

NIEINWAZYJNE BIOMARKERY DO WYKRYWANIA RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO

NON-INVASIVE BIOMARKERS FOR DETECTION OF BLADDER CANCER

Natalia Gruba

*Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego,
Ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk
e-mail: natalia.gruba@ug.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Krążący mRi-18a
2. ONCURIA™
3. Xpert Bladder Cancer
4. ADXBLADDER test
5. Bladder EpiCheck test
6. Mutacje promotora TERT

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr Natalia Gruba, jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, uzyskując kolejno tytuł zawodowy magistra w 2012 roku oraz doktora nauk chemicznych w 2016 roku. Od 2013 r. zatrudniona na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, aktualnie na stanowisku adiunkta w Katedrze Technologii Środowiska. Jej zainteresowania naukowe dotyczą badań nad profilowaniem aktywności enzymów proteolitycznych oraz określaniem ich specyficzności substratowej. Badania naukowe skupiają się głównie na poszukiwaniu nowych metod diagnostycznych dla chorób cywilizacyjnych, jak nowotwory i cukrzyca.



<https://orcid.org/0000-0003-3281-9945>

ABSTRACT

Bladder cancer (BC) is one of the most common cancer in the world. About 3% of all new cancer diagnoses are due to urinary bladder cancer. BC is also a leading cause of cancer-related death, as 2.1% of all cancer deaths are caused by bladder cancer. However, lack of a reliable biomarker is the biggest issue for BC diagnosis, prognosis and treatment. Development of non-invasive, quick and economical methods in bladder cancer diagnosis still remains a great challenge. Highly specific, easy-to-perform tests are really needed. Ideally if they can identify the presence of a tumor before the first symptoms appear, as time plays an important role in cancer. In this article, an overview of the current established diagnostic tests and newly identified biomarkers will be provided.

Keywords: biomarkers, bladder cancer, diagnostic tests, cancerous diseases

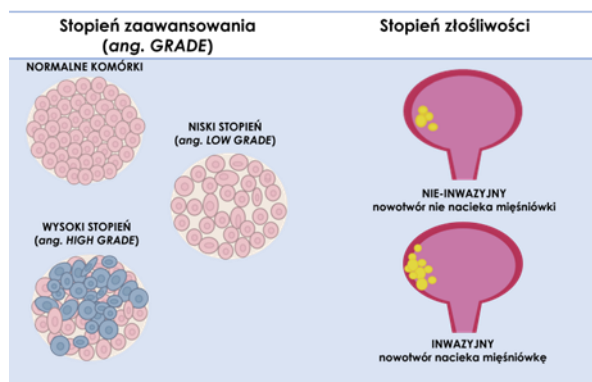
Słowa kluczowe: biomarkery, nowotwór pęcherza moczowego, testy diagnostyczne, choroby nowotworowe

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

A1AT	- alfa-1 antytrypsyna
ANG	- angiogenina
APOE	- apolipoproteina
AUC	- powierzchnia pod krzywą ROC (<i>ang. area under the curve</i>)
BC	- rak pęcherza moczowego (<i>ang. bladder cancer</i>)
BTA-STAT/TRAK	- antygen guza pęcherza moczowego (<i>ang. Bladder tumor antigen</i>)
CA9	- anhydraza węglanowa 9
CA 125	- antygen raka 125 (<i>ang. carcinoma antigen 125</i>)
CD147	- klaster zróżnicowania 147 (<i>ang. cluster of differentiation 147</i>)
CEACAM1	- cząsteczka adhezyjna komórek związana z antygenem rakowo- płodowym 1 (<i>ang. carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i>)
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy
ELISA	- test immunoenzymatyczny (<i>ang. enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FDA	- Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (<i>ang. Food and Drug Administration, FDA</i>)
IL8	- interleukina 8
LDA	- liniowa analiza dyskryminacyjna
MIBC	- naciekający rak pęcherza moczowego
miRNA	- mikroRNA
MMP9	- metalopeptydaza macierzy pozakomórkowej 9
MMP10	- metalopeptydaza macierzy pozakomórkowej 10
NMIBC	- nienaciekający rak pęcherza moczowego
NMP 22	- białko jądrowe-22
NPV	- ujemna wartość predykcyjna
qRT-PCR	- ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją
PAI1	- inhibitor aktywatora plazminogenu 1
PPV	- dodatnia wartość predykcyjna
pTa	- nieinwazyjny rak urotelialny pęcherza moczowego
reg-1	- litostatyna-1-alfa
ROC	- krzywa oceny jakości klasyfikatora
RNA	- kwas rybonukleinowy
SDC1	- syndekan 1
TERT	- odwrotna transkryptaza telomerazy
TNM	- klasyfikacja służąca do określania stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu
UC	- rak urotelialny
UCyt+	- immunocyt
VEGF	- czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

WPROWADZENIE

Rak pęcherza moczowego (BC, ang. *bladder cancer*) jest dziesiątym najczęściej rozpoznawanym nowotworem na świecie, z około 573 000 nowych przypadków [1]. Aspekt ekonomiczny choroby jest niezwykle istotny ze względu na wysoki odsetek nawrotów i konieczność stałego monitorowania pacjentów, co generuje koszty dla systemu opieki zdrowotnej [2]. BC nie wykazuje charakterystycznych objawów, więc diagnoza i monitorowanie pacjentów pozostaje wyzwaniem. Obecnie cystoskopia i cytologia moczu są najczęstszymi metodami stosowanymi w rozpoznaniu choroby, często wspieranymi przez tomografię komputerową układu moczowego [3]. Cystoskopia jest metodą inwazyjną i powoduje znaczny dyskomfort dla pacjenta [4]. Jest jednak łatwa do wykonania, a także jest opisywana jako najbardziej opłacalna metoda diagnostyki i monitorowania raka pęcherza moczowego [5]. Cytologia moczu jest z kolei metodą nieinwazyjną o wysokim wskaźniku wykrywalności w diagnostyce guzów o wysokim stopniu złośliwości, ale stosunkowo mniej czułą w przypadku najczęstszych guzów o niskim stopniu złośliwości (ryc. 1) [6,7].



