

**Aleksandra Semeniuk-Wojtaś**

**PROPOZYCJA NOWEGO MODELU PROGNOSTYCZNEGO U CHORYCH NA  
NIENACIEKAJĄCEGO MIĘŚNIÓWKI RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO**

**Streszczenie**

Rak pęcherza moczowego jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych na świecie. U większości chorych rozpoznawany jest w stadium Ta, Tis lub T1. Podstawą leczenia choroby w tym stopniu zaawansowania jest przezcewkowa elektroresekcja guza (TURBT, ang. *transurethral resection of bladder tumor*). Badania obserwacyjne wskazują jednak, że prawie u połowy chorych leczonych za pomocą metody TURBT dochodzi do wznowy choroby. Występowanie nawrotów wiąże się z koniecznością regularnego wykonywania kontrolnych cystoskopii w celu wykrycia ewentualnej wznowy. Metodą zmniejszającą ryzyko nawrotu choroby o najwyższej skuteczności, stosowaną w grupie pacjentów o pośrednim i wysokim ryzyku nawrotu, jest uzupełniająca dopęcherzowa immunoterapia BCG. Terapia ta wiąże się jednak z licznymi działaniami niepożądanymi. Ograniczeniem w stosowaniu tej formy leczenia są również trudności z dostępnością prątków BCG, dlatego też konieczne jest opracowanie metod pozwalających na wyodrębnienie grupy chorych, którzy posiadają rzeczywiste wskazania do BCG-terapii i uzyskają z niej największe korzyści.

**Założenia**

Rak pęcherza moczowego nienaciekający błony mięśniowej charakteryzuje się częstym występowaniem nawrotów i progresji do raka naciekającego błonę mięśniową. Metodą zmniejszającą ryzyko wznowy choroby o najwyższej skuteczności, stosowaną w grupie chorych o pośrednim i wysokim ryzyku nawrotu, jest uzupełniająca dopęcherzowa immunoterapia BCG, której podanie wiąże się z licznymi działaniami niepożądanymi. Aktualnie szeroko stosowanymi narzędziami określającymi prawdopodobieństwo nawrotu choroby nowotworowej u pacjentów po przebytych zabiegach przezcewkowej resekcji guza pęcherza moczowego są modele prognostyczne stworzone przez EORTC i CUETO oraz tabela grup ryzyka opracowana przez EAU. Dostępne algorytmy opierają się na danych o przebiegu choroby nowotworowej u chorych na raka pęcherza moczowego, u których stosowano leczenie uzupełniające w celu poprawy wskaźników wyleczalności. Wobec powyższego,

wykorzystywanie przedstawionych modeli prognostycznych u chorych po zabiegu usunięcia raka pierwotnego wydaje się nie być optymalne. Dane z piśmiennictwa wskazują ponadto, że przeszacowują one ryzyko nawrotu i progresji choroby w niektórych grupach pacjentów.

Wymienione przyczyny powodują, że zasadne jest opracowanie nowych, prostych metod, które pozwoliłyby na bardziej precyzyjną stratyfikację ryzyka nawrotu i identyfikację grupy pacjentów o wysokim ryzyku wznowy choroby bezwzględnie wymagającej dopęcherzowej immunoterapii BCG.

### **Cele badania**

- Analiza immunohistochemiczna ekspresji białek p53, Ki-67, surwiwiny,  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny, N-kadheryny w raku pęcherza moczowego nienaciekającym błony mięśniowej;
- Analiza zależności pomiędzy ekspresją p53, Ki-67, surwiwiny,  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny, N-kadheryny a stopniem zróżnicowania histologicznego i zaawansowania anatomicznego
- raka pęcherza;
- Określenie wartości prognostycznej poziomu ekspresji wybranych na podstawie piśmiennictwa biomarkerów: p53, Ki-67, surwiwiny,  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny, N-kadheryny;
- - Opracowanie nowego, bardziej precyzyjnego modelu prognostycznego dla chorych na raka pęcherza moczowego nienaciekającego błony mięśniowej po przebytej przezcewkowej elektroresekcji guza pęcherza moczowego.

