

## **Lek. Krzysztof Ratajczyk**

### **Tytuł pracy doktorskiej: „Znaczenie białka KIM-1 w przedoperacyjnej ocenie stopnia zaawansowania klinicznego raka jasnokomórkowego nerki”**

#### **STRESZCZENIE**

##### **Wstęp**

Rak jasnokomórkowy (ang. clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) jest najczęstszym podtypem raka nerki, rozpoznawanym u 75-80 % pacjentów. Większość przypadków ccRCC przebiega bezobjawowo i jest rozpoznawana przypadkowo w badaniach obrazowych. Około 20 - 30 % pacjentów z ccRCC jest diagnozowanych w stadium zaawansowanym miejscowo lub rozsiałym, co wiąże się ze złym rokowaniem. W praktyce klinicznej brakuje taniego i powszechnie dostępnego testu, który umożliwiłby wykrycie tej choroby w stadium, w którym radykalne leczenie chirurgiczne jest nadal możliwe. Białko Kidney Injury Molecule – 1 (KIM-1) zostało oznaczone we krwi i moczu pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nerki i może potencjalnie służyć jako biomarker diagnostyczny oraz prognostyczny w tej jednostce chorobowej.

##### **Cele pracy**

- Ocena użyteczności białka KIM-1 w moczu i osoczu jako biomarkera diagnostycznego dla raka jasnokomórkowego nerki.
- Ocena użyteczności białka KIM-1 w moczu i osoczu do przewidywania stadium zaawansowania i stopnia zróżnicowania histopatologicznego nowotworu oraz obecności niekorzystnych cech prognostycznych wśród pacjentów z diagnozą jasnokomórkowego raka nerki.

- Ocena korelacji między cechami klinicznymi i histopatologicznymi raka jasnokomórkowego nerki, a zakresami stężeń białka KIM-1 w moczu i osoczu.
- Porównanie rozkładu stężeń białka KIM-1 w moczu i osoczu chorych z jasnokomórkowym rakiem nerki w zależności od parametrów badania ogólnego moczu.
- Porównanie rozkładu stężeń białka KIM-1 w moczu i osoczu chorych z jasnokomórkowym rakiem nerki w zależności od występowania chorób towarzyszących (otyłość, nikotynizm, nadciśnienie tętnicze i cukrzyca).
- Wyznaczenie optymalnego punktu odcięcia dla stężenia białka KIM-1 w moczu i osoczu dla zróżnicowania pomiędzy pacjentami z rakiem jasnokomórkowym, a osobami zdrowymi.
- Porównanie wartości diagnostycznej i prognostycznej pomiędzy oznaczeniami białka KIM-1 w moczu i osoczu.

## **Material i metody**

Opisywane badanie kliniczne zostało przeprowadzone prospektywnie w Oddziale Urologii i Urologii Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu w okresie od marca 2015 do grudnia 2017 roku. Zgodę na realizację projektu wyraziła Komisja Bioetyczna przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu (decyzja KB/nr 5/rok 2015 z dnia 24.03.2015 r). Zarówno zdrowi ochotnicy, jak i pacjenci z rozpoznaniem guzem nerki wyrazili pisemną, świadomą zgodę na pozyskanie i wykorzystanie ich próbek biologicznych do celu realizacji powyższego badania. Grupę badaną stanowiły osoby w wieku powyżej 18 r.ż., z rozpoznaniem pierwotnego guza nerki i brakiem ognisk nowotworowych przeciwległej nerki ustalonym na podstawie wyniku badania tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego jamy brzusznej. Kryteriami wyłączenia były: brak zgody na udział w badaniu, współistniejący aktywny proces nowotworowy lub przebyte w przeszłości leczenie z powodu raka nerki. Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy z wywiadem nieobciążonym chorobami nerek. Pierwszy, poranny mocz i krew obwodowa pobierane były rano w dniu operacji. Analiza histopatologiczna preparatów pooperacyjnych została wykonywana w Zakładzie Patomorfologii „Hist-Med” we Wrocławiu. Oznaczenie stężenia ludzkiego białka KIM-1 za pomocą protokołu ELISA przeprowadzono przy wykorzystaniu komercyjnych, zoptymalizowanych zestawów odczynników firmy R&Dsystems. Analizę statystyczną