Rysunek 1. Stopień zaawansowania i złośliwości nowotworu pęcherza moczowego

Figure 1. The grade and stage of the bladder cancer

Ponadto wynik cytologii zależy od ekspertyzy cytopatologa, stąd może być obarczony błędem wynikającym z doświadczenia badacza [8]. Nieinwazyjny, bardzo czuły i specyficzny biomarker do diagnozowania raka pęcherza mógłby zmniejszyć potrzebę cystoskopii i przynieśćby ogromne korzyści zarówno dla pacjentów, jak i dla systemu opieki zdrowotnej. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration, FDA*) zatwierdziła sześć testów moczu do użytku klinicznego w połączeniu z cystoskopią [9]. Trzy z nich są wykorzystywane do diagnostyki i monitorowania BC (białko jądrowe-22 (NMP22); NMP22 Bladder-

Chek; UroVysion), a pozostałe trzy zostały dopuszczone do monitorowania raka pęcherza moczowego po rozpoznaniu guza pierwotnego (immunocyt (UCyt+); BTA-TRAK; BTA-STAT) [9]. W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę wymienionych testów diagnostycznych.

Tabela 1. Charakterystyka testów diagnostycznych zatwierdzonych przez FDA
Table 1. The characteristic of the diagnostic tests approved by FDA

Test	Charakterystyka	Czułość	Swoistość	Lit.
NMP22	wykrywanie białka macierzy jądrowej 22 w próbce moczu; diagnostyka i monitorowanie	51-85%	77-96%	[10,11]
NMP22 BladderChek	Jakościowy test <i>in vitro</i> ; wykrywanie NMP22 w próbce moczu; diagnostyka i monitorowanie	73-78%	89-92%	[12]
UroVysion	wielokolorowy fluorescencyjny test hybrydyzacji <i>in situ</i> ; wykrycie aneuploidii chromosomów 3, 7 lub 17 lub utraty locus 9p21; diagnostyka i monitorowanie	69-87%	89-96%	[13,14]
UCyt+	test immunocytochemiczny UCyt+; wykrywanie karcynoembrionalnych i siarczanowanych glikoprotein mucyny; monitorowanie	60-100%	75-84%	[15-17]
BTA-TRAK	ilościowy test immunologiczny <i>in vitro</i> ; wykrywanie białka związanego z ludzkim czynnikiem H dopełniacza w moczu; monitorowanie w połączeniu z cystoskopią	50-62%	68-87%	[18]
BTA-STAT	jakościowy test immunologiczny <i>in vitro</i> ; wykrywanie białka związanego z ludzkim czynnikiem H dopełniacza w moczu; monitorowanie BC w połączeniu z cystoskopią	40-72%	29-96%	[18]

Od kilkudziesięciu lat naukowcy poszukują nieinwazyjnych metod diagnostyki raka pęcherza moczowego w oparciu o biomarkery moczu. Celem takich badań jest testowanie pacjentów bezobjawowych i wykrycie nawrotu choroby. Istnieje wiele badań opisujących nowe testy, ale ich zastosowanie w praktyce klinicznej pozostaje niejasne. W niniejszej pracy zostanie przedstawiony przegląd odkrytych testów diagnostycznych i nowo zidentyfikowanych biomarkerów.

1. KRAŻĄCY miR-18a

MikroRNA (miRNA) to grupa małych, niekodujących RNA [19], które biorą udział w progresji nowotworu [20]. Nieprawidłowa ekspresja miRNA jest związana z proliferacją, różnicowaniem i apoptozą komórek w różnych typach nowotworów [21]. MikroRNA mogą również funkcjonować jako onkogeny lub jako supresory nowotworów [22]. Profil ekspresji miRNA może ulec istotnej zmianie zarówno w próbkach guza, jak i w moczu i krwi pacjentów onkologicznych [23]. Wiele badań wykazało, że krążące miRNA są atrakcyjnymi kandydatami do roli biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych, ponieważ różnicują normalne komórki od tych nowotworowych [24-26]. Usuba i współpracownicy wykazali, że panel 7 krążących miRNA (miR-6087, miR-6724-5p, miR-3960, miR-1343-5p, miR-1185-1-3p, miR-6831-5p, miR-4695-5p) jest obiecującym narzędziem do BC od próbek nienowotworowych i innych typów nowotworów [27]. Wraz ze współpracownikami wykazał, że proliferacja komórek raka pęcherza moczowego, jak i przerzuty mogą być hamowane przez nadekspresję miR-4324 [28]. Wyższą ekspresję miR-18a stwierdzono w raku prostaty, żołądka, nosogardzieli, raku płaskonabłonkowym przetyku, raku piersi i pęcherza moczowego [29-34], podczas gdy zmniejszoną ekspresję miR-18a odnotowano w tkankach raka jajnika [35]. Niemniej jednak rola miR-18 nadal pozostaje niejasna w odniesieniu do raka pęcherza moczowego. W 2020 roku Wang i współpracownicy odkryli, że miR18-a był podwyższony w tkankach raka pęcherza moczowego człowieka [36]. Zaobserwowali również, że ekspresja miR18-a w osoczu była ściśle związana z typem guza, stopniem zaawansowania, stadiem TNM i wielkością. Byli pierwszymi naukowcami, którzy zbadali potencjalną wartość diagnostyczną miR-18a osocza i tkanek w raku pęcherza moczowego. Ekstrakcję RNA i ilościową reakcją łańcuchową polimerazy z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR) przeprowadzono w celu wykrycia ekspresji miR-18a w 92 próbkach. Znacząco podwyższoną ekspresję zaobserwowano w pierwotnych tkankach raka pęcherza moczowego w porównaniu z normalnymi. Co więcej, ekspresja miR18-a była znacznie wyższa u pacjentów z MIBC (naciekającym rakiem pęcherza moczowego) niż u pacjentów z NMIBC (nienaciekającym rakiem pęcherza). Stwierdzono także, że ekspresja miR-18a była wyższa u pacjentów z NMIBC niż u osób zdrowych. Poziomy miR-18a w tkance guza korelują z poziomami miR-18a w osoczu. Analiza statystyczna ROC tkanek nowotworowych i zdrowych wykazała 92,4% czułości i 90,1% swoistości. Następnie tę samą analizę przeprowadzono w celu oceny przydatności wykorzystania ekspresji miR-18a w tkankach do różnicowania pacjentów z MIBC i NMIBC. Okazało się, że metoda charakteryzuje się 92,2% czułością i 78,6% swoistością. Tak więc krążące miR-18a może być użytecznym biomarkerem w badaniach przesiewowych raka pęcherza, zarówno w diagnostyce, jak i prognozowaniu.