### **Material i metody**

Na wykonanie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Wojskowego Instytutu Medycznego. Projekt został sfinansowany w ramach działalności statutowej (projekt statutowy - grant promotorski dla młodego naukowca nr 477).

Material wykorzystany do badań stanowiły fragmenty raka brodawczakowatego pęcherza moczowego z Kliniki Urologii Ogólnej, Czynnościowej i Onkologicznej Wojskowego Instytutu Medycznego uzyskane podczas przezcewkowej elektroresekcji guza pęcherza moczowego w latach 2010-2015.

Kryteria włączenia do badania obejmowały: potwierdzony histopatologicznie rak pęcherza moczowego nienaciekający błony mięśniowej w momencie rozpoznania, ukończony 18 rok życia, 12-miesięczny okres obserwacji po usunięciu nowotworu. Kryteria wyłączenia

z badania związane były z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego przed rozpoczęciem okresu rekrutacji oraz wystąpienie wznów nowotworu w obrębie górnych dróg moczowych.

Badaną grupę stanowiło 164 chorych na raka brodawkowatego pęcherza moczowego. Pacjenci różnili się pod względem stopnia zaawansowania histologicznego nowotworu i stopnia naciekania ściany pęcherza moczowego. U 10 (6,1%) chorych po badaniu histologicznym guza usuniętego podczas TURBT rozpoznano raka śród nabłonkowego (Tis), u 61 (37,2%) pacjentów stwierdzono nienaciekającego raka brodawkowatego (stadium Ta), u 30 (18,3%) chorych nowotwór naciekał podnabłonkową tkankę łączną (stadium T1). U 63 chorych (38,4%) nie można było określić stopnia naciekania ściany pęcherza moczowego przez nowotwór. Najczęściej rozpoznawanym stopniem zróżnicowania histologicznego był pośrednio zróżnicowany (G2) rak pęcherza moczowego, który został rozpoznany u 78 (47,56%) chorych. Pozostały odsetek stanowił rak wysokozróżnicowany (G1) zdiagnozowany u 69 (42,07%) pacjentów oraz rak niskozróżnicowany (G3) zidentyfikowany u 16 (9,76%) chorych. U 1 (0,61%) chorego nie określono stopnia zróżnicowania histologicznego.

Do oceny ekspresji badanych białek wykorzystano monoklonalne przeciwciała mysie firmy DAKO. Efektem końcowym wykonanych odczynów było wytrącenie brązowego osadu w obrębie odpowiedniego przedziału komórek raka. Immunohistochemiczną analizę poziomu ekspresji  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny, N-kadheryny, białka p53, białka Ki-67 i surwiwiny wykonano u 134 (81,7%) chorych. Materiał tkankowy pozostałych 30 (18,3%) pacjentów nie został oceniony z uwagi na całkowite wykorzystanie tkanek usuniętych podczas TURBT do barwień mających na celu postawienie pierwotnej diagnozy. Barwienia poziomu ekspresji  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny, N-kadheryny oceniano wykorzystując czterostopniową półilościową skalę opisującą stopień zabarwienia błony komórkowej. Oceniając wynik reakcji przeprowadzonych dla białka p53, białka Ki-67 i surwiwiny określano odsetek wybarwionych komórek oraz intensywność uzyskanego odczynu barwnego, a następnie sumowano uzyskane wartości. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w postaci średniej z odchyleniem standardowym, bądź w postaci mediany z podaniem wartości skrajnych. Badanie powiązań pomiędzy rozważanymi zmiennymi wykonano przy użyciu testu korelacji Spearmana. W celu oceny potencjalnego wpływu zmiennych niezależnych na długość czasu wolnego od nawrotu choroby wykonano jednoczynnikową analizę regresji proporcjonalnego hazardu Coxa. Zmienne mający istotny wpływ na długość czasu wolnego od nawrotu zostały następnie użyte do budowy modelu regresji wieloczynnikowej proporcjonalnego hazardu Coxa.

