



UNIwersYTET MEDYczNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka
Zakład Histologii i Embriologii

lek. Adrian Czekaj

**Ekspresja podoplaniny oraz jej wartość prognostyczna
w raku urotelialnym pęcherza moczowego**

PRACA DOKTORSKA

PROMOTOR
Prof. dr hab. n. med. Piotr Dziegiel

Wrocław, 2023

1 STRESZCZENIE

Ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego, jednego z częstszych nowotworów złośliwych u ludzi, wzrasta wraz z wiekiem, a głównym czynnikiem ryzyka jego powstawania jest palenie tytoniu. Spośród licznych typów histologicznych najczęstszym jest rak urotelialny pęcherza moczowego, w którym w zależności od naciekania błony mięśniowej ściany pęcherza moczowego wyróżnia się raka nieinwazyjnego (ang. *non-muscle invasive bladder cancer*; NMIBC) oraz raka inwazyjnego (*muscle invasive bladder cancer*; MIBC). Klasyfikacja ta ma kluczowe implikacje terapeutyczne.

Mikrośrodowisko nowotworowe (ang. *tumour microenvironment*; TME) odnosi się do wszystkich komórkowych i biochemicznych elementów towarzyszących komórkom nowotworowym. W TME najlicniejszą populacją komórek nienowotworowych są fibroblasty, które w warunkach fizjologicznych odpowiadają za podtrzymywanie prawidłowej struktury tkanki poprzez wydzielanie składników macierzy pozakomórkowej (ang. *extracellular matrix*; ECM). W nowotworach w wyniku licznych interakcji komórkowych dochodzi do zmian fenotypowych fibroblastów w wyniku czego powstają tzw. fibroblasty związane z nowotworem (ang. *cancer-associated fibroblasts* (CAF's); ang. *tumour-associated fibroblasts* (TAF's)). W licznych badaniach dowiedziono, że CAF's stymulują wzrost, proliferację, inwazję oraz progresję licznych nowotworów. Jednym z markerów CAF's jest podoplanina (D2-40), która jest transbłonową glikoproteiną zaliczaną jest do mukoprotein. Prognostyczną rolę podoplaniny zaobserwowano również w przypadku jej ekspresji na samych komórkach nowotworowych. W dotychczasowych badaniach poświęconych ekspresji podoplaniny w raku pęcherza moczowego wykazano, że jej duża obecność w komórkach MIBC związana była z krótszym czasem przeżycia wolnego od wznowy oraz krótszym czasem przeżycia ogólnego.

Jak dotąd nie zbadano ekspresji podoplaniny w nieinwazyjnym raku pęcherza moczowego (NMIBC) w kontekście ryzyka wznowy procesy nowotworowego oraz jego progresji do raka inwazyjnego (MIBC), dlatego w niniejszej pracy zdecydowano o prospektywnej obserwacji pacjentów z pierwotnym guzem pęcherza moczowego poddanych zabiegowi przezcewkowej elektroresekcji (TURBT). Badania wykonano na grupie 79 pacjentów, u których zdiagnozowano NMIBC, 40 przypadkach zaawansowanego raka urotelialnego pęcherza moczowego MIBC oraz 10 tkankach kontrolnych w postaci zdrowej ściany pęcherza moczowego. Uzyskany materiał zatopiono w bloczkach parafinowych, które stanowiły źródło do stworzenia mikromacierzy tkankowych (ang. *tissue microarrays*; TMA). Na skrawkach parafinowych TMA wykonano reakcje immunohistochemiczne w celu oceny lokalizacji i poziomu ekspresji antygenów takich jak: podoplanina (D2-40), Ki-67 (marker proliferacji komórkowej), CD31 oraz CD 34 (markery naczyń krwionośnych, które pozwoliły na ocenę MVD). Ekspresję markerów skorelowano z danymi kliniczno-patologicznymi uzyskanymi w wyniku prospektywnej obserwacji pacjentów.

Uzyskane wyniki wskazują na brak istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji podoplaniny w komórkach nowotworowych oraz w CAF's względem grupy kontrolnej. Ponadto, odnotowano brak istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji D2-40 w zależności od stopnia zaawansowania miejscowego,

stopnia złośliwości histologicznej oraz grupy prognostycznej raka NMIBC wg EAU. Stwierdzono natomiast, że ekspresja podoplaniny w komórkach nowotworowych była istotnie wyższa w guzach MIBC w porównaniu do NMIBC. Wykazano również słabą dodatnią korelację pomiędzy ekspresją podoplaniny w komórkach raka, a gęstością mikronaczyń (MVD) ocenianą za pomocą CD31 oraz CD34. Co prawda nie stwierdzono istotności statystycznej pomiędzy MVD ocenianą za pomocą CD31 oraz CD34, ale w obu przypadkach zauważalny był trend dłuższego przeżycia wolnego od wznowy procesu nowotworowego przy niższej gęstości mikronaczyń. Dodatkowo, wykazano słabą dodatnią korelację ekspresji podoplaniny w CAF's z MVD ocenianą na podstawie ekspresji CD34. Wyniki te potwierdzają niejako wpływ CAF's na proces neoangiogenezy w obrębie TME raka urotelialnego pęcherza moczowego. W badaniu nie stwierdzono istotnego związku poziomu ekspresji podoplaniny w CAF's i komórkach nowotworowych z ryzykiem nawrotu NMIBC. CAF's wykazujące niską ekspresję podoplaniny oraz komórki nowotworowe z wysoką ekspresją podoplaniny były związane z dłuższym czasem przeżycia pacjentów wolnego od wznowy, ale trend ten nie osiągnął istotności statystycznej.