2. ONCURIA™

W ostatnich latach naukowcy odkryli wiele nowych biomarkerów białkowych w moczu, jak apolipoproteina A4, kalprotektyna, CD147, CEACAM1, klusteryna, koronina-1A, DJ-1, fibronektyna, reg-1, statmina-1 i γ -synukleina, których czułość waha się od 52% do 97%, a swoistość od 43% do 100% [37]. Pomimo wysiłków żaden z nich nie jest wystarczająco dokładny, aby zastąpić cytologię moczu i cystoskopię. W 2012 roku Chen i współpracownicy opracowali test diagnostyczny, w którym mierzono panel sześciu peptydów- afaminy, adiponektynę, łańcuch gamma C4 dopełniacza, prekursor apolipoproteiny A-II, ceruloplazminę i protrombinę [38]. Test wykazywał 76,3% dodatniej wartości predykcyjnej (PPV) i 77,5% ujemnej wartości predykcyjnej (NPV). Frantzi wraz z kolegami przedstawił panel dwóch biomarkerów o wartości AUC 0,87 do wykrywania pierwotnego raka pęcherza moczowego [39]. Kumar i in. zaproponował panel pięciu białek o 90% czułości i prawie 100% swoistości [40]. Takie odkrycia wyraźnie wskazują, że badanie panelu biomarkerów jest dokładniejsze niż analiza pojedynczego wskaźnika. Pomimo obiecujących wyników badań, tego typu testy nie są szeroko stosowane w praktyce klinicznej.

W 2020 roku Furuya i współpracownicy opracowali nowy test do nieinwazyjnego wykrywania raka pęcherza [41]. ONCURIA™ to wieloskładnikowy test immunologiczny oparty na pomiarze stężenia 10 analitów w moczu (angiogenina, ANG; apolipoproteina, APOE; alfa-1 antytrypsyna, A1AT; anhidraza węglanowa 9, CA9; interleukina 8, IL8 ; metalopeptydaza macierzy pozakomórkowej 9, MMP9; metalopeptydaza macierzy pozakomórkowej 10, MMP10; inhibitor aktywatora plazminogenu 1, PAI1; syndekan 1, SDC1; czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, VEGF). Aby zweryfikować jego użyteczność, naukowcy wykorzystali próbki od pacjentów z krwiomoczem i historią BCa do monitorowania guza. Do wykrywania białek zastosowano koktajl 10 przeciwciał swoistych dla białka, wstępnie pokrytych na mikrocząstkach kodowanych kolorami (Luminex Corp) oraz koktajl przeciwciał biotynylowanych. Mikrocząstki zostały wykryte przy użyciu technologii Luminex xMAP. Test można zakończyć w mniej niż pięć godzin przy użyciu 150 μ l oddanego moczu. Test wykazuje ogólną swoistość diagnostyczną i czułość odpowiednio 81% i 85% [42]. Taki multipleksowy test oparty na oznaczaniu białka, do wczesnego wykrywania raka jajnika został zatwierdzony przez FDA. Test mierzył bezwzględny poziom CA125, apolipoproteiny A1, beta 2 mikroglobuliny, prealbuminy i transferyny, a jego czułość wynosiła 92,2% [43]. Jak dotąd żaden tego typu test do wykrywania raka pęcherza nie został zatwierdzony przez FDA.

3. Xpert Bladder Cancer

Xpert Bladder Cancer to nieinwazyjny test moczu do wykrywania raka pęcherza moczowego, który jest ukierunkowany na wykrycie pięciu mRNA (CRH, IGF2, UPK1B, ANX10 i ABL1), które mogą ulegać nadekspresji w przypadku BC [44,45]. Test jest wysoce ekonomiczny i w pełni zautomatyzowany pod względem przygotowania próbki, amplifikacji kwasu nukleinowego i wykrywania docelowej sekwencji [46]. Próbki identyfikuje się jako dodatnie lub ujemne na podstawie liniowej analizy dyskryminacyjnej (LDA), która wykorzystuje poziomy ekspresji pięciu docelowych mRNA (CRH, IGF2, UPK1B, ANX10 i ABL1). System automatyzuje i integruje licząc komórki, amplifikację kwasów nukleinowych i detekcję docelowych sekwencji za pomocą RT-PCR w ciągu 90 minut [47]. Łączna czułość i swoistość raka pęcherza moczowego Xpert w diagnostyce raka pęcherza wynosi odpowiednio 71% i 81% [48].

