ta in T1) je povzročilo zmanjšano rast in delitve rakavih celic, zakasnen razvoj aneplodije ali vračanje celic v diploidno stanje. Bolniki so dobro prenašali stranske učinke zdravljenja.
	Randomizirana raziskava Faza IIb (116)	Zdravljenje bolnikov (stadij Ta in T1) ni vplivalo na vsebnost DNA v celici, morfologijo urotelijskih celic ali na trajanje preživetja bolnikov brez ponovitve bolezni. Bolniki so dobro prenašali stranske učinke zdravljenja.
	20-letno spremljanje randomizirane raziskave Faze IIb ((116)) (117)	Zdravljenje bolnikov (stadij Ta in T1) ni vplivalo na potek bolezni. Obratnosorazmerna povezava med izhodišnim nivojem VEGF in preživetjem bolnikov.
	Randomizirana raziskava Faza IIb (100)	Zdravljenje bolnikov (stadij Ta in T1) je povzročilo zmanjšanje ravni IGF-1 v krvni plazmi bolnikov.
	Randomizirana raziskava, nadzorovana s placebom Faza III (98)	Zdravljenje bolnikov (stadij Tis, Ta in T1) ni vplivalo na čas ponovitve bolezni. Analiza podskupin je pokazala, da so imeli bolniki, ki so bili hkrati zdravljeni z BCG, zmanjšano tveganje za ponovitev bolezni. Bolniki so dobro prenašali stranske učinke zdravljenja.
Etratinat <sup>2</sup>	Randomizirana raziskava, dvojno slepa, nadzorovana s placebom (114)	Zdravljenje bolnikov (stadij Ta in T1) je zmanjšalo ponovljivost bolezni. Bolniki so dobro prenašali zdravljenje s končnim vzdrževalnim odmerkom, medtem ko so se pri višjih odmerkih pojavili moteči stranski učinki.
	Prospektivna, randomizirana, dvojno slepa s placebom nadzorovana raziskava (105)	Zdravljenje bolnikov (stadij Ta in T1) ni vplivalo na prvo ponovitev bolezni. Podaljšal se je interval do kasnejše ponovitve bolezni oz. rasti tumorja. Bolniki so dobro prenašali stranske učinke, razen trije bolniki, pri katerih so se pojavile okvare srca.
	Randomizirana raziskava, nadzorovana s placebom (118)	Zdravljenje bolnikov (s ponavljajočim se neinvazivnim urotelijskim karcinomom) ni vplivalo na potek bolezni. Tretjina bolnikov je predčasno prekinila zdravljenje zaradi stranskih učinkov.
13- <i>cis</i> -RK <sup>3</sup>	Faza I/II (119)	Zaradi toksičnosti retinoida in odsotnosti pozitivnih rezultatov pri bolnikih (stadij Ta in T1) je bila raziskava prekinjena.
ATRA <sup>4</sup> + ketonazol	(109)	Zdravljenje bolnikov (stadij Ta in T1) je podaljšalo čas preživetja in zmanjšalo stopnjo ponovitve bolezni. Bolniki so dobro prenašali stranske učinke zdravljenja.
13- <i>cis</i> -RK <sup>3</sup> + Entinostat	Faza I (120)	Zdravljenje bolnikov (z epitelnimi tumorji, vključno z urotelijskimi karcinomi) ni vplivalo na potek bolezni. Bolniki so dobro prenašali zdravljenje.

Legenda: <sup>1</sup> 4-HPR – N-(4-hidroksifenil)retinamid, znan tudi kot Fenretinid; <sup>2</sup> Etratinat – znan tudi kot etil etrinoat, Tigason ali Ro 10-9359; <sup>3</sup> 13-*cis*-RK – 13-*cis*-retinojska kislina; <sup>4</sup> ATRA – vse-trans retinojska kislina; BCG – imunoterapija s suspenzijo bacilov tuberkuloze Calmette Guerin; IGF-1 – inzulinu podoben rastni faktor I; VEGF – žilni endotelni rastni faktor.

imeli bolniki z visokim tveganjem, sočasno zdravljeni s fenretinidom in BCG, manjše tveganje za ponovitev bolezni v primerjavi s skupino, ki je prejela placebo. Na uporabnost fenretinida v kliniki kažejo tudi zmanjšane ravni inzulinu podobnega rastnega faktorja I (angl; insulin-like growth factor, IGF) v krvni plazmi bolnikov s papilarnim urotelijskim karcinomom (Ta, T1), ki so

prejemali fenretinid (100). Znana je namreč povezava med visokimi koncentracijami krožečega IGF in povečanim tveganjem za raka pljuč, debelega črevesa, prostate in dojk (101-104).

Razlogi, da večina kliničnih raziskav tako s fenretinidom kot z drugimi retinoidi ni pokazala pozitivnih učinkov oz. vpliva na potek bolezni, so številni (105-107).

Najprej je potrebno poudariti, da je bilo izvedenih zelo malo kliničnih raziskav in da so le-te vključevale manjše skupine oseb ali pa niso imele vključene skupine s placebo. Med ostalimi razlogi so pomembni izzivi povezani z uporabo retinoidov, kot so nizke koncentracije retinoidov na mestu tumorja po sistemskem vnosu, kratek razpolovni čas, slaba topnost retinoidov v vodi, njihova občutljivost na svetlobo, toploto in oksidacijo ter hitra razgradnja med prebavljanjem. Vse to povzroča nizko biološko uporabnost in biološko dostopnost retinoidov (80,108). Eden od načinov za povečanje koncentracije retinoidov na mestu tumorja je uporaba kombinacije retinoidov in zdravil, ki zavirajo razgradnjo retinoidov. Klinična raziskava pri bolnikih s stadijem Ta in T1 je pokazala, da zdravljenje z ATRA v kombinaciji s ketokonazolom (močnim zaviralcem citokroma P450s, ki katabolizira retinojsko kislino) znatno izboljša preživetje bolnikov in zmanjša stopnjo ponovljivosti v primerjavi s kontrolno skupino (109). Nizka učinkovitost retinoidov v kliničnih raziskavah je lahko tudi posledica pojava retinoidne rezistentnosti. Njen mehanizem še ni pojasnjen, predvideni vzroki pa vključujejo zmanjšani privzem retinoidov, povečano razgradnjo ATRA s citokromom P450s (CYP26), znižano ekspresijo različnih genov RAR (metilacija promotorjev) itd. (14). Na to kažejo tudi rezultati predkliničnih *in vitro* študij, ki so pokazale, da je izjemno pomembna izbira retinoida. Več različnih rakavih celičnih linij iz sečnega mehurja kaže rezistentnost na tretiranje z ATRA, medtem ko fenretinid zavira rast teh celic ter sproži njihovo apoptozo (110). Še več, nekatere teh študij kažejo celo, da ATRA rast rakavih celic spodbuja (108).