przeprowadzono wykorzystując komputerowe pakiety programów statystycznych EPIINFO Ver. 7.2.4.0 oraz Statistica Ver. 13.3.  $P \leq 0.05$  uznawano za znaczące statystycznie.

## **Wyniki**

Na potrzebę oznaczenia stężenia białka KIM-1 pobrano próbki moczu i krwi od 34 zdrowych ochotników oraz 73 pacjentów z diagnozą pierwotnego guza nerki, których następnie poddano leczeniu operacyjnemu – nerkooszczędzającemu (NSS, n=38) lub radykalnej nefrektomii (n=35). Na podstawie wyników histopatologicznych usuniętych guzów dokonano podziału na grupę pacjentów z rakiem jasnokomórkowym (ccRCC, n=52) i grupę pacjentów z pozostałymi podtypami histologicznymi guzów nerek (non-ccRCC, n=21).

Obecność białka KIM-1 została potwierdzona zarówno w moczu, jak i w osoczu pacjentów z grupy badanej (ccRCC) oraz w grupach kontrolnych (non-ccRCC, zdrowi ochotnicy). Stwierdzono istotny statystycznie wyższy rozkład stężeń KIM-1 w moczu (uKIM-1) i osoczu (pKIM-1) pacjentów z rakiem jasnokomórkowym w porównaniu z grupami kontrolnymi ( $p < 0,001$ ). Wykazano istotne statystycznie wyższe stężenia uKIM-1 i pKIM-1 u pacjentów z ccRCC zaawansowanym (T3-T4 N0/1 M0/1 wg TNM) niż ccRCC ograniczonym do nerki (T1-T2 N0 M0). Obecność niekorzystnych cech prognostycznych, tj. martwicy, nacieku tłuszczu okołonerkowego i wyższego zróżnicowania histologicznego w skali WHO/ISUP związane były z istotnie wyższym stężeniem uKIM-1 i pKIM-1 ( $p < 0,001$ ), czego nie wykazano dla inwazji do naczyń żylnych. Ponadto stężenia uKIM-1 i pKIM-1 były istotnie wyższe w przypadku występowania krwinkomoczu, białkomoczu oraz leukocyturii (tylko dla pKIM-1) w teście paskowym moczu u pacjentów z ccRCC. Nie stwierdzono natomiast istotnej statystycznie zależności pomiędzy występowaniem najczęstszych chorób cywilizacyjnych a stężeniem badanego białka.

Analiza korelacji wykazała istotną statystycznie pozytywną korelację pomiędzy stężeniem uKIM-1 i pKIM-1 a wielkością guza, grupą zaawansowania wg TNM oraz stopniem zróżnicowania histopatologicznego w skali WHO/ISUP ( $p < 0,001$ ). Stężenie pKIM-1 korelowało również pozytywnie z wiekiem pacjenta, stężeniem kreatyniny w surowicy i stężeniem uKIM-1, a negatywnie z eGFR.

Analizując wyniki wyznaczono optymalne punkty odcięcia stężenia KIM-1 w moczu i osoczu, dla których zróżnicowanie pomiędzy chorymi z ccRCC a osobami zdrowymi byłoby najbardziej prawdopodobne. W przypadku uKIM-1 punkt odcięcia wynosił 1,15 ng/mg Cr, przy

czułości 0,692, swoistości 0,735 i AUC równej 0,733. Wartość pKIM-1 równa 75 pg/ml wykazywała natomiast czułość 0,904, swoistość 0,941 i AUC równą 0,930.