W 2018 roku Pichler i współpracownicy po raz pierwszy zaprezentowali nowy test moczu oparty na mRNA, Xpert Bladder Cancer Monitor. Test przewyższa cytologię pod względem czułości i ujemnej wartości predykcyjnej, nawet w guzach o niskim stopniu złośliwości i pTa, bez zmniejszenia swoistości [47]. Rok później Hurlle ze współpracownikami poinformował, że zastosowanie Xpert BC pozwala uniknąć 33,4% cystoskopii [49]. Co więcej, Valenberg i in. odkryli, że test poprawił ujemną wartość predykcyjną u chorych na raka pęcherza moczowego podczas obserwacji w porównaniu z urologią i cytologią [46]. W 2020 roku naukowcy zwalidowali test u pacjentów z krwimoczem [50]. Wyniki na podstawie cystoskopii i histologii porównano między Xpert, cytologią i UroVysion. Okazało się, że Xpert charakteryzuje się wyższą czułością i ujemną wartością predykcyjną niż cytologia i UroVysion u pacjentów z mikrohematurią [50]. Największą wartością Xpert Bladder Cancer jest redukcja dodatkowej oceny cystoskopowej.

4. ADXBLADDER test

ADXBLADDER to nowy, komercyjnie dostępny test immunoenzymatyczny (ELISA) wykorzystujący przeciwciała przeciwko białku kodującemu minichromosom 5 (MCM5) do wykrywania raka pęcherza moczowego [51]. Białka MCM odgrywają kluczową rolę w inicjacji replikacji DNA [52]. Są one silnie wyrażane we wszystkich komórkach zdolnych do dzielenia się, ale nie występują w komórkach ostatecznie zróżnicowanych [53]. W przypadku raka urotelialnego komórki MCM5-dodatnie są wydalane z moczem, co czyni białko MCM5 potencjalnym biomarkerem raka pęcherza moczowego. Co więcej, poziom białka MCM5 w osadzie moczu wydaje się korelować ze stopniem zaawansowania nowotworu [54]. W 2002 roku Stoeber i współpracownicy badali poziom MCM5

w moczu pobranym od 353 pacjentów z krwimoczem, objawami z dolnych dróg moczowych lub poddanych cystoskopii z powodu raka urotelialnego [55]. Detekcję MCM5 wykonano metodą immunofluorymetryczną. Test był w stanie odróżnić pacjentów z rakiem pęcherza moczowego i bez raka, charakteryzujący się wartością ROC 0,93. W późniejszym badaniu Gontero wraz ze współpracownikami badał test ADXBLADDER w porównaniu z cytologią moczu w wykrywaniu nawrotów nieinwazyjnego raka pęcherza moczowego [56]. Było to wieloosrodkowe, prospektywne, ślepe badanie z udziałem 1718 pacjentów poddanych cystoskopii w ramach obserwacji BC. W tym przypadku ogólna czułość i swoistość testu wyniosła odpowiednio 51,9% i 66,4%, a ujemna wartość predykcyjna wyniosła 92%. Czułość i swoistość zgłaszane dla cytologii wyniosły odpowiednio 16,7% i 98%, a NPV 90,7%. Czułość ADXBLADDER w przypadku nawrotów o niskim i wysokim stopniu złośliwości wyniosła odpowiednio 44,1% i 58,8%, podczas gdy w przypadku cytologii czułość wyniosła 17,6% zarówno dla choroby o niskim, jak i wysokim stopniu złośliwości. Badanie Dudderidge'a i in. dotyczyło wykrywania MCM5 w osadzie moczu pacjentów z krwimoczem [57]. BC zdiagnozowano na podstawie obrazowania i cystoskopii. Ogólna czułość testu wyniosła 73,0%, a ogólna wartość NPV 96,4%. Co więcej, czułość i NPV ADXBLADDER były wyższe w przypadku raka pęcherza moczowego naciekającego mięśnie, w obu przypadkach na poziomie 100%. W przypadku guzów innych niż pTa czułość wykrywania BC wynosiła 97%, a NPV 99,8%. Przedstawione wyniki wykazały, że infekcje dróg moczowych lub obecność krwimoczu nie wpływały na działanie ADXBLADDER. Ponadto autorzy stwierdzili, że test może zastąpić cytologię w diagnostyce raka pęcherza moczowego, ale badanie musi zostać zakończone na większej populacji pacjentów z BC. Największą zaletą nieinwazyjnego testu moczu ADXBLADDER jest to, że test można wykonać za pomocą ogólnego sprzętu laboratoryjnego dostępnego w większości szpitali, takiego jak prosty test ELISA. Wyniki można uzyskać w ciągu 3 godzin, bez konieczności angażowania patologa [56,57].

5. Bladder EpiCheck test

Test Bladder EpiCheck (Nucleix Ltd) jest badaniem moczu opartym na reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, która wykrywa zmiany metylacji DNA związane z BC w panelu 15 biomarkerów genomowych [58]. Test zwraca wartość liczbową (EpiScore) w zakresie 0-100 w oparciu o ogólny poziom metylacji w próbce moczu. Wynik testu uznaje się za pozytywny, gdy EpiScore wynosi 60 lub więcej [59]. Test ma jedną wielką zaletę - jest łatwy do oceny. Z drugiej jednak strony nie jest łatwy do wykonania. Najpierw z każdej próbki moczu należy wytworzyć osad komórkowy, a do wykonania qRT-PCR w odpowiednio wyposażonym laboratorium