Ustrezna izbira retinoida in načina njegovega apliciranja za zdravljenje raka sečnega mehurja je pomembna tudi zaradi toksičnosti posameznih retinoidov, ki se lahko pojavi pri dolgotrajnem zdravljenju. Najbolj zaskrbljujoči učinek sistemske uporabe retinoidov je teratogenost, ki vključuje kraniofacialne in srčne nepravilnosti ter nepravilnosti priželjca in centralnega živčnega sistema. Najpogostejši sistemski učinek retinoidov je hipertrigliceridemija, ki jo med drugim povezujejo s povečano lipogenezo v jetrih ter tvorbo in izločanjem lipoproteinov zelo nizke gostote (*angl.* very low-density lipoprotein, VLDL) (111,112). Retinoidi lahko škodljivo učinkujejo na številne organe. V kosteh se škodljiv učinek lahko izraža s kostnimi trni, kalcinozo ter resorbcijo kosti hkrati s hiperkalcemijo (112), v jetrih pa kot fibroza ali ciroza (113). Retinoidi pogosto izsušijo kožo in lahko povzročijo luščenje in srbenje kože. Prav tako izsušijo tudi sluznice (ust, nosu itd.), domnevno zaradi zmanjšane tvorbe loja, zmanjšane debeline povrhnjice in slabšega

delovanja epidermisa kot pregrade (112). Zdravljenje z jemanjem etretinata je npr. znatno zmanjšalo pogostost potrebnih transuretrnih resekcij pri bolnikih s papilarnimi tumorji sečnega mehurja. Vendar pa so ugotovili, da so se v skupini, ki je prejela etretinat, pri 3 bolnikih pojavile okvare v delovanju srca (105,114). Sistemskih učinkom bi se bilo morda možno izogniti z zamenjavo jemanja skozi usta z ustreznim vnosom v sečni mehur s katetrom, vendar takih študij še niso izvajali. Za preprečevanje sistemskega toksičnega učinka retinoidov med zdravljenjem raziskovalci razvijajo nove sintetične retinoide, kot je na primer WYC-209. V predkliničnih raziskavah je pokazal zaviranje rasti in ponovno naseljevanje celic številnih rakavih celičnih linij (človeški melanomski rak kože, pljučni rak, rak jajčnikov in dojke) ter zaviral pojav metastaz v pljučih *in vivo*, čeprav je bila njegova toksičnost zelo nizka (106). Naslednji korak k večji uporabnosti retinoidov za preprečevanje in zdravljenje raka sečnega mehurja predstavljajo tudi novi dostavni sistemi nanometerskih velikosti, z uporabo katerih bi lahko premagali nekatere od prej opisanih omejitev.

## 6 Kaj lahko prispevajo nanometrski dostavni sistemi?

Novejši nanometrski dostavni sistemi za vnos učinkovin v telo prinašajo rešitve za izboljšanje preprečevanja in zdravljenja z vitaminom A, retinoidi in karotenoidi, saj omogočajo izdelavo prehranskih dodatkov in učinkovin tako, da izboljšajo biološko dostopnost ter zaščito aktivne učinkovine. Poleg tega lahko nanometrski dostavni sistemi zmanjšajo toksičnost, ki jo povzročijo visoki odmerki in dolgotrajno zdravljenje z retinoidi (opisano v 4. in 5. poglavju). Vse to lahko dosežemo z enkapsuliranjem retinoidov v dostavne sisteme, kot so nanodelci, miceli ter liposomi, ali tako, da se retinoidi vežejo na nanodelce, proteine ali kationske polimere (80).

Na področju zdravljenja raka z retinoidi so raziskovalci na predkliničnih modelih pokazali, da nanocelarna oblika retinoida fenretinida z lenalidomidom izboljša biološko dostopnost fenretinida in terapevtski učinek na modelih nevroblastoma tako *in vitro* kot *in vivo* (121). Poleg tega je intravenska aplikacija fenretinidne oljne emulzije v klinični raziskavi faze I pri bolnikih z napredovalimi trdnimi tumorji pokazala višje koncentracije fenretinida v krvi kot s predhodnimi oblikami fenretinida v kapsulah. Stranski učinki zdravljenja so bili sprejemljivi (122). Nanoenkapsuliranje omogoča tudi enostavno hkratno aplikacijo učinkovin. Enkapsuliranje ATRA in kemoterapevtika doksorubicina v isti nanodelec je npr. učinkoviteje zavrla rast tumorja dojke

in inhibirala zarodne rakave celice v predkliničnih raziskavah (123). Še več, Kong in sodelavci so pokazali, da kombiniranje ATRA in doksorubicina z imunoterapevtikom interleukinom 2 v nanodelce omogoča hkrati preoblikovati imunsko mikrookolje tumorja ter inhibira rast tumorja in metastaziranje (124).

Karotenoidi imajo sicer številne pozitivne vplive na zdravje posameznika (107,125), vendar so kemično nestabilni, hitro oksidirajo, so slabo biološko dostopni, slabo topni ter se hitro razgradijo med prebavljanjem. Nanoenkapsuliranje omogoča zaščito karotenoidov, tako da se njihove izvorne lastnosti ohranijo med pripravo prehranskega dopolnila, shranjevanjem ter tudi med prebavljanjem po zaužitju (126,127). Čeprav je področje enkapsuliranja karotenoidov še v povojih, so na trgu že prisotni prehranski izdelki, ki temeljijo na nanotehnologiji. Eden takih je Lucarotin, ki vsebuje  $\beta$ -karoten in se uporablja kot prehransko dopolnilo in barvilo za živila, ter Lycopodium, ki vsebuje likopen (rdeč karotenoid, ki ga najdemo v paradižniku) v obliki nanodelcev. Arunkumar in sodelavci so s predkliničnimi študijami pokazali, da se absorbiranje luteina po nanoenkapsulaciji z vodo-topnim hitozanom izboljša (128). Torej bi se enkapsulirani lutein lahko izkazal kot boljše prehransko dopolnilo od neenkapsuliranega.

S pomočjo novih nanometrskih dostavnih sistemov bi lahko torej v prihodnje izboljšali preprečevanje in zdravljenje raka sečnega mehurja z vitaminom A, retinoidi in karotenoidi.