### **Wnioski**

- Białko KIM-1 jest oznaczalne w moczu i osoczu krwi pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nerki, a rozkład jego osoczowych stężeń jest istotnie wyższy niż w grupach kontrolnych.
- Rozkład stężeń białka KIM-1 w moczu i osoczu jest wyższy w raku jasnokomórkowym wykazującym niekorzystne cechy kliniczne i histopatologiczne, tj. wyższe stadium zaawansowania klinicznego, wyższy stopień zróżnicowania histopatologicznego, obecność martwicy i naciekania tłuszczu okołonerkowego.
- Stężenie białka KIM-1 w osoczu i moczu, koreluje z wielkością guza, stopniem zaawansowania i zróżnicowania raka jasnokomórkowego.
- Rozkład stężeń białka KIM-1 w osoczu i moczu jest istotnie wyższy u pacjentów z krwinkomoczem lub białkomoczem.
- Rozkład stężeń białka KIM-1 w moczu i osoczu pacjentów z rakiem jasnokomórkowym nie różni się istotnie w przypadku współwystępowania otyłości, nikotynizmu, nadciśnienia tętniczego lub cukrzycy.
- Punkt odcięcia dla stężenia białka KIM-1 w osoczu równego 75 pg/ml wykazuje wysoką czułość i swoistość dla odróżnienia pacjentów z rakiem jasnokomórkowym od osób zdrowych.
- Oznaczenie białka KIM-1 w osoczu wykazuje wyższą wartość diagnostyczną i prognostyczną dla raka jasnokomórkowego niż oznaczenie KIM-1 w moczu.

### **ABSTRACT**

## **Introduction:**

Clear cell renal carcinoma (ccRCC) is the most prevalent (75-80%) histological subtype of renal cell carcinoma. Most of ccRCC cases are asymptomatic and discovered incidentally at imaging, and around 20-30% of patients are diagnosed with locally advanced or metastatic disease, which is associated with low survival rate. Unfortunately, in clinical practise there are no screening tests for early detection of the disease, when it is still curable with surgical treatment. Kidney injury molecule (KIM-1) has been determined in urine and blood of ccRCC patients in former studies. It presents good potential to become diagnostic and prognostic biomarker in ccRCC.

## **Aims:**

- Evaluation of the KIM-1 in urine and plasma as a diagnostic biomarkers for clear cell kidney cancer.
- Evaluation of the KIM-1 in urine and plasma for prediction of the clinical stage, histopathological grade and the presence of unfavorable prognostic features among patients diagnosed with ccRCC.
- Correlation analysis between urinary and plasmatic KIM-1 concentrations and the pathological characteristics of ccRCC.
- Comparison of the distribution of uKIM-1 and pKIM-1 of patients with ccRCC depending on the urine parameters.
- Comparison of the distribution of uKIM-1 and pKIM-1 of patients with ccRCC depending on the presence of concomitant diseases (obesity, smoking, hypertension and diabetes).
- Determination of the optimal cut-off point for the concentration of KIM-1 protein in urine and plasma for differentiation between patients with clear cell carcinoma and healthy people.
- Comparison of diagnostic and prognostic value between uKIM-1 and pKIM-1.

## **Material and methods:**

The clinical trial was conducted prospectively in the Department of Urology and Oncological Urology of the Regional Specialist Hospital in Wrocław in the period from March 2015 to December 2017. The project was approved by the Bioethics Committee at the Regional Specialist Hospital in Wrocław (KB/5/2015 - 24.03.2015). Both healthy volunteers and patients diagnosed with a kidney tumor gave written, informed consent to the acquisition and use of

their biological samples for the purpose of the above study. The study group consisted of people over 18 years of age, with a diagnosis of a primary kidney tumor and the absence of concomitant tumor in the contralateral kidney in the contrast-enhanced abdominal imaging studies. The exclusion criteria were: lack of consent, concomitant active malignant disease or previous treatment for kidney cancer. The first, morning urine and peripheral blood were taken in the morning on the day of the operation. Histopathological reports of excised tumors were performed at the Department of Pathology "Hist-Med" in Wrocław. The determination of the concentration of human protein KIM-1 using the ELISA protocol was carried out using commercial, optimized reagent kits from R&Dsystems. The statistical analysis was performed using the statistical software EPIINFO Ver. 7.2.4.0 and Statistica Ver. 13.3 ( $P \leq 0.05$  was considered statistically significant).

