

STRESZCZENIE

CYKL PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ PRACY DOKTORSKIEJ:

1. Michał Andrzej Matuszewski, Krzysztof Tupikowski, Łukasz Dołowy, Beata Szymańska, Janusz Dembowski, Romuald Zdrojowy.: Uroplakins and their potential applications in urology, Cent.Eur.J.Urol. 2016 Vol.69 no.3; s.252-257, , DOI: 10.5173/cej.2016.638 (**Pkt. MNiSW: 14.000**)
2. B[eata] Szymańska, M[ichał] Matuszewski, J[anusz] Dembowski, R[omuald] Zdrojowy, A[nn]a Długosz.: Uroplakin IIIa is a marker in bladder cancer but seems not to reflect chemical carcinogenesis, BioMed Res.Int. 2018 Vol.2018; art.8315410 [9 s.], DOI: 10.1155/2018/8315410 (**IF: 2.583, Pkt. MNiSW: 25.000**)
3. M[ichał] Matuszewski, B[eata] Szymańska, A[nn]a Długosz, B[artosz] Małkiewicz, J[anusz] Dembowski, A[gnieszka] Piwovar.: Preliminary evaluation of the diagnostic usefulness of uroplakin 2 with an assessment of the antioxidant potential of patients with bladder cancer BioMed Res.Int. 2018 Vol.2018; art.8693297 [9 s.] DOI: 10.1155/2018/8693297 (**IF: 2.583, Pkt. MNiSW: 25.000**)

Łączna punktacja za cykl:

Impact factor (IF): 5,166

Liczba punktów MNiSW/KBN: 64,0

Wstęp: Rak pęcherza moczowego (BC – bladder cancer) stanowi 7% nowotworów wśród populacji mężczyzn oraz 2% w populacji kobiet w Polsce. Według światowych danych epidemiologicznych rak ten stanowi siódmy pod względem częstości nowotwór wśród mężczyzn oraz siedemnasty wśród kobiet.

W diagnostyce raka pęcherza moczowego wykorzystuje się obecnie najczęściej metody radiologiczne, bardziej inwazyjne metody endoskopowe (cystoskopia, przezcewkowa resekcja guza) oraz badanie cytologiczne moczu. Nowotwór ten nadal pozostaje dużym wyzwaniem

diagnostycznym a wśród dostępnych badań diagnostycznych brakuje nieinwazyjnych metod służących do wczesnego wykrywania guza pierwotnego oraz nawrotu choroby.

Z powodu niskiej czułości oraz niewystarczającej ujemnej wartości predykcijnej badania cytologicznego moczu poszukiwane są markery raka pęcherza moczowego. Wśród dotychczas badanych markerów należy wymienić: białko NMP-22, receptor 3 czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR3/TERT), UroVysion (FISH) oraz analizę sekwencji mikrosatelitarnych (MSA – Microsatellite analysis). Niektóre z tych testów są dopuszczone do użytku przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA - *Food and Drug Administration*), ale tylko w połączeniu z kontrolną cystoskopią celem wykrycia wznowy guza. W porównaniu do badania cytologicznego cechują się one wyższą czułością lecz niższą swoistością. Ponadto na ich wyniki mogą wpływać inne schorzenia układu moczowego. Niewystarczająca powtarzalność wyników najczęściej związana jest ze stopniem skomplikowania wykonywania oznaczeń laboratoryjnych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że dotychczas przeprowadzone badania wg. wytycznych Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (EAU - *European Association of Urology*) nie pozwalają na zalecenie używania ich w rutynowej diagnostyce BC.

Uroplakiny są glikoproteinami występującymi w nabłonku dróg moczowych. Z tego powodu są badane jako potencjalne markery raka urotelialnego. W dostępnym piśmiennictwie brak jest badań opisujących stężenie uroplakiny II (UPII) i IIIa (UPIIIa) jednocześnie w moczu i w osoczu chorych na raka pęcherz moczowego oraz ich oceny jako czynnika prognostycznego raka pęcherza moczowego.

