

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DIANA POGOREVC

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2021

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



DIANA POGOREVC

**KLINIČNI POMEN DOLOČANJA mRNA TUMORSKIH
OZNAČEVALCEV V URINU PRI BOLNIKI Z RAKOM SEČNEGA
MEHURJA**

**CLINICAL SIGNIFICANCE OF mRNA TUMOR MARKERS IN URINE
OF BLADDER CANCER PATIENTS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2021

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem. za razpoložljivost, pomoč in strokovne nasvete. Hvala kolektivu Adrialab za vso predano znanje in predvsem za priložnost pridobivanja izkušenj v laboratoriju tekom študija. Največja zahvala gre mojim staršem, da so mi študij omogočili, me podpirali in mi zaupali. Za vse vzpodbudne besede in motivacijo pa se moram zahvaliti tudi vsem ostalim mojim najbližjim in prijateljicam, s katerimi je bilo lažje dosegati zastavljene cilje.

In hvala mojemu Alenu – za vse.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Diana Pogorevc

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem.

Članica: asist. dr. Nanča Čebren Lipovec, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	SPLOŠNO O SEČILIH	1
1.1.1	SEČNI MEHUR	3
1.2	BOLEZNI SEČIL	4
1.2.1	OKUŽBE URINARNEGA TRAKTA	4
1.2.1.1	Dejavniki tveganja in epidemiologija	5
1.2.1.2	Diagnostika in zdravljenje	5
1.2.2	RAK SEČNEGA MEHURJA	5
1.2.2.1	Epidemiologija	5
1.2.2.2	Dejavniki tveganja	6
1.2.2.3	Bolezenski znaki	6
1.2.2.4	Klasifikacija	7
1.2.2.5	Diagnostika raka sečnega mehurja	9
1.2.2.6	Zdravljenje	10
1.3	TUMORSKI OZNAČEVALCI	11
1.3.1	VLOGA TUMORSKIH OZNAČEVALCEV PRI RAKU SEČNEGA MEHURJA	11
1.3.2	Cepheid Xpert Bladder Cancer test	12
2	NAMEN DELA	14
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	PREISKOVANCI	15
3.1.1	VAROVANJE OSEBNIH PODATKOV	16
3.2	MATERIALI	16
3.3	METODE RAZISKAVE	16
3.3.1	Xpert BC Monitor test	17
3.3.1.1	Princip metode	17
3.3.1.1.1	RT-PCR	17
3.3.1.2	Način dela	17
3.3.1.3	Podajanje rezultatov	18
3.4	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	19
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	20
4.1	REZULTATI	21
4.2	RAZPRAVA	25
4.2.1	VLOGA SKUPNE VREDNOSTI LDA	26

4.2.2	NAPOVED POZITIVNIH ALI SUMLJIVIH REZULTATOV CISTOSKOPIJE 27	
4.2.3	NAPOVED POZITIVNIH / MALIGNIH REZULTATOV HISTOLOGIJE	28
4.2.4	OMEJITVE ŠTUDIJE.....	28
5	SKLEP.....	30
6	LITERATURA.....	31

KAZALO SLIK

Slika 1:	Zgradba nefrona, povzeto po ⁽³⁾	2
Slika 2:	Sečni sistem pri ženskah (levo) in pri moških (desno), povzeto po ⁽¹⁾	3
Slika 3:	Prikaz različnih tipov tumorjev sečnega mehurja; povzeto po ⁽⁸⁾	8
Slika 4:	ROC krivulja za Xpert BC Monitor test za napoved pozitivnih rezultatov cistoskopije.....	22
Slika 5:	ROC krivulja za Xpert BC Monitor test za napoved pozitivnih/malignih rezultatov histologije.....	23