## Wyniki

Pośrednie nasilenie odczynu barwnego dla  $\beta$ -kateniny wykazano w 6 (4,48%), a wysokie w 128 (95,52%) badanych przypadkach. Ekspresja E-kadheryny została potwierdzona we wszystkich badanych tkankach w wysokim nasileniu. Ekspresję N-kadheryny wykazano u 5 (3,73%) chorych - niskie nasilenie odczynu stwierdzono u 2 (1,49%) a pośrednie u 3 (2,34%) chorych. Ekspresję białka p53 potwierdzono w 129 (96,27%) badanych tkankach. U 9 chorych (6,72%) dodatni odczyn jądrowy wykazano w 66-100% komórek nowotworowych. Stopień intensywności wybarwienia jąder komórkowych był niski w 18 (13,43%) przypadkach, pośredni w 78 (58,21%) przypadkach, a wysoki u 33 (24,63%) chorych. Ekspresję białka Ki-67 wykazano u wszystkich chorych. U 9 chorych (6,72%) odsetek wybarwionych jąder komórkowych był niższy od 1%. Stopień intensywności wybarwienia jąder komórkowych był niski w 7 (5,22%) przypadkach, pośredni w 8 (5,97%) przypadkach, a wysoki w pozostałych 119 (88,81%) przypadkach. Ekspresję surwiwiny stwierdzono w 128 (95,52%) przypadkach. U 35 chorych (26,12%) odsetek wybarwionych jąder komórkowych był niższy od 1% zaś u 4 chorych (2,96%) wynosił ponad 66%. Stopień intensywności wybarwienia jąder komórkowych był niski u 53 (39,55%) chorych, pośredni u 57 (42,54%) chorych a wysoki u pozostałych 18 (13,43%) chorych.

Analizując stopień ekspresji białka Ki-67 wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy odsetkiem wybarwionych jąder komórkowych a stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu. Poziom ekspresji białka p53 wykazywał znamiennej korelację ze stopniem złośliwości histologicznej, wielkością zmiany i liczbą zmian nowotworowych, a poziom ekspresji surwiwiny korelował ze stopniem zaawansowania histologicznego i stopniem naciekania ściany pęcherza moczowego przez nowotwór.

Prezentowane badanie wykazało istotną statystycznie zależność pomiędzy czasem przeżycia wolnym od nawrotu choroby (RFS, ang. *recurrence free survival*) a wielkością największego ogniska nowotworowego ( $p=0,001$ ), liczbą ognisk nowotworowych stwierdzonych podczas cystoskopii ( $p=0,01$ ), intensywnością odczynu jądrowego dla białka p53 ( $p=0,001$ ), surwiwiny ( $p=0,12$ ) i białka Ki-67 ( $p=0,048$ ), odsetkiem wybarwionych jąder komórkowych dla Ki-67 ( $p=0,0004$ ) oraz stosowaniem leczenia uzupełniającego BCG ( $p=0,0004$ ).

W celu wyodrębnienia grupy pacjentów o największym ryzyku wystąpienia nawrotu choroby, którzy mogliby odnieść największe korzyści z zastosowania uzupełniającej immunoterapii BCG stworzono model RECINT (RECURRENT IN NOT TREATED) zbudowany z parametrów kliniczno – patologicznych, które wykazywały najsilniejszą