potrzebny jest specjalista. Co więcej, test nie jest tani, co jest ważnym wymogiem dla biomarkera moczu [59]. W 2018 r. Witjes i in. badali Bladder EpiCheck w zaślepionym, prospektywnym, wieloośrodkowym badaniu na grupie 353 pacjentów monitorowanych za pomocą cystoskopii [60]. Ogólna czułość i swoistość testu wyniosły odpowiednio 68,2% i 88,0%. Badanie wykazało wysoką wartość NPV wynoszącą 95,1%. Co ważniejsze, Bladder EpiCheck może wykrywać guzy o wysokim stopniu złośliwości z czułością 91,7% i NPV 99,3%. Okazało się, że takie cechy jak wiek, płeć, historia palenia, niedawne lub trwające leczenie nie miały wpływu na wyniki testu. W ostatnim badaniu Trenti ze współpracownikami porównał dokładność Bladder EpiCheck z cytologią, cystoskopią i/lub histologią w obserwacji 243 pacjentów z nienaciekającym rakiem pęcherza moczowego (NMIBC) [59]. Ogólna czułość i swoistość dla cytologii wyniosła odpowiednio 33,3% i 98,6%, podczas gdy w przypadku Bladder EpiCheck wartości wyniosły 62,3% i 86,3%. Kombinacja obu testów zwiększyła czułość do 66,7%, podczas gdy swoistość wyniosła 85,6%. W 2020 roku naukowcy porównali dokładność diagnostyczną Bladder EpiCheck i Xpert Bladder Cancer Monitor ze sobą oraz z cytologią moczu, cystoskopią i/lub histologią u 487 pacjentów obserwowanych pod kątem NMIBC [61]. Oba testy wykazały czułość 66,3% dla Xpert Bladder Cancer Monitor i 64,1% dla testu Bladder EpiCheck. Natomiast ogólna czułość cytologii była niska i wyniosła 27,2%. Dokładność diagnostyczna dla pęcherza moczowego EpiCheck została scharakteryzowana na poziomie AUC wynoszącym 73,8%. Czulość obu testów w diagnostyce guzów o wysokim stopniu złośliwości sięga 92,1%, a NPV 92,2%, gdy testy są stosowane łącznie.

6. Mutacje promotora TERT

Telomeraza, zwana także terminalną transferazą, jest rybonukleoproteiną, która jest skorelowana z utrzymaniem długości telomerów i nieograniczonym podziałem komórek nowotworowych [62]. Odwrotna transkryptaza telomerazy (TERT) jest kluczowym wyznacznikiem aktywności telomerazy, która odgrywa kluczową rolę w uniesmiertelnianiu komórek i onkogenezie [63]. Dwie mutacje genu TERT (C228T i C250T) często występują w wielu typach nowotworów, a szczególnie w rakach pęcherza moczowego i górnych dróg moczowych [64]. Mutacje promotora TERT są najczęstszymi zmianami genetycznymi w BC (60-90%) [65]. Wykrycie tych zmian w moczu może być potencjalnie wykorzystane do nieinwazyjnego wykrywania i monitorowania raka pęcherza moczowego. Avogbe i in. badali test UroMuTERT oraz cytologię moczu, w celu porównania skuteczności obu metod do wykrywania małej ilości mutacji promotora TERT w moczu pacjentów z rakiem urotelialnym (UC) [66]. Czulość i swoistość jednogennego biomarkera moczu wyniosły odpo-

wiednio 87,1% i 94,7%. W 2020 roku Hosen wraz z kolegami przedstawili wyniki mutacji promotora TERT w próbkach moczu pobranych od 38 bezobjawowych osób, u których następnie zdiagnozowano pierwotny rak pęcherza i 152 kontroli przy użyciu testu UroMuTERT opartego na sekwencjonowaniu nowej generacji i testu kropłowego PCR (ddPCR) [67]. Czułość i swoistość testu UroMuTERT wyniosła odpowiednio 67,4% i 86,8%. Zastosowanie ddPCR zwiększyło czułość i swoistość odpowiednio do 86,8% i 92,4%. Zgodnie z tymi wartościami, zarówno testy UroMuTERT, jak i ddPCR są obiecującymi kandydatami do nieinwazyjnego wykrywania raka pęcherza moczowego. Co więcej, prostota metody ddPCR sprawia, że nadaje się ona do wdrożenia klinicznego do diagnostyki i monitorowania raka pęcherza moczowego.

UWAGI KOŃCOWE

Rak pęcherza moczowego to prawdziwy problem w systemie opieki zdrowotnej. Wysoki odsetek nawrotów i długi czas „uśpienia” nowotworu sprawiają, że diagnoza raka pęcherza jest kosztowna i obciążająca dla systemu. Cystoskopia i cytologia, które są tak zwanym „złotym standardem”, nie zostały jeszcze zastąpione w praktyce klinicznej, ponieważ dotychczas badane biomarkery oferują niewystarczającą czułość i swoistość w wykrywaniu guzów pęcherza moczowego. W ostatnich latach pojawiło się zainteresowanie rolą biomarkerów moczowych w diagnostyce raka pęcherza moczowego. Jednak żaden z nich nie znalazł zastosowania klinicznego, choć wiele jest obecnie ocenianych w prospektywnych badaniach. Tabela 2 podsumowuje metody diagnostyczne raka pęcherza opisane w tym przeglądzie. Komórki raka pęcherza moczowego mogą wydzielać enzymy, białka i egzosomy, aby regulować swoje mikrośrodowisko, wpływając na przeżycie i progresję raka, co jest również potencjalnym źródłem biomarkerów. Celowanie w te wydzielane składniki otworzyło nową ścieżkę w diagnostyce raka. Większość testów opiera się na pomiarze pojedynczego czynnika specyficznego dla danego typu nowotworu. To podejście nie jest ani bardzo specyficzne, ani czułe. Dalsze badania nad nowymi metodami diagnostycznymi powinny koncentrować się na połączeniu kilku proponowanych testów, gdyż ich indywidualne stosowanie ma niewielką wartość diagnostyczną. Komórki nowotworowe wydzielają specyficzny zestaw białek, których skład różni się od tych wydzielanych przez te zdrowe. Stąd poszukiwanie nowych metod diagnostycznych powinno koncentrować się na zbadaniu przynajmniej kilku składników tego specyficznego mikrośrodowiska raka.

