



**UNIwersYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

**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 Dzięciel**

**Wrocław, 2023**

*Dziękuję mojemu promotorowi*

*Prof. zw. dr hab. n. med. **Piotrowi Dzięgielowi***

*za niezwykłą cierpliwość, wyrozumiałość, wsparcie i prawdziwie partnerskie podejście podczas realizacji badań będących przyczynkiem do powstania tej pracy*

*Olbrzymie podziękowania za pomoc w realizacji badań, interpretacji ich wyników oraz za odkrycie przede mną wielkiego świata zaawansowanych metod badawczych należą się przede wszystkim dr n. med. Aleksandrze Piotrowskiej, dr hab. n. med. Karolinie Jabłońskiej, dr n. med. Jędrzejowi Grzegorzółce oraz pozostałemu niezwykle pomocnemu personelowi Katedry Morfologii i Embriologii Człowieka.*

*Dziękuję również mojej rodzinie, Paulinie, Oliwii oraz Mikołajowi, za cierpliwość, zrozumienie oraz wsparcie bez których niemożliwa byłaby realizacja mojej pracy badawczej.*

# SPIS TREŚCI

1	WYKAZ SKRÓTÓW .....	5
2	WSTĘP .....	8
2.1	RAK PĘCZERZA MOCZOWEGO .....	8
2.2	PODŚCIELISKO NOWOTWOROWE .....	20
2.3	FIBROBLASTY ZWIĄZANE Z NOWOTWOREM (CAF's) .....	21
2.4	PODOPLANINA (D2-40) .....	22
2.5	MARKERY ANGIOGENEZY .....	24
3	CEL PRACY .....	27
4	MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ .....	28
4.1	Materiał kliniczny. Charakterystyka pacjentów .....	28
4.2	Mikromacierze tkankowe .....	29
4.3	Reakcje immunohistochemiczne (IHC) .....	29
4.4	Ocena reakcji immunohistochemicznych .....	30
4.5	Analiza statystyczna .....	31
5	WYNIKI .....	33
6	DYSKUSJA .....	51
7	WNIOSKI .....	57
8	PIŚMIENICTWO .....	58
9	STRESZCZENIE .....	70
10	SUMMARY .....	72
11	ANEKS .....	74
12	ZAŁĄCZNIKI .....	79

# 1 WYKAZ SKRÓTÓW

<b>BC</b>	rak pęcherza moczowego (ang. <i>bladder cancer</i> )
<b>CAF's</b>	fibroblasty związane z nowotworem (ang. <i>cancer-associated fibroblasts</i> )
<b>CAM-DR</b>	oporność na leki zależne od adhezji komórkowej (ang. <i>cell adhesion mediated drug resistance</i> )
<b>CCL2</b>	motyw C-C chemokiny 2 (ang. <i>C-C motif chemokine 2</i> )
<b>CCL8</b>	motyw C-C chemokiny 8 (ang. <i>C-C motif chemokine 8</i> )
<b>CIS</b>	rak śródnabłonkowy (ang. <i>carcinoma in situ</i> )
<b>CLEC-2</b>	lektynopodobny receptor typu C 2 (ang. <i>C-type lectin-like receptor 2</i> )
<b>CSC's</b>	nowotworowe komórki macierzyste (ang. <i>cancer stem-like cells</i> )
<b>ctDNA</b>	krążące nowotworowe DNA (ang. <i>circulating tumour DNA</i> )
<b>CTLA-4</b>	antygen 4 cytotoksycznych limfocytów T (ang. <i>cytotoxic T cell antigen 4</i> )
<b>CXCL12</b>	motyw C-X-C chemokiny 12 (ang. <i>C-X-C motif chemokine 12</i> )
<b>DFS</b>	przeżycie wolne od choroby (ang. <i>disease-free survival</i> )
<b>EAU</b>	Europejskie Towarzystwo Urologiczne (ang. <i>European Association of Urology</i> )
<b>EBRT</b>	radioterapia wiązką zewnętrzną (ang. <i>external beam radiotherapy</i> )
<b>ECM</b>	macierz pozakomórkowa (ang. <i>extracellular matrix</i> )
<b>EGF</b>	naskórkowy czynnik wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>EGFR</b>	receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>EMT</b>	przejście epithelialno-mezenchymalne (ang. <i>epithelial-mesenchymal transition</i> )
<b>ERM</b>	kompleks białek: ezryna, radyksyna, moezyna (ang. <i>ezrin-radixin-moesin proteins complex</i> )
<b>Evs</b>	pęcherzyki pozakomórkowe (ang. <i>extracellular vesicles</i> )
<b>FAP</b>	białko aktywujące fibroblasty (ang. <i>fibroblast activation protein</i> )
<b>FAPI</b>	inhibitor białka aktywującego fibroblasty (ang. <i>fibroblast activation protein inhibitor</i> )
<b>FDA</b>	Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FGF2</b>	czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor</i> )
<b>FGFR3</b>	receptor czynnika wzrostu fibroblastów 3 (ang. <i>fibroblast growth factor receptor 3</i> )
<b>G-CSF</b>	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i> )
<b>HG</b>	rak o wysokim stopniu złośliwości histologicznej (ang. <i>high grade</i> )

<b>HIF-1</b>	czynnik indukowany hipoksją 1 (ang. <i>hypoxia inducible factor 1</i> )
<b>ICIs</b>	inhibitory punktów kontrolnych (ang. <i>immune checkpoint inhibitors</i> )
<b>IGF-7</b>	insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. <i>insulin-like growth factor</i> )
<b>IHC</b>	badania immunohistochemiczne
<b>IL-6</b>	interleukina 6 (ang. <i>interleukin 6</i> )
<b>LG</b>	rak o niskim stopniu złośliwości histologicznej (ang. <i>low grade</i> )
<b>LVI</b>	limfangioinwazja (ang. <i>lymphangiogenesis</i> )
<b>MDSC</b>	komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (ang. <i>myeloid derived suppressor cells</i> )
<b>MET</b>	przejście mezenchymalno-epitelialne (ang. <i>mesenchymal-epithelial transition; EMT</i> )
<b>MIBC</b>	rak pęcherza moczowego naciekający błonę mięśniową właściwą (ang. <i>muscle invasive bladder cancer</i> )
<b>MMP</b>	metaloproteinaza macierzy (ang. <i>matrix metalloproteinase</i> )
<b>MMPI</b>	inhibitor metaloproteinaz (ang. <i>matrix metalloproteinase inhibitor</i> )
<b>MMPs</b>	metaloproteinazy macierzy (ang. <i>matrix metalloproteinases</i> )
<b>MMT</b>	przejście mezenchymalno-mezenchymalne (ang. <i>mesenchymal-to-mesenchymal transition</i> )
<b>MRI</b>	badanie rezonansu magnetycznego (ang. <i>magnetic resonance imaging</i> )
<b>MSCs</b>	mezenchymalne komórki macierzyste (ang. <i>mesenchymal stem cells</i> )
<b>MVD</b>	gęstość mikronaczyń (ang. <i>microvasculature vessel density</i> )
<b>NK</b>	komórki NK (ang. <i>natural killers</i> )
<b>NMIBC</b>	rak pęcherza moczowego nienaciekający błony mięśniowej właściwej pęcherza moczowego (ang. <i>non-muscle invasive bladder cancer</i> )
<b>NPV</b>	ujemna wartość predykcyjna (ang. <i>negative predictive value</i> )
<b>OS</b>	przeżycie całkowite (ang. <i>overall survival</i> )
<b>PD-1</b>	receptor programowanej śmierci komórki typu 1 (ang. <i>programmed cell death receptor 1</i> )
<b>PDGF</b>	płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. <i>platelet-derived growth factor</i> )
<b>PD-L1</b>	ligand receptora programowanej śmierci komórki typu 1 (ang. <i>programmed cell death ligand 1</i> )
<b>PECAM-1</b>	płytkowa cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonna 1 (ang. <i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i> )
<b>PET</b>	pozytywna tomografia emisyjna (ang. <i>positron emission tomography</i> )
<b>PFS</b>	przeżycie wolne od wznowy (ang. <i>progression-free survival</i> )

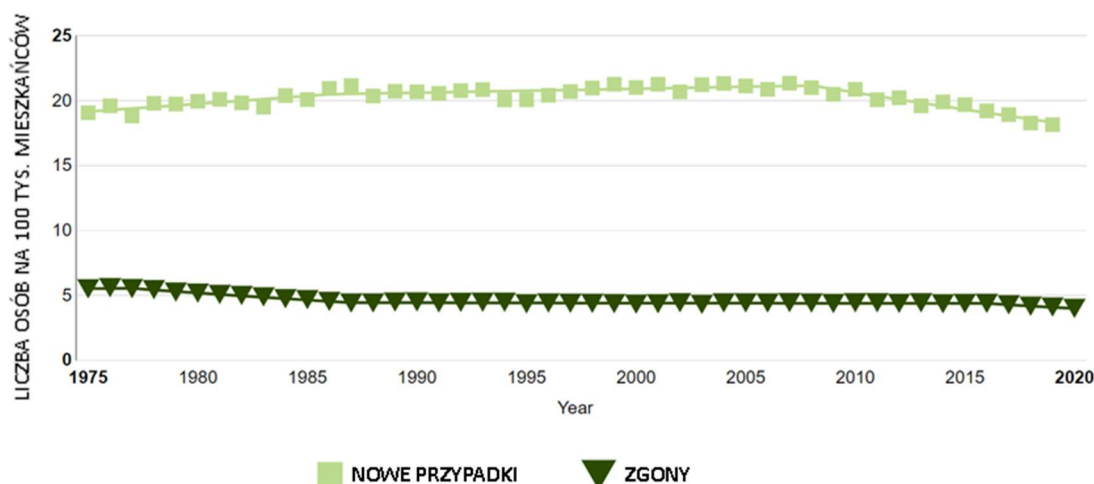
<b>PKC</b>	kinaza proteinowa (ang. <i>protein kinase C</i> )
<b>PLAG</b>	domena stymulująca agregację płytek krwi (ang. <i>platelet aggregation-stimulating domain</i> )
<b>PUNLMP</b>	brodawczakowaty nowotwór urotelialny o niskim potencjale złośliwości (ang. <i>papillary urothelial neoplasm of low malignant potential</i> )
<b>reTURBT</b>	ponowna przezcewkowa elektroresekcja guza pęcherza moczowego (ang. <i>repeat transurethral resection of bladder tumour</i> )
<b>RFS</b>	przeżycie wolne od wznowy (ang. <i>recurrence-free survival</i> )
<b>RGD</b>	trójpeptyd Arg-Gly-Asp
<b>SDF-1</b>	czynnik 1 pochodzący z komórek zrębu (ang. <i>stromal cell-derived factor-1</i> )
<b>SEER</b>	Onkologiczna baza danych epidemiologii nadzoru i wyników końcowych (ang. <i>Database of Surveillance Epidemiology and End Results</i> )
<b>SIR</b>	standaryzowany współczynnik zachorowalności (ang. <i>standardized incidence ratio</i> )
<b>TAF's</b>	fibroblasty związane z nowotworem (ang. <i>tumour-associated fibroblasts</i> )
<b>TAM's</b>	makrofagi związane z nowotworem (ang. <i>tumour-associated macrophages</i> )
<b>TCGA</b>	zaktualizowany atlas genomu raka (ang. <i>The updated Cancer Genome Atlas</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transformujący czynnik wzrostu beta (ang. <i>transforming growth factor</i> )
<b>TMA</b>	mikromacierze tkankowe (ang. <i>tissue microarray</i> )
<b>TME</b>	mikrośrodowisko nowotworowe (ang. <i>tumour microenvironment</i> )
<b>TNM</b>	klasyfikacja stopnia zaawansowania nowotworu - guz pierwotny, węzły chłonne, przerzuty odległe (ang. <i>Tumour, Node, Metastasis Classification</i> )
<b>TURBT</b>	przezcewkowa elektroresekcja guza pęcherza moczowego (ang. <i>transurethral resection of bladder tumour</i> )
<b>UICC</b>	Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem (ang. <i>Union for International Cancer Control</i> )
<b>uro-TK</b>	tomografia komputerowa układu moczowego (tzw. urografia TK)
<b>UTUC</b>	rak górnych dróg moczowych (ang. <i>upper urinary tract urothelial cell carcinoma</i> )
<b>VEGF</b>	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	alfa aktyna mięśni gładkich (ang. <i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i> )

## 2 WSTĘP

### 2.1 RAK PĘCHERZA MOCZOWEGO

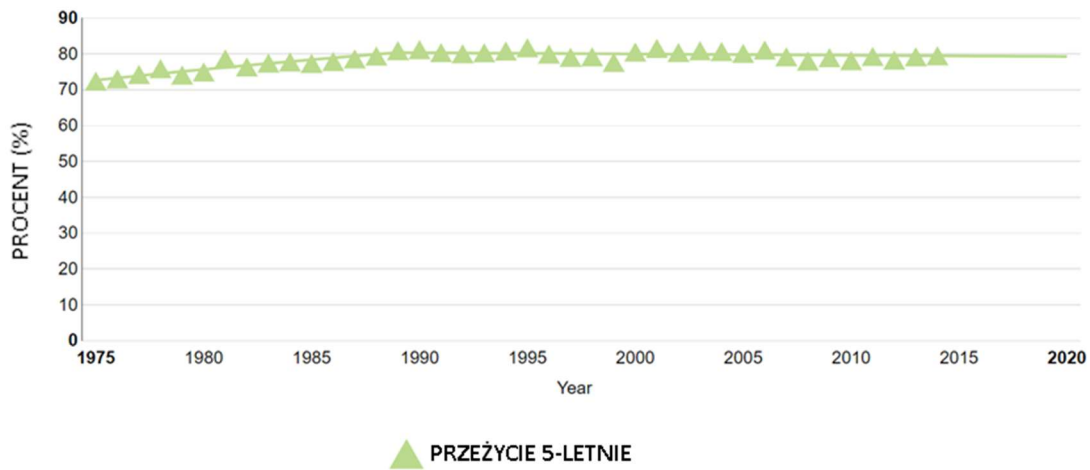
#### *Epidemiologia i czynniki ryzyka*

Rak pęcherza moczowego jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych u ludzi. Ryzyko zachorowania na ten typ nowotworu wzrasta wraz z wiekiem. Szczyt zapadalności przypada między 50, a 70 rokiem życia. Rak pęcherza moczowego jest siódmym najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym w populacji męskiej, ale jedenastym, uwzględniając zapadalność na ten typ nowotworu u obu płci (1). Wskaźniki epidemiologiczne dotyczące raka pęcherza moczowego w Polsce kształtują się niepokojąco na tle innych państw europejskich. W naszym kraju odnotowano 59% wzrost zachorowań na raka pęcherza moczowego w latach 1991-2006, zaś pod względem umieralności na ten typ nowotworu Polska zajmuje obecnie drugie miejsce w Europie (2). Leczenie raka pęcherza moczowego związane jest ze znacznym obciążeniem finansów publicznych - w USA rak pęcherza moczowego ma najwyższy koszt leczenia w przeliczeniu na jednego pacjenta i zajmuje 5 miejsce wśród raków pod względem całkowitego kosztu leczenia wszystkich pacjentów (3,4). Mimo postępu w poznaniu molekularnych podstaw karcynogenezy oraz wprowadzeniu nowych form terapii, na przestrzeni ostatnich kilkadziesiąt lat nie zaobserwowano istotnej poprawy średniej długości życia pacjentów z inwazyjnym rakiem pęcherza moczowego (**Rycina 1, 2**). 10-15% pacjentów z rakiem pęcherza moczowego ma zmiany przerzutowe w momencie rozpoznania, natomiast aż 50% pacjentów doświadcza wznowy procesu nowotworowego mimo radykalnego usunięcia pęcherza moczowego (5). 5-letnie przeżycie pacjentów z rakiem ograniczonym do narządu wynosi 70,2%, natomiast w przypadku obecności choroby przerzutowej wynosi ono jedynie 5,5% (6,7). Brak zauważalnych postępów w wynikach dotychczasowego leczenia oraz wysokie nakłady finansowe opieki zdrowotnej są przyczyną poszukiwania nowych, skuteczniejszych form terapii (8).



**Rycina 1. Trend nowych przypadków (■) oraz śmiertelności (▼) w przebiegu raka pęcherza moczowego na przestrzeni 45 lat (Database of Surveillance Epidemiology and End Results (SEER), NCI, USA; <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>)**





**Rycina 2. Trend 5-letniego przeżycia w przebiegu raka pęcherza moczowego na przestrzeni 40 lat (Database of Surveillance Epidemiology and End Results (SEER), NCI, USA; <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>)**

Spośród wielu znanych czynników zwiększających ryzyko wystąpienia raka pęcherza moczowego do najważniejszych należą:

- **Palenie papierosów**, które odpowiada za 50-65% przypadków u mężczyzn oraz 20-30% przypadków u kobiet (9). Ryzyko zachorowania wzrasta wraz liczbą wypalanych papierosów oraz czasem trwania nałogu. Kancerogenne działanie związane jest z zawartymi w moczu aminami aromatycznymi oraz wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi. Przedłużone i stałe narażenie na te substancje wynika z fazy gromadzenia moczu w pęcherzu moczowym. Ryzyko zachorowania jest również wysokie w przypadku palenia papierosów o niskiej zawartości substancji smolistych (10,11). Nikotynizm związany jest z wyższym ryzykiem nawrotów i progresji raka pęcherza moczowego nienaciekającego błonę mięśniową właściwą pęcherza moczowego (NMIBC; *ang. non-muscle invasive bladder cancer*) oraz mniejszą skutecznością BCG-immunoterapii dopęcherzowej (12,13). Zaobserwowano niemal natychmiastowy spadek ryzyka raka pęcherza moczowego po odstawieniu papierosów – o 40% w ciągu pierwszych czterech lat oraz o 60% po upływie 25 lat (14).
- **Zawodowe narażenie na aminy aromatyczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i chlorowane węglowodory**, które odpowiada za ok. 10% przypadków zachorowania na raka pęcherza. Narażenie takie występuje głównie zakładach przemysłowych zajmujących się przetwórstwem farb, barwników, metali i produktów ropopochodnych (4,15,16).
- **Czynniki genetyczne**. Obserwuje się zwiększoną liczbę przypadków raka pęcherza moczowego u krewnych pierwszego i drugiego stopnia (17). Jak dotąd nie zidentyfikowano jednoznacznych nieprawidłowości genetycznych związanych ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka pęcherza moczowego.

- **Dieta.** Wykazano protekcyjny wpływ diety śródziemnomorskiej oraz negatywny efekt diety zachodniej bogatej w cukry proste, tłuszcze nasycone oraz produkty mięsne (18,19). Dieta bogata w owoce (>100 g na dobę) związana była z niższym ryzykiem wystąpienia raka pęcherza moczowego, ale jedynie u kobiet (20).
- **Radioterapia.** U pacjentów z rakiem gruczołu krokowego leczonych za pomocą radioterapii stwierdzono zwiększone ryzyko pojawienia się wtórnego nowotworu w postaci raka pęcherza moczowego. Standaryzowany współczynnik zachorowalności na raka pęcherza moczowego (SIR; ang. *Standardized Incidence Ratio*) wynosił 1,42 dla radioterapii wiązką zewnętrzną (tzw. teleradioterapia), 1,10 dla brachyterapii oraz 1,39 dla obu tych metod stosowanych jednocześnie (21).
- **Leki.** Wykazano, że stosowanie pioglitazonu, doustnego leku przeciw cukrzycowemu, związane jest ze wzrostem ryzyka raka pęcherza (22). Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA; ang. *Food and Drug Administration*) zaleciła rezygnację ze stosowania tego leku u osób z rozpoznanym rakiem pęcherza moczowego, natomiast w wielu krajach europejskich wycofano lek z obrotu (23,24).
- **Zarażenie *Schistosoma haematobium*.** Druga, po malarii, najczęstsza choroba pasożytnicza na świecie, występująca w krajach afrykańskich, azjatyckich, amerykańskich oraz karaibskich zwiększa ryzyko zachorowania na raka pęcherza (25). Na skutek przewlekłego stanu zapalnego zwiększa ona ryzyko rozwoju zarówno raka urotelialnego, jak również raka płaskonabłonkowego, który jest dominującym typem histologicznym w krajach takich jak Egipt (26).

### ***Klasyfikacja histopatologiczna raka pęcherza moczowego***

Najczęstszym typem histologicznym raka pęcherza moczowego, w ponad 90% przypadków, jest rak urotelialny (rak przejściowokomórkowy) wywodzący się z komórek urotelialnych (baldaszkowatych), będących komórkami nabłonkowymi wyściełającymi układ moczowy. Rzadszymi typami histopatologicznymi są: rak płaskonabłonkowy oraz rak gruczolowy (27). Nowotwory pęcherza moczowego mogą cechować się brodawkowatym lub płaskim oraz nieinwazyjnym albo inwazyjnym typem wzrostu.

Brodawkowaty nowotwór urotelialny o niskim potencjale złośliwości (PUNLMP; ang. *papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*) związany jest z bardzo dobrym rokowaniem (28). Wykazuje wzrost brodawkowaty z minimalną atypią cytologiczną, o grubości ponad siedmiu komórek. Zwykle pojedynczy i zlokalizowany w obrębie trójkąta pęcherza moczowego. Komórki mają zachowaną biegunowość oraz nieznacznie powiększone jądra. 5-letnie ryzyko nawrotu wynosi 20,1%, głównie w postaci PUNLMP lub guzów niskiego ryzyka (LG; ang. *low grade*), natomiast ryzyko progresji nowotworu do raka naciekającego błonę mięśniową wynosi mniej niż 1% (29).

Rak urotelialny LG charakteryzuje się typowo brodawkowatym wzrostem z włóknisto-naczyniową łodygą i częstymi brodawkowatymi rozgałęzieniami z komórkami większych rozmiarów, zaznaczoną

atypią jądrową oraz rzadko pojawiającymi się figurami podziału mitotycznego (30). Ryzyko nawrotu wynosi 48-71%, natomiast ryzyko progresji szacuje się na 2-12% (28).

Rak urotelialny o wysokim stopniu złośliwości (HG; ang. *high grade*) składa się z brodawkowatej łodygi pokrytej komórkami o wysokim stopniu złośliwości histologicznej w warstwie nabłonka urotelialnego. Występuje nieuporządkowana architektura, liczne figury podziału mitotycznego oraz pleomorficzne komórki nowotworowe z wyraźnie powiększonymi jądrami. Nielezione związane są z 80% ryzykiem inwazji tkanki podnabłonkowej, przez co uważane są za prekursora raka inwazyjnego (28).

Obecnie wszystkie warianty raka pęcherza moczowego innego niż rak urotelialny traktuje się jak guzy o wysokim stopniu złośliwości histologicznej, z czego jedynie 15-30% w momencie rozpoznania nie nacieka błony mięśniowej (6,31).

Wyróżnia się następujące typy histologiczne raka pęcherza moczowego: (32) (**Tabela 1**)

**Tabela 1. Typy histologiczne raka pęcherza moczowego wg klasyfikacji WHO z 2016 r.**

1. **Rak urotelialny** (odpowiadający za ponad 90% wszystkich przypadków raka pęcherza moczowego) (ang. *urothelial carcinoma*)
2. **Rak urotelialny z częściowym zróżnicowaniem płaskonabłonkowym i/lub gruczołowym lub odmiennym** (ang. *urothelial carcinomas with partial squamous and/or glandular or divergent differentiation*)
3. **Mikrobrodawkowy rak urotelialny** (ang. *micropapillary urothelial carcinoma*)
4. **Wariant zagnieżdżony/mikrocystyczny** (ang. *nested/microcystic variant*)
5. **Duży wariant zagnieżdżony** (ang. *large nested variant*)
6. **Mikrotubularny rak urotelialny** (ang. *microtubular urothelial carcinoma*)
7. **Wariant plazmacytoidalny, sygnetowaty** (ang. *plasmacytoid, signet ring variant*)
8. **Wariant przypominający limfoepitelioma** (ang. *lymphoepithelioma-like variant*)
9. **Wariant olbrzymiokomórkowy, rozproszony, niezróżnicowany** (ang. *giant cell, diffuse, undifferentiated variant*)
10. **Sarkomatoidalny rak urotelialny** (ang. *sarcomatoid urothelial carcinoma*)
11. **Raki urotelialne z innym rzadkim różnicowaniem** (ang. *urothelial carcinomas with other rare differentiations*)
12. **Raki urotelialne z częściowym różnicowaniem endokrynnym** (ang. *urothelial carcinomas with partial neuroendocrine differentiation*)
13. **Czysty rak neuroendokryny (w tym raki neuroendokryne drobnokomórkowe i wielkokomórkowe)** (ang. *pure neuroendocrine carcinoma, including small and large cell neuroendocrine carcinomas*)

## Ocena stopnia zaawansowania klinicznego (ang. Tumour stage)

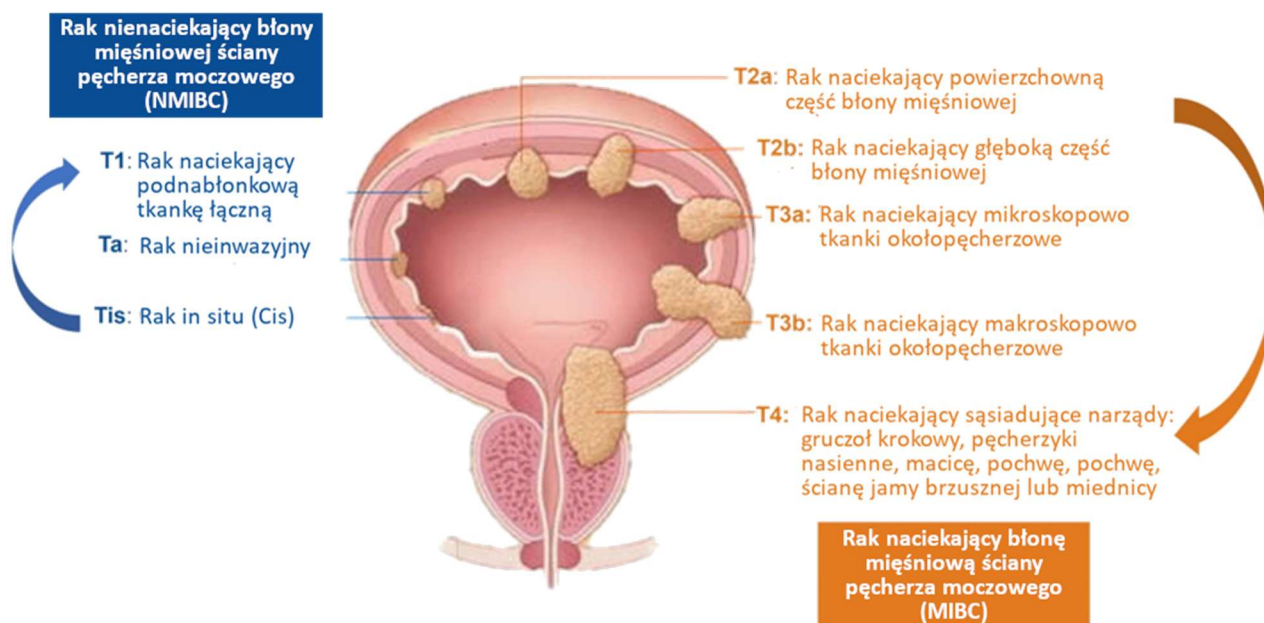
Aktualną klasyfikację stopni zaawansowania raka pęcherza moczowego zaakceptowała w 2016 roku Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem (UICC; ang. *Union for International Cancer Control*) (33) (**Tabela 2**). Stopień zaawansowania TNM raka pęcherza moczowego pozwala na opracowanie najbardziej optymalnej formy postępowania oraz spełnia krytyczną rolę w rokowaniu pacjenta. TNM ocenia się na podstawie badania klinicznego, wyników badań obrazowych i histopatologicznych. Ocena cechy T określa głębokość naciekania raka oraz jego stosunek do ścian pęcherza moczowego i otaczających go narządów. Ocena cechy N określa stopień rozprzestrzeniania się guza nowotworowego do regionalnych węzłów chłonnych znajdujących się w miednicy, w sąsiedztwie pęcherza moczowego. Cecha M wskazuje natomiast na obecność przerzutów odległych (33).

Z uwagi na fakt, iż stwierdzenie nacieku nowotworowego na błonę mięśniową ściany pęcherza moczowego związane jest ze znacznym pogorszeniem rokowania oraz koniecznością radykalnego usunięcia pęcherza moczowego, stosuje się dodatkowy podział guzów pęcherza moczowego na guzy nienaciekające (NMIBC; Ta, T1) i raka naciekającego błonę mięśniową ściany pęcherza moczowego (MIBC; T2-T4) (34,35). Około 75% nowo rozpoznanych raków pęcherza moczowego stanowią raki NMIBC (36).