korelację z nawrotem choroby w podgrupie chorych, którzy nie otrzymali BCG-terapii. Na podstawie wykonanych analiz do modelu włączono następujące zmienne: wielkość ogniska nowotworowego ( $HR\ 1,154\ [95\%CI: 1,015-1,313];\ p=0,0291$ ), intensywność odczynu barwnego dla p53 ( $HR\ 2,969\ [95\%CI: 1,154-7,642];\ p=0,0053$ ), intensywność odczynu jądrowego dla Ki-67 ( $HR\ 1,767\ [95\%CI: 1,183-2,638];\ p=0,024$ ) oraz intensywność odczynu jądrowego dla surwiwiny ( $HR\ 1,454\ [95\%CI: 1,05-2,013];\ p=0,024$ ). Po przydzieleniu zmiennym odpowiednich wartości punktowych, badaną populację chorych podzielono na 4 grupy różniące się sumą wyznaczonych punktów. Grupa pierwsza utworzona była przez chorych, którzy uzyskali 0-6 punktów, grupę drugą tworzyli chorzy, którzy otrzymali 7-8 punkty, trzecią 9-10 punktów i grupę czwartą chorzy, którzy otrzymali 11-14 punktów. Prawdopodobieństwo wystąpienia nawrotu choroby nowotworowej w ciągu roku od usunięcia ogniska pierwotnego oszacowane przy użyciu stworzonego modelu w grupie pierwszej (suma 0-6 punktów) było niższe niż w grupie pacjentów leczonych BCG, wynosiło 16% i nie zmieniało się istotnie w kolejnych latach obserwacji, natomiast ryzyko wznowy u pacjentów należących do grupy czwartej (suma 11-14 punktów) w ciągu pierwszego roku wynosiło aż 73% ( $p<0,001$ ).

## **Wnioski**

- Rak pęcherza moczowego nienaciekający błony mięśniowej wykazuje wysoki, jednorodny poziom ekspresji białek zaangażowanych w utrzymanie połączeń międzykomórkowych oraz zróżnicowany poziom ekspresji białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego.
- Poziom ekspresji białek p53, Ki-67 i surwiwiny koreluje ze stopniem zaawansowania histologicznego, głębokością naciekania ściany pęcherza moczowego przez nowotwór oraz z liczbą i średnicą zmian nowotworowych.
- Stopień intensywności wybarwionych jąder komórkowych dla p53, Ki-67 i surwiwiny, poziom ekspresji białka Ki-67 oraz wielkość zmiany nowotworowej są czynnikami niezależnie związanymi z ryzykiem nawrotu raka brodawkowatego pęcherza moczowego, pozwalającymi na konstrukcję nowego modelu prognostycznego uwzględniającego czas wolny od nawrotu choroby nowotworowej.
- Opracowany model prognostyczny RECINT istotnie różnicuje pacjentów w zależności od ryzyka nawrotu choroby i pozwala wskazać tę grupę chorych, która może odnieść największą korzyść z zastosowania leczenia uzupełniającego BCG.

# **THE PROPOSITION OF NEW PROGNOSTIC MODEL IN PATIENTS WITH NON-MUSCLE-INVASIVE BLADDER CANCER**

## **SUMMARY**

Bladder cancer is one of the most common malignant tumors in the world. In the majority of patients, it is diagnosed at the mucosal (Ta, CIS) or submucosal stage. The main treatment for this stage of bladder cancer is transurethral resection of bladder tumor (TURBT). However, observational studies indicate that almost half of patients undergoing TURBT experience a recurrence of the disease. The risk of recurrence is associated with the need to regularly perform control cystoscopy in order to detect recurrent cancer. The method that most effectively reduces the risk of recurrence and is used in the group of patients with moderate and high recurrence risk is adjuvant intravesical BCG immunotherapy, which is, however, associated with numerous adverse effects. The use of this form of treatment is also limited by shortage of BCG supply; therefore, it is necessary to develop methods that allow the identification of a group of patients who have real indications for BCG therapy and will benefit the most from it.

## **Assumptions**

Bladder cancer in the Ta, Tis or T1 stage is characterized by the frequent recurrence and progression to cancer infiltrating the muscle layer. The method that most effectively reduces the risk of recurrence is intravesical BCG immunotherapy, which is, however, associated with numerous adverse effects.

Currently, widely used tools for the assessment of the probability of tumor recurrence in patients after transurethral resection of the bladder cancer are the prognostic models created by EORTC and CUETO and the risk groups table developed by EAU. The available algorithms are based on information about the course of the disease in bladder cancer patients who were receiving adjuvant therapy aimed, inter alia, at increasing the percentage of patients without recurrence of cancer; therefore the use of this tools for estimating the likelihood of recurrence in patients after removal of primary tumor is not optimal. Data from the literature also indicate that they overestimate the risk of recurrence and progression in some groups of patients. These factors provide rationale for developing new, simple methods that would allow more precise stratification of the risk of recurrence and identification of a group of patients with

a high risk of recurrence who absolutely requires intravesical BCG immunotherapy and will benefit the most from it.