Podsumowując, na podstawie wyników przeprowadzonych badań można stwierdzić, że ocena ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach nieinwazyjnego raka pęcherza moczowego (NMIBC) nie ma wartości prognostycznej w ocenie ryzyka nawrotu i progresji choroby nowotworowej. Może mieć ona jednak wartość w różnicowaniu guzów NMIBC od MIBC oraz szacowaniu czasu wolnego od wznowy procesu nowotworowego. Mogłoby mieć realny wpływ na zmniejszenie częstotliwości badań wykonywanych w ramach obserwacji onkologicznej pacjentów z NMIBC. Jednak do potwierdzenia tych wniosków konieczne byłoby przeprowadzenie prospektywnego badania na większej grupie pacjentów.

2 SUMMARY

The risk of developing bladder cancer, one of the most common human malignancies, increases with age and its main risk factor is cigarette smoking. Of the numerous histological types, the most common is urothelial carcinoma of the bladder, where non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) and muscle invasive bladder cancer (MIBC) are distinguished according to infiltration of the bladder wall muscle membrane. This classification has the key therapeutic implications.

The tumour microenvironment (TME) refers to all cellular and biochemical elements associated with tumour cells. In the TME, the most abundant population of non-cancerous cells are fibroblasts, which under physiological conditions are responsible for maintaining normal tissue structure by secreting extracellular matrix (ECM) components. In tumours, numerous cellular interactions result in phenotypic changes of the fibroblasts, giving rise to so-called cancer-associated fibroblasts (CAF's) or tumour-associated fibroblasts (TAF's). Numerous studies has shown that CAF's stimulate growth, proliferation, invasion and progression of numerous cancers. Podoplanin (D2-40), marker of CAF's, is a transmembrane glycoprotein classified as a mucoprotein. Podoplanin expression in tumour cells has also shown a prognostic value. Previous studies on bladder cancer have found that high expression od podoplanin in MIBC cells was associated with shorter recurrence-free survival and shorter overall survival.

To date, podoplanin expression in non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) has not been correlated with the risk of tumour recurrence and progression to invasive bladder cancer (MIBC), so that in this study I decided to prospectively follow patients with primary bladder tumour undergoing transurethral resection (TURBT). The study was performed on 79 patients diagnosed with NMIBC, 40 patients with advanced urothelial bladder cancer MIBC and 10 control tissues of healthy bladder wall. Obtained material was embedded in paraffin blocks, on the basis of which tissue microarrays (TMAs) were made. Immunohistochemical reactions were performed on paraffin-embedded TMA scrapings to assess the localisation and expression levels of antigens such as podoplanin (D2-40), Ki-67 (a marker of cellular proliferation), CD31 and CD 34 (vascular markers that allowed assessment of MVD). Marker expression was correlated with clinicopathological data obtained from prospective follow-up of patients.

There were no statistically significant differences in podoplanin expression levels in tumour cells and CAF's relative to the control group. In addition, it was noted that there were no statistically significant differences in the expression level of D2-40 according to local stage, histological malignancy and EAU prognostic group of NMIBC cancer. Nonetheless, podoplanin expression in tumour cells was found to be significantly higher in MIBC tumours compared to NMIBC. There was also a weak positive correlation between podoplanin expression in cancer cells and microvessel

density (MVD) as assessed by CD31 and CD34. Admittedly, there was no statistical significance between MVD assessed with CD31 and CD34, but in both cases there was a noticeable trend towards longer recurrence-free survival at lower microvessel density. In addition, there was a weak positive correlation of podoplanin expression in CAF's with MVD as assessed by CD34 expression. These results in some way confirm the influence of CAF's on the process of neoangiogenesis within the TME of urothelial bladder cancer. The study did not find a significant association of podoplanin expression levels in CAF's and tumour cells with the risk of NMIBC recurrence. CAF's with low podoplanin expression and tumour cells with high podoplanin expression were associated with longer patient's recurrence-free survival, but this trend did not reach statistical significance.

Based on the results of this study, it can be concluded that the evaluation of podoplanin (D2-40) expression in non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) cells has no prognostic value in assessing the risk of cancer recurrence and progression. However, it may be of value in differentiating NMIBC tumours from MIBC and estimating the time free from the tumour recurrence. It could have an impact on reducing the frequency and intensity of oncological follow-up of patients with diagnosis of NMIBC. Nonetheless, to confirm these conclusions it is needed to do a prospective study on a larger group of patients.