## 7 Zaključek

Vitamin A, retinoidi in karotenoidi predstavljajo obetavno možnost za zmanjšanje tveganja za nastanek raka sečnega mehurja in za njegovo uspešnejše zdravljenje. V rutinski klinični praksi pa se pri bolnikih z rakom

sečnega mehurja še ne uporabljajo. Potrebne so dodatne predklinične raziskave njihovih molekularnih mehanizmov delovanja, učinkov v različnih kombinacijah s kemoterapevtiki in imunoterapevtiki ter novimi nanometrskimi dostavnimi sistemi. Nadalje so potrebne randomizirane klinične študije z vključitvijo večjih skupin bolnikov in placebo skupin. V Sloveniji je bilo med letoma 2013 in 2017 odkritih povprečno 352 novih primerov raka sečnega mehurja na leto (255 moških in 97 žensk), medtem ko je v tem istem obdobju v povprečju umrlo 194 bolnikov na leto (135 moških in 59 žensk) (19,20). Z ozaveščanjem javnosti in predvsem bolnikov, ki pridejo na prvo obravnavo zaradi suma na raka sečnega mehurja, o pomenu prehrane bogate z vitaminom A in karotenoidi, bi morda lahko vplivali na zmanjšanje tveganja za nastanek in ponovitev bolezni.

## Izjava o navzkrižju interesov

Avtorici nimava navzkrižja interesov.

## Zahvala

Avtorici se zahvaljujeva Maruši Mišmaš Zrimšek, ki je znotraj svoje magistrske naloge izvedla nekatere poskuse. Posebna zahvala za tehnično pomoč gre doc. dr. Nataši Resnik, Nadi Pavlici Dubarič, Sabini Železnik, Sanji Čabraja in Lindi Štrus. Najlepša hvala doc. dr. Tomažu Smrkolju, dr. med., in Igorju Sterletu, dr. med., iz Kliničnega oddelka za urologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, in vsem bolnikom, ki so darovali biopsijske vzorce raka mehurja v raziskovalne namene. Delo je nastalo znotraj raziskovalnega programa P3-0108, infrastrukturnega programa MRIC UL IP-0510 in projektov J7-2594, J3 2521, ki jih je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.

## Literatura

- 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(6):394-424. DOI: 10.3322/caac.21492 PMID: 30207593
- Richters A, Aben KK, Kiemeny LA. The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World J Urol*. 2020;38(8):1895-904. DOI: 10.1007/s00345-019-02984-4 PMID: 31676912
- Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*. 2017;71(1):96-108. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.06.010 PMID: 27370177
- Casilla-Lennon MM, Choi SK, Deal AM, Bensen JT, Narang G, Filippou P, et al. Financial Toxicity among Patients with Bladder Cancer: Reasons for Delay in Care and Effect on Quality of Life. *J Urol*. 2018;199(5):1166-73. DOI: 10.1016/j.juro.2017.10.049 PMID: 29155338
- Tang JE, Wang RJ, Zhong H, Yu B, Chen Y. Vitamin A and risk of bladder cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. *World J Surg Oncol*. 2014;12(1):130. DOI: 10.1186/1477-7819-12-130 PMID: 24773914
- Wu S, Liu Y, Michalek JE, Mesa RA, Parma DL, Rodriguez R, et al. Carotenoid Intake and Circulating Carotenoids Are Inversely Associated with the Risk of Bladder Cancer: A Dose-Response Meta-analysis. *Adv Nutr*. 2020;11(3):630-43. DOI: 10.1093/advances/nmz120 PMID: 31800007