Tabela 2. Charakterystyka testów diagnostycznych na raka pęcherza moczowego
 Table 2. The characteristic of the bladder cancer diagnostic tests

Test	Charakterytyka	Czułość	Swoistość	Lit.
<i>Circulating miR-18a</i>	wykrywanie miR18-a w osoczu; diagnoza i rokowanie	92%	79%	[36]
<i>ONCURIA™</i>	test immunologiczny; wykrywanie 10 analitów w moczu; diagnoza	81%	85%	[41]
<i>Xpert Bladder Cancer</i>	wykrywanie pięciu mRNA w moczu; diagnoza i monitorowanie	71%	81%	[48]
<i>ADXBLADDER test</i>	ELISA-test; detekcja MCM5 w próbkach moczu; diagnoza	52%	66%	[56]
<i>Bladder EpiCheck test</i>	reakcja RT-PCR; detekcja metylacji DNA w panelu 15 biomarkerów genomowych; diagnoza	68%	88%	[60]
<i>TERT promoter mutations</i>	reakcja PCR; wykrywanie mutacji promotora TERT w moczu; diagnoza i monitorowane	87%	92%	[67]

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, *CA Cancer J. Clin.*, 2021, **71**, 209.
- [2] K.D. Sievert, B. Amend, U. Nagele, D. Schilling, J. Bedke, M. Horstmann, J. Hennenlotter, S. Kruck, A., *World J. Urol.*, 2009, **27**, 295.
- [3] M. Babjuk, A. Böhle, M. Burger, O. Capoun, D. Cohen, E.M. Compérat, V. Hernández, E. Kaasinen, J. Palou, M. Roupřet, B.W.G. van Rhijn, S.F. Shariat SF, V. Soukup, R.J. Sylvester, R. Zigeuner, *Eur. Urol.* 2017, **71**, 447.
- [4] K. Koo, L. Zubkoff, B.E. Sirovich, P.P. Goodney, D.J. Robertson, J.D. Seigne, F.R. Schroeck, *Urology*, 2017, **108**:122.
- [5] A.M. Kamat, P.K. Hegarty, J.R. Gee, P.E. Clark, R.S. Svatek, N. Hegarty, S.F. Shariat, E. Xylinas, B.J. Schmitz-Dräger, Y. Lotan, L.C. Jenkins, M. Droller, B.W. van Rhijn, P.I. Karakiewicz, *Eur Urol* 2013, **63**, 4.
- [6] H. Leyh, M. Marberger, P. Conort, C. Sternberg, V. Pansadoro, F. Pagano, P. Bassi, L. Boccon-Gibod, V. Ravery, U. Treiber, L. Ishak, *Eur. Urol.*, 1999, **35**, 52.
- [7] B.W. van Rhijn, H.G. van der Poel, T.H. van der Kwast, *Eur. Urol.*, 2005, **47**, 736.

- [8] E. Xylinas, L.A. Kluth, M. Rieken, P.I. Karakiewicz, Y. Lotan, S.F. Shariat, *Urol. Oncol.*, 2014, **32**, 222.
- [9] K. Ng, A. Stenzl, A. Sharma, N. Vasdev, *Urol. Oncol.*, 2021, **39**, 41.
- [10] A. Schlake, P.L. Crispen, A.P. Cap, T. Atkinson, D. Davenport, D.M. Preston, *Can. J. Urol.*, 2012, **19**, 6351.
- [11] Z. Wang, H. Que, C. Suo, Z. Han, J. Tao, Z. Huang, X. Ju, R. Tan, M. Gu, *Oncotarget*. 2017, **8**, 100648.
- [12] H.S. Choi, S.I. Lee, D.J. Kim, T.Y. Jeong, *Korean J. Urol.*, 2010, **51**, 88.
- [13] B.J. Yoder, M. Skacel, R. Hedgepeth, D. Babineau, J.C. Ulchaker, L.S. Liou, J.A. Brainard, C.V. Biscotti, J.S. Jones, R.R. Tubbs, *Am J Clin Pathol* 2007, **127**, 295.
- [14] T. Hajdinjak, *Urol. Oncol.*, 2008, **26**, 646.
- [15] C. Mian, A. Pycha, H. Wiener, A. Haitel, M. Lodde, M. Marberger, *J. Urol.*, 1999, **1612**, 1486.
- [16] M. Lodd, C. Mian, G. Negri, L. Berner, N. Maffei, L. Lusuardi, S. Palermo, M. Marberger, C. Brssner, A. Pycha, *Urology*, 2003, **61**, 243.
- [17] C. Pfister, D. Chautard, M. Devonec, P. Perrin, D. Chopin, P. Rischmann, O. Bouchot, D. Beurton, C. Coulange, J.J. Rambeaud, *J. Urol.*, 2003, **169**, 921.
- [18] F. Soria, M.J. Droller, Y. Lotan, P. Gontero, D. D'Andrea, K.M. Gust, M. Rouppe, M. Babjuk, J. Palou, S.F. Shariat, *World J. Urol.*, 2018, **36**:1981.
- [19] H. Grosshans, W. Filipowicz, *Nature*, 2008, **451**, 414.
- [20] Z. Sun, K. Shi, S. Yang, J. Liu, Q. Zhou, G. Wang, J. Song, Z. Li, Z. Zhang, W. Yuan, *Mol. Cancer*, 2018, **17**, 147.
- [21] C. Kutter, P. Svoboda, *RNA Biol.*, 2008, **5**, 181.
- [22] D.P. Bartel DP, *Cell*, 2004, **116**, 281.
- [23] A. Tölle, N. Ratert, K. Jung, *Biomark. Med.*, 2014, **8**, 733.
- [24] L. Valihrach, P. Androvic, M. Kubista, *Mol. Aspects Med.*, 2020, **72**, 100825.
- [25] N. Kosaka, H. Iguichi, T. Ochiya, *Cancer Sci.*, 2010, **101**, 2087.
- [26] A. Allegra, A. Alonci, S. Campo, G. Penna, A. Petrunaro, D. Gerace, C. Musolino, *Int. J. Oncol.* 2012, **41**, 1897.
- [27] W. Usuba, F. Urabe, Y. Yamamoto, J. Matsuzaki, H. Sasaki, M. Ichikawa, S. Takizawa, Y. Aoki, S. Niida, K. Kato, S. Egawa, T. Chikaraishi, H. Fujimoto, T. Ochiya, *Cancer Sci.*, 2019, **110**, 408.
- [28] Q. Ge, M. Lu, L. Ju, K. Qian, G. Wang, C.L. Wu, X. Liu, Y. Xiao, X. Wang, *Int. J. Cancer* 2019, **144**, 3043.
- [29] T.I. Hsu, C.H. Hsu, K.H. Lee, J.T. Lin, K.C. Chang, C.YJ. Su, M. Hsiao, P.J. Lu, *Oncogenesis*, 2014, **3**, e99.
- [30] W. Wu, M. Takanashi, N. Borjigin, S.I. Ohno, K. Fujita, S. Hoshino, Y. Osaka, A. Tsuchida, M. Kuroda, *Br. J. Cancer*, 2013, **108**, 653.
- [31] Z. Luo, Y. Dai, L. Zhang, C. Jiang, Z. Li, J. Yang, J.B. McCarthy, X. She, W. Zhang, J. Ma, W. Xiong, M. Wu, J. Lu, X. Li, X. Li, J. Xiang, G. Li, *Carcinogenesis*, 2016, **34**, 415.
- [32] W. Zhang, C. Lei, J. Fan, J. Wang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016, **477**, 144.
- [33] A. Shidfar, F.F. Costa, D. Scholtens, J.M. Bischof, M.E. Sullivan, D.Z. Ivancic, E.F. Vanin, M.B. Soares, J. Wang, S.A. Khan, *Cancer Prev. Res. (Phila)*, 2017, **10**, 89.
- [34] F. Dong, T. Xu, Y. Shen, S. Zhong, S. Chen, Q. Ding, Z. Shen, *Oncotarget*, 2017, **8**, 27547.
- [35] P. Liu, X. Qi, C. Bian, F. Yang, X. Lin, S. Zhou, C. Xie, X. Zhao, T. Yi, *Oncol. Lett.*, 2017, **13**:4039.
- [36] R.-X. Song, G.-J. Zhu, CH.-M. Dong, Z.-P. Wang, *Clin. Biochem.*, 2020, pii: S0009-9120(20)30921.
- [37] J.J. D'Costa, J.C. Goldsmith, J.S. Wilson, R.T. Bryan, D.G. Ward, *Bladder Cancer Amst. Neth.*, 2016, **2**, 301.