Cel: Celem pracy doktorskiej było określenie wartości prognostycznych stężeń uroplakiny II oraz IIIa u chorych na raka pęcherza moczowego a dokładniej:

1. Szczegółowa analiza obserwowanych stężeń UPII i UPIIIa w badanym materiale (mocz i osocze) u chorych z rakiem pęcherza moczowego, w zależności od stopnia zaawansowania (nowotwory nieinwazyjne – NMIBC, nowotwory inwazyjne – MIBC) oraz stopnia złośliwości (high grade –HG, low grade – LG)
2. Ocena użyteczności otrzymanych wyników poprzez analizę wartości predykcyjnych UPII i UPIIIa w różnych grupach chorych z BC.

Cel pracy doktorskiej zrealizowano poprzez przeprowadzenie dwóch projektów badawczych, których efektem było powstanie dwóch prac oryginalnych wchodzących w skład cyklu publikacji.

Metody: Grupę badaną stanowiło 61 pacjentów Kliniki Urologii i Onkologii Urologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu poddanych zabiegom przezcewkowej elektroresekcji guza pęcherza moczowego lub cystektomii radykalnej w latach 2014-2016. U pacjentów wykonano badanie histopatologiczne pozwalające na określenie stopnia inwazyjności nowotworu NMIBC/MIBC oraz stopnia złośliwości LG/HG. Grupę kontrolną stanowiły 33 osoby zdrowe. Wszyscy uczestnicy badania wypełnili ankietę uwzględniającą takie czynniki jak palenie tytoniu, narażenie na substancje kancerogenne, rodzinne występowanie nowotworów.

Materiał do badań laboratoryjnych stanowił mocz oraz osocze, które były pobrane przed wdrożeniem leczenia. Próbkę porannego moczu były odwirowane przez 10 minut (1438xg; 4°) i usunięto z nich supernatant. Osocze było pobierane na podłoże z antykoagulantem oraz odwirowane przez 10 minut (1438xg, 4°).

Poziom UPIIIa i UPII zmierzono przy użyciu testu immunoenzymatycznego (ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay) z wykorzystaniem zestawów Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit, USCN Life Science Inc., PRC (opracowane przez Cloud-Clone Corp. USA). Wyniki stężenia UPIIIa i UPII w moczu zostały odniesione do stężenia kreatyniny w moczu.

Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem programu Statistica 12 (StatSoft, Inc., USA). Poziom istotności statystycznej określono jako $p < 0,05$ dla wszystkich obliczeń.

Od wszystkich osób uzyskano świadomą zgodę na udział w prowadzonym badaniu. Uzyskano także zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (KB-292/2-16).

Wyniki:

Uroplakina IIIa

Wykazano średnie stężenie UPIIIa w moczu na poziomie 2,44 ng/mg kreatyniny w grupie badanej oraz 1,02 ng/mg w grupie kontrolnej. Opisywana różnica była istotna statystycznie ($p \leq 0,001$). Wyniki UPIIIa nie uwzględniające odniesienia do stężenia kreatyniny w moczu także były wyższe w grupie BC niż w grupie kontrolnej. Średnie stężenie UPIIIa w osoczu chorych z BC (1,47ng/ml) także było wyższe niż w grupie kontrolnej (0,58ng/ml) ($p \leq 0,001$).

Nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych w stężeniach UPIIIa w moczu i osoczu w odniesieniu do inwazyjność nowotworu (NMIBC oraz MIBC), przy czym w obu grupach wyniki były wyższe niż u osób zdrowych z grupy kontrolnej ($p \leq 0,001$). Podobnie nie stwierdzono różnicy statystycznej pomiędzy grupami LG i HG raka pęcherza moczowego. Porównanie grup LG/grupa kontrolna oraz HG/grupa kontrolna wykazało istotne różnice dla stężenia UPIIIa ($p \leq 0,001$).

Nie wykazano istotnych różnic stężenia UPIIIa w moczu i osoczu palących i niepalących osób z rakiem pęcherza moczowego. Tylko pomiędzy niepalącymi osobami zdrowymi a palącymi chorymi zaobserwowano istotne różnice stężenia UPIIIa w moczu i osoczu ($p \leq 0,05$). Analiza grupy kontrolnej wykazała brak różnic pomiędzy zdrowymi palącymi i niepalącymi, co wskazuje, że palenie tytoniu nie wpływa na stężenia UPIIIa u osób zdrowych.