7. Al-Zalabani AH, Stewart KF, Wesselius A, Schols AM, Zeegers MP. Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. *Eur J Epidemiol*. 2016;31(9):811-51. DOI: [10.1007/s10654-016-0138-6](https://doi.org/10.1007/s10654-016-0138-6) PMID: 27000312
8. Luo X, Lu H, Li Y, Wang S. Carrot intake and incidence of urothelial cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(44):77957-62. DOI: [10.18632/oncotarget.19832](https://doi.org/10.18632/oncotarget.19832) PMID: 29100438
9. Maiani G, Castón MJ, Catasta G, Toti E, Cambrodón IG, Bysted A, et al. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(S2):S194-218. DOI: [10.1002/mnfr.200800053](https://doi.org/10.1002/mnfr.200800053) PMID: 19035552
10. Toti E, Chen CO, Palmery M, Villaño Valencia D, Peluso I, Non-Provitamin A, et al. Non-Provitamin A and Provitamin A Carotenoids as Immunomodulators: Recommended Dietary Allowance, Therapeutic Index, or Personalized Nutrition? *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:4637861. DOI: [10.1155/2018/4637861](https://doi.org/10.1155/2018/4637861) PMID: 29861829
11. Murillo AG, Fernandez ML. Potential of Dietary Non-Provitamin A Carotenoids in the Prevention and Treatment of Diabetic Microvascular Complications. *Adv Nutr*. 2016;7(1):14-24. DOI: [10.3945/an.115.009803](https://doi.org/10.3945/an.115.009803) PMID: 26773012
12. Murillo AG, Fernandez ML. Potential of Dietary Non-Provitamin A Carotenoids in the Prevention and Treatment of Diabetic Microvascular Complications. *Adv Nutr*. 2016;7(1):14-24. DOI: [10.3945/an.115.009803](https://doi.org/10.3945/an.115.009803) PMID: 26773012
13. Dattola A, Silvestri M, Bennardo L, Passante M, Scali E, Patruno C, et al. Role of Vitamins in Skin Health: a Systematic Review. *Curr Nutr Rep*. 2020;9(3):226-35. DOI: [10.1007/s13668-020-00322-4](https://doi.org/10.1007/s13668-020-00322-4) PMID: 32602055
14. Dobrotkova V, Chlapek P, Mazanek P, Sterba J, Veselska R. Traffic lights for retinoids in oncology: molecular markers of retinoid resistance and sensitivity and their use in the management of cancer differentiation therapy. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1059. DOI: [10.1186/s12885-018-4966-5](https://doi.org/10.1186/s12885-018-4966-5) PMID: 30384831
15. Chlapek P, Slavikova V, Mazanek P, Sterba J, Veselska R. Why Differentiation Therapy Sometimes Fails: Molecular Mechanisms of Resistance to Retinoids. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):132. DOI: [10.3390/ijms19010132](https://doi.org/10.3390/ijms19010132) PMID: 29301374
16. Uray IP, Dmitrovsky E, Brown PH. Retinoids and rexinoids in cancer prevention: from laboratory to clinic. *Semin Oncol*. 2016;43(1):49-64. DOI: [10.1053/j.seminoncol.2015.09.002](https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.09.002) PMID: 26970124
17. Tratnjek L, Jeruc J, Romih R, Zupančič D. Vitamin A and Retinoids in Bladder Cancer Chemoprevention and Treatment: A Narrative Review of Current Evidence, Challenges and Future Prospects. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):3510. DOI: [10.3390/ijms22073510](https://doi.org/10.3390/ijms22073510) PMID: 33805295
18. Bushue N, Wan YJ. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(13):1285-98. DOI: [10.1016/j.addr.2010.07.003](https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.07.003) PMID: 20654663
19. Zadnik V, Kokolj-Kokot M, Černelč K, Bric NJO. Ocena zamikov pri napotitvi, izvedbi diagnostike in prvega zdravljenja pri bolnikih z raki sečnega mehurja in ledvic v Sloveniji. *Onkologija*. 2020;24(1):6-10.
20. Zadnik V, Žagar T. SLORA: Slovenija in rak. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2023 [cited 2021 Jan 12]. Available from: <http://www.slora.si/>
21. Zupančič DH. Research models of urinary bladder cancer for improved diagnostics and treatment. *Zdrav Vestn*. 2020;89:301-19.
22. Khandelwal P, Abraham SN, Apodaca G. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297(6):F1477-501. DOI: [10.1152/ajprenal.00327.2009](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00327.2009) PMID: 19587142
23. Hicks RM. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1975;50(2):215-46. DOI: [10.1111/j.1469-185X.1975.tb01057.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1975.tb01057.x) PMID: 1100129
24. Birder L, Andersson KE. Urothelial signaling. *Physiol Rev*. 2013;93(2):653-80. DOI: [10.1152/physrev.00030.2012](https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2012) PMID: 23589830
25. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2004;84(3):935-86. DOI: [10.1152/physrev.00038.2003](https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2003) PMID: 15269341
26. Lewis SA, de Moura JL. Incorporation of cytoplasmic vesicles into apical membrane of mammalian urinary bladder epithelium. *Nature*. 1982;297(5868):685-8. DOI: [10.1038/297685a0](https://doi.org/10.1038/297685a0) PMID: 6283364
27. Magers MJ, Lopez-Beltran A, Montironi R, Williamson SR, Kaimakliotis HZ, Cheng L. Staging of bladder cancer. *Histopathology*. 2019;74(1):112-34. DOI: [10.1111/his.13734](https://doi.org/10.1111/his.13734) PMID: 30565300
28. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. Berlin: Springer International Publishing; 2018.
29. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):106-19. DOI: [10.1016/j.eururo.2016.02.028](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028) PMID: 26996659
30. Kamat AM, Hahn NM, Efsthathiou JA, Lerner SP, Malmström PU, Choi W, et al. Bladder cancer. *Lancet*. 2016;388(10061):2796-810. DOI: [10.1016/S0140-6736\(16\)30512-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30512-8) PMID: 27345655
31. Babjuk M, Burger M, Compérat EM, Gontero P, Mostafid AH, Palou J, et al.; European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. *Eur Urol*. 2019;76(5):639-57. DOI: [10.1016/j.eururo.2019.08.016](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.08.016) PMID: 31443960
32. Ritch CR, Velasquez MC, Kwon D, Becerra MF, Soodana-Prakash N, Atluri VS, et al. Use and Validation of the AUA/SUO Risk Grouping for Nonmuscle Invasive Bladder Cancer in a Contemporary Cohort. *J Urol*. 2020;203(3):505-11. DOI: [10.1097/JU.0000000000000593](https://doi.org/10.1097/JU.0000000000000593) PMID: 31609178
33. Tan TZ, Rouanne M, Tan KT, Huang RY, Thierry JP. Molecular Subtypes of Urothelial Bladder Cancer: Results from a Meta-cohort Analysis of 2411 Tumors. *Eur Urol*. 2019;75(3):423-32. DOI: [10.1016/j.eururo.2018.08.027](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.08.027) PMID: 30213523
34. Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, Compérat EM, Cowan NC, Gakis G, et al. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: summary of the 2020 Guidelines. *Eur Urol*. 2021;79(1):82-104. DOI: [10.1016/j.eururo.2020.03.055](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2020.03.055) PMID: 32360052
35. Huang Z, Liu Y, Qi G, Brand D, Zheng SG. Role of Vitamin A in the Immune System. *J Clin Med*. 2018;7(9):258. DOI: [10.3390/jcm7090258](https://doi.org/10.3390/jcm7090258) PMID: 30200565
36. Polcz ME, Barbul A. The Role of Vitamin A in Wound Healing. *Nutr Clin Pract*. 2019;34(5):695-700. DOI: [10.1002/ncp.10376](https://doi.org/10.1002/ncp.10376) PMID: 31389093
37. Zasada M, Budzisz E. Retinoids: active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Postepy Dermatol Alergol*. 2019;36(4):392-7. DOI: [10.5114/ada.2019.87443](https://doi.org/10.5114/ada.2019.87443) PMID: 31616211
38. Issa MC, Tamura B, eds. *Retinoids*. In: Azulay DR, Vendramini DL. *Daily Routine in Cosmetic Dermatology*. Cham: Springer International Publishing; 2016. pp. 1-16. DOI: [10.1007/978-3-319-20250-1\\_15-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20250-1_15-1)
39. Clagett-Dame M, Knutson D. Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients*. 2011;3(4):385-428. DOI: [10.3390/nu3040385](https://doi.org/10.3390/nu3040385) PMID: 22254103
40. Zhu G. Vitamin A and its Derivatives-Retinoid Acid and Retinoid Pharmacology. *Am J Biomed Sci Res*. 2019;3(2):162-77. DOI: [10.34297/AJBSR.2019.03.000656](https://doi.org/10.34297/AJBSR.2019.03.000656)
41. Iyer N, Vaishnav S. Vitamin A at the interface of host-commensal-pathogen interactions. *PLoS Pathog*. 2019;15(6):e1007750. DOI: [10.1371/journal.ppat.1007750](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007750) PMID: 31170262
42. Cantorna MT, Snyder L, Arora J. Vitamin A and vitamin D regulate the microbial complexity, barrier function, and the mucosal immune responses to ensure intestinal homeostasis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2019;54(2):184-92. DOI: [10.1080/10409238.2019.1611734](https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1611734) PMID: 31084433
43. Dao DQ, Ngo TC, Thong NM, Nam PC. Is Vitamin A an Antioxidant or a Pro-oxidant? *J Phys Chem B*. 2017;121(40):9348-57. DOI: [10.1021/acs.jpcc.7b07065](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b07065) PMID: 28937764