**Tabela 2. Klasyfikacja TNM raka pęcherza moczowego z 2016 roku**

<b>T – guz pierwotny (ang. tumour)</b>	
<b>Tx</b>	Brak możliwości stwierdzenia guza pierwotnego
<b>T0</b>	Nie stwierdza się guza pierwotnego
<b>Ta</b>	Nieinwazyjny rak brodawkowaty (ang. <i>non-invasive papillary carcinoma</i> )
<b>Tis</b>	Rak śródnabłonkowy (ang. <i>carcinoma in situ</i> ; CIS)
<b>T1</b>	Nowotwór naciekający podnabłonkową tkankę łączną (tzw. podścielisko)
<b>T2</b>	Nowotwór naciekający błonę mięśniową <b>T2a</b> nowotwór naciekający wewnętrzną połowę błony mięśniowej <b>T2b</b> nowotwór naciekający zewnętrzną połowę błony mięśniowej
<b>T3</b>	Nowotwór naciekający <b>T3a</b> naciekanie poza błonę mięśniową widoczne tylko mikroskopowo <b>T3b</b> naciekanie nowotworu poza błonę mięśniową widoczne makroskopowo (guz przekracza ścianę pęcherza moczowego)
<b>T4</b>	Nowotwór naciekający narządy sąsiadujące <b>T4a</b> nowotwór naciekający na stercz, macicę pochwę <b>T4b</b> nowotwór naciekający na ścianę miednicy lub powłoki brzuszne

<b>N – regionalne węzły chłonne (ang. nodes)</b>	
<b>Nx</b>	Brak możliwości oceny węzłów chłonnych
<b>N0</b>	Brak przerzutów do węzłów chłonnych
<b>N1</b>	Przerzut w pojedynczym węźle chłonnym w miednicy mniejszej (podbrzuszny, zasłonowy, biodrowy zewnętrzny lub przedkrzyżowy)
<b>N2</b>	Przerzuty w wielu regionalnych węzłach chłonnych miednicy mniejszej (podbrzuszny, zasłonowy, biodrowy zewnętrzny lub przedkrzyżowy)
<b>N3</b>	Przerzuty do węzłów chłonnych biodrowych wspólnych
<b>M – przerzuty odległe (ang. metastases)</b>	
<b>Mx</b>	Nie można ocenić obecności przerzutów odległych
<b>M0</b>	Nie ma przerzutów odległych
<b>M1</b>	Obecność przerzutów odległych <b>M1a</b> Przerzuty do pozaregionalnych węzłów chłonnych <b>M1b</b> Przerzuty odległe do innych narządów

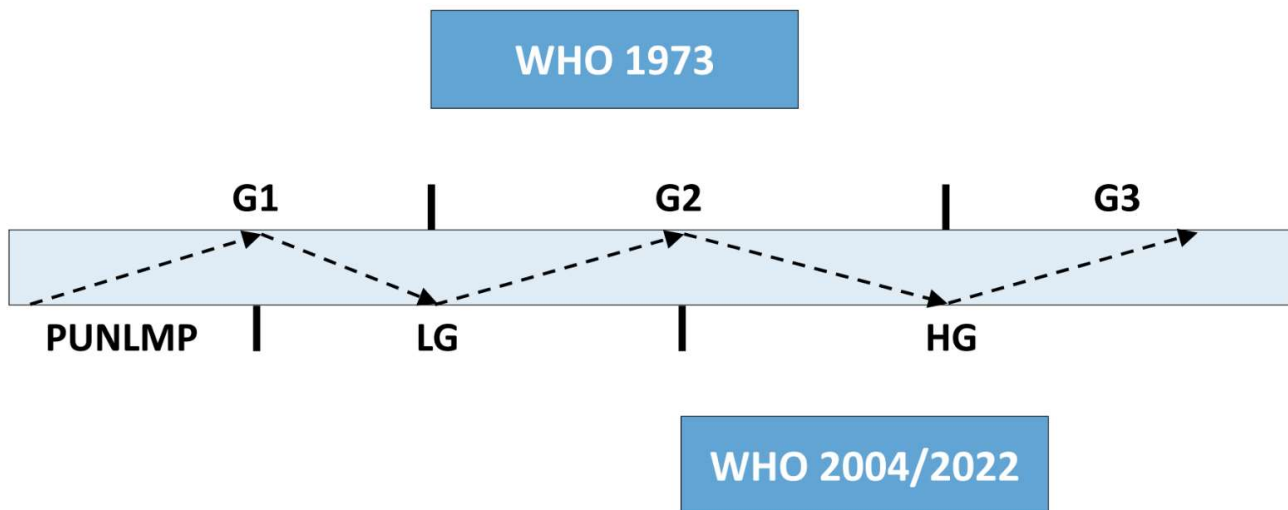


**Rycina 3. Stopnie zaawansowania miejscowego raka pęcherza moczowego.**

(na podstawie: <https://asieris.com/products-retired-20230420/bladder-cancer/>)

### Ocena stopnia zróżnicowania histologicznego (ang. histological grade)

Obecnie wykorzystuje się dwie klasyfikacje oceniające stopień zróżnicowania histologicznego raka pęcherza moczowego: klasyfikację WHO z 1973 roku oraz klasyfikację WHO z 2004 roku, aktualizowaną w 2016 oraz 2022 roku. Pierwsza z nich podzieliła guzy pęcherza moczowego na stopień G1, G2 oraz G3, natomiast druga wprowadziła podział na guzy PUNLMP (brodawkowaty nowotwór urotelialny o niskim potencjale złośliwości; ang. *papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*), LG (guzy o niskim stopniu złośliwości; ang. *low grade*) oraz HG (guzy o wysokim stopniu złośliwości; ang. *high grade*) (31,37) (**Rycina 3**). Konsekwencją zmian był wzrost liczby pacjentów z rozpoznaniem guzem HG na skutek przesunięcia do tej grupy pacjentów ze stosunkowo dobrze rokującym stopniem G2.(38) Dodatkowo, zmniejszeniu uległa grupa pacjentów z rozpoznawanym PUNLMP.(39)



**Rycina 4. Stopnie złośliwości histologicznej raka pęcherza moczowego – zestawienie klasyfikacji WHO z 1973 roku z klasyfikacją WHO z 2004 roku uaktualnioną w 2016 oraz 2022 roku (7).**

Przegląd systematyczny oraz metaanaliza z 2017 roku nie potwierdziły przewagi żadnej z wymienionych klasyfikacji pod kątem nawrotu lub progresji raka pęcherza moczowego (38). Stwierdzono również, że jednoczesne stosowanie obu klasyfikacji ma istotną przewagę nad stosowaniem każdej z tych klasyfikacji osobno dzięki podziałowi pacjentów ze stopniem G2 na HG/LG. Dodatkowo wykazano, że pacjenci z rakiem pęcherza w stopniu TaLG mają takie samo rokowanie jak pacjenci z rozpoznaniem PUNLMP. Aktualnie wytyczne Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (EAU; ang. *European Association of Urology*) zalecają jednoczesne stosowanie obu klasyfikacji w ocenie preparatów histopatologicznych raka pęcherza moczowego (7,40).

Osobnego omówienia wymaga rak śródnabłonkowy (CIS; ang. *carcinoma in situ*), który jest nieinwazyjnym rakiem pęcherza o wysokim stopniu złośliwości histologicznej (HG). W wielu

przypadkach jest zmianą wieloogniskową i przypomina zmiany zapalne. W przeciwieństwie do pozostałych guzów nieinwazyjnych (NMIBC), CIS nie da się wyleczyć poprzez izolowane wycięcie zmiany podczas zabiegu przezcewkowej elektroresekcji guza pęcherza moczowego (TURBT; ang. *transurethral resection of bladder tumour*) (41).

### **Podtypy molekularne raka pęcherza**

Molekularna klasyfikacja raka pęcherza oparta jest na analizie genomu nowotworu według TCGA (ang. *The updated Cancer Genome Atlas*). Zidentyfikowano dwie główne grupy nowotworów: luminalny (ang. *luminal*) i podstawno-płaskonabłonkowy (ang. *basal-squamous*) z dalszym ich podziałem na podtypy: brodawkowaty luminalny (ang. *luminal-papillary*), naciekający luminalny (ang. *luminal-infiltrated*), luminalny, płaskonabłonkowy, neuronalny (ang. *neuronal*). Każdy z tych podtypów związany jest z różnym profilem mutacji, cech histopatologicznych, dalszą prognozą oraz kierunkami terapeutycznymi (42). Podtyp podstawno-płaskonabłonkowy, który charakteryzuje się ekspresją cytokeratyn oraz obfitym naciekiem immunologicznym, uważany jest za podtyp chemowrażliwy. Podtypy luminalne, które charakteryzują się m.in. mutacjami genu receptora czynnika wzrostu fibroblastów 3 (FGFR3) oraz obecnością markerów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT), mogą być związane z opornością na chemioterapię (43,44). Ma to bezpośrednie implikacje terapeutyczne w ramach tzw. terapii personalizowanej. Zastosowanie erdafitinibu - inhibitora kinazy tyrozynowej FGFR1-4, u chorych wykazujących mutacje w obrębie genu *FGFR3*, związane było ze stabilizacją lub regresją choroby nowotworowej u 40% pacjentów z zaawansowanym lub rozsianym rakiem pęcherza moczowego (45).

### **Diagnostyka raka pęcherza moczowego**

Podstawowym elementem diagnostyki w kierunku raka pęcherza moczowego jest wywiad lekarski. Najczęstszym objawem zgłaszanym przez pacjentów jest makroskopowy krwimocz lub mikroskopowy krwinkomocz. Wykazano, że większość pacjentów z krwimoczem ma zwykle zdiagnozowany nowotwór w wyższym stopniu zaawansowania w porównaniu z pacjentami z krwinkomoczem.(46) Ryzyko rozpoznania raka pęcherza moczowego u osób zgłaszających się z powodu krwinkomoczu wynosi 2-5%, natomiast w przypadku krwimoczu jest to ok. 20%.(47,48) Rak pęcherza *in situ* (CIS) lub zaawansowane nowotworowy pęcherza moczowego mogą powodować uczucie naglącego parcia na mocz, objawy dysuryczne, częstomocz, nykturię a nawet ból zlokalizowany z miednicy mniejszej (6,7).

Celem diagnostyki obrazowej w raku pęcherza moczowego jest: wykrycie guza, zróżnicowanie guzów T1 (NMIBC) oraz T2 (MIBC) ze względu na inną formę leczenia, ocena odpowiedzi na leczenie systemowe, oraz ocena zaawansowania miejscowego, regionalnego i odległego w postaci ewentualnych zmian przerzutowych. Żadna z dostępnych obecnie metod diagnostyki obrazowej nie jest w stanie wykryć CIS. Zwykle w pierwszej kolejności wykonywane jest badanie USG jamy brzusznej

pozwalające na ocenę obecności zmian egzofitycznych na ścianie pęcherza moczowego, ewentualnego poszerzenia światła układów zbiorczych nerek lub obecności zmian ogniskowych nerek. Niestety badanie USG nie jest w stanie z dużą pewnością wykluczyć obecności guzów w górnych drogach moczowych (tzn. moczowodach oraz układach kielichowo-miedniczkowych nerek), dlatego standardem jest obecnie tomografia komputerowa układu moczowego (tzw. urografia TK; uro-TK). Badanie to pozwala dodatkowo na jednoczesną ocenę stanu węzłów chłonnych oraz sąsiadujących narządów jamy brzusznej i miednicy mniejszej (6,49).

Przecewkowe wziernikowanie pęcherza moczowego tzw. cystoskopia, ma na celu zobrazowanie lokalizacji i liczby zmian egzofitycznych na ścianach pęcherza moczowego. W przypadku stwierdzenia zmian we wcześniejszych badaniach obrazowych, zamiast diagnostycznej cystoskopii, zaleca się wykonanie zabiegu TURBT (przecewkowa elektroresekcja guza pęcherza moczowego; ang. *transurethral resection of bladder tumour*) w znieczuleniu rdzeniowym lub ogólnym (6,7). Dodatkowo cystoskopia jest podstawowym elementem okresowej kontroli onkologicznej pacjentów po endoskopowym organooszczędzającym usunięciu guza pęcherza moczowego. Częstość badania zależy od stopnia ryzyka nawrotu leczonej choroby nowotworowej oraz jej ewentualnej progresji do raka naciekającego błonę mięśniową właściwą (7) (**Tabela 3**).

**Tabela 3. Grupy prognostyczne dla guzów NMIBC wg Europejskiego Towarzystwa Urologicznego**

<b>GRUPA RYZYKA</b>	<b>CECHY KLINICZNE RAKA NMIBC</b>
NISKIE RYZYKO	Pierwotny, pojedynczy guz TaT1 LG/G1 o średnicy <3 cm bez CIS u pacjenta <70r.ż.
	Pierwotny guz Ta LG/G1 bez CIS z co najwyżej JEDNYM z dodatkowych klinicznych czynników ryzyka
POŚREDNIE RYZYKO	Pacjenci bez CIS, którzy nie zaliczają się do grup niskiego lub wysokiego ryzyka
WYSOKIE RYZYKO	Wszystkie guzy T1, HG, G3, CIS

### **Cytologia moczu**

Badanie cytologiczne moczu związane jest z wysoką czułością (84%) w przypadku guzów o wysokim stopniu złośliwości histologicznej, natomiast małą (16%) w kontekście guzów o niskiej złośliwości histologicznej. Ujemny wynik badania nie wyklucza obecności raka pęcherza moczowego, natomiast wynik dodatni może sugerować obecność nowotworu również w górnych drogach moczowych (50). Wynik badania w dużej mierze zależy od jakości preparatu (ilość komórek z nieuszkodzoną błoną komórkową), czynników zakłócających ocenę (m.in. kamica moczowa, zakażenie



układu moczowego, dopęcherzowe wlewy preparatów leczniczych) oraz od doświadczenia histopatologa oceniającego otrzymany materiał. Specyficzność badania sięga 90% (51). Algorytmy sztucznej inteligencji w połączeniu z cyfrowym przetwarzaniem obrazu (test VisioCyt) poprawiły czułość cytologii w przypadku guzów HG nawet o 92% (52). Obowiązującym w raportowaniu wyników badań cytologicznych jest zaktualizowany w 2022 roku System Paryski (53) (*Tabela 4*).

**Tabela 4. System Paryski do oceny wyników badań cytologicznych moczu z 2022 roku**

WYNIK	KOMENTARZ
BRAK DIAGNOZY	Brak możliwości odpowiedniej diagnozy m.in. ze względu na brak komórek
UJEMNY	Nie stwierdzono obecności komórek nowotworowych
ATYPIA	Nietypowe komórki nabłonka dróg moczowych
PODEJRZANY	Podejrzenie komórek HG/G3 raka urotelialnego
ZŁOŚLIWY	Obecność komórek HG/G3 raka urotelialnego

#### **Diagnostyka molekularna raka pęcherza moczowego – stan obecny**

Ze względu na małą czułość cytologii w guzach LG/G1 oraz częstą konieczność inwazyjnej diagnostyki endoskopowej w postaci cystoskopii, poszukuje się potencjalnych markerów pozwalających na wczesne bezinwazyjne rozpoznanie raka pęcherza moczowego, szczególnie w grupach ryzyka (m.in. mężczyźni, po 40-50 r.ż., palący papierosy). Tego typu markery mogłyby mieć również rolę w ocenie ryzyka choroby nawrotowej, progresji nowotworowej, odpowiedzi na stosowane leczenie systemowe lub konieczności wcześniejszego leczenia operacyjnego w postaci radykalnego usunięcia pęcherza moczowego. Wiele z proponowanych obecnie testów wykazuje czułość wyższą niż cytologia moczu, kosztem wyraźnie niższej specyficzności (6,7).

Kilka z opracowanych testów (UroVysion (FISH), receptor czynnika wzrostu fibroblastów 3 (FGFR3)/odwrotna transkryptaza telomerazy (TERT), białko macierzy jądrowej NMP22, analiza mikrosatelitarna), umożliwia przewidywanie ryzyka nawrotu choroby i jej ewentualnej progresji w przypadku ujemnego wyniku cystoskopii oraz badań obrazowych oceniających górne drogi moczowe (54–57).

Spośród testów, które sprawdziły się na etapie diagnostyki raka pęcherza moczowego, szerszego omówienia wymaga kilka z nich:

- **Cxbladder** - test mRNA, wykrywający w materiale cytologicznym moczu ekspresję pięciu genów (*IGF, HOXA, MDK, CDC, IL8R*), na podstawie których klasyfikuje się pacjentów względem ryzyka zachorowania na raka urotelialnego. Wykazuje on podobną negatywną wartość predykcyjną (NPV; ang. *negative predictive value*) jak badanie cytologiczne moczu (97% vs 93%) (58).

- **ADXBLADDER** - badanie moczu oparte na detekcji MCM5, białka zaangażowanego w inicjację replikacji DNA, którego ekspresja występuje we wszystkich komórkach zdolnych do podziału. W porównaniu do cytologii moczu wykazuje on wyższą czułość (51,9% vs 17,6%), niższą swoistość (6,4% vs 98%) oraz porównywalną wartość NPV (92% vs 90,7%) (59).

- **Xpert Bladder Cancer Monitor** - test oceniający obecność ekspresji pięciu genów (*ABLI*, *UPK1B*, *CRH*, *ANXA10*, *IGF2*), których nadekspresję stwierdza się w komórkach raka urotelialnego pęcherza moczowego. W porównaniu do cytologii moczu, test ten związany jest z wyższą czułością (72,7% vs 7,7%), niższą swoistością (73,7% vs 96,5%) oraz porównywalną wartością NPV (96,5% vs 92,8%). Dodatkowo jest on w stanie wykryć guzy HG z 92,3% dokładnością (60).

- **Bladder EpiCheck** - test, będący panelem 15 wzorców metylacji DNA. Związany jest on z 88% specyficznością, 94,4% NPV dla jakiegokolwiek raka pęcherza moczowego oraz 99,3% NPV dla raka HG. Pozytywny wynik testu Bladder EpiCheck wskazuje na istotny wzrost ryzyka nawrotu raka urotelialnego oraz raka HG (61).

Nowym kierunkiem badań diagnostycznych w ocenie odpowiedzi na leczenie inhibitorami punktów kontrolnych (ICIs; ang. *immune checkpoint inhibitors*) jest analiza krążącego nowotworowego DNA (ctDNA; ang. *circulating tumour DNA*). Immunoterapia z zastosowaniem Atezolizumabu - przeciwciała skierowanego względem liganda receptora programowanej śmierci komórki typu 1 (PD-L1; ang. *programmed death ligand*), związana jest z dłuższym przeżyciem wolnym od choroby (ang. *disease free survival*; DFS) oraz całkowitym przeżyciem (ang. *overall survival*; OS) u chorych, u których zidentyfikowano ctDNA (62).

Według stanowiska EAU, obecnie nie ma jednak wystarczających dowodów na to, żeby uzależniać postępowanie w raku pęcherza moczowego od wyników dostępnych obecnie markerów oraz powstałej w ostatnim czasie subklasyfikacji raka urotelialnego na podtypy molekularne (6,7).

### **Leczenie raka pęcherza moczowego**

W zależności od różnych czynników, w tym przede wszystkim od stopnia zaawansowania procesu nowotworowego, wyróżnia się następujące elementy procesu terapeutycznego raka pęcherza moczowego:

- **Przezcewkowa elektroresekcja guza pęcherza moczowego** (TURBT; ang. *transurethral resection of bladder tumour*) - celem diagnostycznym zabiegu jest ocena stopnia zaawansowania guza (ang. *stage*) oraz jego złośliwości histologicznej (ang. *grade*), a w przypadku guzów NMIBC (PUNLMP/Ta/T1) daje szansę na wyleczenie i uniknięcie radykalnego wycięcia pęcherza moczowego (7).

- **Dopęcherzowy wlew chemioterapeutyku** - ze względu na ryzyko wczesnego nawrotu choroby po zabiegu TURBT, zastosowanie znajdują substancje podawane dopęcherzowo takie jak m.in. chemioterapeutyki np. mitomycyna C, doksorubicyna, epirubicyna, pirarubicyna oraz gemcytabina.

Pojedynczy dopęcherzowy wlew tych substancji wykonany bezpośrednio po zabiegu zmniejsza ryzyko nawrotu guza z 59% do 45% (63).

- **BCG-immunoterapia dopęcherzowa** - dopęcherzowe wlewy atenuowanych prątków gruźlicy typu bydlęcego (łac. *Mycobacterium bovis*; szczepionka *Bacillus Calmette–Guérin*; BCG) w postaci cyklu indukcyjnego oraz cykli przypominających powtarzanych przez 12-36 m-cy (64). Wykazano, że zastosowanie BCG-terapii związane jest z mniejszym ryzykiem nawrotu oraz progresji nowotworu w porównaniu do pacjentów jedynie po zabiegu TURBT (65,66).

- **Radykalne usunięcie pęcherza moczowego (tzw. cystektomia radykalna)** - zabieg usunięcia pęcherza moczowego, miednicznych węzłów chłonnych, gruczołu krokowego u mężczyzn, macicy z przydatkami i cewką moczową u kobiet oraz, w zależności od wskazań, męskiej cewki moczowej. Zabieg ten można wykonać tradycyjnie metodą otwartą, laparoskopowo lub w asyście robota chirurgicznego. W przypadku cystektomii radykalnej wykonywanej u pacjentów z MIBC, 5-letnie przeżycie całkowite wynosi 50% (ang. *overall survival*; OS) (67).

- **Leczenie systemowe (chemioterapia oraz immunoterapia)** w leczeniu raka MIBC można rozważyć w ramach leczenia przedoperacyjnego (tzw. leczenie neoadjuwantowe), pooperacyjnego u osób z wysokim ryzykiem wznowy procesu nowotworowego (tzw. leczenie adjuwantowe) oraz jako leczenie paliatywne u osób z chorobą nowotworową w stadium rozsiewu, którego celem jest przedłużenie życia pacjenta (6). Spośród różnych schematów leczenia neoadjuwantowego, najefektywniejsza jest chemioterapia oparta na cisplatynie (np. MVAC – metotreksat, vinblastyna, adriamycyna, cisplatyna; CMV – cisplatyna, metotreksat, vinblastyna; CM – cisplatyna, metotreksat; GC – gemcytabina, cisplatyna; cisplatyna z 5-fluorouracylem) (68). Niejednoznaczne są wytyczne względem chemioterapii adjuwantowej u pacjentów z chorobą w stadium pT3/T4 i/lub N+. Poprawę w 5-letnim przeżyciu stwierdzono jedynie u pacjentów z bardzo wysokim ryzykiem nawrotu choroby nowotworowej tzn. z naciekiem tkanek okołopęcherzowych i/lub dodatkimi węzłami chłonnymi (69). Leczenie raka urotelialnego pęcherza moczowego w stadium rozsiewu nie zmieniło się istotnie na przestrzeni ponad ostatnich 20 lat i oparte jest w pierwszej kolejności na opisanych już schematach zawierających cisplatynę, które to zapewniają OS na poziomie ok. 12-14 m-cy (70). Natomiast w przypadku leczenia drugiej linii, po zastosowanej wcześniej chemioterapii, pembrolizumab związany jest z lepszym OS niż chemioterapia drugiej linii: 10.3 m-cy vs. 7.4 m-cy (71).

### **Obserwacja w raku pęcherza moczowego (tzw. follow-up)**

W przypadku NMIBC, ze względu na ryzyko nawrotu oraz ewentualnej progresji choroby nowotworowej, pacjenci wymagają ścisłej obserwacji mającej za zadanie umożliwić odpowiednio wczesne rozpoznanie. Podstawą takiej diagnostyki jest okresowo wykonywane badanie cystoskopowe, cytologia moczu i uroTK. Częstość i zakres badań oraz czas trwania obserwacji uzależniony jest od stopnia zaawansowania oraz stopnia złośliwości histologicznej nowotworu. Na chwilę obecną żaden z

opisanych wcześniej markerów nie może zastąpić cystoskopii oraz badania cytologicznego moczu. Natomiast obserwacja pacjentów po leczeniu radykalnym w przebiegu MIBC koncentruje się na okresowo wykonywanym badaniu TK klatki piersiowej oraz uroTK. Celem tych badań jest jak najwcześniejsze wykrycie ewentualnej wznowy miejscowej, zmian węzłowych lub przerzutów odległych (6,7).

## 2.2 PODŚCIELISKO NOWOTWOROWE

Pojęcie mikrośrodowiska nowotworowego (TME; ang. *tumour microenvironment*) odnosi się do wszystkich komórkowych i biochemicznych elementów towarzyszących komórkom nowotworowym, włącznie z: fibroblastami związanymi z nowotworem (CAF's; ang. *carcinoma-associated fibroblasts*), komórkami układu odpornościowego, naczyniami krwionośnymi, hipoksemicznym i kwaśnym środowiskiem oraz elementami składającymi się na macierz pozakomórkową (ECM; ang. *extracellular matrix*) w tym proteoglikany, kwas hialuronowy, kolagen, fibronektyna, laminina, czynniki wzrostu, chemokiny, cytokiny, przeciwciała oraz różne metabolity (72). W TME fibroblasty są najliczniejszą populacją komórek nienowotworowych, natomiast makrofagi są najliczniejszymi komórkami układu immunologicznego, pełniąc dominującą rolę w odpowiedzi zapalnej (73).

ECM nie pełni jedynie funkcji biernego rusztowania dla komórek, ale jest dynamiczną strukturą wpływającą na polaryzację komórek, ich ruch, komunikację międzykomórkową i adhezję. Produkcja, degradacja i reorganizacja ECM jest procesem ściśle regulowanym i zaburzenie tego procesu może skutkować nieprawidłowym funkcjonowaniem zasiedlających ją komórek. Wykazano również, że ECM ma kluczowe znaczenie dla tworzenia się niszy metastatycznej w miejscu przerzutu nowotworowego. Dodatkowo, ECM odgrywa istotną rolę w powstawaniu naczyń krwionośnych i limfatycznych podczas nowotworowej angiogenezy oraz limfangiogenezy (74,75).

Mikrośrodowisko nowotworowe umożliwia wzrost i progresję procesu nowotworowego oraz wydaje się być krytycznym czynnikiem regulującym ucieczkę nowotworu spod nadzoru układu immunologicznego, progresję komórek nowotworowych oraz tworzenie przerzutów odległych (76,77). Wiele badań sugeruje, że w tkance nowotworowej panują warunki charakterystyczne dla przewlekłego stanu zapalnego. W wielu nowotworach, w tym w raku pęcherza moczowego, wykazano zależność pomiędzy przewlekłym stanem zapalnym, a ryzykiem karcynogenezy. Dodatkowo, same komórki nowotworowe wydzielają szereg cytokin i chemokin, których efektem jest rekrutacja komórek odpowiedzi zapalnej (m.in. makrofagi, mastocyty, granulocyty) (78–80). Pod wpływem tych substancji następuje zmiana fenotypu rekrutowanych komórek w efekcie czego dochodzi do powstania m.in. tzw. makrofagów związanych z nowotworem (TAM's; ang. *tumour-associated macrophages*), CAF's oraz aktywowanych komórek endotelialnych (81,82). Skutkiem toczącego się stanu zapalnego są także zmiany w obrębie układu naczyniowego – dochodzi do zwiększonej przepuszczalności istniejących już

naczyń oraz powstawania nowych m.in. w efekcie działania VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyń; ang. vascular endothelial growth factor) wydzielanego przez makrofagi i fibroblasty. W wyniku zwiększonej przepuszczalności naczyń nowotworowych, wolnego przepływu krwi oraz wydzielania w tkance nowotworowej czynników prozakrzepowych dochodzi do powstawania skrzepów krwi. Uwalniane w efekcie różne składniki układu krzepnięcia oraz interakcje płytek krwi z komórkami TME mogą odgrywać rolę w karcynogenezie oraz progresji nowotworowej (83).

Komórki podścieliska mogą przyczyniać się do progresji nowotworu poprzez wydzielanie chemoatraktantów, czynników wzrostu oraz białek degradujących ECM jak metaloproteinazy (MMP; ang. *metalloproteinases*). Degradacja ECM jest konieczna nie tylko do inwazji komórek nowotworowych. W trakcie tego procesu uwalniane są czynniki wzrostu, w tym EGF i TGF- $\beta$ , oraz odsłaniane są motywy RGD (trójpeptyd Arg-Gly-Asp), które mogą być rozpoznane przez integryny znajdujące się na powierzchni komórek nowotworowych (84). Ponadto, efektem działania MMP jest przerwanie ciągłości błony podstawnej naczyń i umożliwienie komórkom śródbłonna wrastanie w ECM podczas procesu neoangiogenezy (85). Spośród innych komórek obecnych w obrębie TME, komórki odpornościowe współdziałają, aby zapobiegać lub promować lokalny wzrost guzów i ich rozprzestrzenianie się, przy czym komórki NK (ang. *natural killers*), TAM's, komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (MDSC; ang. *myeloid derived suppressor cells*;) oraz limfocyty T odgrywają w tym procesie kluczową rolę (86).