### **The aim of the study**

- Immunohistochemical analysis of the expression of p53, Ki-67,  $\beta$ -catenin, E-cadherin, N-cadherin, and survivin in bladder cancer.
- Analysis of the relationship between the expression of p53, Ki-67,  $\beta$ -catenin, E-cadherin, N-cadherin, survivin and the histological grade and anatomical extent of bladder cancer.
- Determination of the prognostic value of the expression level of: p53, Ki-67,  $\beta$ -catenin, E-cadherin, N-cadherin, survivin,
- Development of a prognostic model for patients with non-muscle-invasive bladder cancer after transurethral resection of the bladder tumor.

### **Material and methods**

The approval of the Bioethics Commission of the Military Institute of Medicine in Warsaw was obtained for conducting the study. The project was financed as part of the statutory activity (statutory project – a supervisor grant for a young scientist No. 477).

The material used for the study were fragments of papillary carcinoma of the bladder from the Department of General, Functional and Oncological Urology of the Military Institute of Medicine in Warsaw obtained during transurethral resection of the bladder tumor between 2010 and 2015. Criteria for inclusion in the study included: histopathologically confirmed bladder cancer that was non-muscle-invasive at diagnosis, 18 years of age, 12-month follow-up after tumor resection. The exclusion criterion was the diagnosis of bladder cancer before the start of the recruitment and tumor recurrence within the upper urinary tract.

The study group consisted of 164 patients with papillary carcinoma of the bladder. Patients differed in the histological grade of the cancer and the extent of bladder wall invasion. In 10 (6.1%) patients histopathological examination of the tumor removed during TURBT showed intraepithelial carcinoma (Tis), in 61 (37.2%) patients – non-invasive papillary carcinoma (Ta), in 30 (18.3%) patients the tumor infiltrated the sub-epithelial connective tissue (T1). In 63 patients (38.4%), the extent of infiltration of the bladder wall by the tumor could not be determined. The most frequently diagnosed histopathological grade was moderately differentiated (G2) carcinoma, which was found in 78 (47.56%) patients. Highly differentiated

carcinoma (G1) was diagnosed in 69 (42.07%) patients and low-differential carcinoma (G3) – in 16 (9.76%) patients. In 1 (0.61%) patient histopathological grade was not determined.

Monoclonal mouse antibodies (DAKO) were used to evaluate the expression of the studied proteins. The final result of the reactions was the precipitation of a brown deposit within the specific compartments of cancer cells. Immunohistochemical analysis of the expression level of  $\beta$ -catenin, E-cadherins, N-cadherins, p53 proteins, Ki-67 proteins and survivin was performed in 134 (81.7%) patients. The tissue material of the remaining 30 (18.3%) patients could not be subjected to histopathological analysis, because all tissues removed during TURBT were used for staining aimed at establishing the initial diagnosis.

The staining for  $\beta$ -catenin, E-cadherin and N-cadherin levels was assessed using a four-grade semi-quantitative scale describing the intensity of coloration of the cell membrane. When assessing the results of reactions carried out for p53 protein, Ki-67 proteins and survivin, the percentage of stained cells and the intensity of the obtained color reaction were determined, and then the obtained values were summed up.

The obtained results were presented as mean and standard deviation, or as median and range (the minimum and maximum values). The analysis of relationships between the variables of interest was performed using the Spearman correlation test. In order to assess the potential effect of independent variables on the recurrence free survival, univariate Cox proportional hazard regression analysis was performed. Variables having a significant impact on the recurrence-free survival were then used to create a Cox proportional hazard regression model.