44. Siddikuzzaman, Grace VM. Antioxidant potential of all-trans retinoic acid (ATRA) and enhanced activity of liposome encapsulated ATRA against inflammation and tumor-directed angiogenesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2013;35(1):164-73. DOI: [10.3109/08923973.2012.736520](https://doi.org/10.3109/08923973.2012.736520) PMID: 23116338
45. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *J Nat Med.* 2020;74(1):1-16. DOI: [10.1007/s11418-019-01364-x](https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x) PMID: 31588965
46. Bendich A, Olson JA. Biological actions of carotenoids. *FASEB J.* 1989;3(8):1927-32. DOI: [10.1096/fasebj.3.8.2656356](https://doi.org/10.1096/fasebj.3.8.2656356) PMID: 2656356
47. Khachik F, Beecher GR, Goli MB, Lusby WR, Smith JC. Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma. *Anal Chem.* 1992;64(18):2111-22. DOI: [10.1021/ac00042a016](https://doi.org/10.1021/ac00042a016) PMID: 1416048
48. Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med.* 2005;26(6):459-516. DOI: [10.1016/j.mam.2005.10.001](https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001) PMID: 16309738
49. von Lintig J, Moon J, Lee J, Ramkumar S. Carotenoid metabolism at the intestinal barrier. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(11):158580. DOI: [10.1016/j.bbalip.2019.158580](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158580) PMID: 31794861
50. Edge R, Truscott TG. Singlet Oxygen and Free Radical Reactions of Retinoids and Carotenoids-A Review. *Antioxidants (Basel).* 2018;7(1):5. DOI: [10.3390/antiox7010005](https://doi.org/10.3390/antiox7010005) PMID: 29301252
51. Poličnik R. Zdrava prehrana, priložnik za izvajalce v zdravstvenih domovih. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2018.
52. Jordan T, Mastnak DM, Palamar N, Kozjek NR. Nutritional Therapy for Patients with Esophageal Cancer. *Nutr Cancer.* 2018;70(1):23-9. DOI: [10.1080/01635581.2017.1374417](https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1374417) PMID: 29016197
53. Kozjek Rotovnik N, Mlakar Mastnak D, Kogovšek K, Sedej I, Peklaj E. Prehrana in rak. Kej jesti, če zbolimo. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2017 [cited 2022 Jan 12]. Available from: [https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/Strokovna\\_knjiznica/publikacije\\_za\\_bolnike/Prehrana\\_in\\_rak\\_2017.pdf](https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/Strokovna_knjiznica/publikacije_za_bolnike/Prehrana_in_rak_2017.pdf).
54. Murillo AG, DiMarco DM, Fernandez ML. The Potential of Non-Provitamin A Carotenoids for the Prevention and Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Biology (Basel).* 2016;5(4):42. DOI: [10.3390/biology5040042](https://doi.org/10.3390/biology5040042) PMID: 27834813
55. Rubin LP, Ross AC, Stephensen CB, Bohn T, Tanumihardjo SA. Metabolic Effects of Inflammation on Vitamin A and Carotenoids in Humans and Animal Models. *Adv Nutr.* 2017;8(2):197-212. DOI: [10.3945/an.116.014167](https://doi.org/10.3945/an.116.014167) PMID: 28298266
56. O'Byrne SM, Blaner WS. Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J Lipid Res.* 2013;54(7):1731-43. DOI: [10.1194/jlr.R037648](https://doi.org/10.1194/jlr.R037648) PMID: 23625372
57. Moise AR, Noy N, Palczewski K, Blaner WS. Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry.* 2007;46(15):4449-58. DOI: [10.1021/bi7003069](https://doi.org/10.1021/bi7003069) PMID: 17378589
58. Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, et al. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science.* 2007;315(5813):820-5. DOI: [10.1126/science.1136244](https://doi.org/10.1126/science.1136244) PMID: 17255476
59. Blaner WS. STRA6, a cell-surface receptor for retinol-binding protein: the plot thickens. *Cell Metab.* 2007;5(3):164-6. DOI: [10.1016/j.cmet.2007.02.006](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.02.006) PMID: 17339024
60. Henning P, Conaway HH, Lerner UH. Retinoid receptors in bone and their role in bone remodeling. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6:31. DOI: [10.3389/fendo.2015.00031](https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00031) PMID: 25814978
61. Riahi RR, Bush AE, Cohen PR. Topical Retinoids: Therapeutic Mechanisms in the Treatment of Photodamaged Skin. *Am J Clin Dermatol.* 2016;17(3):265-76. DOI: [10.1007/s40257-016-0185-5](https://doi.org/10.1007/s40257-016-0185-5) PMID: 26969582
62. Hurst RJ, Else KJ. Retinoic acid signalling in gastrointestinal parasite infections: lessons from mouse models. *Parasite Immunol.* 2012;34(7):351-9. DOI: [10.1111/j.1365-3024.2012.01364.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01364.x) PMID: 22443219