Ze względu na istotną rolę ECM i komórek TME w procesie wzrostu i progresji nowotworowej, podejmowane są obecnie liczne próby opracowania strategii terapeutycznych ukierunkowanych na różne składniki podścieliska guza, w tym cząsteczki sygnałowe, proteazy degradujące ECM, komórki zapalne, komórki śródbłonna i fibroblasty (72).

### **2.3 FIBROBLASTY ZWIĄZANE Z NOWOTWOREM (CAF's)**

Fibroblasty są komórkami, które w warunkach fizjologicznych odpowiadają za podtrzymywanie prawidłowej struktury tkanki poprzez wydzielanie składników ECM (87). Fibroblastami związanymi z nowotworem (CAF's) lub ang. *tumour-associated fibroblasts* (TAF's) nazywamy komórki, które będąc elementem TME, stymulują wzrost, proliferację oraz inwazyjność komórek nowotworowych, w przeciwieństwie do normalnych fibroblastów, które zwykle powodują supresję tworzącego się guza nowotworowego (88,89). Fibroblasty obecne w TME produkują elementy ECM, regulują różnicowanie komórek oraz modulują odpowiedź immunologiczną. Mogą one stymulować wzrost i inwazyjność komórek nowotworowych, a także stan zapalny i angiogenezę, a ich obecność w tkance nowotworowej związana jest zwykle z większą agresywnością oraz gorszym rokowaniem (90,91). W niektórych jednak nowotworach CAFs mogą wykazywać działanie odwrotne, hamujące rozwój nowotworu (91). Około 20% CAF's pochodzi ze szpiku kostnego z tzw. mezenchymalnych komórek macierzystych (ang.

*mesenchymal stem cells*; MSCs), a pozostałe to komórki rekrutowane w miejscu guza nowotworowego (92).

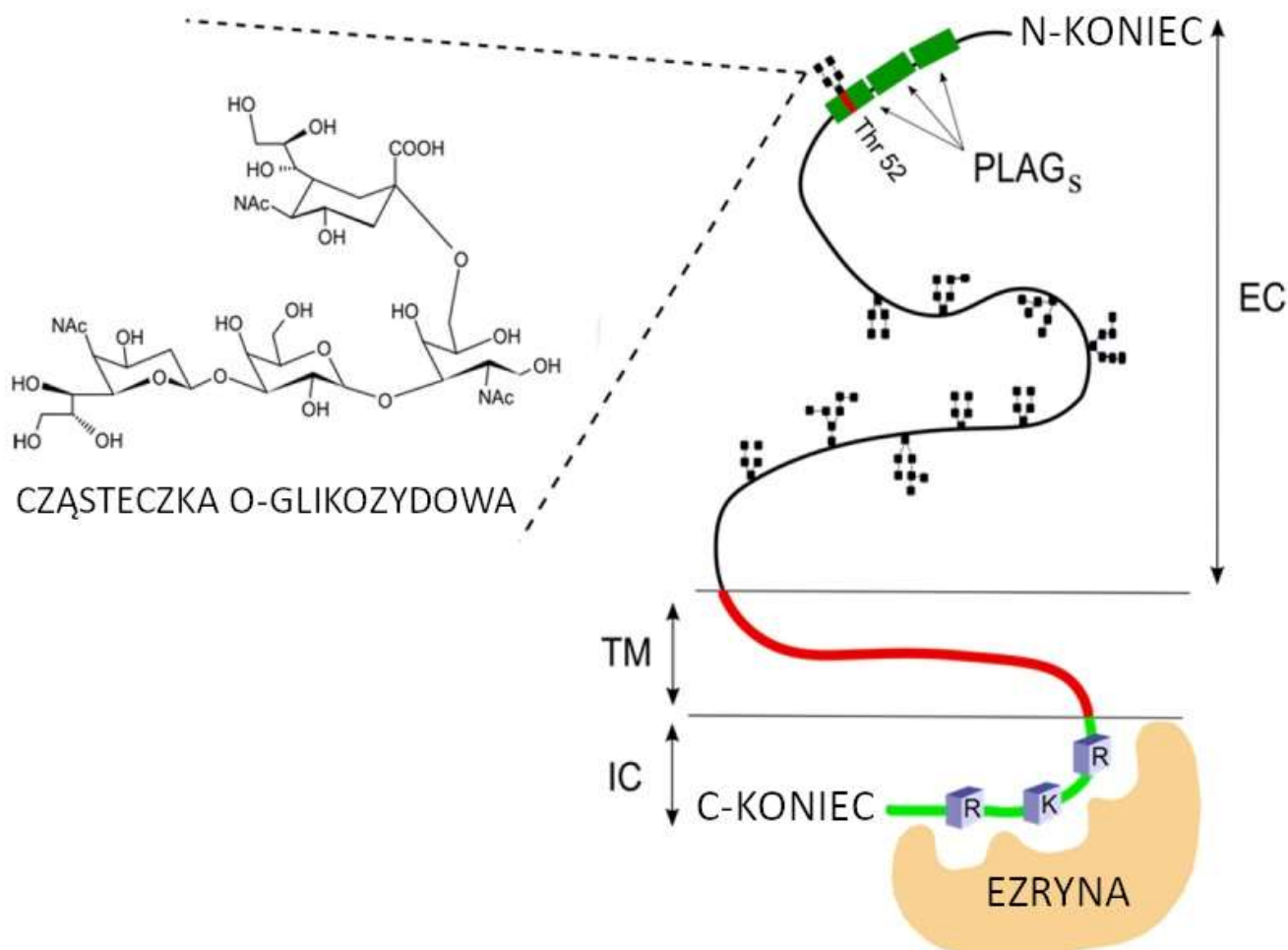
W porównaniu z rezydualnymi fibroblastami tkankowymi, CAF's mają zwiększony potencjał proliferacyjny, zwiększoną produkcję składników ECM i inny profil wydzielanych cytokin (m.in. TGF- $\beta$ , IL-6, EGF, SDF1, VEGF, FGF, PDGF oraz HGF). CAF's indukują przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT; ang. *epithelial-mesenchymal transition*) (93–96). CAF's współodpowiadają za powstawanie niszy o właściwościach prozapalnych poprzez wydzielanie cytokin i chemokin, takich jak m.in. CXCL12 (znane też jako SDF-1), CCL2, CCL8, białko wiążące IGF-7 (97). CAF's reorganizują ECM w taki sposób, że w efekcie zawiera ona większą ilość czynników parakrynych (np. IGF-1, IGF-2) promujących przeżycie komórek nowotworowych. (94) Produkowany przez CAF's kolagen typu I może pełnić rolę w oporności na stosowane leczenie onkologiczne (98).

Wykazano, że CAF's pierwotnych guzów pęcherza moczowego wykazują inny profil ekspresji białek w porównaniu z tkankowymi fibroblastami układu moczowego oraz napletka, a różnica ta może wynikać m.in. ze zmienionej ekspresji specyficznych miRNA (99). W inwazyjnym urotelialnym raku pęcherza moczowego (MIBC) dochodzi do większej deregulacji CAF's w porównaniu do raka nieinwazyjnego (NMIBC), co wskazuje na ich rolę w procesie inwazji nowotworowej oraz tworzeniu ognisk przerzutowych (100). Ponadto zwiększona ekspresja metaloproteinaz (MMPs), produkowanych między innymi przez CAF's, związana jest z większym ryzykiem progresji nowotworu oraz powstawania zmian przerzutowych, co sumarycznie przekłada się na gorsze rokowanie tych pacjentów (101). Poziomy MMP-9 w moczu, MMP-7 w surowicy oraz MMP-2, MMP-7 i MMP-14 w tkankach zostały zidentyfikowane jako potencjalne markery prognostyczne raka urotelialnego pęcherza moczowego (102).

## 2.4 PODOPLANINA (D2-40)

Podoplanina (D2-40), jest transbłonową glikoproteiną o masie cząsteczkowej 42 kD (38-50 kDa w zależności od stopnia sialilacji domeny zewnątrzkomórkowej), składającą się ze 162 aminokwasów, która ze względu na obecność dużej ilości łańcuchów O-glikozydowych zaliczana jest do mukoprotein. Znana jest również pod szeregiem innych nazw: D2-40, Aggrus, gp, 36, gp38, OTS-8, T1 $\alpha$ , PA.A26 oraz M2A, natomiast sama nawa „podoplanina” odnosi się do podocytów, w których po raz pierwszy w 1997 roku stwierdzono jej ekspresję (103). Białko to zawiera tzw. domeny stymulujące agregację płytek krwi (PLAG; ang. *platelet aggregation-stimulating domain*), które poprzez zawartą w niej cząsteczkę O-glikozydową łączą się z ektynopodobnym receptorem typu C 2 (CLEC-2; ang. *C-type lectin-like receptor 2*) obecnym na płytkach krwi. Na C-końcu białka obecne są aminokwasy łączące się z białkami ERM (kompleks białek: ezryna, radyksyna, moezyna; ang. *ezrin-radixin-moesin proteins complex*), które pełnią rolę molekularnych łączników między filamentami aktynowymi, a białkami

zakotwiczeni w błonie komórkowej. Domena wewnątrzkomórkowa białka, poprzez interakcję z białkami ERM oraz kinazą proteinową C (PKC; ang. *protein kinase C*) wpływa na mobilność komórek nowotworowych oraz ich potencjał inwazyjny. Strukturę cząsteczki podoplaniny przedstawiono na rycinie poniżej (104–109) (**Rycina 5**).



**Rycina 5.** Schemat cząsteczki podoplaniny łączącej się z wewnątrzkomórkowym elementem kompleksu białek ERM – ezryną; EC - domena zewnątrzkomórkowa; TM - domena przezbłonowa; IC – domena wewnątrzkomórkowa. ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859667](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859667))

Ekspresję podoplaniny stwierdzono w wielu prawidłowych tkankach i komórkach (m.in. wypustki stopowate podocytów, komórki endotelialne naczyń limfatycznych, pneumocyty typu I, osteocyty, osteoblasty, komórki mezotelium) oraz w licznych nowotworach, gdzie potwierdzono rolę D2-40 w adhezji, migracji oraz tworzeniu zmian przerzutowych (110–115). Podoplanina uważana jest głównie za marker komórek endotelialnych naczyń limfatycznych, a przez to procesu limfangiogenezy. Co więcej, ekspresję tego białka stwierdzono w zarówno w komórkach nowotworowych, jak i w CAF's. Rezydualne fibroblasty tkankowe w przeciwieństwie do CAF's nie wykazują ekspresji D2-40 (116–119).

Podoplanina poprzez swoje oddziaływanie z receptorem CLEC-2 na płytkach krwi powoduje powstawanie agregatów płytkowych, które tworząc mikrozatory promują powstawanie przerzutów oraz

wchodzą w interakcje z komórkami nowotworowymi (114,120–122). Wyniki badań wskazują ponadto na istotną rolę podoplaniny jako markera aktywnych CAF's uczestniczących w progresji procesu nowotworowego oraz modulowaniu fenotypu komórek nowotworowych (118,123–127). Najwięcej CAF's wykazujących ekspresję podoplaniny stwierdzono w raku jelita grubego, raku żołądka, raku dróg żółciowych i w raku trzustki, podczas gdy w nowotworach takich jak rak pęcherza moczowego, rak gruczołu piersiowego, rak prostaty, rak płuc, rak wątroby, rak macicy i rak jajnika, ekspresję podoplaniny stwierdzono w mniej niż połowie CAF's. W raku tarczycy nie odnotowano ekspresji podoplaniny w podścielisku nowotworowym (TME) (128).

Poziom ekspresji podoplaniny, jak i jej rokownicze znaczenie jest zróżnicowane w zależności od typu nowotworu. Wysoki poziom ekspresji podoplaniny w CAF's raka gruczołu piersiowego, trzustki, przełyku, gruczolaka płuc i czerniaka związany był z gorszym rokowaniem pacjentów (127,129–131). W przypadku gruczolaka jelita grubego, wysoka ekspresja podoplaniny w CAF's okazała się być korzystnym czynnikiem rokowniczym związanym z rzadszym występowaniem przerzutów do wątroby (132,133). W raku płaskonabłonkowym płuc, wysoka ekspresja D2-40 w CAF's nie miała istotnej wartości prognostycznej, podczas gdy w gruczolaku płuc związana była z opornością na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych (134–136). W przypadku raka szyjki macicy guzy wykazujące ekspresję podoplaniny w CAF's wykazywały mniejszą tendencję do tworzenia zmian przerzutowych do węzłów chłonnych, a w gruczolaku przełyku związane to było z krótszym przeżyciem wolnym od choroby (DFS) oraz przeżyciem całkowitym (OS) (137,138).

Badania przeprowadzone przez zespół Satoshi *et al.* wykazały, że spośród 135 przypadków raka pęcherza moczowego połowa przypadków z potwierdzonymi przerzutami charakteryzowała się podwyższoną ekspresją D2-40 w komórkach nowotworowych (114). Wyciszenie ekspresji podoplaniny u myszy z wyindukowanym rakiem pęcherza moczowego hamowało powstawanie agregatów płytkowych i zmniejszało ryzyko powstawania przerzutów do płuc, przez co postuluje się jej ewentualny potencjał terapeutyczny w tym nowotworze (114,139,140). W innym badaniu stwierdzono, że duża ilość komórek wykazujących ekspresję podoplaniny w tkance inwazyjnego raka pęcherza moczowego (MIBC) związana jest z krótszym czasem przeżycia wolnego od wznowy (RFS; ang. *recurrence-free survival*) oraz krótszym czasem przeżycia całkowitego (OS) (141).

## 2.5 MARKERY ANGIOGENEZY

Wzrost nowych naczyń krwionośnych jest niezbędny do wzrostu guza, inwazji i późniejszego tworzenia zmian przerzutowych (142). Patologiczne naczynia tkanki nowotworowej rosną w szybkim tempie, zapewniając komórkom nowotworowym składniki odżywcze (143). Proces powstawania nowej sieci naczyń krwionośnych na bazie już istniejących nazywamy angiogenezą. Co ważne, m.in. w kontekście penetracji stosowanych leków o działaniu systemowym, rozkład naczyń w guzach nie jest



równomierny – na ich obwodzie naczyń jest więcej niż wewnątrz guzów (144,145). Interakcja pomiędzy komórkami nowotworowymi a komórkami śródbłonna odgrywa zasadniczą rolę w migracji komórek przez barierę ściany naczyń (146). Przekroczenie przez komórki nowotworowe bariery pericytów błony podstawnej i komórek śródbłonna jest krytycznym etapem zdolności tworzenia zmian przerzutowych (147).

Działanie proangiogenne w tkance guza wykazują m.in. CAF's wydzielając SDF-1 (ang. *stromal cell-derived factor-1*; również znane jako CXCL12), czynnik, którego efektem jest rekrutacja progenitorowych komórek śródbłonna (ang. *endothelial progenitor cells*; EPC's) (143). Spośród innych ważnych czynników działających stymulująco na wzrost naczyń wymienia się m.in. VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*), FGF (ang. *fibroblast growth factor*) oraz EGF (ang. *epidermal growth factor*).

VEGF-A wydzielany jest w wyniku hipoksji oraz działania czynników indukownych hipoksją (ang. *hypoxia inducible factor* – HIF), takich jak HIF-1 oraz HIF-2. VEGF-A działa poprzez receptory znajdujące się na powierzchni komórek endotelialnych (148). W przypadku nieinwazyjnego raka pęcherza moczowego NMIBC, wyższa ekspresja mRNA VEGF związana jest z większym ryzykiem nawrotu, progresji oraz z krótszym DFS (149).

FGF (ang. *fibroblast growth factor*) jest czynnikiem wzrostu, który odgrywa rolę we wzroście prawidłowych komórek, ich przeżyciu, różnicowaniu oraz angiogenezie, ale bierze również udział we wzroście guza nowotworowego (150). FGF, działając synergistycznie z VEGF-A, wykazuje działanie proangiogenne (151). Mutacje aktywujące gen *FGFR3* (receptora czynnika wzrostu fibroblastów 3; ang. *fibroblast growth factor receptor 3*) stwierdzono w 50% guzów pęcherza moczowego i są związane z niższym ryzykiem progresji oraz śmiertelności. Są one szczególnie częste w guzach o niskim stopniu złośliwości, gdzie stwierdza się je aż w 85% przypadków (152).

Stymulujący wpływ na angiogenezę wykazuje również szlak sygnałowy receptora dla EGF (ang. *epidermal growth factor receptor*), którego nadekspresję stwierdza się w 31-48% przypadków raka urotelialnego pęcherza moczowego. Hamowanie EGFR zmniejsza poziom VEGF-A, IL8 oraz  $\beta$ -FGF, które są silnymi czynnikami proangiogennymi (153). Wysoką ekspresję EGFR stwierdza się w 74% przypadków raka pęcherza moczowego, natomiast niską w prawidłowym nabłonku urotelialnym. Wysoka ekspresja EGFR, sprzyjająca inwazji oraz migracji, w raku pęcherza moczowego związana jest ze złym rokowaniem (154,155).

Ocena procesu angiogenezy w tkance nowotworowej ma istotną wartość prognostyczną i potencjalną wartość predykcyjną w wielu nowotworach (156). Obecnie główną metodą ilościowej oceny liczby nowych naczyń jest pomiar gęstości mikronaczyń (ang. *microvessel density*; MVD) za pomocą markerów śródbłonna, zaproponowany po raz pierwszy przez Weidnera w 1991 roku (157).

Jednymi z częściej wykorzystywanych markerów w ocenie MVD są obecnie CD31 oraz CD34. CD34 jest transbłonowym białkiem kodowanym przez gen *CD34* na chromosomie 1q/32, ulegającym

ekspresji w ludzkich komórkach krwiotwórczych szpiku kostnego i układu limfatycznego, a także w komórkach endotelialnych. CD34 reguluje wczesne różnicowanie komórek krwi, ale także działa jako międzykomórkowy czynnik adhezyjny w komórkach endotelium oraz w hematopoetycznych komórkach progenitorowych (158).

CD31, płytkowa cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonna 1 (PECAM-1, ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule*), jest transbłonowym białkiem kodowanym przez gen *PECAM* zlokalizowanym na chromosomie 17q/23. CD31 jest ekspresjonowane w komórkach endotelialnych naczyń krwionośnych oraz w mniejszym stopniu naczyń limfatycznych. CD34 oraz CD31 są powszechnie stosowanymi markerami naczyń krwionośnych i odgrywają znaczącą rolę w ocenie angiogenezy nowotworowej (159).

W przypadku raka pęcherza moczowego NMIBC wykazano, że większa gęstość naczyń (MVD) w momencie rozpoznania NMIBC związana jest z większym ryzykiem progresji choroby nowotworowej, natomiast w raku pęcherza moczowego MIBC, MVD jako niezależny czynnik prognostyczny związany jest z krótszym DFS oraz OS (160–162).

### 3 CEL PRACY

Dotychczas opisywano rolę podoplaniny w zaawansowanym, inwazyjnym raku pęcherza moczowego stwierdzając, że jej wysoka ekspresja koreluje z wielkością guza nowotworowego, ryzykiem jego progresji i tworzeniem się przerzutów odległych. Jak dotąd nie oceniano jednak ewentualnej wartości diagnostycznej i prognostycznej podoplaniny w raku pęcherza moczowego nienaciekającym błony mięśniowej ściany pęcherza moczowego (NMIBC).

Celem niniejszej pracy jest immunohistochemiczna ocena poziomu ekspresji podoplaniny w komórkach raka urotelialnego pęcherza moczowego nienaciekającego błonę mięśniową ściany pęcherza moczowego (NMIBC) oraz w fibroblastach podścieliska nowotworowego (CAF's), a także skorelowanie jej z danymi kliniczno-patologicznymi. Ocenie porównawczej poddana została również ekspresja podoplaniny w guzach nienaciekających (NMIBC) i naciekających błonę mięśniową właściwą pęcherza moczowego (MIBC). Dodatkowo, biorąc pod uwagę znaczenie D2-40 w procesach angio- i limfangiogenezy, celem pracy była ocena korelacji podoplaniny z ekspresją markerów naczyń krwionośnych: CD34 będącego markerem nowopowstających naczyń (tzw. marker neoangiogenezy) oraz CD31 będącego markerem dojrzałych naczyń krwionośnych. Zbadana została również korelacja podoplaniny z Ki-67, uznanym markerem proliferacji komórkowej.

## 4 MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

### 4.1 Materiał kliniczny. Charakterystyka pacjentów.

Materiał do badań pobierano w Oddziale Urologii i Urologii Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu w latach 2017-2018. Do badania zakwalifikowano pacjentów ze stwierdzonym pierwotnym guzem pęcherza moczowego. Rozpoznanie nowotworu odbywało się w toku rutynowej diagnostyki klinicznej tzn. cystoskopii, badania USG lub uroTK.

Materiał do badań stanowiły wycinki pobierane podczas zabiegów przezcewkowej elektroresekcji guzów pęcherza moczowego (TURBT) o śr.>1 cm. Wycinki pobierane były za pomocą kleszczy biopsyjnych, celem wykluczenia negatywnego wpływu energii elektrycznej stosowanej podczas właściwej części zabiegu (tzw. elektroresekcji monopolarnej lub bipolarnej). Materiał zabezpieczono w 10% roztworze zbuforowanej formaliny i zatopiono w parafinie na potrzeby późniejszych badań immunohistochemicznych. W zależności od wyniku badania histopatologicznego oraz stwierdzonego ryzyka nawrotu lub progresji choroby nowotworowej, pacjenci otrzymywali jednorazowy dopęcherzowy wlew chemioterapeutyku (roztwór 40 mg mitomycyny C lub 50 mg doksorubicyny) lub kwalifikowani byli do trwającej 12-26 miesięcy dopęcherzowej BCG-immunoterapii.

Dalszej obserwacji onkologicznej poddawano pacjentów, u których po zabiegu nie stwierdzono raka urotelialnego naciekającego błonę mięśniową właściwą ściany pęcherza moczowego, czyli pacjentów z guzem NMIBC. W przypadku, w którym stwierdzono raka naciekającego (MIBC), pacjenci wyłączani byli z dalszej obserwacji, jednak uzyskany materiał biologiczny zabezpieczano na potrzeby późniejszych badań porównawczych. Z badania wyłączono również pacjentów z rakiem *in situ* (Cis) oraz o typie histologicznym innym niż rak urotelialny. Zabieg ponownej przezcewkowej elektroresekcji (reTURBT; ang. *repeat transurethral resection of bladder tumour*;) wykonywany rutynowo 2-6 tygodni po pierwotnym zabiegu TURBT u pacjentów z grupy ryzyka nie spełniał kryterium wznowy procesu nowotworowego. Czas prospektywnej obserwacji pacjentów przewidziano na okres minimum 36 m-cy lub do czasu stwierdzenia wznowy lub progresji procesu nowotworowego. Za wznowę uznawano ponowne pojawienie się guza nowotworowego potwierdzonego wynikiem badania histopatologicznego. Natomiast progresję nowotworu stwierdzano w przypadku wyższego stopnia zaawansowania miejscowego (skala TNM) lub wyższego stopnia złośliwości histologicznej (skala LG/HG oraz G1/G2/G3) w wycinkach uzyskiwanych podczas kolejnych zabiegów TURBT.

Grupę kontrolą stanowili pacjenci po zabiegach radykalnego usunięcia pęcherza moczowego, u których wycinki pobierano z makroskopowo zdrowego fragmentu ściany pęcherza moczowego, u których w wyniku badania histopatologicznego całego pęcherza moczowego nie stwierdzono współistnienia raka *in situ* (Cis). Dodatkowo, celem oceny różnic w ekspresji białek w rakach NMIBC oraz MIBC wycinki z guza pobierano również od pacjentów poddawanych cystektomii radykalnej .

Badania wykonano za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (KB 532/2018). Pacjentom zakwalifikowanym do badania przekazano informację dla pacjenta, świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu, zgodę na przetwarzanie danych osobowych, zgodę na pobranie i wykorzystanie materiału tkankowego w celach badawczych oraz zgodę na przedstawione warunki ubezpieczenia. Do badania włączono chorych, od których uzyskano pisemną świadomą zgodę. Środki na przeprowadzenie badań pozyskano w ramach Grantu dla Młodych Naukowców przyznanego przez Centrum Wspierania Nauki Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w 2018 r.

## 4.2 Mikromacierze tkankowe

Materiał do badań stanowiło 79 bloczków parafinowych od pacjentów po zabiegu TURBT w przebiegu nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego (NMIBC), 10 bloczków parafinowych tkanki kontrolnej w postaci fragmentu zdrowej ściany pęcherza moczowego oraz 40 archiwalnych bloczków parafinowych raków naciekających błonę mięśniową pęcherza moczowego (MIBC) z Zakładu Patomorfologii „Hist-Med” we Wrocławiu.

Bloczki parafinowe pokrojono na skrawki o grubości 4  $\mu\text{m}$ , a następnie wykonano preparaty barwione hematoksyliną i eozyną. Preparaty zeskanowano przy użyciu skanera histologicznego Panoramic MID (3DHistech). Zdjęcia preparatów pozwoliły na wybranie reprezentatywnych obszarów tkanki (spoty) w celu stworzenia mikromacierzy tkankowych (TMA; ang. *tissue microarrays*) za pomocą automatycznego systemu TMA Grand Master (3DHistech) – po 3 spoty z każdego bloczka parafinowego, każdy o średnicy 1,5 mm. Zastosowanie mikromacierzy pozwoliło na redukcję kosztów związanych z badaniami umożliwiając jednoczesną analizę preparatów pochodzących od dużej liczby pacjentów.

## 4.3 Reakcje immunohistochemiczne (IHC)

Pierwszym etapem reakcji immunohistochemicznej było gotowanie skrawków parafinowych w temperaturze 97°C w aparacie PTLINK (DAKO, Dania) w buforze EnVision FLEX Target Retrieval Solution przez 20 minut celem deparafinizacji, uwodnienia oraz odsłonięcia epitopów. Preparaty studzono w buforze płuczącym Wash Buffer (bufor TBS z Tween 20). Celem zapewnienia stałych warunków reakcji oraz powtarzalności wyników, właściwe reakcje immunohistochemiczne przeprowadzono z użyciem automatycznego systemu AutostainerLink 48 (DAKO, Dania) z zastosowaniem systemu do wizualizacji EnVision FLEX+, Mouse, High pH (DAKO, Dania). Kolejnym etapem IHC było blokowanie aktywności endogennej peroksydazy przy użyciu odczynnika EnVision FLEX Peroxidase Blocking Reagent - w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Następnie preparaty przepłukano buforze płuczącym i poddano 20-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej z pierwszorzędowym przeciwciałami: anti-D2-40 (IR072, ready-to-use; DAKO, Dania), anti-Ki-67

(IR626 ready-to-use; DAKO, Dania), anti-CD31 (IR610, ready-to-use; DAKO, Dania), anti-CD34 (IR632, ready-to-use; DAKO, Dania), anti-wimentyna (IR630, ready-to-use; DAKO, Dania) oraz anti- $\alpha$ -SMA (IR611, ready-to-use; DAKO, Dania). Za pomocą Wash Buffer przepłukano preparaty usuwając nadmiar przeciwciał. Kolejnym krokiem była 20 minutowa inkubacja z drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z peroksydazą chrzanową (EnVision FLEX/HRP) w temperaturze pokojowej. Po przepłukaniu w buforze płuczającym dodano roztwór tetrachlorowodoru 3'3'-diaminobenzyny (DAB) będącego substratem dla peroksydazy chrzanowej - 5 min inkubacja w temperaturze pokojowej. Resztki odczynnika usunięto poprzez dwukrotne płukanie preparatów w buforze płuczającym. W kolejnym etapie wykonano barwienie kontrastujące hematoksyliną (EnVision FLEX Hematoxylin; DAKO, Dania) - 5 minutowa inkubacja w temperaturze pokojowej. Ostatniego płukania dokonano przy użyciu wody destylowanej. Tak uzyskany materiał odwodniono przeprowadzając preparaty przez szereg alkoholowy o wzrastającym stężeniu procentowym (70%, 96%, 99,8%) – 5 minut w każdym stężeniu. Ostatecznie preparaty inkubowano 5-minut w roztworze ksylenu. Uzyskany preparaty zamknięto przy użyciu żywicy syntetycznej DAKO Mounting Medium (DAKO, Dania) w automatycznej zaklejarce Coverslipper (DAKO, Dania)

#### 4.4 Ocena reakcji immunohistochemicznych

Skrawki guzów NMIBC po wybarwieniu hematoksyliną i eozyną poddano standardowej ocenie histopatologicznej wg klasyfikacji WHO.(31) W celu oceny poziomu ekspresji D2-40 (w komórkach podścieliska nowotworowego oraz w komórkach nowotworowych) wykorzystano półilościową skalę IRS wg Remmele i Stegner (skala w zakresie od 0-12 punktów uwzględniająca intensywność reakcji barwnej oraz odsetek pozytywnych komórek).(Tabela 5)(163) Wynik oceny preparatów IHC stanowi średnią oceny z trzech reprezentatywnych obszarów (tzw. spotów) materiału tkankowego.