## **Results**

The moderate intensity of the reaction for  $\beta$ -catenin was found in 6 (4.48%) and high in 128 (95.52%) patients. High expression of E-cadherin was confirmed in all tissues tested. The expression of N-cadherin was demonstrated in 5 (3.73%) patients – low intensity of the reaction was found in 2 (1.49%) and moderate in 3 (2.34%) patients. The expression of the p53 protein was confirmed in 129 (96.27%) of the examined tissues. In 9 patients (6.72%), positive nuclear reaction was demonstrated in 66–100% of cancer cells. Staining intensity of the cell nuclei was low in 18 (13.43%) patients, moderate in 78 (58.21%) patients and high in 33 (24.63%) patients. Expression of Ki-67 protein was demonstrated in all analyzed cases. In 9 patients (6.72%), the percentage of stained cell nuclei was less than 1%. Staining intensity of the cell nuclei was low in 7 (5.22%) cases, moderate in 8 (5.97%) cases and high in the other 119 (88.81%) cases. Survivin expression was found in 128 (95.52%) cases. In 35 patients (26.12%), the percentage



of stained cell nuclei was less than 1% and in 4 patients (2.96%) it was over 66%. Staining intensity of the cell nuclei was low in 53 (39.55%) patients, moderate in 57 (42.54%) patients and high in the remaining 18 (13.43%) patients.

When analyzing the expression of the Ki-67 protein, a statistically significant relationship was found between the percentage of stained cell nuclei and the histological grade of the tumor. The level of p53 expression showed a significant correlation with the grade of histological malignancy, the size of the neoplastic lesion and the number of lesions, whereas the level of survivin expression correlated with the histological grade and the depth of infiltration of the bladder wall by the tumor.

The study showed a statistically significant relationship between recurrence free survival (RFS) and the size of the largest neoplastic lesion ( $p = 0.001$ ), the number of neoplastic lesions found during cystoscopy ( $p = 0.01$ ), the intensity of the nuclear reaction for p53 ( $p = 0.001$ ), survivin ( $p = 0.12$ ) and Ki-67 ( $p = 0.048$ ), the percentage of stained cell nuclei for Ki-67 ( $p = 0.0004$ ) and the use of adjuvant BCG therapy ( $p=0.0004$ ).

In order to identify the group of patients with the highest risk of recurrence, who could benefit the most from adjuvant BCG immunotherapy, the RECINT (RECURRENCE IN NOT TREATED) model was created, based on clinical and pathological parameters that showed the strongest correlation with the recurrence of the disease. Based on the analyzes performed, the following variables were included in the model: tumor size ( $HR 1,154 [95\%CI: 1,015-1,313]; p=0,0291$ ), intensity of the color reaction for p53 ( $HR 2,969 [95\%CI: 1,154-7,642]; p = 0.0053$ ), intensity of the nuclear reaction for Ki-67 ( $HR 1,767 [95\%CI: 1,183-2,638]; p=0,024$ ) and intensity of the nuclear reaction for survivin ( $HR 1,454 [95\%CI: 1,05-2,013]; p=0,024$ ). After assigning the appropriate point values to the variables, the studied population of patients was divided into 4 groups differing in the sum of the designated points. The first group was formed by the patients, who scored 0-6 points, the second group was formed by the patients who received 7-8 points, the third - 9-10 points and the fourth group - patients who received 11-14 points. The probability of tumor recurrence within one year of primary tumor removal estimated using the model created was lower in the first group (sum of 0–6 points) than in the BCG-treated group; it was 16% and did not change significantly in subsequent years of observation, whereas the risk of recurrence in patients assigned to the fourth group (the sum of 11-14 points) in the first year was as much as 73% ( $p < 0.001$ ).

## **Conclusions**

- The non-muscle-invasive bladder cancer shows high levels of expression of all proteins involved in the maintenance of intercellular connections and various levels of expression of proteins involved in the regulation of the cell cycle.
- The level of expression of p53, Ki-67 and survivin proteins correlates with the histological grade, depth of bladder wall infiltration by the tumor and the number and diameter of neoplastic lesions.
- The intensity of cell nuclei staining for p53, Ki-67 and survivin, the level of Ki-67 protein expression and tumor size are independently associated with the risk of recurrent bladder cancer, allowing the development of a new prognostic model for the recurrence free survival.
- The developed prognostic model, RECINT, categorizes patients depending on the risk of recurrence and allows for identification of the group of patients who may benefit the most from adjuvant BCG treatment.