63. Wu L, Guo X, Wang W, Medeiros DM, Clarke SL, Lucas EA, et al. Molecular aspects of  $\beta$ ,  $\beta$ -carotene-9', 10'-oxygenase 2 in carotenoid metabolism and diseases. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016;241(17):1879-87. DOI: [10.1177/1535370216657900](https://doi.org/10.1177/1535370216657900) PMID: 27390265
64. Steivson F, Jing J, Tripathy S, Isoherranen N. Role of Retinoic Acid-Metabolizing Cytochrome P450s, CYP26, in Inflammation and Cancer. *Adv Pharmacol.* 2015;74:373-412. DOI: [10.1016/bs.apha.2015.04.006](https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.04.006) PMID: 26233912
65. Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 2002;43(11):1773-808. DOI: [10.1194/jlr.R100015-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.R100015-JLR200) PMID: 12401878
66. Iskakova M, Karbyshev M, Piskunov A, Rochette-Egly C. Nuclear and extranuclear effects of vitamin A. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;93(12):1065-75. DOI: [10.1139/cjpp-2014-0522](https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0522) PMID: 26459513
67. Coyle K, Sultan M, Thomas M, Vaghar-Kashani A, Marcato P. Retinoid signaling in cancer and its promise for therapy. *J Carcinog Mutagen.* 2013;S7:1-14. DOI: [0.4172/2157-2518.S7-006](https://doi.org/10.4172/2157-2518.S7-006)
68. Boorjian S, Scherr DS, Mongan NP, Zhuang Y, Nanus DM, Gudas LJ. Retinoid receptor mRNA expression profiles in human bladder cancer specimens. *Int J Oncol.* 2005;26(4):1041-8. DOI: [10.3892/ijo.26.4.1041](https://doi.org/10.3892/ijo.26.4.1041) PMID: 15754000
69. Boorjian S, Tickoo SK, Mongan NP, Yu H, Bok D, Rando RR, et al. Reduced lecithin: retinol acyltransferase expression correlates with increased pathologic tumor stage in bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(10):3429-37. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-03-0756](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0756) PMID: 15161698
70. Toki K, Enokida H, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, Yoshino H, et al. CpG hypermethylation of cellular retinol-binding protein 1 contributes to cell proliferation and migration in bladder cancer. *Int J Oncol.* 2010;37(6):1379-88. PMID: 21042705
71. Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Suzuki T, Okamoto K, Ichikawa T, et al. ALDH1A1 in patient-derived bladder cancer spheroids activates retinoic acid signaling leading to TUBB3 overexpression and tumor progression. *Int J Cancer.* 2020;146(4):1099-113. DOI: [10.1002/ijc.32505](https://doi.org/10.1002/ijc.32505) PMID: 31187490
72. Zupančič D, Korać-Prljić J, Kreft ME, Franković L, Vilović K, Jeruc J, et al. Vitamin A Rich Diet Diminishes Early Urothelial Carcinogenesis by Altering Retinoic Acid Signaling. *Cancers (Basel).* 2020;12(7):1712. DOI: [10.3390/cancers12071712](https://doi.org/10.3390/cancers12071712) PMID: 32605249
73. Amann PM, Czaja K, Bazhin AV, Rühl R, Eichmüller SB, Merk HF, et al. LRAT overexpression diminishes intracellular levels of biologically active retinoids and reduces retinoid antitumor efficacy in the murine melanoma B16F10 cell line. *Skin Pharmacol Physiol.* 2015;28(4):205-12. DOI: [10.1159/000368806](https://doi.org/10.1159/000368806) PMID: 25721651
74. Amann PM, Czaja K, Bazhin AV, Rühl R, Skazik C, Heise R, et al. Knockdown of lecithin retinol acyltransferase increases all-trans retinoic acid levels and restores retinoid sensitivity in malignant melanoma cells. *Exp Dermatol.* 2014;23(11):832-7. DOI: [10.1111/exd.12548](https://doi.org/10.1111/exd.12548) PMID: 25236354
75. Simmons DP, Peach ML, Friedman JR, Green MM, Nicklaus MC, De Luca LM. Evidence that sequence homologous region in LRAT-like proteins possesses anti-proliferative activity and DNA binding properties: translational implications and mechanism of action. *Carcinogenesis.* 2006;27(4):693-707. DOI: [10.1093/carcin/bgi235](https://doi.org/10.1093/carcin/bgi235) PMID: 16234259
76. Steinmaus CM, Nuñez S, Smith AH. Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables. *Am J Epidemiol.* 2000;151(7):693-702. DOI: [10.1093/oxfordjournals.aje.a101264](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a101264) PMID: 10752797
77. Mettlin C, Graham S. Dietary risk factors in human bladder cancer. *Am J Epidemiol.* 1979;110(3):255-63. DOI: [10.1093/oxfordjournals.aje.a112810](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112810) PMID: 582494
78. Piyathilake C. Dietary factors associated with bladder cancer. *ICUrology.* 2016;17(Suppl 1):S14-25. DOI: [10.4111/icu.2016.57.S1.S14](https://doi.org/10.4111/icu.2016.57.S1.S14) PMID: 27326403

79. Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS, Estey EH, Löwenberg B, Naoe T, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2019;133(15):1630-43. DOI: [10.1182/blood-2019-01-894980](https://doi.org/10.1182/blood-2019-01-894980) PMID: 30803991
80. Ferreira R, Napoli J, Enver T, Bernardino L, Ferreira L. Advances and challenges in retinoid delivery systems in regenerative and therapeutic medicine. *Nat Commun*. 2020;11(1):4265. DOI: [10.1038/s41467-020-18042-2](https://doi.org/10.1038/s41467-020-18042-2) PMID: 32848154
81. Clifford JL, Sabichi AL, Zou C, Yang X, Steele VE, Kelloff GJ, et al. Effects of novel phenylretinamides on cell growth and apoptosis in bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(4):391-5. PMID: 11319181
82. Nutting C, Chowaniec J. Evaluation of the actions and interactions of retinoic acid and epidermal growth factor on transformed urothelial cells in culture: implications for the use of retinoid therapy in the treatment of bladder cancer patients. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 1992;4(1):51-5. DOI: [10.1016/S0936-6555\(05\)80778-2](https://doi.org/10.1016/S0936-6555(05)80778-2) PMID: 1310606
83. Laaksovirta S, Rajala P, Nurmi M, Tammela TL, Laato M. The cytostatic effect of 9-cis-retinoic acid, tretinoin, and isotretinoin on three different human bladder cancer cell lines in vitro. *Urol Res*. 1999;27(1):17-22. DOI: [10.1007/s002400050084](https://doi.org/10.1007/s002400050084) PMID: 10092149
84. Zou C, Zhou J, Qian L, Feugang JM, Liu J, Wang X, et al. Comparing the effect of ATRA, 4-HPR, and CD437 in bladder cancer cells. *Front Biosci*. 2006;11(1):2007-16. DOI: [10.2741/1942](https://doi.org/10.2741/1942) PMID: 16720286
85. Chien CL, Chen TW, Lin YS, Lu KS. The apoptotic process of human bladder carcinoma T24 cells induced by retinoid. *J Biomed Sci*. 2004;11(5):631-40. DOI: [10.1007/BF02256129](https://doi.org/10.1007/BF02256129) PMID: 15316139
86. Southgate J, Hutton KA, Thomas DF, Trejdosiewicz LK. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. *Lab Invest*. 1994;71(4):583-94. PMID: 7967513
87. Lin F, Kolluri SK, Chen GQ, Zhang XK. Regulation of retinoic acid-induced inhibition of AP-1 activity by orphan receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21414-22. DOI: [10.1074/jbc.M201885200](https://doi.org/10.1074/jbc.M201885200) PMID: 11934895
88. Wang Z, Zhang Z, Liu Y, Chen Y, Li Q, Duanguolan, et al. Effect of retinoic acid and its complexes with transition metals on human bladder cancer cell line EJ in vitro. *Urol Res*. 2000;28(3):191-5. DOI: [10.1007/s002409900090](https://doi.org/10.1007/s002409900090) PMID: 10929428
89. Murasaki G, Miyata Y, Babaya K, Arai M, Fukushima S, Ito N. Inhibitory effect of an aromatic retinoic acid analog on urinary bladder carcinogenesis in rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann*. 1980;71(3):333-40. PMID: 7418979
90. Grubbs CJ, Moon RC, Squire RA, Farrow GM, Stinson SF, Goodman DG, et al. 13-cis-Retinoic acid: inhibition of bladder carcinogenesis induced in rats by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Science*. 1977;198(4318):743-4. DOI: [10.1126/science.910158](https://doi.org/10.1126/science.910158) PMID: 910158
91. Becci PJ, Thompson HJ, Strum JM, Brown CC, Sporn MB, Moon RC. N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder cancer in C57BL/6 X DBA/2 F1 mice as a useful model for study of chemoprevention of cancer with retinoids. *Cancer Res*. 1981;41(3):927-32. PMID: 7459879
92. Becci PJ, Thompson HJ, Grubbs CJ, Brown CC, Moon RC. Effect of delay in administration of 13-cis-retinoic acid on the inhibition of urinary bladder carcinogenesis in the rat. *Cancer Res*. 1979;39(8):3141-4. PMID: 455298
93. Becci PJ, Thompson HJ, Grubbs CJ, Squire RA, Brown CC, Sporn MB, et al. Inhibitory effect of 13-cis-retinoic acid on urinary bladder carcinogenesis induced in C57BL/6 mice by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. *Cancer Res*. 1978;38(12):4463-6. PMID: 719631
94. Sporn MB, Squire RA, Brown CC, Smith JM, Wenk ML, Springer S. 13-cis-retinoic acid: inhibition of bladder carcinogenesis in the rat. *Science*. 1977;195(4277):487-9. DOI: [10.1126/science.835006](https://doi.org/10.1126/science.835006) PMID: 835006
95. Squire RA, Sporn MB, Brown CC, Smith JM, Wenk ML, Springer S. Histopathological evaluation of the inhibition of rat bladder carcinogenesis by 13-cis-retinoic acid. *Cancer Res*. 1977;37(8 Pt 2):2930-6. PMID: 872122
96. Tannenbaum M, Tannenbaum S, Richelo BN, Trown PW. Effects of 13-cis and all-trans-retinoic acid on the development of bladder cancer in rats: an ultrastructural study. *Scan Electron Microsc*. 1979(3):673-8. PMID: 524032
97. Thompson HJ, Becci PJ, Grubbs CJ, Shealy YF, Stanek EJ, Brown CC, et al. Inhibition of urinary bladder cancer by N-(ethyl)-all-trans-retinamide and N-(2-hydroxyethyl)-all-trans-retinamide in rats and mice. *Cancer Res*. 1981;41(3):933-6. PMID: 7459880
98. Sabichi AL, Lerner SP, Atkinson EN, Grossman HB, Caraway NP, Dinney CP, et al. Phase III prevention trial of fenretinide in patients with resected non-muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(1):224-9. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-07-0733](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0733) PMID: 18172274
99. Sabichi AL, Lerner SP, Grossman HB, Lippman SM. Retinoids in the chemoprevention of bladder cancer. *Curr Opin Oncol*. 1998;10(5):479-84. DOI: [10.1097/00001622-199809000-00019](https://doi.org/10.1097/00001622-199809000-00019) PMID: 9800121
100. Torrisi R, Mezzetti M, Johansson H, Barreca A, Pigatto F, Robertson C, et al. Time course of fenretinide-induced modulation of circulating insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGFBP-3 in a bladder cancer chemoprevention trial. *Int J Cancer*. 2000;87(4):601-5. DOI: [10.1002/1097-0215\(20000815\)87:4<601::AID-IJC22>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20000815)87:4<601::AID-IJC22>3.0.CO;2-W) PMID: 10918204
101. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*. 1998;279(5350):563-6. DOI: [10.1126/science.279.5350.563](https://doi.org/10.1126/science.279.5350.563) PMID: 9438850
102. Yu H, Spitz MR, Mistry J, Gu J, Hong WK, Wu X. Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(2):151-6. DOI: [10.1093/jnci/91.2.151](https://doi.org/10.1093/jnci/91.2.151) PMID: 9923856
103. Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, et al. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(7):620-5. DOI: [10.1093/jnci/91.7.620](https://doi.org/10.1093/jnci/91.7.620) PMID: 10203281
104. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, et al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet*. 1998;351(9113):1393-6. DOI: [10.1016/S0140-6736\(97\)10384-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)10384-1) PMID: 9593409
105. Studer UE, Jenzer S, Biedermann C, Chollet D, Kraft R, von Toggenburg H, et al. Adjuvant treatment with a vitamin A analogue (etretinate) after transurethral resection of superficial bladder tumors. Final analysis of a prospective, randomized multicenter trial in Switzerland. *Eur Urol*. 1995;28(4):284-90. DOI: [10.1159/000475068](https://doi.org/10.1159/000475068) PMID: 8575494
106. Chen J, Cao X, An Q, Zhang Y, Li K, Yao W, et al. Inhibition of cancer stem cell like cells by a synthetic retinoid. *Nat Commun*. 2018;9(1):1406. DOI: [10.1038/s41467-018-03877-7](https://doi.org/10.1038/s41467-018-03877-7) PMID: 29643385
107. Maghsoudi S, Taghavi Shahraki B, Rabiee N, Fatahi Y, Bagherzadeh M, Dinarvand R, et al. The colorful world of carotenoids: a profound insight on therapeutics and recent trends in nano delivery systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2021;61(1):1-40. PMID: 33399020
108. Costantini L, Molinari R, Farinon B, Lelli V, Timperio AM, Merendino N. Docosahexaenoic Acid Reverted the All-trans Retinoic Acid-Induced Cellular Proliferation of T24 Bladder Cancer Cell Line. *J Clin Med*. 2020;9(8):2494. DOI: [10.3390/jcm9082494](https://doi.org/10.3390/jcm9082494) PMID: 32756427
109. Hameed DA, el-Metwally TH. The effectiveness of retinoic acid treatment in bladder cancer: impact on recurrence, survival and TGFalpha and VEGF as end-point biomarkers. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(1):92-100. DOI: [10.4161/cbt.7.1.5134](https://doi.org/10.4161/cbt.7.1.5134) PMID: 18347417
110. Zou C, Liebert M, Zou C, Grossman HB, Lotan R. Identification of effective retinoids for inhibiting growth and inducing apoptosis in bladder cancer cells. *J Urol*. 2001;165(3):986-92. DOI: [10.1016/S0022-5347\(05\)66589-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)66589-5) PMID: 11176527
111. Bonet ML, Ribot J, Palou A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(1):177-89. DOI: [10.1016/j.bbali.2011.06.001](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2011.06.001) PMID: 21669299