Opracowano krzywe ROC (receiver operating characteristic) w celu określenia wartości diagnostycznych i prognostycznych stężeń UPIIIa. Stwierdzono że pomiar stężenia UPIIIa w moczu cechuje się 69% czułością i 89% swoistością, a w osoczu wyniki te są nieznacznie wyższe (79% i 91%). Pole pod krzywą (AUC – area under the curve) wynosiło 0,78 dla próbek moczu i 0,85 dla osocza. Uzyskane wyniki wskazują na dobre wartości diagnostyczne UPIIIa w osoczu (AUC powyżej 0,8). Dodatnia wartość predykcyjna (PPV – positive predictive value) była nieznacznie wyższa w osoczu (0,94) niż w moczu (0,913).

Uroplakina II

Średnie stężenie UP II w osoczu chorych na raka pęcherza moczowego było 1,4x wyższe niż w grupie kontrolnej ($p \leq 0,001$), podczas gdy w moczu średnie stężenie UPII było 3,4x wyższe w grupie BC niż w grupie kontrolnej ($p \leq 0,001$).

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniu UPII zarówno w osoczu i moczu pomiędzy NMIBC a MIBC, ale różnice były istotne pomiędzy ww. grupami a grupą kontrolną ($p \leq 0,001$). Podobne wyniki uzyskano w grupach LG i HG. Nieistotne różnice występowały w moczu i osoczu palących i niepalących pacjentów. Tylko pomiędzy mężczyznami i kobietami z grupy BC różnica w stężeniu osoczowej UPII była istotna ($p \leq 0,001$). Podobnych różnic nie zaobserwowano w grupie kontrolnej ($p > 0,05$).

Zbadano wartość diagnostyczną stężeń UPII w obu materiałach biologicznych, wykazując wysokie wartości swoistości i czułości UPII w osoczu (76%, 80%) oraz moczu (88%, 84%).

Otrzymane wyniki wskazują, że pomiar stężeń UPII metodą immunoenzymatyczną cechuje się dobrą wartością diagnostyczną dla chorych z grupy BC. Obliczono także AUC, uzyskując wynik 0,79 dla osocza oraz 0,89 dla moczu. Potwierdza to dobrą wartość diagnostyczną stężeń UPII w osoczu i moczu (wartość powyżej 0,8). Wartość graniczną dla stężenia UPII określona na poziomie 3,107ng/ml w osoczu i 0,104 ng/mg kreatyniny w moczu.

Wnioski:

1. Rozwój raka pęcherza moczowego związany jest z destrukcją urothelium, w trakcie której dochodzi do uwalniania elementów tworzących nabłonek dróg moczowych, m.in. uroplakin. Potwierdzeniem tego są wyższe wartości stężeń UPII i UPIIIa w moczu osób z grupy BC.
2. Część z uwalnianych w trakcie uszkodzenia urothelium białek przedostaje się do krwioobiegu, za czym przemawia wyższe stężenie UPII i UPIIIa w osoczu osób chorych na raka pęcherza moczowego.
3. Na podstawie oznaczania stężeń UPII i UPIIIa w moczu oraz osoczu nie można określić czy nowotwór cechuje się inwazyjnością (MIBC/NMIBC) lub wyższym stopniem złośliwości (HG/LG).
4. Nowotwory pęcherza moczowego o niskim stopniu złośliwości (LG) cechują się istotnie wyższymi stężeniami UPII i UPIIIa w moczu i osoczu niż w grupie osób zdrowych. Pozwala to upatrywać potencjalne zastosowanie oznaczania stężeń UPII i UPIIIa w tej grupie chorych, bowiem powszechnie stosowane badanie cytologiczne moczu cechuje się niską czułością i swoistością w grupie chorych z nowotworami LG.
5. Uzyskane wyniki potwierdzają, że oznaczanie stężenia UPIIIa metodą immunoenzymatyczną cechuje się dobrą wartością diagnostyczną dla chorych z rakiem pęcherza moczowego. Także wartość prognostyczna (PPV) jest wysoka ale nie wykazuje różnicy w zależności od stopnia zaawansowania oraz złośliwości nowotworu.
6. Oznaczanie stężenia UPII metodą immunoenzymatyczną w osoczu oraz szczególnie w moczu cechuje się dobrą wartością diagnostyczną i prognostyczną (AUC powyżej 0,8) u chorych na raka pęcherza moczowego.
7. Palenie tytoniu nie wpływa na poziom oznaczanych stężeń UPII i UPIIIa.