KAZALO TABEL

Tabela 1:	Klasifikacija stopnje invazije tumorja po TNM – kategorija T.....	7
Tabela 2:	Klasifikacija stopnje invazije tumorja po TNM – kategorija N.....	8
Tabela 3:	Klasifikacija stopnje invazije tumorja po TNM – kategorija M.....	8
Tabela 4:	Demografski podatki pacientov	20
Tabela 5:	Povzetek pridobljenih rezultatov.....	20
Tabela 6:	Primerjava izračunanih median skupne vrednosti LDA pozitivne in negativne skupine pacientov glede na posamezno preiskavo	21
Tabela 7:	Rezultati statistične analize z Mann-Whitneyevim U testom ter izračunane p vrednosti.....	22
Tabela 8:	Občutljivost, specifičnost ter pozitivna in negativna napovedna vrednost neinvazivnih urinskih testov za napoved pozitivnih cistoskopskih rezultatov.....	24
Tabela 9:	Občutljivost, specifičnost ter pozitivna in negativna napovedna vrednost neinvazivnih urinskih testov za napoved pozitivnih histoloških rezultatov.....	24
Tabela 10:	Občutljivost neinvazivnih urinskih testov glede na razred tumorja.....	25
Tabela 11:	Občutljivosti neinvazivnih urinskih testov glede na stadij tumorja	25

POVZETEK

Rak sečnega mehurja (RSM) v Evropi predstavlja 6,2 % vseh rakov pri moških in 1,6 % pri ženskah. V treh četrtinah primerov ga odkrijemo v začetni, površinski stopnji, ki lahko sčasoma napreduje v mišično invazivni rak, ta pa povzroča hude zdravstvene težave in lahko vodi tudi v smrt bolnika. Glavno načelo zdravljenja površinskega RSM je takojšnja transuretralna resekcija tumorja in pogosto spremljanje s cistoskopskimi pregledi, ki so invazivni, boleči in imajo nevarnost hujših zapletov.

V zadnjem desetletju so odkrili številne tumorske označevalce, ki so prisotni v urinu in bi teoretično lahko nadomestili cistoskopsko spremljanje ali vsaj omogočili daljše časovne razmike med cistoskopskimi pregledi. Eden izmed testov, ki temelji na teh označevalcih je Cepheid Xpert Bladder Cancer test, ki do naše raziskave v Sloveniji še ni bil klinično uporabljen.

Namen magistrske naloge je bil ovrednotiti klinični pomen Cepheid Xpert Bladder Cancer testa za odkrivanje in spremljanje raka mehurja.

V raziskavo smo vključili 54 bolnikov, od tega 42 moških in 12 žensk. Vsi so že imeli potrjeno diagnozo RSM. Med njimi so bili bolniki z novo odkritim RSM in so bili hospitalizirani na Kliničnem oddelku za urologijo UKC Ljubljana pred prvo transuretralno resekcijo RSM in bolniki, ki so prišli na redno kontrolno cistoskopijo v cistoskopirnico Kliničnega oddelka za urologijo UKC Ljubljana po predhodni transuretralni resekciji RSM.

Rezultati naše študije so pokazali, da je občutljivost Xpert BC Monitor testa za napovedovanje pozitivnega in sumljivega rezultata cistoskopije bistveno večja kot pri citološkem pregledu urina (75,0 % v primerjavi z 41,2 %), boljša je tudi negativna napovedna vrednost (93,0 % v primerjavi z 85,4 %).

Visoka diskriminantna moč Xpert BC Monitor testa med malignimi in benignimi histološkimi skupinami je posledica zelo signifikantne razlike med mediano skupne vrednosti LDA v obeh skupinah (0,2486 za benigno in 0,9869 za maligno skupino). Skupna občutljivost in negativna napovedna vrednost Xpert BC Monitor testa za napovedovanje malignega histološkega rezultata znašata 76,9 % in 93,0 % in močno presegata vrednosti citološkega pregleda urina (46,2 % in 85,4 %).

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko podamo naslednje ugotovitve: Xpert BC Monitor test je pokazal bistveno večjo občutljivost in negativno napovedno vrednost v primerjavi s citološkim

pregledom urina. Njegova sposobnost odkrivanja ponovitve tumorjev bi lahko spremenila nadaljnje urnike kontrolnih cistoskopij. Pri bolnikih z negativnim rezultatom Xpert BC Monitor testa bi lahko povečali priporočene intervale med posameznimi cistoskopijami. Xpert BC Monitor test je dovolj dober in zanesljiv, da kombiniranje le-tega s citološkim pregledom urina ne izboljša njegove zmogljivosti.