112. Olson JM, Ameer MA, Goyal A, Vitamin A. Toxicity. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC; 2022.
113. Cheruvattath R, Orrego M, Gautam M, Byrne T, Alam S, Voltchenok M, et al. Vitamin A toxicity: when one a day doesn't keep the doctor away. *Liver Transpl.* 2006;12(12):1888-91. DOI: [10.1002/lt.21007](https://doi.org/10.1002/lt.21007) PMID: [17133567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17133567/)
114. Alftan O, Tarkkanen J, Gröhn P, Heinonen E, Pyrhönen S, Säilä K. Tigason (etretinate) in prevention of recurrence of superficial bladder tumors. A double-blind clinical trial. *Eur Urol.* 1983;9(1):6-9. DOI: [10.1159/000474033](https://doi.org/10.1159/000474033) PMID: [6337054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6337054/)
115. Decensi A, Bruno S, Costantini M, Torrissi R, Curotto A, Gatteschi B, et al. Phase IIa study of fenretinide in superficial bladder cancer, using DNA flow cytometry as an intermediate end point. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(2):138-40. DOI: [10.1093/jnci/86.2.138](https://doi.org/10.1093/jnci/86.2.138) PMID: [8271297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8271297/)
116. Decensi A, Torrissi R, Bruno S, Costantini M, Curotto A, Nicolò G, et al. Randomized trial of fenretinide in superficial bladder cancer using DNA flow cytometry as an intermediate end point. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(10):1071-8. PMID: [11045790](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11045790/)
117. Puntoni M, Petrerà M, Campora S, Garrone E, Defferrari C, Torrissi R, et al. Prognostic Significance of VEGF after Twenty-Year Follow-up in a Randomized Trial of Fenretinide in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2016;9(6):437-44. DOI: [10.1158/1940-6207.CAPR-15-0345](https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-15-0345) PMID: [27045034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27045034/)
118. Pedersen H, Wolf H, Jensen SK, Lund F, Hansen E, Olsen PR, et al. Administration of a retinoid as prophylaxis of recurrent non-invasive bladder tumors. *Scand J Urol Nephrol.* 1984;18(2):121-3. DOI: [10.3109/00365598409182178](https://doi.org/10.3109/00365598409182178) PMID: [6379859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6379859/)
119. Prout GR, Jr, Barton BA, Kontz W, Jr, Loening S, Flangan M, Branen G. 13-cis-Retinoic acid in chemoprevention of superficial bladder cancer. *J Cell Biochem Suppl.* 1992;16:148-52. PMID: [1305679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1305679/)
120. Pili R, Salumbides B, Zhao M, Altiok S, Qian D, Zwiebel J, et al. Phase I study of the histone deacetylase inhibitor entinostat in combination with 13-cis retinoic acid in patients with solid tumours. *Br J Cancer.* 2012;106(1):77-84. DOI: [10.1038/bjc.2011.527](https://doi.org/10.1038/bjc.2011.527) PMID: [22134508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22134508/)
121. Orienti I, Francescangeli F, De Angelis ML, Fecchi K, Bongiorno-Borbone L, Signore M, et al. A new bioavailable fenretinide formulation with antiproliferative, antimetabolic, and cytotoxic effects on solid tumors. *Cell Death Dis.* 2019;10(7):529. DOI: [10.1038/s41419-019-1775-y](https://doi.org/10.1038/s41419-019-1775-y) PMID: [31332161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31332161/)
122. Thomas JS, El-Khoueiry AB, Maurer BJ, Groshen S, Pinski JK, Cobos E, et al. A phase I study of intravenous fenretinide (4-HPR) for patients with malignant solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2021;87(4):525-32. DOI: [10.1007/s00280-020-04224-8](https://doi.org/10.1007/s00280-020-04224-8) PMID: [33423090](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33423090/)
123. Sun R, Liu Y, Li SY, Shen S, Du XJ, Xu CF, et al. Co-delivery of all-trans-retinoic acid and doxorubicin for cancer therapy with synergistic inhibition of cancer stem cells. *Biomaterials.* 2015;37:405-14. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2014.10.018](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.018) PMID: [25453968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25453968/)
124. Kong M, Tang J, Qiao Q, Wu T, Qi Y, Tan S, et al. Biodegradable Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles for Regulating Tumor Microenvironment and Enhancing Antitumor Efficiency. *Theranostics.* 2017;7(13):3276-92. DOI: [10.7150/thno.19987](https://doi.org/10.7150/thno.19987) PMID: [28900509](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28900509/)
125. Álvarez R, Vaz B, Gronemeyer H, de Lera AR. Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. *Chem Rev.* 2014;114(1):1-125. DOI: [10.1021/cr400126u](https://doi.org/10.1021/cr400126u) PMID: [24266866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24266866/)
126. Rehman A, Tong Q, Jafari SM, Assadpour E, Shehzad Q, Aadil RM, et al. Carotenoid-loaded nanocarriers: A comprehensive review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020;275:102048. DOI: [10.1016/j.cis.2019.102048](https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102048) PMID: [31757387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31757387/)
127. Lohith Kumar DH, Mitra J, Roopa SS. Nanoencapsulation of Food Carotenoids. In: Dasgupta N, Ranjan S, Lichtfouse E, eds. *Environmental Nanotechnology*, Volume 3. Berlin: Springer; 2020. DOI: [10.1007/978-3-030-26672-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-26672-1_7)
128. Arunkumar R, Harish Prashanth KV, Baskaran V. Promising interaction between nanoencapsulated lutein with low molecular weight chitosan: characterization and bioavailability of lutein in vitro and in vivo. *Food Chem.* 2013;141(1):327-37. DOI: [10.1016/j.foodchem.2013.02.108](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.108) PMID: [23768365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23768365/)