### **Results:**

Urine and blood samples were taken from 34 healthy volunteers and 73 patients with a diagnosis of primary kidney tumor, who were subsequently subjected to surgical treatment – nephron sparing surgery (NSS,  $n = 38$ ) or radical nephrectomy ( $n = 35$ ). Based on the histopathological results of the excised tumors, a division was made into a group of patients with clear cell carcinoma (ccRCC,  $n=52$ ) and a group of patients with other histological subtypes of renal tumors (non-ccRCC,  $n=21$ ).

The presence of KIM-1 protein was confirmed both in the urine and plasma of patients in the study group (ccRCC) and in control groups (non-ccRCC, healthy volunteers). KIM-1 concentrations in urine (uKIM-1) and plasma (pKIM-1) was found statistically significantly higher in ccRCC group compared to the control groups ( $p < 0.001$ ). Statistically significant higher concentrations of uKIM-1 and pKIM-1 were demonstrated in patients with advanced ccRCC (T3-T4 N0/1 M0/1 according to TNM) than ccRCC limited to the kidney (T1-T2 N0 M0). The presence of unfavorable prognostic features, i.e. necrosis, perineal fat infiltration and higher histological grade were associated with significantly higher concentrations of uKIM-1 and pKIM-1 ( $p < 0.001$ ), which was not demonstrated for venous invasion. In addition, uKIM-1 and pKIM-1 concentrations were significantly higher for erythrocyturia, proteinuria and leukocyturia (for pKIM-1 only) in patients with ccRCC. However, no statistically significant association was found between the presence of the most common concomitant diseases and the concentrations of the biomarkers.

Correlation analysis showed a statistically significant positive correlation between both uKIM-1, and pKIM-1 concentrations, and tumor size, TNM staging group, and histopathological grade ( $p < 0.001$ ). pKIM-1 also correlated positively with the patient's age, serum creatinine and uKIM-1 concentrations, but negatively with eGFR.

Optimal cut-off points for uKIM-1 and pKIM-1 concentrations, for differentiation between ccRCC and healthy volunteers, were determined. For uKIM-1, the cut-off point was 1.15 ng/mg Cr, with a sensitivity of 0.692, a specificity of 0.735 and an AUC of 0.733. A pKIM-1 value of 75 pg/ml showed a sensitivity of 0.904, a specificity of 0.941 and an AUC of 0.930.

### **Conclusions:**

- The KIM-1 protein is present in the urine and plasma of patients with ccRCC, and the distribution of its plasma concentrations is significantly higher than in the control groups.
- The distribution of concentrations of KIM-1 protein in urine and plasma is higher in clear cell carcinoma showing unfavorable clinical and histopathological features, i.e. a higher stage and grade or the presence of tumor necrosis and perirenal fat infiltration.
- The concentration of uKIM-1 and pKIM-1 correlates with tumor size, stage and grade in ccRCC.
- The uKIM-1 and pKIM-1 concentrations are significantly higher in ccRCC patients presenting with erythrocyturia or proteinuria.
- The uKIM-1 and pKIM-1 concentrations of ccRCC patients does not differ significantly in the case of on the presence of concomitant diseases (obesity, smoking, hypertension and diabetes).
- The cut-off point for pKIM-1 protein of 75 pg/ml shows high sensitivity and specificity to distinguish patients with ccRCC from healthy volunteers.
- Plasma KIM-1 demonstrates a higher diagnostic and prognostic potential in ccRCC than urinary KIM-1.