**Tabela 5. Skala IRS wg Remmele'go i Stegner.**

ODSETEK POZYTYWNYCH KOMÓREK (%) (A)	PUNKTACJA	INTENSYWNOŚĆ REAKCJI BARWNEJ (B)	PUNKTACJA	ILOŚĆ UZYSKANYCH PUNKTÓW (AxB)	INTERPRETACJA WYNIKU
0	0	Brak reakcji	0	0-1	Negatywny
<10	1	Miała	1	2-3	Słaba ekspresja
10-50	2	Średnia	2	4-8	Średnia ekspresja
51-80	3	Duża	3	9-12	Silna ekspresja
>80	4	-----			

Do oceny poziomu ekspresji Ki-67 wykorzystano 4-stopniową skalę oceniającą odsetek komórek wykazujących reakcję barwną (**Tabela 6. Skala oceny ekspresji Ki-67 na podstawie odsetka komórek wykazujących reakcję barwną**). Do dalszej analizy statystycznej wykorzystano średnią wartość oceny uzyskaną z pomiarów trzech reprezentatywnych obszarów (tzw. spotów) materiału tkankowego.

**Tabela 6. Skala oceny ekspresji Ki-67 na podstawie odsetka komórek wykazujących reakcję barwną.**

ODSETEK POZYTYWNYCH KOMÓREK (%)	PUNKTACJA
<5	0
6-25	1
26-50	2
>50	3

Reakcja IHC z wykorzystaniem przeciwciał zastosowanych w celu detekcji wimentyny oraz  $\alpha$ -SMA (uznanych markerów fibroblastów) miało za zadanie potwierdzić lokalizację obszarów zajmowanych przez CAF's.

Oceny reakcji immunohistochemicznych mających na celu detekcję antygenów: D2-40, Ki-67, wimentyny oraz  $\alpha$ -SMA dokonano za pomocą mikroskopu świetlnego (BX-40; Olympus, Japonia). Ekspresję antygenów: CD31 (markera dojrzałych naczyń krwionośnych) oraz CD34 (markera nowopowstałych naczyń krwionośnych) oceniono z użyciem mikroskopu świetlnego w powiększeniu 400x mierząc gęstość mikronaczyń (ang. *microvasculature vessel density*; MVD) za pomocą okularu Chalkleya (Chalkley Point Array graticule; Pyser SGI, Edenbridge, UK).

#### 4.5 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu GraphPad Prism 5,0 (La Jolla, Ca, USA). Do określenia rozkładu badanych cech ilościowych wykorzystany został test Kołmogorowa-Smirnowa. Korelacje pomiędzy dwoma cechami (parametrami kliniczno-patologicznymi, a ekspresją badanych markerów) analizowano za pomocą testu t-Studenta. Test Manna-Whitneya wykonywano, gdy porównywane grupy nie spełniały założeń testu parametrycznego. W przypadku gdy ocenie porównawczej poddawano więcej niż dwie cechy wykorzystywano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) lub test Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna. W celu zbadania istniejących korelacji, w zależności od rozkładu cech, wykorzystano testy korelacji Pearsona lub Spearmana. Analizę prawdopodobieństwa wystąpienia wznowy raka pęcherza moczowego przeprowadzono za pomocą testu Mantela Coxa, Dodatkowo, przy użyciu metody Kaplana-Meyera,

przygotowano krzywe prawdopodobieństwa wystąpienia wznowy choroby. We wszystkich analizach wyniki uznano za istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ .



## 5 WYNIKI

### **Charakterystyka kliniczno-patologiczna przypadków nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego (NMIBC)**

Do badania w okresie od 02.02.2017 r. do 12.12.2018 r. zrekrutowano 120 pacjentów, których poddano zabiegowi TURBT oraz od których uzyskano i zabezpieczono materiał tkankowy. Z tej grupy 79 pacjentów spełniło kryteria w postaci rozpoznania guza NMIBC oraz obserwacji onkologicznej trwającej minimum 36 m-cy lub do czasu stwierdzenia wznowy lub progresji procesu nowotworowego. W tym czasie zabezpieczono również materiał ze zdrowej ściany pęcherza moczowego od 10 pacjentów oraz materiał z zaawansowanego raka urotelialnego pęcherza moczowego MIBC od 40 pacjentów.

Spośród 79 pacjentów poddanych prospektywnej obserwacji 24 stanowiły kobiety, natomiast 55 mężczyźni (30,4% vs 69,6%). Średni wiek pacjentów w dniu zabiegu przezcewkowej elektroesekcji guza pęcherza moczowego wynosił 67,9 lat (35-90 r.ż.). 59 pacjentów (74,7%) miało dodatni wywiad w kierunku palenia wyrobów tytoniowych trwający od 2 do 100 paczkolet (śr. 18,6 paczkoleta). Guzy pęcherza moczowego u 52 pacjentów (65,8%) rozpoznane były w toku diagnostyki krwimoczku, u 23 pacjentów (29%) do rozpoznania doszło przypadkowo podczas badania USG jamy brzusznej wykonanego z innego powodu, u 3 pacjentów (3,9%) guz stwierdzono podczas cystoskopii wykonanej w ramach diagnostyki zaburzeń mikiacji, natomiast u 1 pacjentki (1,3%) guz zdiagnozowano podczas przezpochwowego badania USG wykonanego w ramach okresowej kontroli ginekologicznej. Średni czas trwania krwimoczku poprzedzając moment rozpoznania guza wynosił 3,08 m-ce (0,5-24 m-ce). Mnogiego guza pęcherza moczowego podczas zabiegu TURBT stwierdzono u 27 pacjentów (34,2%). Śródzabiegowo stwierdzono obecność od 2 do 11 guzów (średnio 1,89). Nawrót choroby nowotworowej stwierdzono ostatecznie u 29 pacjentów (36,7%), średnio po 621,2 dniach od pierwotnego zabiegu TURBT (112-1657 dni). Progresję nowotworu do guza o wyższym stopniu zaawansowania miejscowego lub o wyższym stopniu złośliwości histologicznej rozpoznano u 11 pacjentów (14%). Podstawowe informacje dotyczące charakterystyki badanych guzów zawarto w **Tabela 7.**

### **Charakterystyka**

**Tabela 7. Charakterystyka przypadków nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego (NMIBC) poddanych prospektywnej obserwacji oraz analizie statystycznej**

PARAMETR	LICZBA	%
<b>Stopień zaawansowania miejscowego</b>		
Ta	56	70,9
T1	23	20,1
<b>Stopień złośliwości histologicznej wg. skali WHO z 1973 roku</b>		
G1	50	63,3
G2	14	17,7
G3	15	19
<b>Stopień złośliwości histologicznej wg. skali WHO z 2004/2022 roku</b>		
LG	50	63,3
HG	29	36,7
<b>Grupy ryzyka raka nieinwazyjnego (NMIBC) według Europejskiego Towarzystwa Urologicznego</b>		
Niskie ryzyko	33	41,8
Pośrednie ryzyko	17	21,5
Wysokie ryzyko	29	36,7
<b>Nawrót choroby nowotworowej</b>		
NIE	29	36,7
TAK	50	63,3
Średni czas do nawrotu	604,5 dni	
<b>Progresja choroby nowotworowej</b>		
NIE	68	86
TAK	11	14

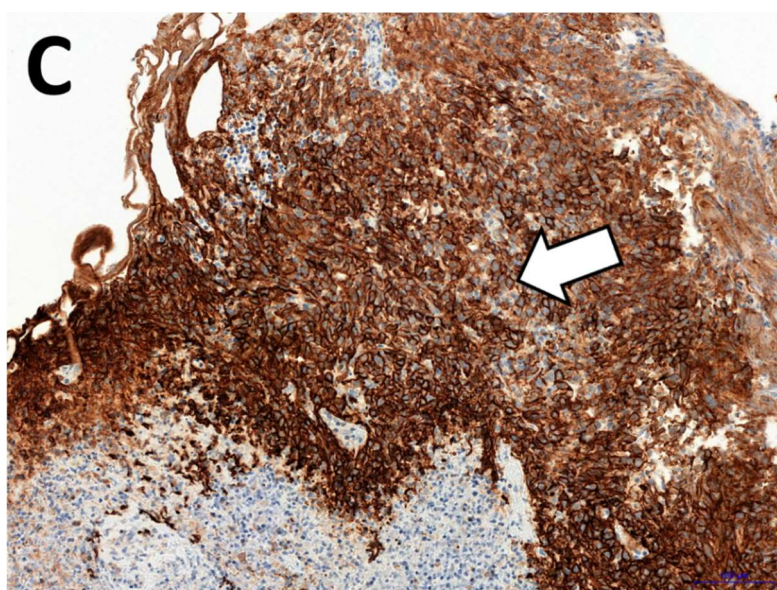
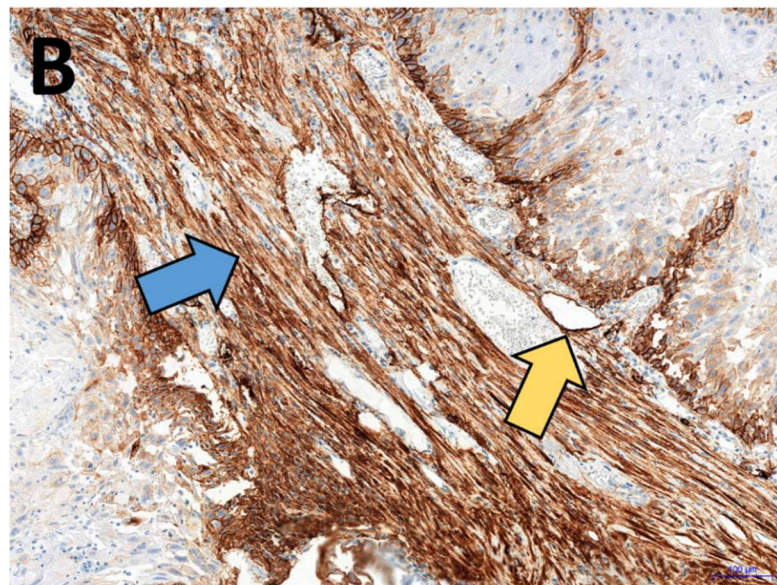
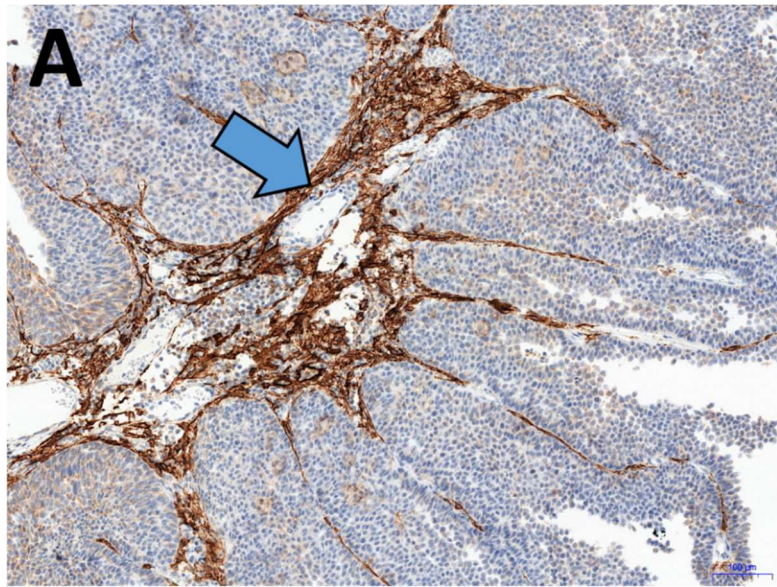
**Wyniki oceny reakcji immunohistochemicznych oraz korelacje z danymi kliniczno-patologicznymi w nieinwazyjnych rakach urotelialnych pęcherza moczowego (NMIBC)**

Ekspresję podoplaniny (D2-40) w CAF's stwierdzono we wszystkich badanych preparatach (100%), natomiast ekspresję D2-40 w komórkach nowotworowych zaobserwowano u 59 pacjentów (74,7%). W **Tabeli 8** przedstawiono podsumowanie rozkładu nasilenia ekspresji badanych immunohistochemicznie markerów w grupie pacjentów z NIMBC.

**Tabela 8. Rozkład nasilenia ekspresji badanych markerów: podoplaniny (D2-40), Ki-67, CD31 oraz CD34 w raku urotelialnym nieinwazyjnym NIMBC .**

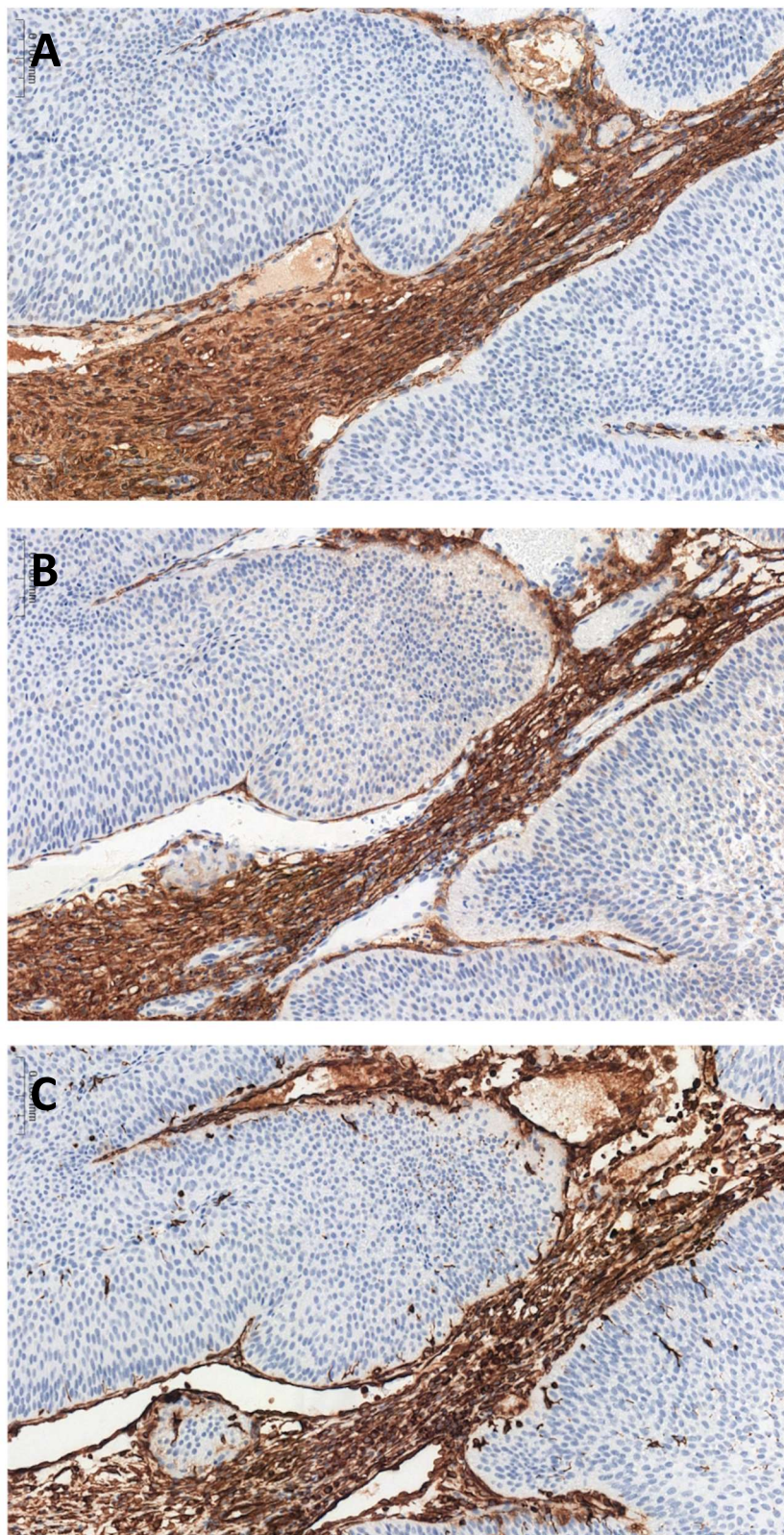
PARAMETR	LICZBA PRZYPADKÓW	%
<b>Ekspresja podoplaniny (D2-40) w komórkach nowotworowych</b>		
UJEMNA	20	25,3
DODATNIA	59	74,7
<b>Ekspresja podoplaniny (D2-40) w CAF's</b>		
UJEMNA	0	0
DODATNIA	79	100
<b>Średnia ekspresja podoplaniny (D2-40) w skali IRS</b>		
Komórki nowotworowe	2,791	
CAF's	8,616	
<b>Naczynia limfatyczne w preparatach z podoplaniną (D2-40)</b>		
NIEOBECNE	71	89,9
OBECNE	8	10,1
<b>Średnia ekspresja pozostałych markerów</b>		
Ki-67	1,89	
CD31 (MVD)	2,32	
CD34 (MVD)	5,03	

Przykładowe reakcje immunohistochemiczne obrazujące ekspresję podoplaniny w komórkach raka urotelialnego, CAF's oraz w komórkach endotelialnych naczyń limfatycznych przedstawiono na *Rycinie 6*.



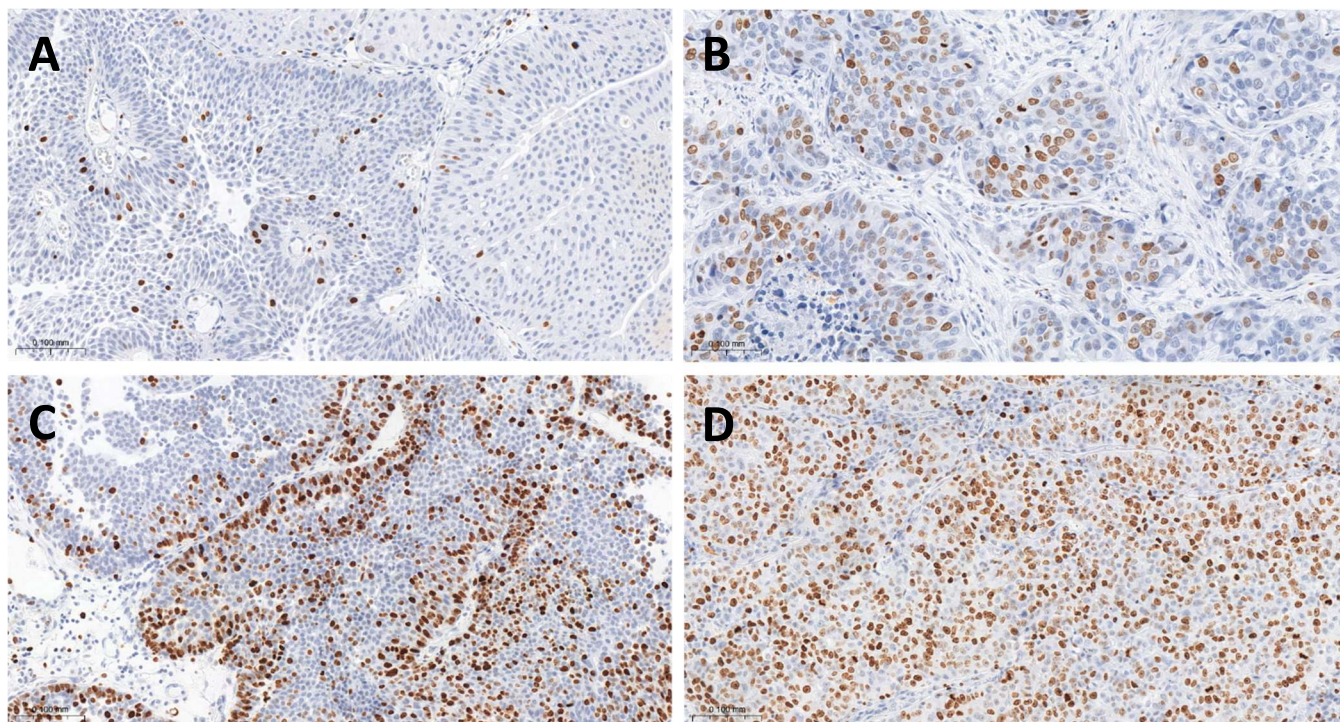
**Rycina 6. Obrazy reakcji immunohistochemicznej (A, B, C) przedstawiające ekspresję podoplaniny (D2-40) w raku urotelialnym pęcherza moczowego. Niebieską strzałką oznaczono ekspresję D2-40 w podścielisku (obraz A i B). Białą strzałką oznaczono silną błonową ekspresję podoplaniny w komórkach nowotworowych (obraz C). Żółtą strzałką oznaczono komórki endotelialne naczyń limfatycznych (obraz B).**

Obecność CAF's w badanych tkankach potwierdzano poprzez oznaczenie uznanych markerów fibroblastów podścieliska nowotworowego:  $\alpha$ -SMA (alfa aktyna mięśni gładkich; *ang.  $\alpha$ -smooth muscle actin*) oraz wimentyny (białko cytoszkieletu należące do III typu filamentów pośrednich) (**Rycina 7**).



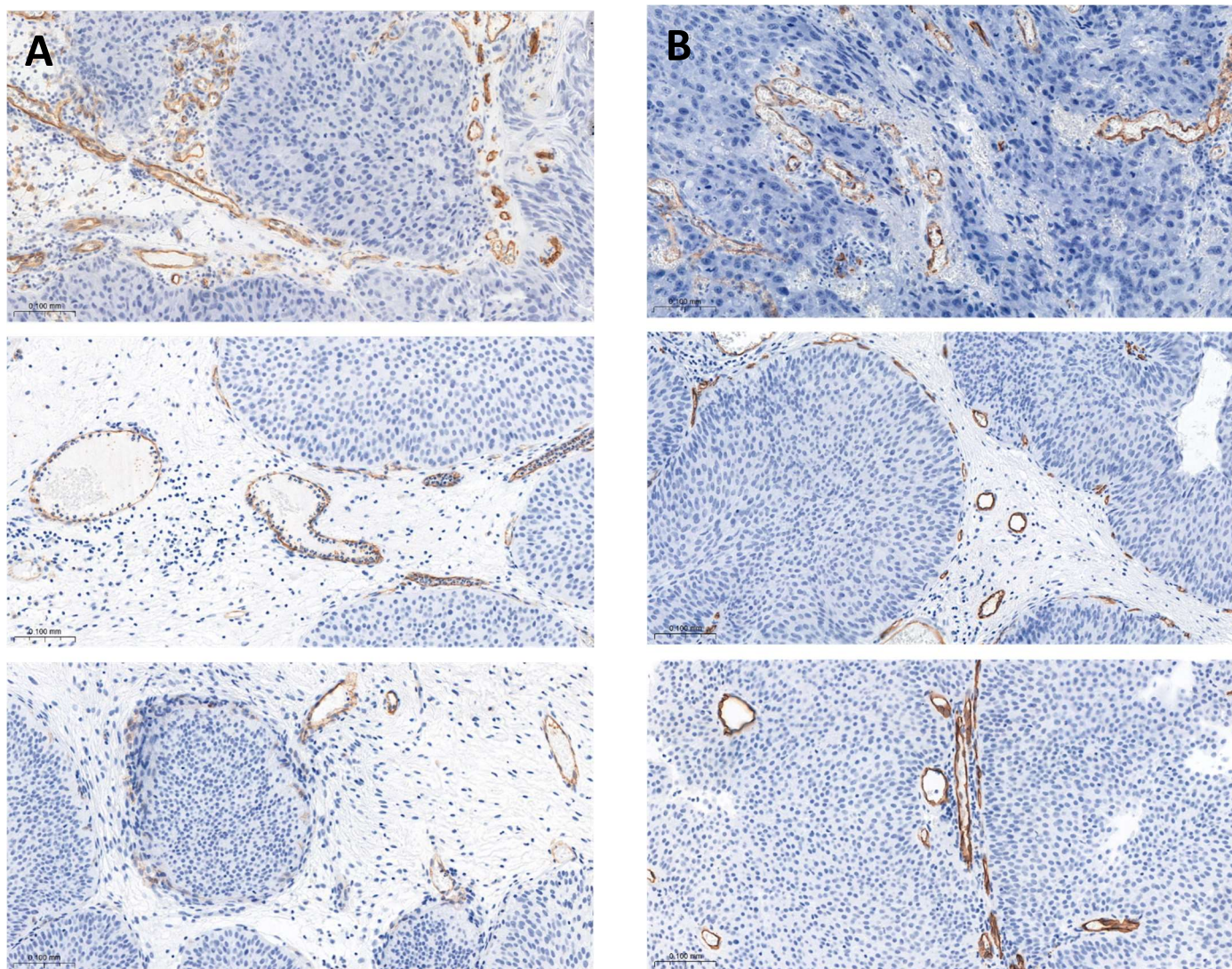
**Rycina 7.** Ekspresja markerów w fibroblastach podścieliska nowotworowego (CAF's') w seryjnych przekrojach nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego (NMIBC) przy użyciu przeciwciał przeciwko  $\alpha$ -SMA (A), podoplaninie (D2-40) (B) oraz wimentynie (C).

Cztery stopnie nasilenia ekspresji Ki-67 w komórkach raka urotelialnego pęcherza moczowego przedstawiono na *Rycinie 8*.



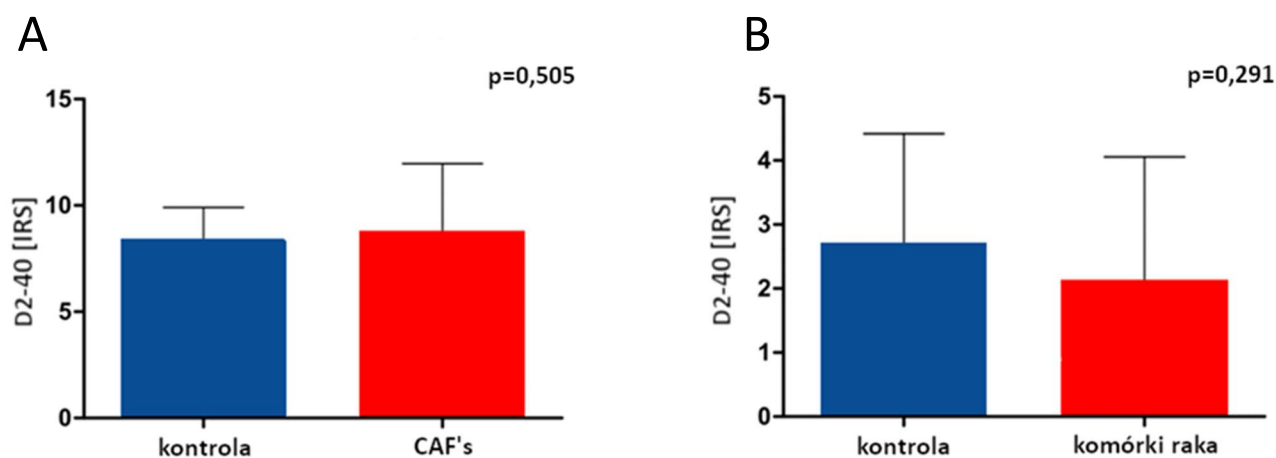
*Rycina 8. 4 stopnie nasilenia ekspresji jądrowej antygenu Ki-67 w komórkach nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego (NMIBC): <5% (A), 6-25% (B), 26-50% (C), >50% (D)*

Ekspresję CD31 oraz CD34 w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych zlokalizowanych w podścielisku nowotworowym zobrazowano na *Rycinie 9*.