- [38] Y.T. Chen, H.W. Chen, D. Domanski, D.S. Smith, K.H. Liang, C.C. Wu, C.L. Chen, T. Chung, M.C. Chen, Y.S. Chang, C.E. Parker, C.H. Borchers, J.S. Yu, *J. Proteomics*, 2012, **75**, 3529.
- [39] M. Frantzi, K.E. van Kessel, E.C. Zwarthoff, M. Marquez, M. Rava, N. Malats, A.S. Merseburger, I. Katafigiotis, K. Stravodimos, W. Mullen, J. Zoidakis, M. Makridakis, M. Pejchinovski, E. Critselis, R. Lichtinghagen, K. Brand, M. Dakna, M.G. Roubelakis, D. Theodorescu, A. Vlahou, H. Mischak, N.P. Anagnou, *Clin. Cancer Res.*, 2016, **22**, 4077.
- [40] P. Kumar, S. Nandi, T.Z. Tan, S.G. Ler, K.S. Chia, W.Y. Lim, Z. Bütow, D. Vordos, A. De la Taille, M. Al-Haddawi, M. Raida, B. Beyer, E. Ricci, M. Colombel, T.W. Chong, E. Chiong, R. Soo, M.K. Park, H.K. Ha, J. Gunaratne, J.P. Thiery, *Oncotarget*, 2015, **6**, 13539.
- [41] H. Furuy, L.Tabula, R.Lee, P.Kralovec, M.Ramsden, R.Wong, C.J. Rosser, *Pract. Lab. Med.*, 2020, **22**, 2352.
- [42] S. Goodison, O. Ogawa, Y. Matsui, T. Kobayashi, M. Miyake, S. Ohnishi, K. Fujimoto, Y. Dai, Y. Shimizu, K. Tsukikawa, H. Furuya, C.J. Rosser, *J. Transl. Med.*, 2016, **14**, 287.
- [43] K.L.M. Boylan, K. Geschwind, J.S. Koopmeiners, M.A. Geller, T.K. Starr, A.P.N. Skubitz, *Clin. Proteomics*, 2017, **14**, 34.
- [44] M. Miyake, T. Owari, S. Hori, Y. Nakai, K. Fujimoto, *Res. Rep. Urol.*, 2018, **10**, 251.
- [45] E. Wallace, R. Higuchi, M. Satya, L. McCann, M.L.Y. Sin, J.A. Bridge, H. Wei, J. Zhang, E. Wong, A. Hiar, K.E. Mach, D. Scherr, R.B. Egerdie, S. Ohta, W.J. Sexton, M.V. Meng, A.Z. Weizer, M. Woods, G.K. Jansz, J. Zadra, Y. Lotan, B. Goldfarb, J.C. Liao, *J. Urol.*, 2018, **199**, 655.
- [46] F.J.P.V. Valenberg, A.M. Hiar, E. Wallace, J.A. Bridge, D.J. Mayne, S. Beqaj, W.J. Sexton, Y. Lotan, A.Z. Weizer, G.K. Jansz, A. Stenzl, J.F. Danella, B. Shepard, K.J. Cline, M.B. Williams, S. Montgomery, R.D. David, R. Harris, E.W. Klein, T.J. Bradford, F.N. Wolk, K.R. Westenfelder, A.F. Trainer, T.A. Richardson, R.B. Egerdie, B. Goldfarb, J.A. Zadra, S. Ge, S. Zhao, I.M. Simon, S.A. Campbell, B. Rhees, M.P. Bates, R.G. Higuchi, J.A. Witjes, *Eur. Urol.*, 2019, **75**, 853.
- [47] R.Pichler, J.Fritz, G.Tulchiner, G.Klinglmair, A.Soleiman, W. Horninger, H. Klocker, I. Heidegger, *BJU Int.*, 2018, **121**, 29.
- [48] Y.L. Liu, X.L. Wang, X.H. Yang, X.H. Wu, G.X. He, L.M. Xie, X.J. Cao, X.G. Guo, *World J. Surg. Onc.*, 2021, **19**, 42.
- [49] R. Hurlle, P. Casale, A. Saita, P. Colombo, G.M. Elefante, G. Lughezzani, V. Fasulo, M. Paciotti, L. Domanico, G. Bevilacqua, D. Maffei, P. Diana, N. Frego, M.T. Sandri, F. Maura, E. Morengi, N.M. Buffi, G. Guazzoni, M. Lazzeri, *World J. Urol.*, 2009, **38**, 2215.
- [50] M. Mancini, M. Righetto, S. Zumerle, M. Montopoli, F. Zattoni, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 6542.
- [51] Ł. Białek, K. Czerwińska, Ł. Fus, W. Krajewski, A. Sadowska, P. Radziszewski, J. Dobruch, P. Kryst, S. Poletajew, *Cancer Biomark.*, 2021, **30**, 139.
- [52] B.K. Tye, *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, **68**, 649.
- [53] K. Stoeber, T.D. Tlsty, L. Happerfield, G.A. Thomas, S. Romanov, L. Bobrow, E.D. Williams, G.H. Williams, *J. Cell Sci.*, 2001, **114**, 2027.
- [54] K. Stoeber, I. Halsall, A. Freeman, R. Swinn, A. Doble, L. Morris, N. Coleman, N. Bullock, R.A. Laskey, C.N. Hales, G.H. Williams, *Lancet*, 1999, **354**, 1524.
- [55] K. Stoebe, R. Swinn, A.T. Prevost, P. de Clive-Lowe, I. Halsall, S.M. Dilworth, J. Marr, W.H. Turner, N. Bullock, A. Doble, C.N. Hales, G.H. Williams, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2002, **94**, 1071.
- [56] P. Gontero, E. Montanari, M. Roupert, F. Longo, J. Stockley, A. Kennedy, O. Rodriguez, S.R.C. McCracken, T. Dudderidge, C. Sieverink, F. Vanié, M. Allasia, J.A. Witjes, R. Sylvester, M. Colombel, J. Palou, *BJU Int.*, 2021, **127**, 198.
- [57] T.Dudderidge, J.Stockley, G.Nabi, J.Mom, N.Umez-Eronini, D. Hrouda, J. Cresswell, S.R.C. McCracken, *Eur. Urol. Oncol.*, 2020, **3**, 42.
- [58] Wasserstrom A., et al. *J. Urol.*, 2016, **195**, e140.