ABSTRACT

Introduction: Bladder cancer (BC) represents 7% carcinoma in male and 2% of female population in Poland. Worldwide it is on seventh place among men and seventeen among women according to frequency of morbidity.

In diagnosis of BC radiological methods, invasive procedures (cystoscopy, transurethral resection of bladder tumor (TURB-T)) and cytological examination of urine are used. However bladder cancer is still a great diagnostic challenge and there is a deficiency of non-invasive diagnostic methods, which could be used in early detection of primary tumor and in follow-up.

According to the low sensitivity and low negative predictive value of urine cytology new markers of bladder cancer are evaluated. Among previously studied BC markers need to be mentioned: nuclear matrix protein 22 (NMP-22), fibroblast growth factor receptor 3 FGFR3/TERT, UroVysion (FISH) and microsatellite analysis (MSA). Some of listed tests are approved to diagnostic use by Food and Drug Administration (FDA) but only in combination with control cystoscopy for the detection of cancer recurrence. In comparison to urine cytology these tests have higher sensitivity but lower specificity. Moreover other diseases of urinary tract could affect on their results. Also complicated laboratory method is connected with insufficient reproducibility of these tests. It is important to mention, that Guidelines of European Urology Association (EAU) based on performed studies do not allow their usage in routine diagnostic method of bladder cancer.

Uroplakins are glycoproteins which are presented in urothelium. Due to this fact they are evaluated as a potential marker of urothelial cancer. In published researches there are any study, which evaluate levels of UPII and UPIIIa in urine and plasma of BC patients as a prognostic tests of bladder cancer.

Aim: Aim of PhD thesis was to estimate the prognostic value of uroplakin II and IIIa in bladder cancer, or more specifically:

1. Detailed analysis of UPII and UPIIIa levels in research materials (urine and plasma) in patients with bladder cancer according to the level of tumor stage (non-invasive neoplasm – NMIBC, invasive neoplasm – MIBC) and grade (high grade – HG, low grade – LG).

2. Evaluation of study results by analysis of predictive value of UPII and UPIIIa levels in different groups of BC patients.

Researches were performed in two projects and two original articles were published, which are a part of series of articles.

Materials and method: The study group is comprised of 61 BC patients of the Urology and Oncological Urology Department (Wroclaw Medical University) hospitalized between September 2014 and July 2015. Transurethral resection of bladder tumor or radical cystectomy and histopathological examination of tissue taken by during surgical procedure were performed. Based on histopathological examination stage (NMIBC/MIBC) and grade (LG/HG) were stated. The control group was consisted of 33 healthy persons. All patients filled questionnaire about: smoking, environmental risk factors of cancerogenesis and hereditary cancers.

Urine and plasma were materials for laboratory tests and were obtained before surgical treatment. Morning urine samples were collected in polystyrene containers and then centrifuged for 10minutes (1438xg at 4°). Blood samples were collected into plastic tubes with an anticoagulant and centrifuged at 1438xg for at least 10 min at 4°C.

UPIIIa an UPII levels were measured in urine and plasma by an immunoenzymatic (ELISA) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit, USCN Life Science Inc., PRC (designed by Cloud-Clone Corp. USA). Levels of UPIIIa and UPII in urine were calculated in relation to the urine creatinine level.

Statistical analysis was conducted with Statistica PL software (version 12.1). The values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

All patients were informed about the study, participation was voluntary, and all signed written informed consent. The study was approved by Ethics Committee of Wroclaw Medical University (KB-292/2-16).

Results

Uroplakin IIIa

The mean urine level of UPIIIa was 2.44 ng/mg of creatinine (cr.) in the group of patients with BC and 1.02 ng/mg cr. in the control group. The difference was statistically significant ($p \leq 0.001$). The results of UPIIIa measurement without calculating the creatinine level were also