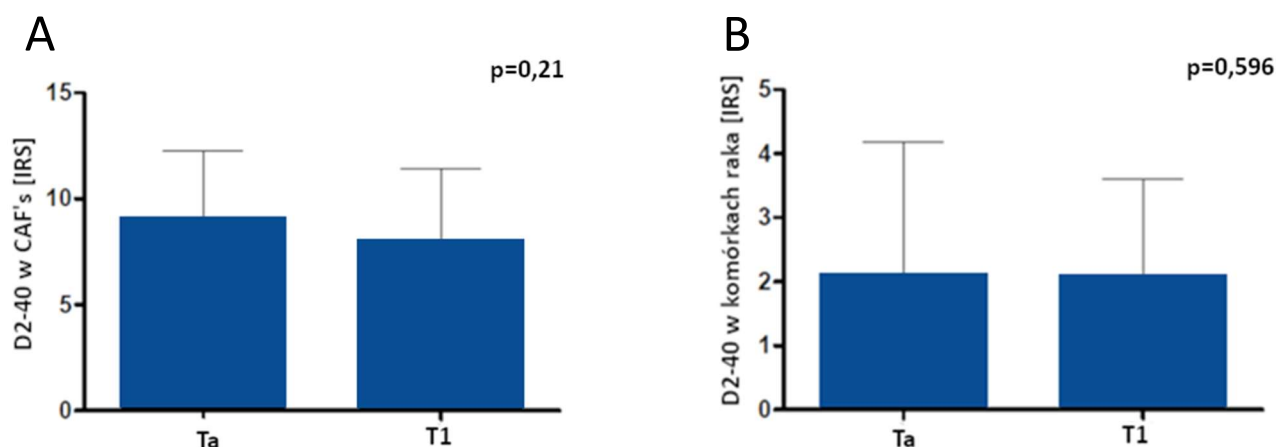
*Rycina 9. Przykładowa ekspresja markerów neo- i angiogenezy, CD31 (A) oraz CD34 (B) w nieinwazyjnym urotelialnym raku pęcherza moczowego (NMIBC)*

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji podoplaniny zarówno pomiędzy kontrolą, a ekspresją podoplaniny w CAF's ( $p=0,291$ ), jak również pomiędzy kontrolą, a ekspresją D2-40 w komórkach nowotworowych ( $p=0,505$ ). (Rycina 10)



**Rycina 10. Porównanie poziomu ekspresji (IHC) podoplaniny (D2-40) w kontroli (prawidłowych fibroblastach) względem ekspresji w CAF' ( $p=0,505$ ) (A) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,291$ ) (B)**

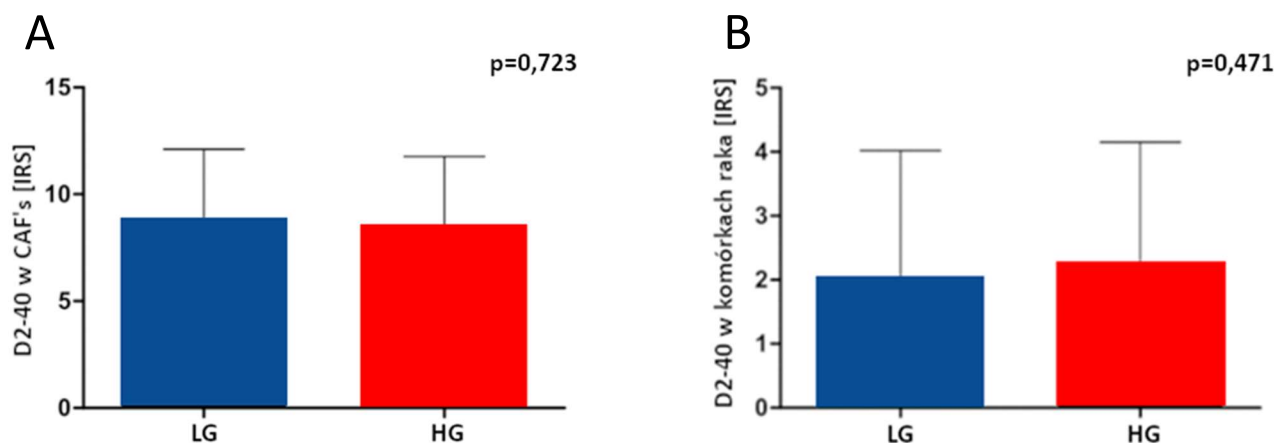
Nie wykazano różnic w poziomie ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,21$ ) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,596$ ) w zależności od stopnia zaawansowania miejscowego ocenianego wg klasyfikacji TNM. (Rycina 11)



**Rycina 11. Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,21$ ) (A) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,596$ ) (B) w zależności od stopnia zaawansowania miejscowego raka nieinwazyjnego (NMIBC)**

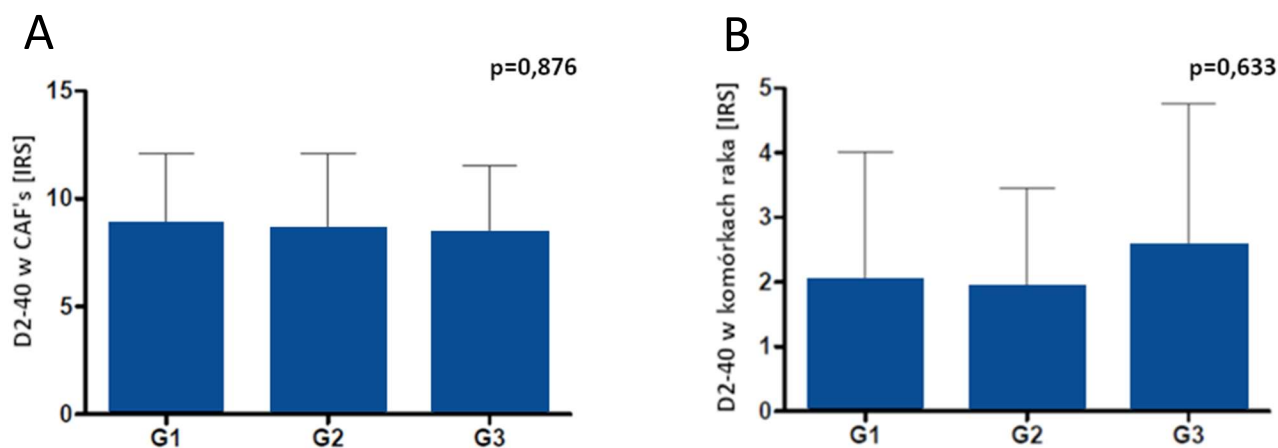


Nie stwierdzono różnic w poziomie ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,723$ ) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,471$ ) w zależności od stopnia złośliwości histologicznej ocenianej według skali WHO z 2004/2022 roku. (*Rycina 12*)



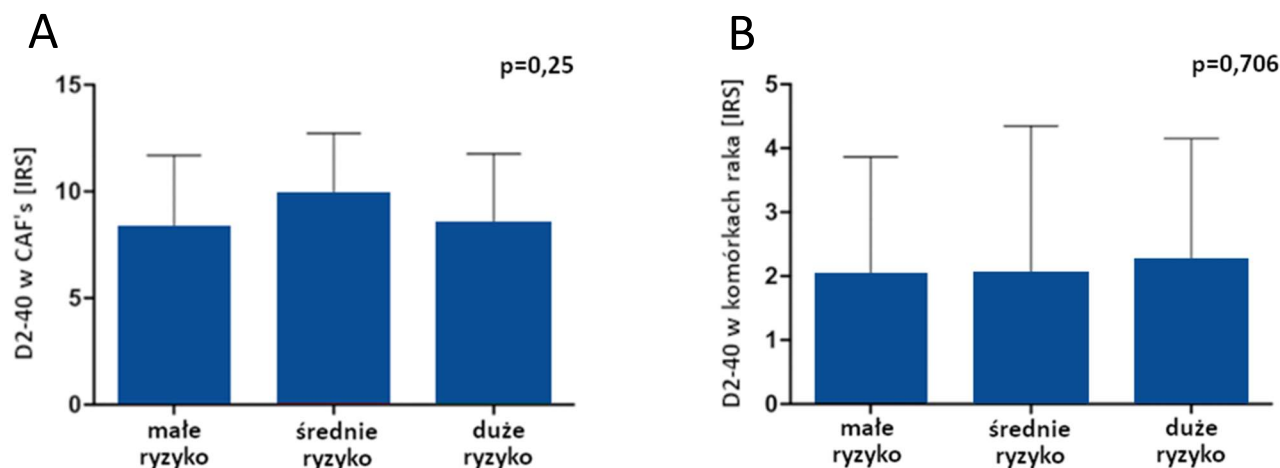
*Rycina 12 Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,723$ ) (A) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,471$ ) (B) w zależności od stopnia złośliwości histologicznej ocenianej według skali WHO z 2004/2022 roku*

Nie wykazano różnic w poziomie ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,876$ ) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,633$ ) w zależności od stopnia złośliwości histologicznej ocenianej według skali WHO z 1973 roku. (*Rycina 13*)



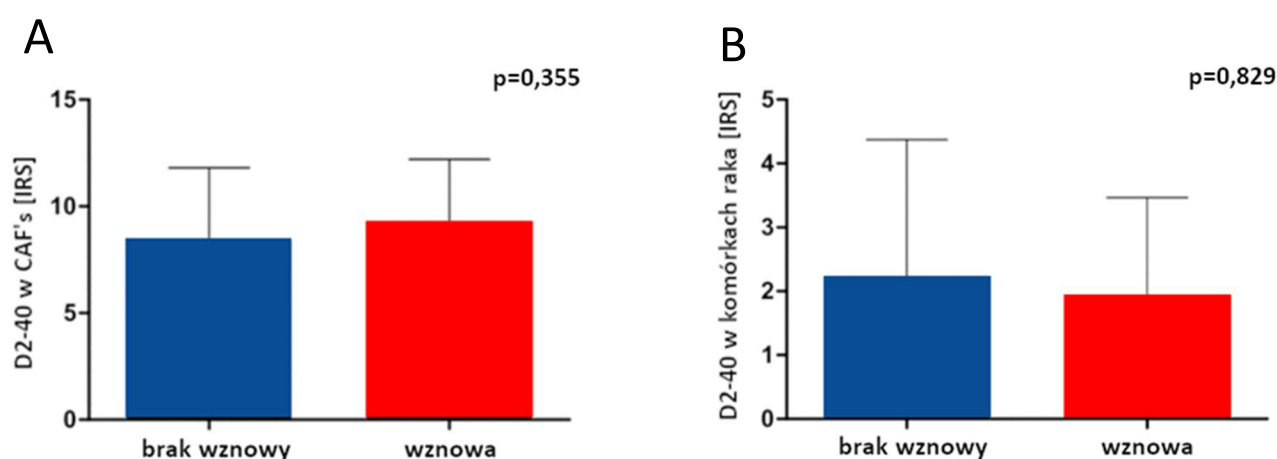
*Rycina 13. Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,876$ ) (A) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,633$ ) (B) w zależności od stopnia złośliwości histologicznej ocenianej według skali WHO z 1973 roku*

Nie stwierdzono różnic w poziomie ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,25$ ) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,706$ ) w zależności od grupy prognostycznej ryzyka progresji nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego w skali opracowanej przez Europejskie Towarzystwo Urologiczne. (*Rycina 14*)



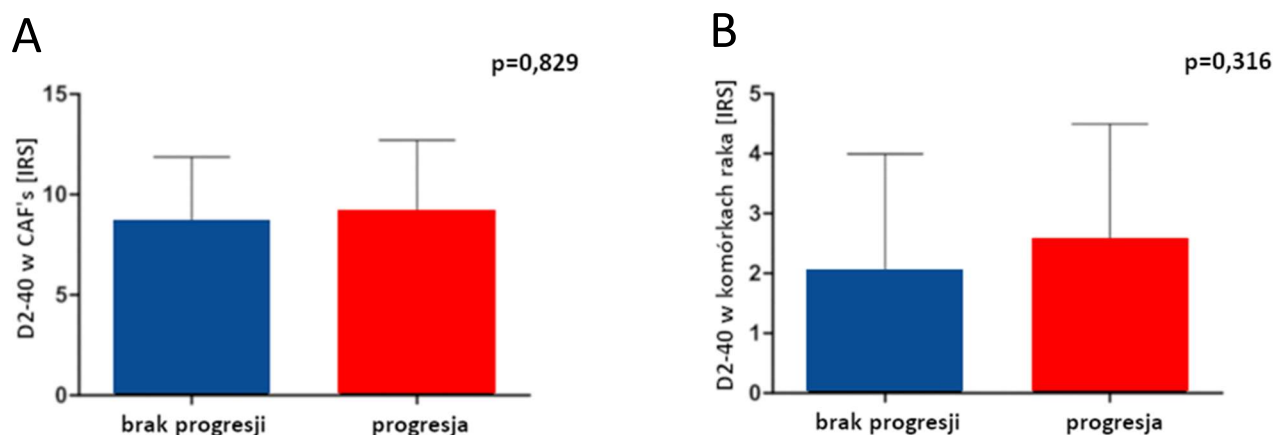
**Rycina 14.** Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,25$ ) (A) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,706$ ) (B) w zależności od grupy prognostycznej ryzyka progresji nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego wg Europejskiego Towarzystwa Urologicznego

Nie wykazano różnic w poziomie ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,355$ ) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,829$ ) u pacjentów u których doszło do wznowy procesu nowotworowego w porównaniu do pacjentów wolnych od nawrotu choroby. (*Rycina 15*)



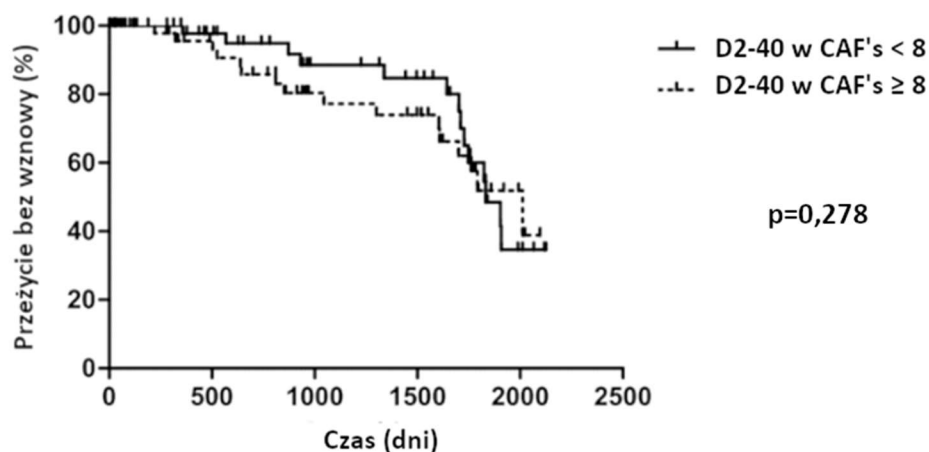
**Rycina 15.** Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,355$ ) (A) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,829$ ) (B) w zależności od ryzyka wznowy procesu nowotworowego

Nie stwierdzono różnic w poziomie ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,829$ ) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,316$ ) u pacjentów u których doszło do progresji procesu nowotworowego w porównaniu do pacjentów, u których do takiej progresji nie doszło. (*Rycina 16*)



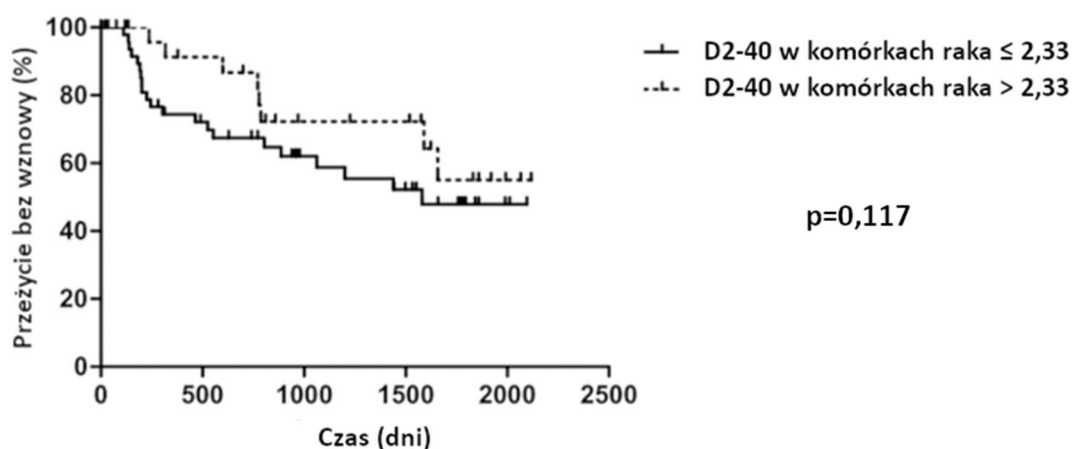
*Rycina 16. Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,829$ ) (A) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,316$ ) (B) w zależności od ryzyka progresji procesu nowotworowego*

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w przeżyciach wolnych od wznowy (RFS) ( $p=0,278$ ) pomiędzy pacjentami, u których ekspresja podoplaniny (D2-40) w CAF's w skali IRS była niższa niż 8 (mediana), w porównaniu do pacjentów, u których ta ekspresja była wyższa lub równa 8. (*Rycina 17*)



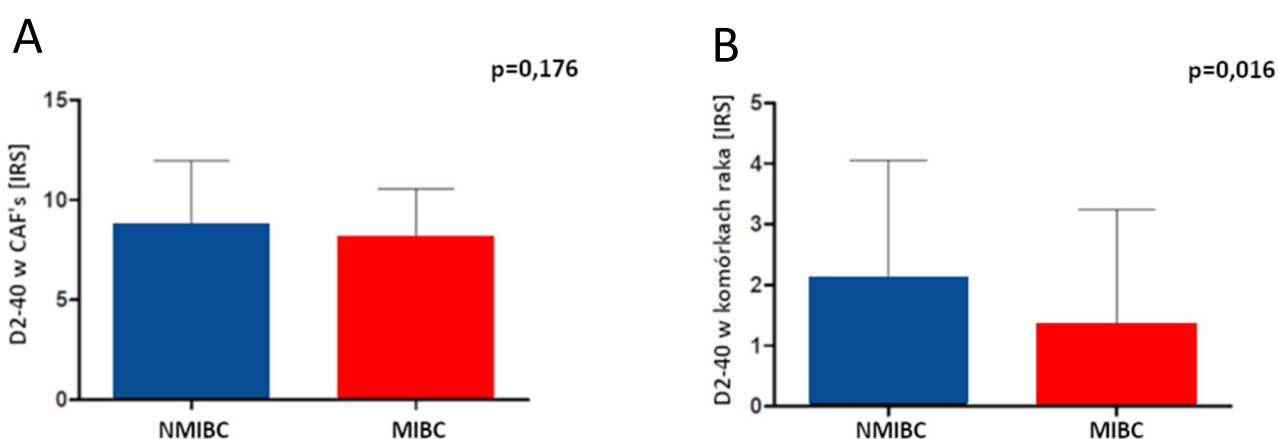
*Rycina 17. Krzywa przeżyć Kaplana-Meiera. Brak istotnych różnic w czasie przeżyć wolnych od wznowy (RFS) w zależności od poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,278$ )*

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w przeżyciach wolnych od wznowy (RFS) ( $p=0,117$ ) pomiędzy pacjentami, u których ekspresja podoplaniny (D2-40) w komórkach raka pęcherza moczowego w skali IRS była większa od 2,33 (mediana), w porównaniu do pacjentów, u których ta ekspresja była niższa lub równa 2,33. (*Rycina 18*)



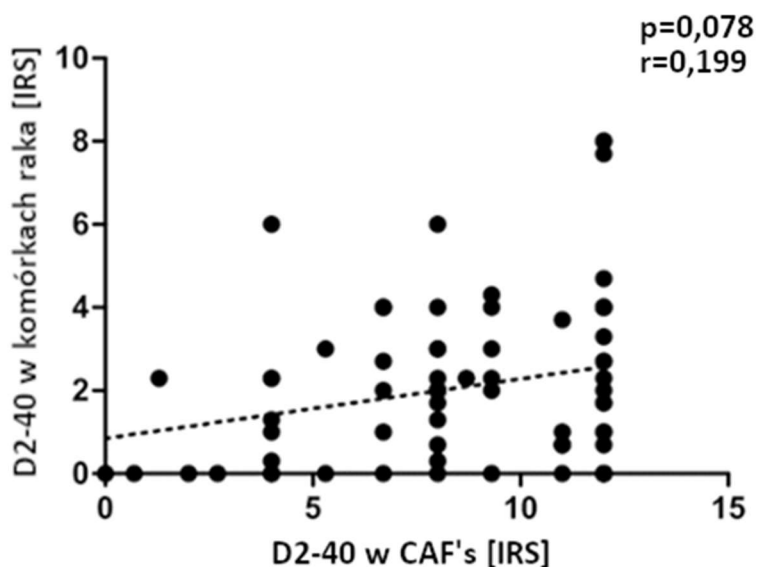
*Rycina 18. Krzywa przeżyć Kaplana-Meiera. Brak istotnych różnic w czasie przeżyć wolnych od wznowy (RFS) w zależności od poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach nowotworowych ( $p=0,117$ )*

Wykazano, że poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach nowotworowych u pacjentów z nieinwazyjnym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego (NMIBC) był istotnie statystycznie wyższy niż u pacjentów z rakiem inwazyjnym (MIBC) ( $p=0,016$ ). Brak istotnej różnicy w poziomie ekspresji podoplaniny w CAF's w przypadkach NMIBC w porównaniu z MIBC ( $p=0,176$ ). (*Rycina 19*)



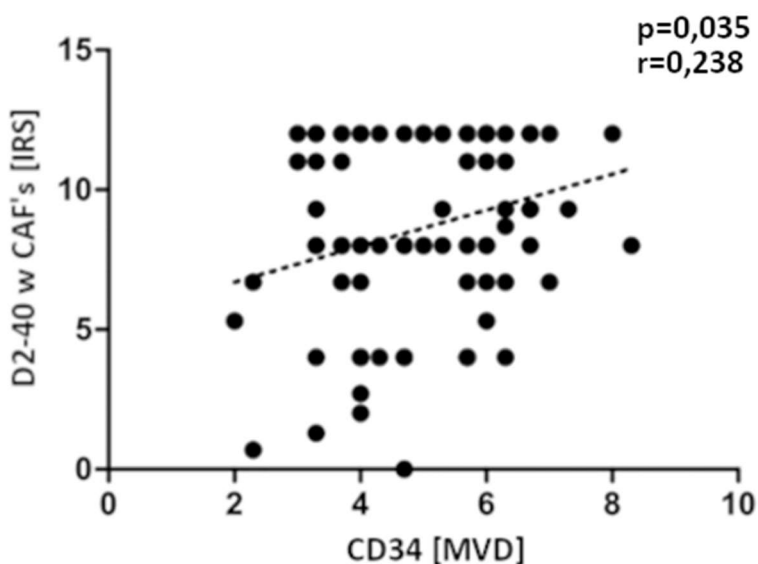
*Rycina 19. Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's ( $p=0,176$ ) (A) oraz w komórkach nowotworowych ( $p=0,016$ ) (B) w raku pęcherza moczowego nieinwazyjnym (NMIBC) oraz inwazyjnym (MIBC).*

Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach raka urotelialnego a poziomem ekspresji podoplaniny w CAF's ( $p=0,078$ ). (*Rycina 20*)



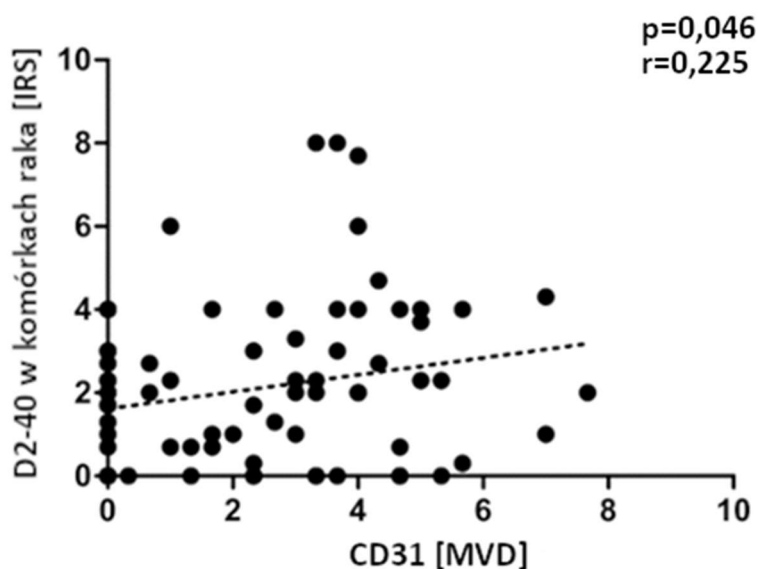
*Rycina 20. Korelacja poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach raka urotelialnego z poziomem ekspresji podoplaniny w CAF's ( $p=0,078$ ;  $r=0,199$ )*

Wykazano istotną statystycznie słabą dodatnią korelację pomiędzy poziomem ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's a gęstością mikronaczyń wykazujących ekspresję CD34 ( $p=0,035$ ;  $r=0,238$ ). (*Rycina 21*)



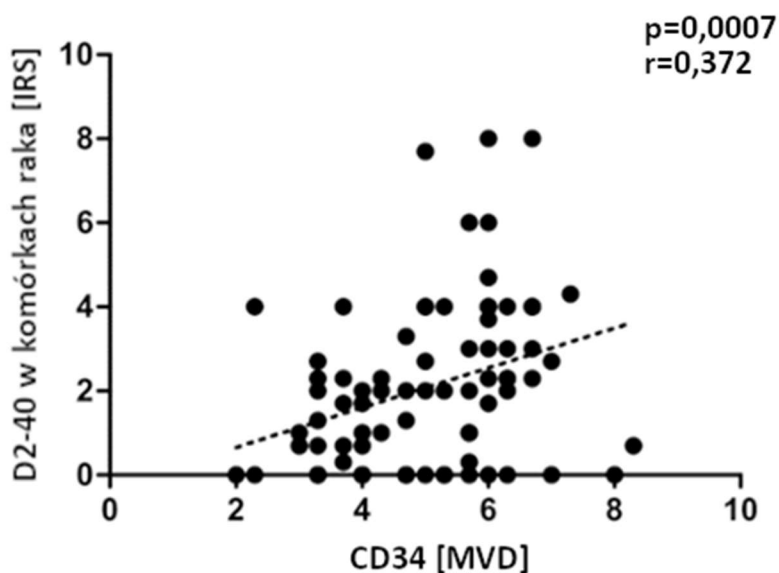
*Rycina 21. Korelacja poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's z gęstością mikronaczyń wykazujących ekspresję CD34 ( $p=0,035$ ;  $r=0,238$ )*

Stwierdzono istotną statystycznie słabą dodatnią korelację pomiędzy poziomem ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach raka urotelialnego pęcherza moczowego z gęstością mikronaczyń wykazujących ekspresję CD31 ( $p=0,046$ ;  $r=0,225$ ). (Rycina 22)



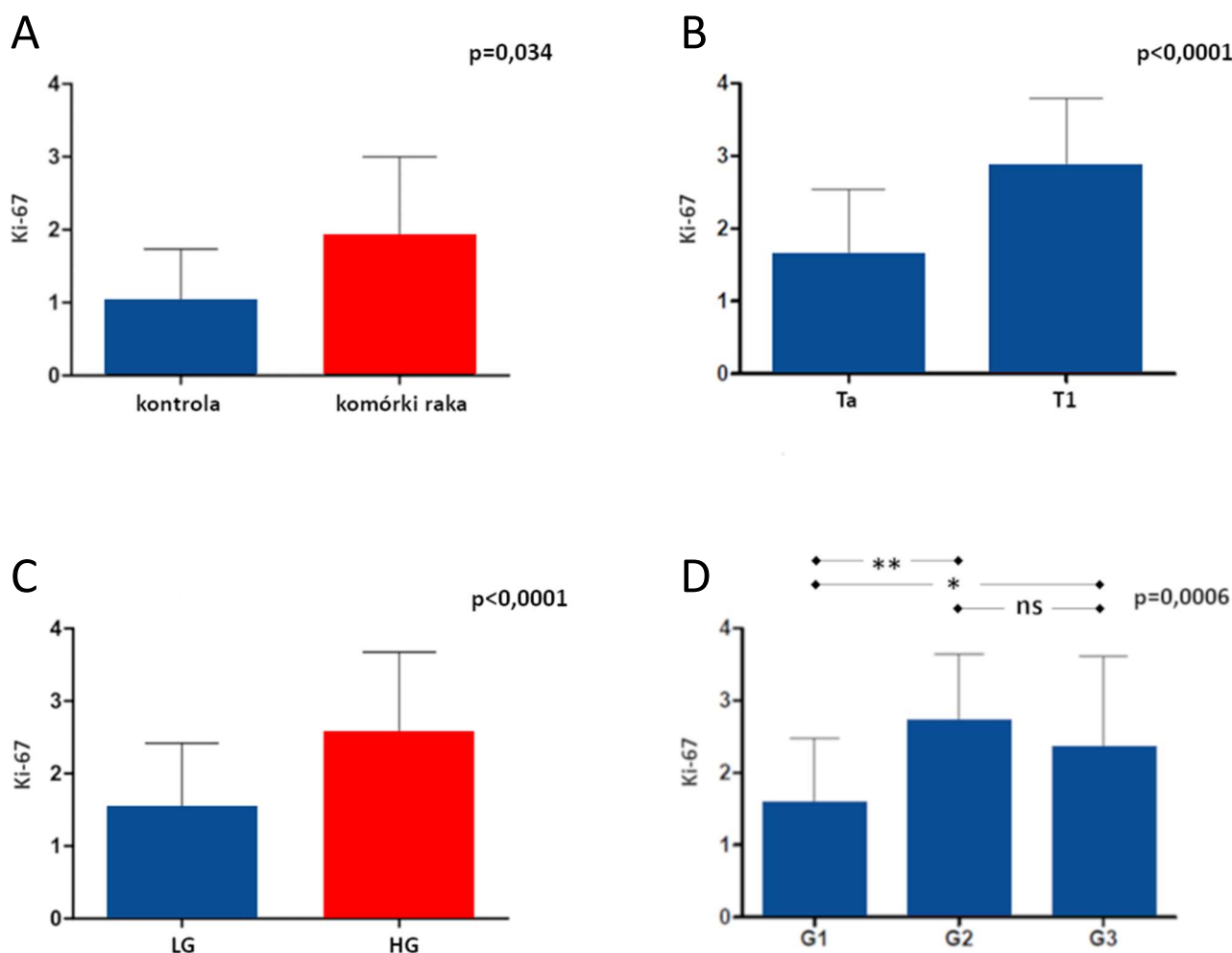
*Rycina 22. Korelacja poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach raka urotelialnego pęcherza moczowego z gęstością mikronaczyń wykazujących ekspresję CD31 ( $p=0,046$ ;  $r=0,225$ )*