- [59] E. Trenti, C. D'Elia, C. Mian, C. Schwienbacher, E. Hanspeter, A. Pycha, M. Kafka, S. Degener, H. Danuser, S. Roth, A. Pycha. *Cancer Cytopathol.*, 2019, **127**, 465.
- [60] J.A. Witjes, J. Morote, E.B. Cornel, G. Gakis, F.J.P. van Valenberg, F. Lozano, I.A. Sternberg, E. Willemsen, M.L. Hegemann, Y. Paitan, I. Leibovitch, *Eur. Urol. Oncol.*, 2018, **1**, 307.
- [61] E. Trenti, S. Pycha, C. Mian, C. Schwienbacher, E. Hanspeter, M. Kafka, G.A. Spedicato, E. Vjaters, S. Degener, A. Pycha, C. D'Elia, *Cancer Cytopathol.*, 2020, **128**, 341.
- [62] A. Cassel, M.A. Rahat, N. Lahat, N. Lindenfel, Y. Mecz, A. Stein, *J. Urol.*, 2001, **166**, 841.
- [63] Y.S. Cong, W.E. Wright, J.W. Shay, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002, **66**, 407.
- [64] I. Hosen, P.S. Rachakonda, B. Heidenreich, P.J. de Verdier, C. Ryk, G. Steineck, K. Hemminki, R. Kumar, *Int. J. Cancer*, 2015, **137**, 1621.
- [65] M.I. Hosen, N. Forey, G. Durand, C. Voegelé, S. Bilici, P.H. Avogbe, T.M. Delhomme, M. Foll, A. Manel, E. Vian, S. Meziani, B. De Tilly, G. Polo, O. Lole, P. Francois, A. Bouraille, E. Pisarev, A. Salas, S. Monteiro-Reis, R. Henrique, G. Byrnes, C. Jeronimo, G. Scelo, J.D. McKay, F.L. Calvez-Kelm, M.Zvereva, *Cancers (Basel)*, 2020, **12**, 3541.
- [66] P.H. Avogbe, A. Manel, E. Vian, G. Durand, N. Forey, C. Voegelé, M. Zvereva, M.I. Hosen, S. Meziani, B. De Tilly, G. Polo, O. Lole, P. Francois, T.M. Delhomme, C. Carreira, S. Monteiro-Reis, R. Henrique, B. Abedi-Ardekani, G. Byrnes, M. Foll, E. Weiderpass, J. McKay, C. Jeronimo, G. Scelo, F. Le Calvez-Kelm, *EBioMedicine*, 2019, **44**, 431.
- [67] M.I. Hosen, M. Sheikh, M. Zvereva, G. Scelo, N. Forey, G. Durand, C. Voegelé, H. Poustchi, M. Khoshnia, G. Roshandel, M. Sotoudeh, A. Nikmanesh, A. Etemadi, P.H. Avogbe, P. Chopard, T.M. Delhomme, M. Foll, A. Manel, E. Vian, E. Weiderpass, F. Kamangar, P. Boffetta, P.D. Pharaoh, S.M. Dawsey, C.C. Abnet, P. Brennan, J. McKay, R. Malekzadeh, F.L. Calvez-Kelm, *EBioMedicine*, 2020, **53**, 102643.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 lipca 2022 r.