higher than in the control group. The mean plasma level of UPIIIa in BC patients (1.47 ng/ml) was higher than in the control group (0.58 ng/ml) ($p \leq 0.001$). There was no statistically significant difference of UPIIIa level in either plasma or urine between nonmuscle invasive bladder cancer (NMIBC) and invasive bladder cancer (MIBC), but in both groups the UPIIIa level was higher than in the control group ($p \leq 0.001$). Similar results were obtained in LG and HG groups in BC. No significant difference in UPIIIa level in urine or plasma between low grade and high grade BC tumour was noted. A significant difference between LG/control group and also HG/control was observed. The comparison of HG/control and LG/control showed statistically significant differences ($p \leq 0.001$), which is interesting and indicates additional value of UPIIIa level in LG diagnosis. No significant difference between UPIIIa level in BC smokers and non-smoking patients was observed, in either urine or plasma. Only between BC smokers and healthy controls was the difference significant in both urine and plasma ($p < 0.05$). The examination of control group showed a lack of difference between UPIIIa level in smokers and non-smokers. It confirms that smoking does not influence UPIIIa level in healthy people.

The receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to estimate the diagnostic and prognostic value of UPIIIa. It was found that the measurement of UPIIIa level has a 69% sensitivity and 89% specificity in urine and a little higher in plasma (79%, 91%). The area under the curve (AUC) was calculated as 0.78 in urine and 0.85 in plasma. It indicates good diagnostic value of UPIIIa in plasma (over 0.8).

The PPV was a little higher in plasma (0.94) but also high in urine (0.913). The results show that the level of UPIIIa measured by immunoenzymatic methods has good diagnostic value in bladder cancer. Also the prognostic value (PPV) seems to be high, but there are no significant differences in UPIIIa level according to grade and stage of BC.

Uroplakin II

The mean plasma concentration of UP2 in BC group was 1.4 higher than in the control group ($p \leq 0.001$), whereas the mean urine concentration of UP2 in group of patients with BC was 3.4 higher than in the control group ($p \leq 0.001$). There were no statistically significant differences of UP2 concentration both in plasma or in urine between non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) and invasive bladder cancer (MIBC) but in both groups UP2 concentration was higher than in the control C ($p \leq 0.001$). Similar trend of results was obtained in LG and HG groups. Non-significant differences between UP2 concentration in smokers and no-smoking patients were also

observed, both in urine and in plasma. Only between BC men and BC women difference was significant in plasma UP2 concentration ($p \leq 0.001$), while any significant difference between the concentrations of UP2 in the plasma of women and men in the control group was found ($p > 0.05$).

A low positive correlation between the UP2 excreted into urine and age and higher correlation between UP2 in plasma and sex were noted only in patients group.

The diagnostic value of the examined tested UP2 in both biological fluids was evaluated. The high specificity and sensitivity for UP2 in plasma (76%, 80%, respectively) and urine (88%, 84%, respectively) were observed. The results show that the concentration of UP2 measured by immunoenzymatic methods has a good diagnostic value in BC group. The AUC was calculated as 0.79 in plasma and 0.89 in urine. It points a good diagnostic value of UP2 in plasma or in urine (over 0.8). The designated cut-off points were for UP2 in plasma 3.107 ng/ml and for UP2 in urine 0.104 ng/mg cr., respectively.

Conclusions:

1. Growth of the bladder cancer is related with the destruction of urothelium. During this process elements of the urothelium like uroplakins are released. Confirmation of this are higher levels of UPII and UPIIIa concentrations in urine of BC patients.
2. Some of the released from urothelium proteins penetrate into vascular system. Argumentation of this are higher concentrations of UPII and UPIIIa in plasma of patients with bladder cancer.
3. Measurement of urine and plasma concentration of UPII and UPIIIa is insufficient to diagnose the tumor stage (NMIBC/MIBC) or grade (HG/LG).
4. Low grade (LG) bladder tumor are related with statistically significant higher concentration of UPII and UPIIIa in urine and plasma compared to healthy persons. This fact can play a role in possible application of UPII and UPIIIa testing in this patients group because of the low sensitivity and specificity of urine cytology in group of patients with LG bladder cancer.
5. Obtained results confirmed that measurement of UPIIIa concentration with immunoenzymatic method has a good diagnostic value. Also positive prognostic value (PPV) is high, but not correlate with tumor stage or grade.

6. Measurement of UPII concentration with immunoenzymatic method in plasma and especially in urine has a good diagnostic value (AUC over 0.8) in bladder cancer patients.
7. Smoking does not affect concentration levels of UPII and UPIIIa.