Wykazano istotną statystycznie średnią dodatnią korelację pomiędzy poziomem ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach nowotworowych a gęstością mikronaczyń wykazujących ekspresję CD34 ( $p=0,0007$ ;  $r=0,372$ ). (Rycina 23)



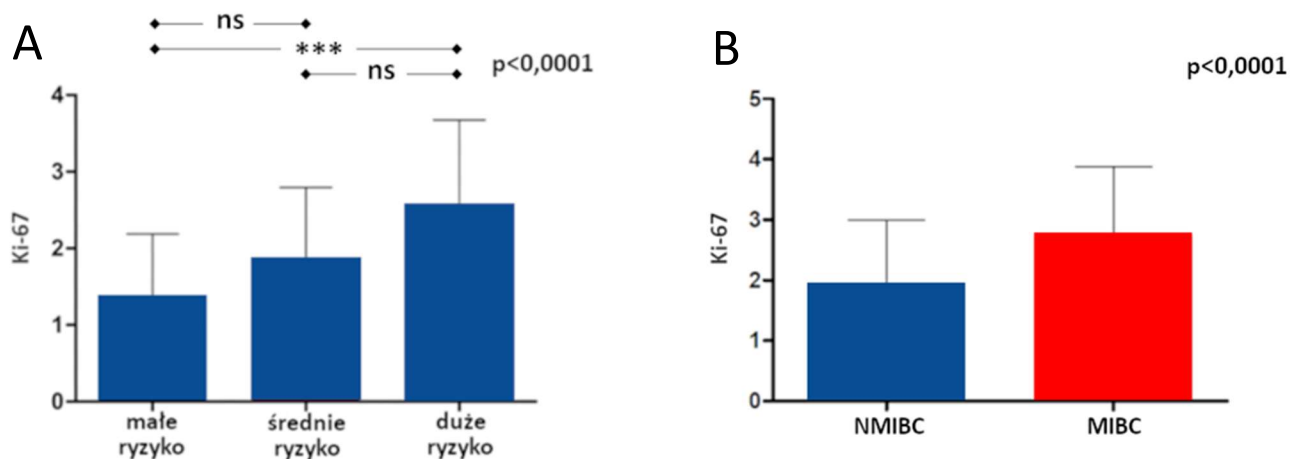
*Rycina 23. Korelacja poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach nowotworowych z gęstością mikronaczyń wykazujących ekspresję CD34 ( $p=0,0007$ ;  $r=0,372$ )*

Stwierdzono, że poziom ekspresji Ki-67 w komórkach nowotworowych był istotnie statystycznie wyższy niż w prawidłowych komórkach urotelialnych ( $p=0,034$ ). Ekspresja Ki-67 była również wyższa w guzach w stopniu zaawansowania miejscowego T1 w porównaniu do stopnia Ta ( $p<0,0001$ ). Podobnie, poziom ekspresji Ki-67 w guzach HG był wyższy niż w guzach LG ( $p<0,0001$ ). Biorąc pod uwagę skalę WHO z 1973 roku przełożyło się to istotnie statystycznie niższą ekspresję Ki-67 w guzach G1 w porównaniu do guzów G2 (\*\*) oraz guzów G3 (\*). Nie zaobserwowano natomiast różnic pomiędzy guzami G2 oraz G3. (*Rycina 24*)



**Rycina 24. Porównanie poziomu ekspresji Ki-67 w komórkach nowotworowych: względem kontroli ( $p=0,034$ ) (A), w zależności od stopień zaawansowania miejscowego raka pęcherza moczowego ( $p<0,0001$ ) (B), względem stopienia złośliwości histologicznej wg. WHO z 2004/2022 roku ( $p<0,0001$ ) (C), oraz względem stopienia złośliwości histologicznej wg. WHO z 1973 roku ( $p=0,0006$ ) (D)**

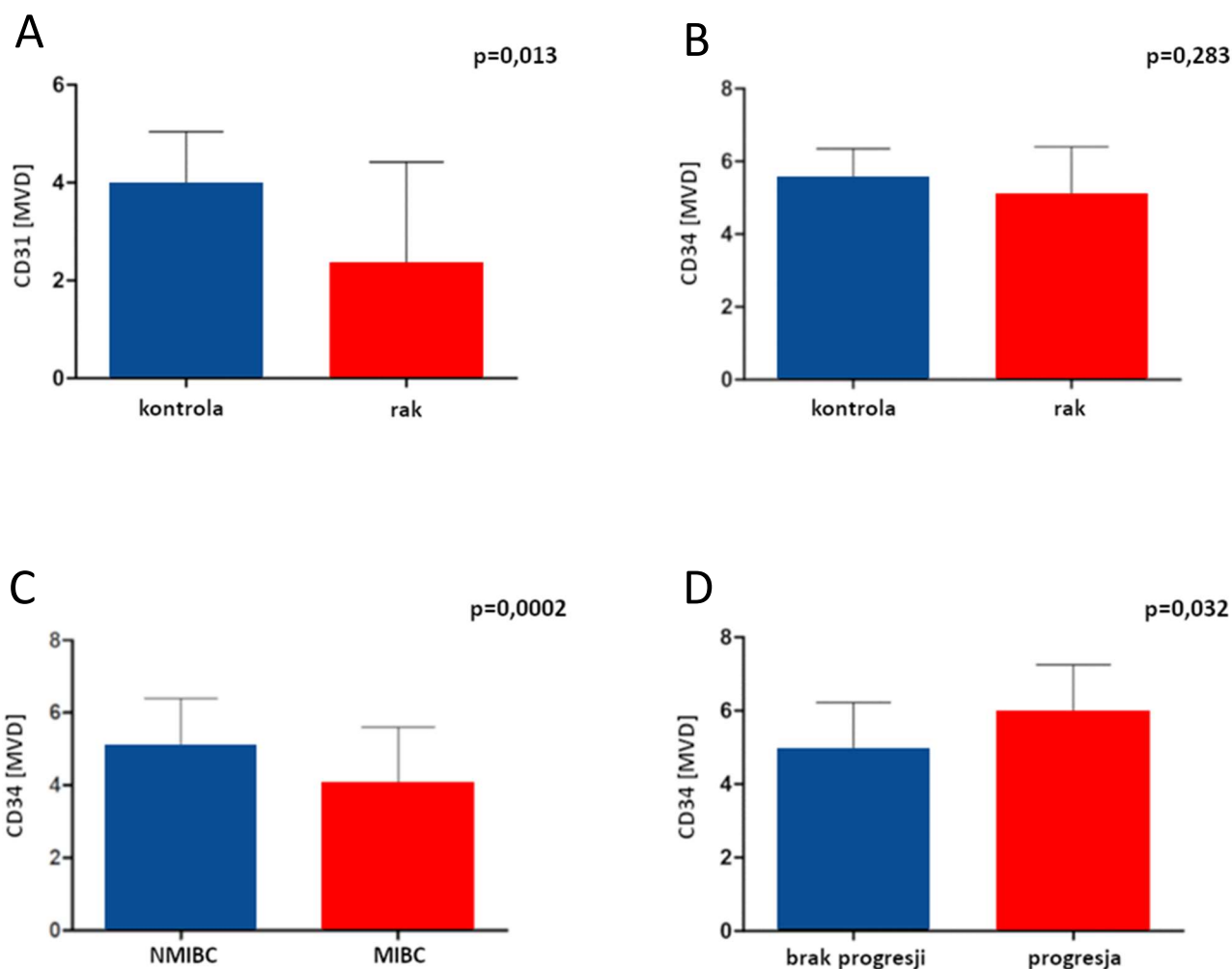
Wykazano, że poziom ekspresji Ki-67 był istotnie statystycznie niższy w grupie pacjentów niskiego ryzyka nawrotu i progresji raka urotelialnego pęcherza moczowego w porównaniu do grupy wysokiego ryzyka (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ). Ekspresja Ki-67 była również wyższa w grupie pacjentów z rakiem naciekającym błonę mięśniową właściwą ściany (MIBC) w porównaniu do pacjentów z rakiem nienaciekającym (NMIBC) ( $p < 0,0001$ ). (Rycina 25)



**Rycina 25. Porównanie poziomu ekspresji Ki-67: w różnych grupach prognostycznych raka nieinwazyjnego (NMIBC) według Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (\*\*\*)  $p < 0,0001$  (A), w nieinwazyjnym (NMIBC) oraz inwazyjnym (MIBC) raku pęcherza moczowego ( $p < 0,0001$ )(B)**

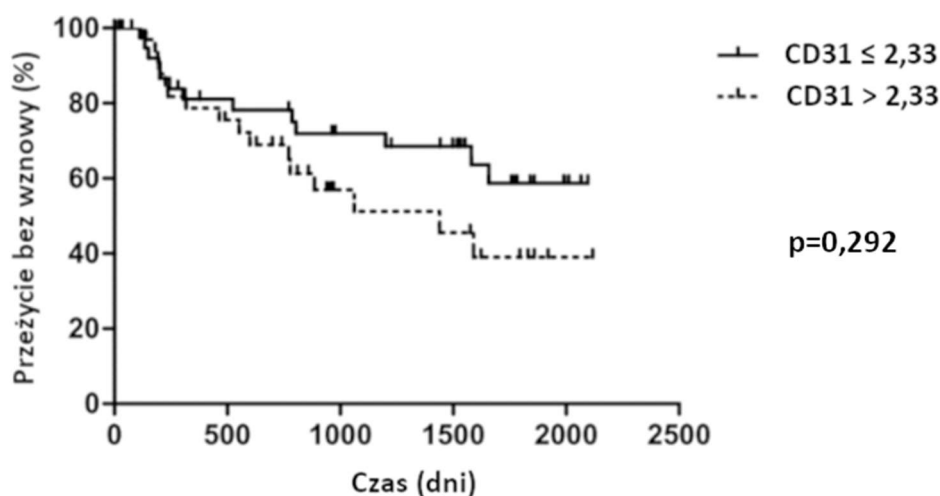


Stwierdzono, że gęstość mikronaczyń wykazujących ekspresję CD31 w tkance raka urotelialnego była istotnie statystycznie niższa niż w ścianie prawidłowego pęcherza moczowego ( $p=0,013$ ). Zależności takiej nie wykazano w przypadku gęstości mikronaczyń wykazujących ekspresję CD34. Stwierdzono jednak, że wyższa gęstość mikronaczyń wykazujących ekspresję CD34 związana była z rakiem NMIBC w porównaniu do raka MIBC ( $p=0,0002$ ) oraz z wyższym ryzykiem progresji procesu nowotworowego. (Rycina 26)



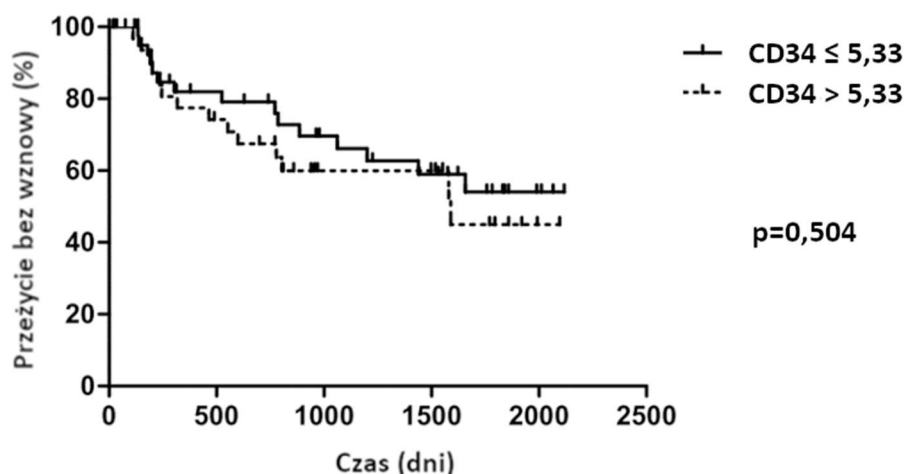
**Rycina 26. Gęstość mikronaczyń (MVD) oparta na ocenie ekspresji CD31 w komórkach nowotworowych i komórkach prawidłowych ( $p=0,013$ ) (A), MVD oparta na ocenie ekspresji CD34 w komórkach nowotworowych i komórkach prawidłowych ( $p=0,283$ ) (B), MVD oparta na ocenie ekspresji CD34 w raku pęcherza moczowego nieinwazyjnym (NMIBC) oraz inwazyjnym (MIBC) ( $p=0,0002$ ) (C), MVD oparta na ocenie ekspresji CD34 względem ryzyka progresji procesu nowotworowego ( $p=0,032$ ) (D).**

Nie wykazano istotnego statystycznie związku gęstości mikronaczyń wykazujących ekspresję CD31 z czasem przeżycia wolnym od wznowy (RFS). Zauważalny był jednak wyraźny trend, w którym gęstość mikronaczyń (MVD) mniejsza lub równa 2,33 (mediana) związana była z dłuższym przeżyciem bez nawrotu raka urotelialnego pęcherza moczowego. (*Rycina 27*)



**Rycina 27. Krzywa przeżyć Kaplana-Meiera. Brak istotnych różnic w czasie przeżyć wolnych od wznowy (RFS) w zależności od gęstości mikronaczyń (MVD) ocenionej na podstawie ekspresji CD31 w komórkach śródbłonna ( $p=0,292$ )**

Nie wykazano istotnego statystycznie związku gęstości mikronaczyń wykazujących ekspresję CD34 z czasem przeżycia wolnym od wznowy (RFS). Zauważalny był jednak niewielki trend, w którym gęstość mikronaczyń (MVD) mniejsza lub równa 5,33 (mediana) związana była z dłuższym przeżyciem bez nawrotu raka urotelialnego pęcherza moczowego. (*Rycina 28*)



**Rycina 28 Krzywa przeżyć Kaplana-Meiera. Brak istotnych różnic w czasie przeżyć wolnych od wznowy (RFS) w zależności od gęstości mikronaczyń (MVD) ocenionej na podstawie ekspresji CD34 w komórkach śródbłonna ( $p=0,504$ )**

## 6 DYSKUSJA

W wielu badaniach wykazano, że ekspresja podoplaniny (D2-40), traktowanej początkowo jedynie jako marker limfangiogenezy, występuje w różnych typach nowotworów. Lokalizacja tkankowa białka D2-40 jest zróżnicowana, gdyż występuje ono zarówno w komórkach nowotworowych, jak i w fibroblastach podścieliska nowotworowego (CAF's). Jak dotąd opisano ekspresję podoplaniny w nowotworach, takich jak: guzy zarodkowe jądra, rak płaskonabłonkowy jamy ustnej, niedrobnokomórkowy rak płuc, rak trzustki, rak płaskonabłonkowy przełyku czy rak krtani (119). Wykazano, że rokownicze znaczenie ekspresji podoplaniny jest różne, w zależności od typu nowotworu (164–167). Wysoka ekspresja podoplaniny w CAF's w raku piersi, trzustki, przełyku, gruczolakoraku płuc i czerniaka związana jest z gorszym rokowaniem, podczas gdy w gruczolakoraku jelita grubego oraz w raku szyjki macicy, guzy wykazujące ekspresję podoplaniny w CAF's charakteryzują się mniejszą tendencją do tworzenia zmian przerzutowych (127,129–131,133,137).

Dotychczasowe dane literaturowe dotyczące ekspresji D2-40 w raku pęcherza moczowego są niespójne. Z jednej strony Satoshi *et al.* wykazał, iż blisko połowa spośród 135 badanych pacjentów z rakiem urotelialnym pęcherza moczowego wykazywała ekspresję podoplaniny w komórkach nowotworowych (114). Z drugiej zaś strony Okajima *et al.* w badaniu obejmującym grupę pacjentów z inwazyjnym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego (MIBC;  $\geq T2$ ) poddanych radykalnemu leczeniu operacyjnemu nie stwierdził obecności ekspresji D2-40 w komórkach nowotworowych (168). Tymczasem, w badanej przez nas grupie pacjentów z pierwotnym nieinwazyjnym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego (NMIBC) odnotowano ekspresję tego markera w komórkach nowotworowych w przypadku 74,7% pacjentów. W kontekście badanego podścieliska, w badaniu zespołu Kitano *et al.* oceniającego ekspresję podoplaniny w kilkunastu różnych nowotworach, stwierdzono ekspresję D2-40 w 52% CAF's raka pęcherza moczowego, podczas gdy w naszym badaniu zaobserwowano ekspresję tego białka u wszystkich badanych pacjentów (128). Wydaje się, że różnice te mogą wynikać z różnic w zastosowanej preparatyce i sposobie barwienia immunohistochemicznego oraz z zupełnie innego profilu badanych pacjentów. W badaniu Okajimy *et al.* badano jedynie pacjentów z rakiem inwazyjnym, natomiast w badaniu Kitano *et al.* guzy nieinwazyjne stanowiły jedynie 38% (11 z 29) wszystkich badanych przypadków raka pęcherza moczowego (128,168).

Podoplanina jest uznanym markerem komórek endotelialnych naczyń limfatycznych, a przez to markerem procesu limfangiogenezy (169). Ma to szczególne znaczenie biorąc pod uwagę fakt, iż stwierdzenie limfangioinwazji (LVI; ang. *lymphangioinvasion*) w wycinkach raka pęcherza moczowego uzyskanych podczas zabiegu TURBT związane jest z większym ryzykiem progresji nowotworu oraz gorszym rokowaniem (170). Dlatego wiarygodne rozpoznanie obecności LVI wydaje się istotne w kontekście dalszej, pozabiegowej obserwacji pacjenta. W badaniu Martini *et al.* zauważono, że wzbogacenie standardowej oceny wyników raka pęcherza moczowego po zabiegu radykalnej

cystektomii o ekspresję podoplaniny (D2-40) w komórkach endotelialnych naczyń limfatycznych, pozwalało na rozpoznanie LVI u dodatkowych 5% pacjentów z fałszywie ujemnym wynikiem badania opartego na rutynowym barwieniu HE (hemotaoksylina i eozyna) (171). W naszym badaniu obecność naczyń limfatycznych wykazujących ekspresję podoplaniny stwierdzono jedynie u 10,1% pacjentów (8 z 79). Wynika to w przeważającej mierze z zupełnie innej histologii raka nieinwazyjnego (NMIBC) oraz raka inwazyjnego (MIBC) oraz z różnej ilości materiału tkankowego jakim dysponuje histopatolog po zabiegu TURBT w porównaniu do zabiegu radykalnego usunięcia pęcherza moczowego. Dodatkowo, ilość podścieliska nowotworowego w guzach NMIBC (które charakteryzuje brodawkowato rozgałęziający się cienki włóknisto-naczyniowy rdzeń pokryty komórkami raka urotelialnego) jest dużo mniejsza niż ilość zrębu w guzach MIBC, w których to naczynia limfatyczne wykazujące ekspresję podoplaniny (D2-40) stwierdzono u 55,2% pacjentów (141). W badaniu Bolenz *et al.* z 2013 roku oceniającym materiał tkankowy uzyskany po zabiegu TURBT, obecność naczyń limfatycznych w tkance guza NMIBC stwierdzono w 80% przypadków, a w tkance okołonowotworowej u 90% badanych pacjentów. Naczynia limfatyczne wewnątrz guza zwykle były zapadnięte, podczas gdy naczynia położone obwodowo wykazywały światło szeroko otwarte (172). Różnicę w odsetku stwierdzonych naczyń limfatycznych w preparacie tkankowym w naszym badaniu może tłumaczyć fakt pobierania wycinków jedynie z powierzchniowych fragmentów brodawkowatych guzów. Ocenę histologiczną i molekularną tkanek uzyskiwanych podczas przezcewkowej elektroresekcji guza może zaburzać stosowany w trakcie zabiegu prąd elektryczny oraz znaczna fragmentacja tkanek, dlatego wdrażane stopniowo laserowe techniki enukleacyjne guzów pęcherza dają nadzieję na dysponowanie w przyszłości zdecydowanie lepszym materiałem badawczym (173).

Prognostyczną rolę CAF's w inwazyjnym raku urotelialnym pęcherza moczowego (MIBC) potwierdzają wyniki wielu dotychczasowych badań. Wykazano, że w inwazyjnym urotelialnym raku pęcherza moczowego (MIBC) w porównaniu do raka nieinwazyjnego (NMIBC) dochodzi do większej deregulacji CAF's, co wskazuje na ich potencjalną rolę w procesie inwazji nowotworowej oraz tworzeniu ognisk przerzutowych (100). W innym badaniu stwierdzono, że guzy MIBC z dużą ilością komórek wykazujących ekspresję podoplaniny w obrębie podścieliska nowotworowego związane były z krótszym czasem przeżycia pacjentów wolnego od wznowy oraz krótszym czasem przeżycia całkowitego (141). Na gorsze rokowanie u tych chorych wpływ mają przede wszystkim związki wydzielane przez CAF's, takie jak metaloproteinazy (MMPs). Wykazano między innymi, że zwiększona ekspresja metaloproteinaz związana jest z większym ryzykiem progresji raka urotelialnego pęcherza moczowego oraz powstawaniem zmian przerzutowych (101).

Nieinwazyjny rak urotelialny pęcherza moczowego (NMIBC) różni się diametralnie od raka inwazyjnego (MIBC) tym, że w tym pierwszym ciągle możliwe jest leczenie oszczędzające pęcherz moczowy, jednak kosztem ścisłego nadzoru onkologicznego w postaci okresowo wykonywanych badań cytologicznych moczu, cystoskopii, badań uro-TK, kwalifikacji do BCG-immunoterapii dopęcherzowej

oraz ponownych zabiegów TURBT w przypadku nawrotu procesu nowotworowego (7). Dlatego też leczenie raka NMIBC generuje największe koszty w leczeniu raka pęcherza moczowego. Dodatkowo, ze względu na to, że cystoskopia jest badaniem inwazyjnym, a badanie cytologiczne moczu obarczone jest niską czułością w guzach o niskim stopniu złośliwości histologicznej (LG), nadal poszukiwane są nowe markery diagnostyczne i prognostyczne w tym nowotworze. Na chwilę obecną nie ma jednak wystarczających dowodów na to, żeby postępowanie w raku pęcherza moczowego uzależniać od wyników dostępnych obecnie nowych markerów (6,7).

Obecnie nadal brakuje informacji odnośnie ekspresji podoplaniny w nieinwazyjnym raku pęcherza moczowego (NMIBC) w kontekście ryzyka wznowy procesy nowotworowego oraz jego progresji do raka inwazyjnego (MIBC). To skłoniło mnie o prospektywnej obserwacji pacjentów z pierwotnym guzem pęcherza moczowego poddanych zabiegowi przezcewkowej elektroresekcji (TURBT).

Nawroty guzów pęcherza moczowego oraz genezę mnogich ognisk raka urotelialnego w układzie moczowym starają się wyjaśnić dwie hipotezy. Zgodnie z pierwszą z nich, teorią „pojedynczej komórki progenitorowej” (ang. „*single progenitor cell*” hypothesis), wieloogniskowość raka pęcherza moczowego jest efektem wysiewania lub śródnabłonkowego rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych. Drugą koncepcją jest tzw. hipoteza „defektu pola” (ang. „*field defect*” hypothesis), według której komórki nabłonka dróg moczowych są przygotowane do przejścia transformacji nowotworowej w wyniku wcześniejszego działania czynników prokarcynogennych (174,175). Szacuje się, że ryzyko ponownego nawrotu guza zależy od wielu czynników, takich jak wiek i płeć pacjenta, od wielkości guza pierwotnego, liczby ognisk nowotworowych, współistnienia raka śródnabłonkowego (ang. *carcinoma in-situ*; Cis), wyjściowego stopnia zaawansowania oraz stopnia złośliwości histologicznej (7). Około 50-70% guzów NMIBC nawraca w ciągu 5 lat (176). W moim badaniu poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) zarówno w komórkach nowotworowych jak i w CAF's nie był związany z ryzykiem wystąpienia wznowy raka pęcherza moczowego, która wystąpiła ostatecznie u 63,3% pacjentów. Natomiast CAF's wykazujące niską ekspresję podoplaniny oraz komórki nowotworowe z wysoką ekspresją podoplaniny były związane z dłuższym czasem przeżycia wolnego od wznowy, ale trend ten nie osiągnął istotności statystycznej.

Ryzyko progresji nieinwazyjnego raka pęcherza moczowego (NMIBC) do raka inwazyjnego (MIBC), podobnie jak ryzyko nawrotu, uzależnione jest od licznych czynników. Z tego też powodu powstały grupy prognostyczne niskiego, pośredniego i wysokiego ryzyka (7). W zależności od grupy prognostycznej 5-letnie ryzyko progresji raka NMIBC do raka o wyższym stopniu zaawansowania miejscowego lub do raka o wyższym stopniu złośliwości histologicznej wynosi od 0,93% do 9,6%. 40% jeśli wyodrębni się grupę bardzo wysokiego ryzyka, do której zalicza się guzy T1HG+Cis wraz z dodatkowymi czynnikami ryzyka tzn. wiek pacjenta >70 lat, mnogi guz pierwotny i/lub guz o średnicy >3cm.(40) W moim badaniu progresję raka NMIBC stwierdzono u 14% pacjentów. Nie

zaobserwowałem natomiast, żeby ekspresja podoplaniny (D2-40) w komórkach nowotworowych jak i w CAF's była związana z ryzykiem progresji raka pęcherza moczowego.

W moim badaniu nie wykazałem również, aby ekspresja podoplaniny (D2-40) w komórkach nowotworowych oraz w CAF's istotnie różniła się od jej ekspresji w grupie kontrolnej, od stopnia zaawansowania miejscowego pT1/Ta, od stopnia złośliwości histologicznej wg WHO z 2004/2022 roku, od stopnia złośliwości histologicznej wg WHO z 1973 roku oraz od grupy prognostycznej wg Europejskiego Towarzystwa Urologicznego. Podobne wyniki uzyskano w badaniu Takagi *et. al.*, w którym nie stwierdzono istotnej różnicy w ekspresji podoplaniny w komórkach raka pęcherza moczowego o stopniu złośliwości G1-G3, jednak zauważono istotnie wyższą jej ekspresję w ogniskach przerzutowych (114). W innym badaniu ekspresję podoplaniny w komórkach nowotworowych guzów MIBC stwierdzono w 17,2% przypadkach, spośród których wszystkie wykazywały stopień złośliwości G3 (141).

Stwierdzono również, że ekspresja podoplaniny w komórkach nowotworowych była istotnie statystycznie wyższa w inwazyjnym raku pęcherza moczowego (MIBC) u pacjentów po radykalnym usunięciu pęcherza moczowego w porównaniu do komórek nowotworowych raka nieinwazyjnego (NMIBC) pacjentów po zabiegu TURBT. Zależności takiej nie zaobserwowano w przypadku ekspresji podoplaniny w CAF's. Wykazano również, że wraz ze wzrostem ekspresji podoplaniny w CAF's wzrastała ekspresja podoplaniny w komórkach nowotworowych, ale trend ten nie osiągnął jednak istotności statystycznej. Niejako potwierdzenie ma to w badaniu oceniającym ekspresję podoplaniny w CAF's licznych typów nowotworów, w tym również w raku pęcherza moczowego, w którym wykazano częstszą jej obecność wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania miejscowego – 26% w guzach T1 oraz 49% w guzach T2-T4 (134). W badaniu tym nie różnicowano nieinwazyjnego raka pęcherza na stopień Ta oraz T1.

Wykazano również słabą dodatnią korelację pomiędzy ekspresją podoplaniny w komórkach raka a gęstością mikronaczyń (MVD) ocenianą za pomocą ekspresji CD31 oraz CD34. Podobnie, słabą dodatnią korelację wykazała ekspresja podoplaniny w CAF's z MVD ocenianą na podstawie ekspresji CD34. Oceniając gęstość mikronaczyń (MVD) w wycinkach raka NMIBC, MVD oparta na ekspresji CD34 była niższa w tkance guza niż w zdrowej ścianie pęcherza moczowego w przeciwieństwie do MVD opartej na ekspresji CD31, gdzie takiej zależności nie zaobserwowano. Natomiast MVD oparta na ocenie gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD34 była wyższa u pacjentów doświadczających progresji procesu nowotworowego oraz w raku inwazyjnym (MIBC) w porównaniu do raka nieinwazyjnego (NMIBC). Co prawda nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy MVD ocenianą za pomocą ekspresji CD31 oraz CD34, ale w obu przypadkach zauważalny był trend dłuższego przeżycia wolnego od wznowy procesu nowotworowego przy niższej gęstości mikronaczyń. Jest to zgodne z wynikami ostatnich badań, które wykazały, że CAF's mogą indukować proliferację komórek nowotworowych oraz stymulować neoangiogenezę, której markerami są właśnie CD31 oraz CD34

(143,177–179). W przypadku nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego (NMIBC) stwierdzono, że większa gęstość mikronaczyń (MVD) związana jest z większym ryzykiem progresji choroby nowotworowej, natomiast w raku inwazyjnym (MIBC) MVD jest niezależnym czynnikiem prognostycznym, związanym z krótszym przeżyciem wolnym od choroby (DFS) oraz krótszym przeżyciem całkowitym (OS) (160–162).

Oceniając ekspresję Ki-67, uznanego markera stopnia proliferacji komórek nowotworowych, stwierdzono jego wyższą ekspresję w komórkach nowotworowych niż komórkach prawidłowego nabłonka urotelialnego, w raku w stopniu zaawansowania miejscowego T1 w porównaniu do stopnia Ta, w raku w stopniu złośliwości histologicznej G2 i G3 w porównaniu do stopnia G1 oraz w raku w stopniu złośliwości histologicznej HG w porównaniu do stopnia LG. Dodatkowo, ekspresja Ki-67 była wyższa w grupie wysokiego ryzyka progresji wg Europejskiego Towarzystwa Urologicznego oraz w raku MIBC w porównaniu do raka NMIBC. Jest to zgodne z wynikami przeglądu systematycznego oraz metaanalizy z 2016 roku, w której wyższy poziom ekspresji Ki-67 w komórkach raka urotelialnego pęcherza moczowego związany był z wyższym stopniem złośliwości histologicznej nowotworu oraz większymi rozmiarami guza (180). W opozycji jednak do naszych wyników w badaniu tym zaobserwowano istotną statystycznie wyższą ekspresję Ki-67 u pacjentów z guzem w stadium Ta/T1 doświadczających wznowy procesu nowotworowego (180). Natomiast w badaniu He *et al.* takiego związku w guzach NMIBC nie zaobserwowano (181). Wykazano ponadto, wyższy poziom ekspresji tego markera w guzach w stadium T1 w porównaniu do guzów w stadium Ta, podczas gdy w moim badaniu trend ten nie osiągnął ostatecznie istotności statystycznej (180). W przeciwieństwie do moich wyników, w badaniu Warli *et al.* z 2018 roku nie wykazano różnic w ekspresji Ki-67 w pomiędzy rakiem nieinwazyjnym (NMIBC) a rakiem inwazyjnym (MIBC) (182). Może być to efekt zastosowania w tych badaniach innej skali oceny ekspresji Ki-67 w komórkach nowotworowych raka pęcherza moczowego.

Spośród czynników, które potencjalnie mogły mieć niekorzystny wpływ na ostateczne wyniki tej pracy, niewątpliwie najważniejszym jest to, że spośród 120 pacjentów zakwalifikowanych wstępnie do badania przed pierwotną przezcewkową elektroresekcją raka pęcherza (TURBT), kryteria włączenia i czas prospektywnej obserwacji spełniło ostatecznie 79 chorych (66%). Możliwe, że większa grupa badanych spowodowałaby, że trend dłuższego przeżycia wolnego od nawrotu choroby w zależności od poziomu ekspresji podoplaniny w komórkach nowotworowych oraz CAF's nabrałyby istotności statystycznej. Możliwe byłoby wtedy ewentualne szacowanie czasu wolnego od wznowy procesu nowotworowego, a to z kolei mogłoby mieć realny wpływ na zmniejszenie częstości badań wykonywanych u pacjentów z rakiem nieinwazyjnym (NMIBC). Wydaje się dodatkowo, że o ile materiał z guza pęcherza moczowego pobrany za pomocą biopsji kleszczykowej jest wystarczający do badań z zakresu biologii molekularnej, o tyle może być niewystarczający podczas oceny tkanki nowotworowej w badaniach immunohistochemicznych. Możliwe, że makroskopowo nieinwazyjne guzy pęcherza usuwane w całości (tzw. *en-block*) zapewniałyby lepszy jakościowo materiał badawczy z

jednoczesną obecnością całego brodawkowego guza, warstwą podśluzową i błoną mięśniową ściany pęcherza moczowego.

Otrzymane przeze mnie rezultaty niewątpliwie świadczą o pewnych trendach z wiązanych z nasileniem ekspresji podoplaniny zarówno w komórkach nowotworowych jak i w fibroblastach podścieliska nowotworowego (CAF's) raka urotelialnego pęcherza moczowego, w aspekcie wartości prognostycznej D2-40, a także w korelacji z danymi kliniczno-patologicznymi. Możliwe, że szerzej zakrojone badania na materiale tkankowym uzyskanym od większej liczby pacjentów oraz z zastosowaniem metod biologii molekularnej (qPCR, Western-blot, mikrodyssekcja laserowa i inne) mogłyby pozwolić na uzyskanie bardziej jednoznacznych wyników.



## 7 WNIOSKI

Przeprowadzone badania pozwalają na wysunięcie następujących wniosków:

1. Ocena poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach raka urotelialnego pęcherza moczowego może stanowić potencjalny marker różnicujący guzy naciekające błonę mięśniową ściany pęcherza moczowego (MIBC) od guzów nienaciekających (NMIBC), zwiększając tym samym ryzyko konieczności radykalnego usunięcia pęcherza moczowego.
2. Wysoki poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego (NMIBC) może być potencjalnym markerem dłuższego przeżycia wolnego od wznowy, ale celem potwierdzenia takiej zależności konieczne byłoby przeprowadzenie badań na większej grupie pacjentów poddanych kilkuletniej prospektywnej kontroli onkologicznej.
3. Wyższy poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach raka nieinwazyjnego (NMIBC) oraz CAF's wydaje się być markerem zmian zachodzących w tkance nowotworowej, w tym zwiększonej gęstości mikronaczyń przemawiającej za nasileniem procesu angiogenezy.
4. Wyższa gęstość mikronaczyń wykazujących ekspresję CD34 (MVD) jest potencjalnym markerem ryzyka progresji nieinwazyjnego raka pęcherza moczowego (NMIBC) do raka o wyższym stopniu zaawansowania miejscowego lub o wyższym stopniu złośliwości histologicznej.

## 8 PIŚMIENNICTWO

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
2. Zbigniew Jabłonowski. Rak pęcherza moczowego – epidemiologia, diagnostyka i leczenie w XXI wieku. *Folia Medica Lodziensia*. 2013;40(1):31–52.
3. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003;21(18):1315–30.
4. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013;63(2):234–41.
5. Rosenberg JE, Carroll PR, Small EJ. Update on chemotherapy for advanced bladder cancer. *J Urol*. 2005;174(1):14–20.
6. J.A. Witjes, H.M. Bruins, A. Carrión, R. Cathomas, E.M. Compérat, J.A. Efstathiou, et al. EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. 2023.
7. Gontero P, Compérat E, Dominguez JL, Liedberg F, Mariappan P, Masson-Lecomte A, et al. EAU Guidelines on Non-muscle invasive Bladder Cancer (TaT1 and CIS). 2023.
8. Milowsky MI, Osterman CK. New and Emerging Therapies in the Management of Bladder Cancer. *F1000Res*. 2020;9.
9. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 2011 Aug 17;306(7):737–45.
10. van Osch FHM, Jochems SHJ, Schooten FJ van, Bryan RT, Zeegers MP. Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies. *Int J Epidemiol*. 2016 Jun 1;45(3):857–70.
11. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 2011 Aug 17;306(7):737–45.
12. Rink M, Xylinas E, Babjuk M, Pycha A, Karakiewicz PI, Novara G, et al. Smoking reduces the efficacy of intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. 2012 Dec;62(6):1204–6.
13. Lammers RJM, Witjes WPJ, Hendricksen K, Caris CTM, Janzing-Pastors MHC, Witjes JA. Smoking status is a risk factor for recurrence after transurethral resection of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. 2011 Oct;60(4):713–20.
14. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *J Cancer*. 2000;86:289–94.
15. Pesch B, Taeger D, Johnen G, Gawrych K, Bonberg N, Schwentner C, et al. Screening for bladder cancer with urinary tumor markers in chemical workers with exposure to aromatic amines. *Int Arch Occup Environ Health*. 2014 Oct 1;87(7):715–24.
16. Colt JS, Friesen MC, Stewart PA, Donguk P, Johnson A, Schwenn M, et al. A case-control study of occupational exposure to metalworking fluids and bladder cancer risk among men. *Occup Environ Med*. 2014 Oct 1;71(10):667–74.

17. Martin C, Leiser CL, O'Neil B, Gupta S, Lowrance WT, Kohlmann W, et al. Familial Cancer Clustering in Urothelial Cancer: A Population-Based Case-Control Study. *J Natl Cancer Inst.* 2018 May 1;110(5):527–33.
18. Dianatinasab M, Wesselius A, Salehi-Abargouei A, Yu EYW, Fararouei M, Brinkman M, et al. Dietary fats and their sources in association with the risk of bladder cancer: A pooled analysis of 11 prospective cohort studies. *Int J Cancer.* 2022 Jul 1;151(1):44–55.
19. Buckland G, Ros MM, Roswall N, Bueno-De-Mesquita HB, Travier N, Tjonneland A, et al. Adherence to the Mediterranean diet and risk of bladder cancer in the EPIC cohort study. *Int J Cancer.* 2014 May 15;134(10):2504–11.
20. Jochems SHJ, Reulen RC, van Osch FHM, Witlox WJA, Goossens ME, Brinkman M, et al. Fruit consumption and the risk of bladder cancer: A pooled analysis by the Bladder Cancer Epidemiology and Nutritional Determinants Study. *Int J Cancer.* 2020 Oct 15;147(8):2091–100.
21. Nieder AM, Porter MP, Soloway MS. Radiation therapy for prostate cancer increases subsequent risk of bladder and rectal cancer: a population based cohort study. *J Urol.* 2008 Nov;180(5):2005–10.
22. Adil M, Khan RA, Ghosh P, Venkata SK, Kandhare AD, Sharma M. Pioglitazone and risk of bladder cancer in type 2 diabetes mellitus patients: A systematic literature review and meta-analysis of observational studies using real-world data. *Clin Epidemiol Glob Health.* 2018 Jun 1;6(2):61–8.
23. Update on ongoing European review of pioglitazone-containing medicines | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2023 Apr 16]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/news/update-ongoing-european-review-pioglitazone-containing-medicines>
24. FDA Drug Safety Podcast: Updated FDA review concludes that use of pioglitazone may be linked to an increased risk of bladder cancer | FDA [Internet]. [cited 2023 Apr 16]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/fda-drug-safety-podcasts/fda-drug-safety-podcast-updated-fda-review-concludes-use-pioglitazone-may-be-linked-increased-risk>
25. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 1994;61:1.
26. Gouda I, Mokhtar N, Bilal D, El-Bolkainy T, El-Bolkainy NM. Bilharziasis and bladder cancer: a time trend analysis of 9843 patients. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2007 Jun 1;19(2):158–62.
27. Chalasani V, Chin JL, Izawa JI. Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer. *Can Urol Assoc J.* 2009;3(6 Suppl 4).
28. Montironi R, Lopez-Beltran A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *Int J Surg Pathol.* 2005 Apr;13(2):143–53.
29. Maxwell JP, Wang C, Wiebe N, Yilmaz A, Trpkov K. Long-term outcome of primary Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential (PUNLMP) including PUNLMP with inverted growth. *Diagn Pathol.* 2015 Jul 1;10(1).
30. Dinney CPN, McConkey DJ, Millikan RE, Wu X, Bar-Eli M, Adam L, et al. Focus on bladder cancer. *Cancer Cell.* 2004;6(2):111–6.
31. Urinary and Male Genital Tumours. Vol. 8, WHO Classification of Tumours. WHO; 2022. 193–233 p.
32. Veskimäe E, Espinos EL, Bruins HM, Yuan Y, Sylvester R, Kamat AM, et al. What Is the Prognostic and Clinical Importance of Urothelial and Nonurothelial Histological Variants of Bladder Cancer in Predicting Oncological Outcomes in Patients with Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer? A

European Association of Urology Muscle Invasive and Metastatic Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur Urol Oncol*. 2019 Nov 1;2(6):625–42.

33. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8 th edition due December 2016. Union for International Cancer Control. 2017;1–272.
34. Van Rhijn BWG, Van Der Kwast TH, Alkhateeb SS, Fleshner NE, Van Leenders GJLH, Bostrom PJ, et al. A new and highly prognostic system to discern T1 bladder cancer substage. *Eur Urol*. 2012 Feb;61(2):378–84.
35. Compérat E, Amin MB, Berney DM, Cree I, Menon S, Moch H, et al. What’s new in WHO fifth edition - urinary tract. *Histopathology*. 2022 Oct 1;81(4):439–46.
36. Compérat E, Larré S, Roupert M, Neuzillet Y, Pignot G, Quintens H, et al. Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old. *Virchows Arch*. 2015 May 1;466(5):589–94.
37. Compérat E, Amin MB, Berney DM, Cree I, Menon S, Moch H, et al. What’s new in WHO fifth edition - urinary tract. *Histopathology*. 2022 Oct 1;81(4):439–46.
38. Soukup V, Čapoun O, Cohen D, Hernández V, Babjuk M, Burger M, et al. Prognostic Performance and Reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization Grading Classification Systems in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A European Association of Urology Non-muscle Invasive Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur Urol*. 2017 Nov 1;72(5):801–13.
39. Hentschel AE, van Rhijn BWG, Bründl J, Compérat EM, Plass K, Rodríguez O, et al. Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUN-LMP): Still a meaningful histo-pathological grade category for Ta, noninvasive bladder tumors in 2019? *Urol Oncol*. 2020 May 1;38(5):440–8.
40. Sylvester RJ, Rodríguez O, Hernández V, Turturica D, Bauerová L, Bruins HM, et al. European Association of Urology (EAU) Prognostic Factor Risk Groups for Non-muscle-invasive Bladder Cancer (NMIBC) Incorporating the WHO 2004/2016 and WHO 1973 Classification Systems for Grade: An Update from the EAU NMIBC Guidelines Panel. *Eur Urol*. 2021 Apr 1;79(4):480–8.
41. Andersson M, Berger M, Zieger K, Malmström PU, Bläckberg M. The diagnostic challenge of suspicious or positive malignant urine cytology findings when cystoscopy findings are normal: an outpatient blue-light flexible cystoscopy may solve the problem. *Scand J Urol*. 2021;55(4):263–7.
42. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*. 2017 Oct 19;171(3):540-556.e25.
43. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, Su X, Siefker-Radtke A, Dinney C, et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2014;11(7):400–10.
44. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*. 2014 Feb 10;25(2):152–65.
45. Loriot Y, Necchi A, Park SH, Garcia-Donas J, Huddart R, Burgess E, et al. Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019 Jul 25;381(4):338–48.
46. Trinh TW, Glazer DI, Sadow CA, Sahni VA, Geller NL, Silverman SG. Bladder cancer diagnosis with CT urography: test characteristics and reasons for false-positive and false-negative results. *Abdom Radiol (NY)*. 2018 Mar 1;43(3):663–71.

47. Cha EK, Tirsar LA, Schwentner C, Hennenlotter J, Christos PJ, Stenzl A, et al. Accurate Risk Assessment of Patients with Asymptomatic Hematuria for the Presence of Bladder Cancer. *World J Urol* [Internet]. 2012 Dec 5 [cited 2023 Apr 27];30(6):847. Available from: /pmc/articles/PMC4004026/
48. Grossfeld GD, Litwin MS, Wolf JS, Hricak H, Shuler CL, Agerter DC, et al. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy--part I: definition, detection, prevalence, and etiology. *Urology*. 2001;57(4):599–603.
49. Trinh TW, Glazer DI, Sadow CA, Sahni VA, Geller NL, Silverman SG. Bladder cancer diagnosis with CT urography: test characteristics and reasons for false-positive and false-negative results. *Abdom Radiol (NY)*. 2018 Mar 1;43(3):663–71.
50. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*. 2015 Feb 1;33(2):66.e25-66.e31.
51. Raitanen MP, Aine R, Rintala E, Kallio J, Rajala P, Juusela H, et al. Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol* [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2023 Apr 28];41(3):284–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12180229/>
52. Lebret T, Pignot G, Colombel M, Guy L, Rebillard X, Savareux L, et al. Artificial intelligence to improve cytology performances in bladder carcinoma detection: results of the VisioCyt test. *BJU Int* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Apr 28];129(3):356–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33751774/>
53. Eva M. Wojcik, Daniel F.I. Kurtycz, Dorothy L. Rosenthal. *The Paris System for Reporting Urinary Cytology*. Wojcik EM, Kurtycz DFI, Rosenthal DL, editors. Cham: Springer International Publishing; 2022.
54. Kim PH, Sukhu R, Cordon BH, Sfakianos JP, Sjoberg DD, Hakimi AA, et al. Reflex fluorescence in situ hybridization assay for suspicious urinary cytology in patients with bladder cancer with negative surveillance cystoscopy. *BJU Int*. 2014;114(3).
55. Grossman HB, Messing E, Soloway M, Tomera K, Katz G, Berger Y, et al. Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA*. 2005;293(7).
56. van der Aa MNM, Zwarthoff EC, Steyerberg EW, Boogaard MW, Nijsen Y, van der Keur KA, et al. Microsatellite Analysis of Voided-Urine Samples for Surveillance of Low-Grade Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma: Feasibility and Clinical Utility in a Prospective Multicenter Study (Cost-Effectiveness of Follow-Up of Urinary Bladder Cancer Trial [CEFUB]). *Eur Urol*. 2009;55(3).
57. Beukers W, van der Keur KA, Kandimalla R, Vergouwe Y, Steyerberg EW, Boormans JL, et al. FGFR3, TERT and OTX1 as a Urinary Biomarker Combination for Surveillance of Patients with Bladder Cancer in a Large Prospective Multicenter Study. *J Urol*. 2017 Jun 1;197(6):1410–8.
58. Konety B, Shore N, Kader AK, Porten S, Daneshmand S, Lough T, et al. Evaluation of Cxbladder and Adjudication of Atypical Cytology and Equivocal Cystoscopy. *Eur Urol*. 2019 Aug 1;76(2):238–43.
59. Gontero P, Montanari E, Roupret M, Longo F, Stockley J, Kennedy A, et al. Comparison of the performances of the ADXBLADDER test and urinary cytology in the follow-up of non-muscle-invasive bladder cancer: a blinded prospective multicentric study. *BJU Int*. 2021 Feb 1;127(2):198–204.
60. Cancel-Tassin G, Roupret M, Pinar U, Gaffory C, Vanie F, Ondet V, et al. Assessment of Xpert Bladder Cancer Monitor test performance for the detection of recurrence during non-muscle invasive bladder cancer follow-up. *World J Urol*. 2021 Sep 1;39(9):3329–35.

61. D'Andrea D, Soria F, Zehetmayer S, Gust KM, Korn S, Witjes JA, et al. Diagnostic accuracy, clinical utility and influence on decision-making of a methylation urine biomarker test in the surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int.* 2019 Jun 1;123(6):959–67.
62. Powles T, Assaf ZJ, Davarpanah N, Banchereau R, Szabados BE, Yuen KC, et al. ctDNA guiding adjuvant immunotherapy in urothelial carcinoma. *Nature.* 2021 Jul 15;595(7867):432–7.
63. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Holmang S, Sydes MR, Birtle A, Gudjonsson S, et al. Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur Urol.* 2016 Feb 1;69(2):231–44.
64. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol.* 1976;116(2):180–2.
65. Sylvester RJ, Van der Meijden APM, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol.* 2002 Nov 1;168(5):1964–70.
66. Shelley MD, Kynaston H, Court J, Wilt TJ, Coles B, Burgon K, et al. A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int.* 2001;88(3):209–16.
67. May M, Helke C, Nitzke T, Vogler H, Hoschke B. Survival rates after radical cystectomy according to tumor stage of bladder carcinoma at first presentation. *Urol Int.* 2004;72(2):103–11.
68. Griffiths G, Hall R, Sylvester R, Raghavan D, Parmar MK. International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial. *J Clin Oncol.* 2011 Jun 1;29(16):2171–7.
69. Svatek RS, Shariat SF, Lasky RE, Skinner EC, Novara G, Lerner SP, et al. The effectiveness of off-protocol adjuvant chemotherapy for patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res.* 2010 Sep 1;16(17):4461–7.
70. Bellmunt J, Petrylak DP. New therapeutic challenges in advanced bladder cancer. *Semin Oncol.* 2012 Oct;39(5):598–607.
71. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med.* 2017 Mar 16;376(11):1015–26.
72. Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista P V., Fernandes AR. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 2;20(4).
73. Fukumura D, Jain RK. Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *J Cell Biochem.* 2007 Jul 1;101(4):937–49.
74. Dolmatov IY, Nizhnichenko VA, Dolmatova LS. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Echinoderms: Structure and Possible Functions. *Cells.* 2021 Sep 1;10(9).
75. Paolillo M, Schinelli S. Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 1;20(19).
76. Son B, Lee S, Youn HS, Kim EG, Kim W, Youn BH. The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance. *Oncotarget.* 2017 Jan 1;8(3):3933.

77. Bejarano L, Jordão MJC, Joyce JA. Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov* [Internet]. 2021 [cited 2023 May 18];11(4):933–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33811125/>
78. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 2005;7(3):211–7.
79. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 26;420(6917):860–7.
80. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001 Feb 17;357(9255):539–45.
81. Neri D, Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jun;5(6):436–46.
82. Szala S. Komórki mikrośrodowiska nowotworowego: cel terapii przeciwnowotworowej. *Nowotwory Journal of Oncology*. 2007;57(6):633–633.
83. Li Y, Wang H, Zhao Z, Yang Y, Meng Z, Qin L. Effects of the interactions between platelets with other cells in tumor growth and progression. *Front Immunol*. 2023;14:1165989.
84. Van Der Horst G, Bos L, Van Der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Mol Cancer Res*. 2012 Aug;10(8):995–1009.
85. Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argáez V, Lara-Riegos J, et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Front Oncol*. 2019 Dec 6;9:1370.
86. Goubran HA, Kotb RR, Stakiw J, Emara ME, Burnouf T. Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. *Cancer Growth Metastasis*. 2014 Jan;7:CGM.S11285.
87. Kang HW, Kim WJ, Yun SJ. The role of the tumor microenvironment in bladder cancer development and progression. *Transl Cancer Res*. 2017 Jun 1;6(Suppl 4):S744–58.
88. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2015 Dec 11 [cited 2023 May 3];7(4):2443–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26690480/>
89. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005 May 6;121(3):335–48.
90. Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(1):19–25.
91. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 May;6(5):392–401.
92. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SSW, Takashi S, et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*. 2011 Feb 15;19(2):257–72.
93. Polanska UM, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *J Cell Physiol*. 2013 Aug;228(8):1651–7.
94. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer Associated Fibroblasts in Cancer Pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(1):33.
95. Paraiso KHT, Smalley KSM. Fibroblast-mediated drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol*. 2013 Apr 15;85(8):1033–41.

96. Goulet CR, Champagne A, Bernard G, Vandal D, Chabaud S, Pouliot F, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling. *BMC Cancer*. 2019 Feb 11;19(1).
97. Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y, et al. New horizons in tumor microenvironment biology: Challenges and opportunities. Vol. 13, *BMC Medicine*. BioMed Central Ltd.; 2015.
98. Loeffler M, Krüger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest*. 2006 Jul 3;116(7):1955–62.
99. Enkelmann A, Heinzelmann J, Von Eggeling F, Walter M, Berndt A, Wunderlich H, et al. Specific protein and miRNA patterns characterise tumour-associated fibroblasts in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Jul 4;137(5):751–9.
100. Alexa A, Baderca F, Lighezan R, Izvernariu D. Myofibroblasts reaction in urothelial carcinomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2009 Jan 1;50(4):639–43.
101. Miao C, Liang C, Zhu J, Xu A, Zhao K, Hua Y, et al. Prognostic role of matrix metalloproteinases in bladder carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(19):32309–21.
102. Rodriguez Faba O, Palou-Redorta J, Fernández-Gómez JM, Algaba F, Eiró N, Villavicencio H, et al. Matrix Metalloproteinases and Bladder Cancer: What is New? *ISRN Urol*. 2012 Jul 17;2012:1–9.
103. Pula B, Wojnar A, Werynska B, Ambicka A, Kruczak A, Witkiewicz W, et al. Impact of different tumour stroma assessment methods regarding podoplanin expression on clinical outcome in patients with invasive ductal breast carcinoma. *Anticancer Res*. 2013 Apr 1;33(4):1447–55.
104. Ugorski M, Dziegiel P, Suchanski J. Podoplanin - a small glycoprotein with many faces. *Am J Cancer Res*. 2016;6(2):370.
105. Matsui K, Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Kerjaschki D. Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14 Suppl 1(SUPPL. 1):9–11.
106. Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S, et al. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol*. 1998 Feb 23;140(4):885–95.
107. Hałoń A, Donizy P. The role of the ERM protein family in maintaining cellular polarity, adhesion and regulation of cell motility. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2012;66:158–64.
108. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun 1;119(6):1420–8.
109. Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer*. 2007 Jan 15;96(1):1–5.
110. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol*. 2005;166(3):913–21.
111. Kaneko MK, Yamada S, Nakamura T, Abe S, Nishioka Y, Kunita A, et al. Antitumor activity of chLpMab-2, a human-mouse chimeric cancer-specific antihuman podoplanin antibody, via antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Med*. 2017 Apr 1;6(4):768–77.
112. Fujita N, Takagi S. The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumour metastasis. *J Biochem*. 2012 Nov;152(5):407–13.



113. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*. 2003 Jul 1;22(14):3546–56.
114. Takagi S, Oh-Hara T, Sato S, Gong B, Takami M, Fujita N. Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its role in pulmonary metastasis. *Int J Cancer*. 2014 Jun 1;134(11):2605–14.
115. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol*. 1999;154(2):385–94.
116. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Horvat R, Amann G, Kowalski H, Kerjaschki D. [Podoplanin--a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1999 Jan 1;83:270–5.
117. Grzegorzolka J, Wojtyra P, Biala M, Piotrowska A, Gomulkiewicz A, Rys J, et al. Correlation Between Expression of Twist and Podoplanin in Ductal Breast Carcinoma. *Anticancer Res*. 2017 Oct 3;37(10).
118. Kawase A, Ishii G, Nagai K, Ito T, Nagano T, Murata Y, et al. Podoplanin expression by cancer associated fibroblasts predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2008 Sep 1;123(5):1053–9.
119. Pula B, Jethon A, Piotrowska A, Gomulkiewicz A, Owczarek T, Calik J, et al. Podoplanin expression by cancer-associated fibroblasts predicts poor outcome in invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology*. 2011 Dec;59(6):1249–60.
120. Suzuki-Inoue K, Osada M, Ozaki Y. Physiologic and pathophysiologic roles of interaction between C-type lectin-like receptor 2 and podoplanin: partners from in utero to adulthood. *J Thromb Haemost*. 2017 Feb 1;15(2):219–29.
121. Kaneko MK, Kato Y, Kitano T, Osawa M. Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/podoplanin as a platelet aggregation-inducing factor. *Gene*. 2006 May 11;378(1–2):52–7.
122. Takemoto A, Okitaka M, Takagi S, Takami M, Sato S, Nishio M, et al. A critical role of platelet TGF- $\beta$  release in podoplanin-mediated tumour invasion and metastasis. *Sci Rep*. 2017 Feb 8;7.
123. Pula B, Witkiewicz W, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M. Significance of podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts: a comprehensive review. *Int J Oncol*. 2013 Jun;42(6):1849–57.
124. Erez N, Truitt M, Olson P, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 2010 Feb 17;17(2):135–47.
125. Vermeulen L, De Sousa E Melo F, Van Der Heijden M, Cameron K, De Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2010 May;12(5):468–76.
126. Melo FDSE, Vermeulen L, Richel D, Medema JP. Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clin Cancer Res*. 2011 Feb 15;17(4):647–53.
127. Pula B, Jethon A, Piotrowska A, Gomulkiewicz A, Owczarek T, Calik J, et al. Podoplanin expression by cancer-associated fibroblasts predicts poor outcome in invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology*. 2011 Dec;59(6):1249–60.
128. Kitano H, Kageyama SI, Hewitt SM, Hayashi R, Doki Y, Ozaki Y, et al. Podoplanin expression in cancerous stroma induces lymphangiogenesis and predicts lymphatic spread and patient survival. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Oct;134(10):1520–7.

129. Shindo K, Aishima S, Ohuchida K, Fujiwara K, Fujino M, Mizuuchi Y, et al. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts enhances tumor progression of invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Mol Cancer*. 2013 Dec 20;12(1).
130. Kan S, Konishi E, Arita T, Ikemoto C, Takenaka H, Yanagisawa A, et al. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts aggressive behavior in melanoma. *J Cutan Pathol*. 2014;41(7):561–7.
131. Schoppmann SF, Jesch B, Riegler MF, Maroske F, Schwameis K, Jomrich G, et al. Podoplanin expressing cancer associated fibroblasts are associated with unfavourable prognosis in adenocarcinoma of the esophagus. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Apr;30(4):441–6.
132. Carvalho FM, Zaganelli FL, Almeida BGL, Goes JCS, Baracat EC, Carvalho JP. Prognostic value of podoplanin expression in intratumoral stroma and neoplastic cells of uterine cervical carcinomas. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010 Jan 1;65(12):1279–83.
133. Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, Kanai Y, et al. Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. *Oncology*. 2009 Jul;77(1):53–62.
134. Kitano H, Kageyama SI, Hewitt SM, Hayashi R, Doki Y, Ozaki Y, et al. Podoplanin expression in cancerous stroma induces lymphangiogenesis and predicts lymphatic spread and patient survival. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Oct;134(10):1520–7.
135. Kadota K, Huang CL, Liu D, Nakashima N, Yokomise H, Ueno M, et al. The clinical significance of the tumor cell D2-40 immunoreactivity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010 Oct;70(1):88–93.
136. Yoshida T, Ishii G, Goto K, Neri S, Hashimoto H, Yoh K, et al. Podoplanin-positive cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment induce primary resistance to EGFR-TKIs in lung adenocarcinoma with EGFR mutation. *Clin Cancer Res*. 2015 Feb 1;21(3):642–51.
137. Carvalho FM, Zaganelli FL, Almeida BGL, Goes JCS, Baracat EC, Carvalho JP. Prognostic value of podoplanin expression in intratumoral stroma and neoplastic cells of uterine cervical carcinomas. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010 Jan 1;65(12):1279–83.
138. Schoppmann SF, Jesch B, Riegler MF, Maroske F, Schwameis K, Jomrich G, et al. Podoplanin expressing cancer associated fibroblasts are associated with unfavourable prognosis in adenocarcinoma of the esophagus. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Apr;30(4):441–6.
139. Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, Ito H, Kameyama A, Ogasawara S, et al. Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci*. 2008 Jan;99(1):54–61.
140. Ogasawara S, Kaneko MK, Price JE, Kato Y. Characterization of anti-podoplanin monoclonal antibodies: critical epitopes for neutralizing the interaction between podoplanin and CLEC-2. *Hybridoma (Larchmt)*. 2008 Aug 1;27(4):259–67.
141. Zhou Q, Wang Z, Zeng H, Zhang H, Liu Z, Huang Q, et al. Identification and validation of poor prognosis immunoevasive subtype of muscle-invasive bladder cancer with tumor-infiltrating podoplanin+ cell abundance. *Oncoimmunology*. 2020 Jan 1;9(1).
142. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jul;10(7):505–14.
143. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005 May 6;121(3):335–48.

144. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):967–74.
145. Wechman SL, Emdad L, Sarkar D, Das SK, Fisher PB. Vascular mimicry: Triggers, molecular interactions and in vivo models. *Adv Cancer Res*. 2020 Jan 1;148:27.
146. Huang J, Ma X, Chen X, Liu X, Zhang B, Minmin L, et al. Microvessel density as a prognostic factor in bladder cancer: a systematic review of literature and meta-analysis. *Cancer Biomark*. 2014;14(6):505–14.
147. Reymond N, D'Água BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(12):858–70.
148. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*. 2011 Jul 15;437(2):169–83.
149. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D, et al. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res*. 1997 Dec 1;57(23):5281–5.
150. Korc M, Friesel R. The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009 Aug 21;9(5):639–51.
151. Choi SC, Kim SJ, Choi JH, Park CY, Shim WJ, Lim DS. Fibroblast growth factor-2 and -4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Stem Cells Dev*. 2008 Aug;17(4):725–36.
152. Van Rhijn BWG, Vis AN, Van Der Kwast TH, Kirkels WJ, Radvanyi F, Ooms ECM, et al. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2003 May 15;21(10):1912–21.
153. Fus ŁP, Górnicka B. Role of angiogenesis in urothelial bladder carcinoma. *Cent European J Urol*. 2016;69(3):258–63.
154. Bazley LA, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Jul;12 Suppl 1(SUPPL. 1).
155. Chaux A, Cohen JS, Schultz L, Albadine R, Jadallah S, Murphy KM, et al. High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: A study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Hum Pathol*. 2012 Oct;43(10):1590–5.
156. Katayama Y, Uchino J, Chihara Y, Tamiya N, Kaneko Y, Yamada T, et al. Tumor Neovascularization and Developments in Therapeutics. *Cancers* 2019, Vol 11, Page 316. 2019 Mar 6;11(3):316.
157. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991 Jan 3;324(1):1–8.
158. Russell Jones R, Orchard G, Zelger B, Wilson Jones E. Immunostaining for CD31 and CD34 in Kaposi sarcoma. *J Clin Pathol*. 1995;48(11):1011–6.
159. Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, Baroni G, Boddi V, Taddei GL. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in advanced ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2004 Sep;14(5):815–23.
160. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. 2011 Aug 16;21(2):193–215.

161. Huang J, Ma X, Chen X, Liu X, Zhang B, Minmin L, et al. Microvessel density as a prognostic factor in bladder cancer: a systematic review of literature and meta-analysis. *Cancer Biomark.* 2014;14(6):505–14.
162. Ajili F, Kacem M, Tounsi H, Darouiche A, Enayfer E, Chebi M, et al. Prognostic impact of angiogenesis in nonmuscle invasive bladder cancer as defined by microvessel density after immunohistochemical staining for CD34. *Ultrastruct Pathol.* 2012 May 10;36(5):336–42.
163. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe.* 1987 May 1;8(3):138–40.
164. Rahadiani N, Ikeda JI, Makino T, Tian T, Qiu Y, Mamat S, et al. Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2010 May;17(5):1311–23.
165. Kreppel M, Scheer M, Drebber U, Ritter L, Zöller JE. Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch.* 2010 May;456(5):473–82.
166. Kadota K, Huang CL, Liu D, Nakashima N, Yokomise H, Ueno M, et al. The clinical significance of the tumor cell D2-40 immunoreactivity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2010 Oct;70(1):88–93.
167. Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M. Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol.* 2006 May;111(5):483–8.
168. Okajima E, Tomizawa M, Shimada K, Negishi T, Nishiyama N, Kitamura H. D2-40/podoplanin expression in cancer stroma by immunohistochemical staining is associated with poor prognosis in bladder cancer patients after radical cystectomy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 2020 Oct 1;38(10):797.e7-797.e13.
169. Krishnan H, Rayes J, Miyashita T, Ishii G, Retzbach EP, Sheehan SA, et al. Podoplanin: An emerging cancer biomarker and therapeutic target. *Cancer Sci.* 2018 May 1;109(5):1292.
170. Kim HS, Kim M, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Presence of lymphovascular invasion in urothelial bladder cancer specimens after transurethral resections correlates with risk of upstaging and survival: a systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol.* 2014;32(8):1191–9.
171. Martini T, Ströbel P, Steidler A, Petrakopoulou N, Erben P, Bolenz C. [Detection of lymphovascular invasion in urothelial carcinoma of the bladder through D2-40 immunostaining]. *Urologe A.* 2015 Jan 1;54(1):70–5.
172. Bolenz C, Auer M, Ströbel P, Heinzlbecker J, Schubert C, Trojan L. The lymphatic system in clinically localized urothelial carcinoma of the bladder: morphologic characteristics and predictive value. *Urol Oncol.* 2013 Nov;31(8):1606–14.
173. O’Sullivan NJ, MacCraith E, Temperley HC, Naughton A, Davis NF. Standard Transurethral Resection vs Transurethral Laser Surgery for Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis Comparing Clinical Outcomes and Complications. *J Endourol.* 2023 Mar 1;37(3):304–15.
174. Habuchi T. Origin of multifocal carcinomas of the bladder and upper urinary tract: Molecular analysis and clinical implications. *International Journal of Urology.* 2005 Aug 1;12(8):709–16.
175. Acar Ö, Özkurt E, Demir G, Saraç H, Alkan C, Esen T, et al. Determining the origin of synchronous multifocal bladder cancer by exome sequencing. *BMC Cancer.* 2015 Nov 9;15(1):1–7.

176. Donat SM. Evaluation and follow-up strategies for superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am* [Internet]. 2003 [cited 2023 May 21];30(4):765–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14680313/>
177. Joshi RS, Kanugula SS, Sudhir S, Pereira MP, Jain S, Aghi MK. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Tumor Progression. *Cancers* 2021, Vol 13, Page 1399. 2021 Mar 19;13(6):1399.
178. Linares J, Marín-Jiménez JA, Badia-Ramentol J, Calon A. Determinants and Functions of CAFs Secretome During Cancer Progression and Therapy. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jan 22;8:1706.
179. Burley A, Rullan A, Wilkins A. A review of the biology and therapeutic implications of cancer-associated fibroblasts (CAFs) in muscle-invasive bladder cancer. *Front Oncol.* 2022 Oct 13;12:5513.
180. Tian Y, Ma Z, Chen Z, Li M, Wu Z, Hong M, et al. Clinicopathological and Prognostic Value of Ki-67 Expression in Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016 Jul 1;11(7).
181. He Y, Wang N, Zhou X, Wang J, Ding Z, Chen X, et al. Prognostic value of ki67 in BCG-treated non-muscle invasive bladder cancer: a meta-analysis and systematic review. *BMJ Open.* 2018 Apr 1;8(4):e019635.
182. Warli SM, Dharma Kadar D, Putra Siregar G, Mirsya S, Universitas W, Utara S, et al. Ki-67 Expression as a Predictive Factor of Muscle Invasion in Bladder Cancer. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018 Feb 9;6(2):260–2.

## 9 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 wznovy oraz krótszym czasem przeżycia ogólnego.

Jak dotąd nie zbadano ekspresji podoplaniny w nieinwazyjnym raku pęcherza moczowego (NMIBC) w kontekście ryzyka wznovy 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.

## 10 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 of 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.

## **11 ANEKS**

## SPIS RYCIN

<b>Rycina 1.</b> Trend nowych przypadków (■) oraz śmiertelności (▼) w przebiegu raka pęcherza moczowego na przestrzeni 45 lat (Database of Surveillance Epidemiology and End Results (SEER), NCI, USA; <a href="https://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html">https://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html</a> ).....	8
<b>Rycina 2.</b> Trend 5-letniego przeżycia w przebiegu raka pęcherza moczowego na przestrzeni 40 lat (Database of Surveillance Epidemiology and End Results (SEER), NCI, USA; <a href="https://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html">https://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html</a> ).....	9
<b>Rycina 3.</b> Stopnie zaawansowania miejscowego raka pęcherza moczowego. ....	13
<b>Rycina 4.</b> Stopnie złośliwości histologicznej raka pęcherza moczowego – zestawienie klasyfikacji WHO z 1973 roku z klasyfikacją WHO z 2004 roku uaktualnioną w 2016 oraz 2022 roku .....	14
<b>Rycina 5.</b> Schemat cząsteczki podoplaniny łączącej się z wewnątrzkomórkowym elementem kompleksu białek ERM – ezryną; EC - domena zewnątrzkomórkowa; TM - domena przezbłonowa; IC – domena wewnątrzkomórkowa. ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859667">www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859667</a> ) .....	23
<b>Rycina 6.</b> Obrazy reakcji immunohistochemicznej (A, B, C) przedstawiające ekspresję podoplaniny (D2-40) w raku urotelialnym pęcherza moczowego. Niebieską strzałką oznaczono ekspresję D2-40 w podścielisku (obraz A i B). Białą strzałką oznaczono silną błonową ekspresję podoplaniny w komórkach nowotworowych (obraz C). Żółtą strzałką oznaczono komórki endotelialne naczyń limfatycznych (obraz B).....	36
<b>Rycina 7.</b> Ekspresja markerów w fibroblastach podścieliska nowotworowego (CAF's) w seryjnych przekrojach nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego (NMIBC) przy użyciu przeciwciał przeciwko $\alpha$ -SMA (A), podoplaninie (D2-40) (B) oraz wimentynie (C). ....	37
<b>Rycina 8.</b> 4 stopnie nasilenia ekspresji jądrowej antygenu Ki-67 w komórkach nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego (NMIBC): <5% (A), 6-25% (B), 26-50% (C), >50% (D) .....	38
<b>Rycina 9.</b> Przykładowa ekspresja markerów neo- i angiogenezy, CD31 (A) oraz CD34 (B) w nieinwazyjnym urotelialnym raku pęcherza moczowego (NMIBC) .....	39
<b>Rycina 10.</b> Porównanie poziomu ekspresji (IHC) podoplaniny (D2-40) w kontroli (prawidłowych fibroblastach) względem ekspresji w CAF' (p=0,505) (A) oraz w komórkach nowotworowych (p=0,291) (B).....	40
<b>Rycina 11.</b> Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's (p=0,21) (A) oraz w komórkach nowotworowych (p=0,596) (B) w zależności od stopnia zaawansowania miejscowego raka nieinwazyjnego (NMIBC).....	40
<b>Rycina 12</b> Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's (p=0,723) (A) oraz w komórkach nowotworowych (p=0,471) (B) w zależności od stopnia złośliwości histologicznej ocenianej według skali WHO z 2004/2022 roku.....	41

<b>Rycina 13.</b> Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's (p=0,876) (A) oraz w komórkach nowotworowych (p=0,633) (B) w zależności od stopnia złośliwości histologicznej ocenianej według skali WHO z 1973 roku.....	41
<b>Rycina 14.</b> Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's (p=0,25) (A) oraz w komórkach nowotworowych (p=0,706) (B) w zależności od grupy prognostycznej ryzyka progresji nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego wg Europejskiego Towarzystwa Urologicznego .....	42
<b>Rycina 15.</b> Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's (p=0,355) (A) oraz w komórkach nowotworowych (p=0,829) (B) w zależności od ryzyka wznowy procesu nowotworowego .....	42
<b>Rycina 16.</b> Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's (p=0,829) (A) oraz w komórkach nowotworowych (p=0,316) (B) w zależności od ryzyka progresji procesu nowotworowego .....	43
<b>Rycina 17.</b> Krzywa przeżyć Kaplana-Meiera. Brak istotnych różnic w czasie przeżyć wolnych od wznowy (RFS) w zależności od poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's (p=0,278) .....	43
<b>Rycina 18.</b> Krzywa przeżyć Kaplana-Meiera. Brak istotnych różnic w czasie przeżyć wolnych od wznowy (RFS) w zależności od poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach nowotworowych (p=0,117) .....	44
<b>Rycina 19.</b> Poziom ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's (p=0,176) (A) oraz w komórkach nowotworowych (p=0,016) (B) w raku pęcherza moczowego nieinwazyjnym (NMIBC) oraz inwazyjnym (MIBC). .....	44
<b>Rycina 20.</b> Korelacja poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach raka urotelialnego z poziomem ekspresji podoplaniny w CAF's ( p=0,078; r=0,199).....	45
<b>Rycina 21.</b> Korelacja poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w CAF's z gęstością mikronaczyń wykazujących ekspresję CD34 (p=0,035; r=0,238) .....	45
<b>Rycina 22.</b> Korelacja poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach raka urotelialnego pęcherza moczowego z gęstością mikronaczyń wykazujących ekspresję CD31 (p=0,046; r=0,225) .	46
<b>Rycina 23.</b> Korelacja poziomu ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach nowotworowych z gęstością mikronaczyń wykazujących ekspresję CD34 (p=0,0007; r=0,372) .....	46
<b>Rycina 24.</b> Porównanie poziomu ekspresji Ki-67 w komórkach nowotworowych: względem kontroli (p=0,034) (A), w zależności od stopień zaawansowania miejscowego raka pęcherza moczowego (p<0,0001) (B), względem stopienia złośliwości histologicznej wg. WHO z 2004/2022 roku (p<0,0001) (C), oraz względem stopienia złośliwości histologicznej wg. WHO z 1973 roku (p=0,0006) (D) .....	47
<b>Rycina 25.</b> Porównanie poziomu ekspresji Ki-67: w różnych grupach prognostycznych raka nieinwazyjnego (NMIBC) według Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (***, p<0,0001) (A), w nieinwazyjnym (NMIBC) oraz inwazyjnym (MIBC) raku pęcherza moczowego ( p<0,0001)(B) .	48
<b>Rycina 26.</b> Gęstość mikronaczyń (MVD) oparta na ocenie ekspresji CD31 w komórkach nowotworowych i komórkach prawidłowych (p=0,013) (A), MVD oparta na ocenie ekspresji CD34 w komórkach nowotworowych i komórkach prawidłowych (p=0,283) (B), MVD oparta na ocenie	

ekspresji CD34 w raku pęcherza moczowego nieinwazyjnym (NMIBC) oraz inwazyjnym (MIBC) (p=0,0002) (C), MVD oparta na ocenie ekspresji CD34 względem ryzyka progresji procesu nowotworowego (p=0,032) (D). ..... 49

**Rycina 27.** Krzywa przeżyć Kaplana-Meiera. Brak istotnych różnic w czasie przeżyć wolnych od wznowy (RFS) w zależności od gęstości mikronaczyń (MVD) ocenionej na podstawie ekspresji CD31 w komórkach śródbłonna (p=0,292)..... 50

**Rycina 28** Krzywa przeżyć Kaplana-Meiera. Brak istotnych różnic w czasie przeżyć wolnych od wznowy (RFS) w zależności od gęstości mikronaczyń (MVD) ocenionej na podstawie ekspresji CD34 w komórkach śródbłonna (p=0,504)..... 50

## SPIS TABEL

<b>Tabela 1.</b> Typy histologiczne raka pęcherza moczowego wg klasyfikacji WHO z 2016 r.....	11
<b>Tabela 2.</b> Klasyfikacja TNM raka pęcherza moczowego z 2016 roku.....	12
<b>Tabela 3.</b> Grupy prognostyczne dla guzów NMIBC wg Europejskiego Towarzystwa Urologicznego .....	16
<b>Tabela 4.</b> System Paryski do oceny wyników badań cytologicznych moczu z 2022 roku.....	17
<b>Tabela 5.</b> Skala IRS wg Remmele’go i Stegner.....	30
<b>Tabela 6.</b> Skala oceny ekspresji Ki-67 na podstawie odsetka komórek wykazujących reakcję barwną. .....	31
<b>Tabela 7.</b> Charakterystyka przypadków nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego (NMIBC) poddanych prospektywnej obserwacji oraz analizie statystycznej.....	34
<b>Tabela 8.</b> Rozkład nasilenia ekspresji badanych markerów: podoplaniny (D2-40), Ki-67, CD31 oraz CD34 w raku urotelialnym nieinwazyjnym NIMBC .	35

## 12 ZAŁĄCZNIKI

KOMISJA BIOETYCZNA  
przy  
Uniwersytecie Medycznym  
we Wrocławiu  
ul. Pasteura 1; 50-367 WROCLAW

### OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ Nr KB – 532/2018

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, powołana zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 133/XV R/2017 z dnia 21 grudnia 2017 r. oraz działająca w trybie przewidzianym rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz.U. nr 47, poz. 480) na podstawie ustawy o zawodzie lekarza z dnia 5 grudnia 1996 r. (Dz.U. nr 28 z 1997 r. poz. 152 z późniejszymi zmianami ) w składzie:

dr hab. Jacek Daroszewski (endokrynologia, diabetologia)  
prof. dr hab. Krzysztof Grabowski (chirurgia)  
dr Henryk Kaczkowski (chirurgia szczękowa, chirurgia stomatologiczna)  
mgr Irena Knabel-Krzyszowska (farmacja)  
prof. dr hab. Jerzy Liebhart (choroby wewnętrzne, alergologia)  
ks. dr hab. Piotr Mrzygłód (duchowny)  
mgr prawa Luiza Müller (prawo)  
dr hab. Sławomir Sidorowicz (psychiatria)  
dr hab. Leszek Szenborn (pediatria, choroby zakaźne)  
Danuta Tarkowska (pielęgniarstwo)  
prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska (farmakologia kliniczna)  
dr hab. Andrzej Wojnar (histopatologia, dermatologia) przedstawiciel Dolnośląskiej Izby Lekarskiej)  
dr hab. Jacek Zieliński (filozofia)

pod przewodnictwem  
prof. dr hab. Jana Kornafela ( ginekologia i położnictwo, onkologia)

Przestrzegając w działalności zasad Good Clinical Practice oraz zasad Deklaracji Helsińskiej, po zapoznaniu się z projektem badawczym pt.:

„Ekspresja podoplaniny (D2-40) oraz jej wartość prognostyczna w raku urotelialnym pęcherza moczowego ”



zgłoszonym przez **prof. dr hab. Piotra Dięgiela** zatrudnionego w Katedrze Morfologii i Embriologii Człowieka, Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz złożonymi wraz z wnioskiem dokumentami, w tajnym głosowaniu postanowiła **wyrazić zgodę** na przeprowadzenie badania przez **lek. Adriana Czekaja** w Zakładzie Histologii i Embriologii Katedry Morfologii i Embriologii Człowieka UMW oraz Oddziale Urologii i Urologii Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu **pod warunkiem zachowania anonimowości uzyskanych danych**.

Uwaga: Badanie to zostało objęte ubezpieczeniem odpowiedzialności cywilnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z tytułu prowadzonej działalności.

Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu.

Opinia powyższa dotyczy projektu badawczego będącego podstawą grantu dla młodych naukowców.

Wrocław, dnia 21 września 2018 r.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KOMISJA BIOETYCZNA  
przewodniczący  
prof. dr hab. Jan Kornatfel



**Informacja  
dla osób uczestniczących w badaniu naukowym**

**Ośrodek naukowy:**

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy.  
ul. Kamińskiego 73A, 51-124 Wrocław

**Temat badania:**

**Poszukiwanie markerów progresji nowotworowej w pierwotnych powierzchniowych nowotworach pęcherza moczowego**

Założeniem badania jest opracowanie fragmentu pobranego guza w trakcie zabiegu przezewkowej elektroresekcji. Część tkankowa zostanie pobrana w ilości niezakłócającej procesu diagnostyki histopatologicznej. Materiał zabezpieczony zostanie przekazany do Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu celem badań molekularnych. Będą one dotyczyły mechanizmów wpływających na progresję choroby nowotworowej

W czasie pobytu w szpitalu jesteście Państwo objęci polisą ubezpieczeniową Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu.

Wszelkie informacje zgromadzone w trakcie badania będą zebrane w pamięci komputera ale bez Pani/Pana nazwiska. Tylko lekarz będzie wiedział, która informacja odnosi się do Pani/Pana. Zbieranie i przechowywanie danych będzie przebiegało zgodnie z obowiązującym stanem prawnym.

W każdym momencie badania może Pan/Pani wycofać się z udziału w badaniu, bez podawania przyczyny. Taka decyzja w żadnym stopniu nie wpłynie na proces dalszego leczenia.

<b>Osoba włączona do badania</b>	..... <i>(Imię i Nazwisko)</i>	..... <i>(data i podpis)</i>
<b>Lekarz prowadzący</b>	..... <i>(Imię i Nazwisko)</i>	..... <i>(data i podpis)</i>

**OŚWIADCZENIE BADANEGO**  
**Zgoda na przyjęcie warunków ubezpieczenia**

1. Imię i nazwisko osoby badanej: .....

..... wiek badanego .....

2. Adres: .....

.....

3. Temat badań: „Poszukiwanie markerów progresji nowotworowej w pierwotnych  
powierzchnych nowotworach pęcherza moczowego”

Oświadczam, że zostałem/am szczegółowo poinformowany/na o warunkach  
ubezpieczenia mojego udziału w badaniach i przyjmuję te warunki.

.....  
Podpis badacza

.....  
Podpis badanego

.....  
Miejsce, data

**OŚWIADCZENIE BADANEGO**  
**Zgoda na udział w badaniach**

1. **Imię i nazwisko:** .....
2. **Wiek badanego:** .....
3. **Adres:** .....  
.....
4. **Temat badań:**

**Poszukiwanie markerów progresji nowotworowej w pierwotnych powierzchniowych  
nowotworach pęcherza moczowego**

Oświadczam, że zostałem poinformowany o celu zamierzonych badań i sposobie ich przeprowadzania. Rozumiem na czym mają one polegać i do czego potrzebna jest moja zgoda. Zostałem poinformowany/na, że mogę odmówić zgody na udział w badaniach na każdym etapie realizacji projektu badawczego.

Wyrażam pełną i świadoma zgodę na udział w badaniach

Imię i Nazwisko badacza  
(drukowanymi)

.....

Podpis i data

.....

Imię i Nazwisko pacjenta  
(drukowanymi)

.....

Podpis i data

.....

**OŚWIADCZENIE BADANEGO**  
**Zgoda na przetwarzanie danych**

1. Imię i nazwisko osoby badanej: .....

..... wiek badanego .....

2. Adres: .....

.....

3. Temat badań

**Poszukiwanie markerów progresji nowotworowej w pierwotnych powierzchniowych  
nowotworach pęcherza moczowego**

**Oświadczam, że wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych w  
zakresie niezbędnym do realizacji projektu badawczego, w którym biorę udział.**

.....  
Podpis badacza

.....  
Podpis badanego

.....  
Miejsce, data



**UNIwersYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU  
CENTRUM WSPIERANIA NAUKI  
Sekcja Krajowych Projektów Naukowych

Wasze pismo z dnia:                      Wasz znak:                      Nasz znak: RN-N/2131-4111/2018                      Data: 10.08.2018

*prof.dr hab. Piotr Dziągpiel*  
*Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka*

*Szanowny Panie,*

uprzejmie informuję, że w związku z pozytywną oceną Recenzenta, projekt badawczy pt. „**Ekspresja podoplaniny (D2-40) oraz jej wartość prognostyczna w raku urotelialnym pęcherza moczowego**” zgłoszony przez Państwa został skierowany do realizacji od 01.01.2018 r. Na jego realizację w 2018 r. przyznano kwotę: **2420,00 zł.** Przyznane środki finansowe należy wykorzystywać systematycznie w ciągu całego roku, z zastrzeżeniem, że do dnia **30 listopada 2018 roku** należy uruchomić wszystkie procedury związane z wykorzystaniem bieżącej dotacji. Dysponowanie środkami z dotacji roku poprzedniego możliwe jest wyłącznie do dnia **30 czerwca 2019 roku**. Po tym terminie środki przechodzą do dyspozycji Prorektora ds. Nauki.

Dysponowanie środkami będzie możliwe po dostarczeniu do **Centrum Wspierania Nauki, Sekcja Krajowych Projektów Naukowych (Budynek Rektoratu, IIp., pok. 20)**, w terminie do **30.09.2018 r.**, kalkulacji kosztów na rok bieżący, zgodnej z przyznanym finansowaniem. Numer ewidencyjny Projektu zostanie nadany po złożeniu wymaganej kalkulacji kosztów i potwierdzony przez e-mail z adresu: [spk@umed.wroc.pl](mailto:spk@umed.wroc.pl).

Wzory wymaganych formularzy są dostępne na stronie CWN: <https://www.nauka.umed.wroc.pl/dzial-nauki-formularze>. Bardzo proszę o przesłanie dokumentów zarówno w wersji papierowej, jak i edytowalnej wersji elektronicznej na adres: [spk@umed.wroc.pl](mailto:spk@umed.wroc.pl) (podając w tytule e-mail: imię i nazwisko Kierownika Projektu).

Wydatkowanie środków powinno być zgodne z **Zarządzeniem nr 29/XV R/2017 Rektora UMW** z dnia 29.03.2017 r. Warunkiem rozliczenia projektu własnego jest przedstawienie Prorektorowi ds. Nauki kopii co najmniej 1 publikacji w czasopiśmie z listy A MNiSW. W przypadku projektu promotorskiego końcowe rozliczenie projektu następuje po przedłożeniu oryginału zaświadczenia o uzyskaniu stopnia naukowego doktora w przypadku uczestników studiów doktoranckich.

Dodatkowo proszę Kierowników zadań badawczych rozpoczynających się w 2018 roku o przedłożenie do CWN do dnia **30.09.2018 r.** stosownej zgody właściwej komisji, jeżeli zadanie obejmuje badania z udziałem ludzi, zwierząt, itd. Jeżeli zgoda nie jest wymagana Kierownik zadania wraz z Kierownikiem jednostki zobowiązani są złożyć właściwe oświadczenie. Brak zgody właściwej Komisji lub oświadczenia spowoduje wstrzymanie finansowania projektu badawczego.

Osobą kontaktową w powyższej sprawie jest **Katarzyna Skowrońska-Dzierzba** tel. 71 784 14 90 e-mail: [spk@umed.wroc.pl](mailto:spk@umed.wroc.pl)

Z wyrazami szacunku

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka  
Zakład Histologii i Embriologii  
SEKRETARIAT

wpłynęło dnia *14.08.2018 r.*  
podpis *Kozłowski*

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
CENTRUM WSPIERANIA NAUKI  
mgr inż. *A. Skowrońska-Dzierzba*