Ključne besede: rak sečnega mehurja, mRNA tumorski označevalci, Cepheid Xpert Bladder Cancer Monitor test, cistoskopija, citopatološka preiskava urina

ABSTRACT

Bladder cancer (BC) in Europe accounts for 6,2 % of all cancers in men and 1,6 % in women. In three-quarters of cases, it is detected in the initial, superficial stage, which can eventually progress to muscle-invasive cancer, which in turn causes severe health problems and can even lead to the death of the patient. The main principle of treatment of superficial BC is immediate transurethral resection of the tumor and frequent monitoring with cystoscopic examinations, which are invasive, painful and have a risk of severe complications.

Over the last decade, several tumor markers have been discovered that are present in urine and could theoretically replace cystoscopic monitoring or at least allow longer intervals between cystoscopic examinations. One of the tests based on these markers is the Cepheid Xpert Bladder Cancer test, which has not been used clinically in Slovenia until our research.

The purpose of the master's thesis was to evaluate the clinical significance of the Cepheid Xpert Bladder Cancer test for the detection and monitoring of bladder cancer.

We included 54 patients in the study, of which 42 were men and 12 were women. All already had a confirmed diagnosis of BC. Among them were patients with newly discovered BC and were hospitalized at the Clinical Department of Urology at the University Medical Center Ljubljana before the first transurethral resection of the BC and patients who came for regular control cystoscopy in the cystoscopy room of the Clinical Department of Urology at the University Medical Center Ljubljana after previous transurethral resection.

The results of our study showed that the sensitivity of the Xpert BC Monitor test to predict a positive and suspicious cystoscopy result is significantly higher than in the cytological examination of urine (75,0 % compared to 41,2 %), the negative prognostic value is also better (93,0 % compared to 85,4 %).

The high discriminant power of the Xpert BC Monitor test between malignant and benign histological groups is due to an incredibly significant difference between the median total LDA values in both groups (0,2486 for the benign and 0,9869 for the malignant group). The overall sensitivity and negative predictive value of the Xpert BC Monitor test for predicting malignant histological outcome are 76,9 % and 93,0 %, respectively, and greatly exceed the values of urine cytological examination (46,2 % and 85,4 %).

Based on the obtained results, we can make the following conclusions: Xpert BC Monitor test showed significantly higher sensitivity and negative prognostic value compared to cytological

examination of urine. Its ability to detect tumor recurrence could alter further cystoscopy follow-up schedules. In patients with a negative Xpert BC Monitor test result, the recommended intervals between individual cystoscopies could be increased. The combination of both tests, the Xpert BC Monitor test and the cytological examination of the urine, does not improve the performance of the Xpert BC Monitor test itself.

Key words: bladder cancer, mRNA tumor markers, Cepheid Xpert Bladder Cancer Monitor test, cystoscopy, cytopathological examination of urine

SEZNAM OKRAJŠAV

RSM	rak sečnega mehurja
UPEC	<i>ang. UroPathogenic Escherichia Coli</i> ; uropatogena bakterija <i>Escherichia coli</i>
TNM	<i>ang. tumor, node, metastasis</i> ; tumor, vozlišče, metastaze
WHO	<i>ang. World Health Organization</i> ; Svetovna zdravstvena organizacija
RTG	rentgen
UZ	ultrazvok
CT	računalniška tomografija
MR	magnetna resonanca
EAU	Evropsko urološko združenje (<i>ang. European Association of Urology</i>)
FDA	Uprava za hrano in zdravila (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
NMP22	strukturni jedrni protein 22 (<i>ang. nuclear matrix protein 22</i>)
BTA stat	tumorski antigen sečnega mehurja (<i>ang. bladder tumor antigen stat</i>)
VEGF	vaskularni endotelijski rastni faktor (<i>ang. vascular endothelial growth factor</i>)
FGFR3 3)	fibroblastni receptor za rastni faktor 3 (<i>ang. fibroblast growth factor receptor</i>
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
CRH	kortikotropin sproščujoči hormon (<i>ang. corticotropin-releasing hormone</i>)
IGF2	inzulinu podoben rastni faktor 2 (<i>ang. insuline-like growth factor 2</i>)
UPK1B	uroplakin 1B
ANXA10	aneksin 10
Ct	cikel praga detekcije
LDA	linearna diskriminantna analiza
LDATC	mejna vrednost skupne vrednosti LDA
ROC	karakteristika delovanja sprejemnika (<i>ang. receiver operating system</i>)
NNV	negativna napovedna vrednost
PNV	pozitivna napovedna vrednost

1 UVOD

1.1 SPLOŠNO O SEČILIH

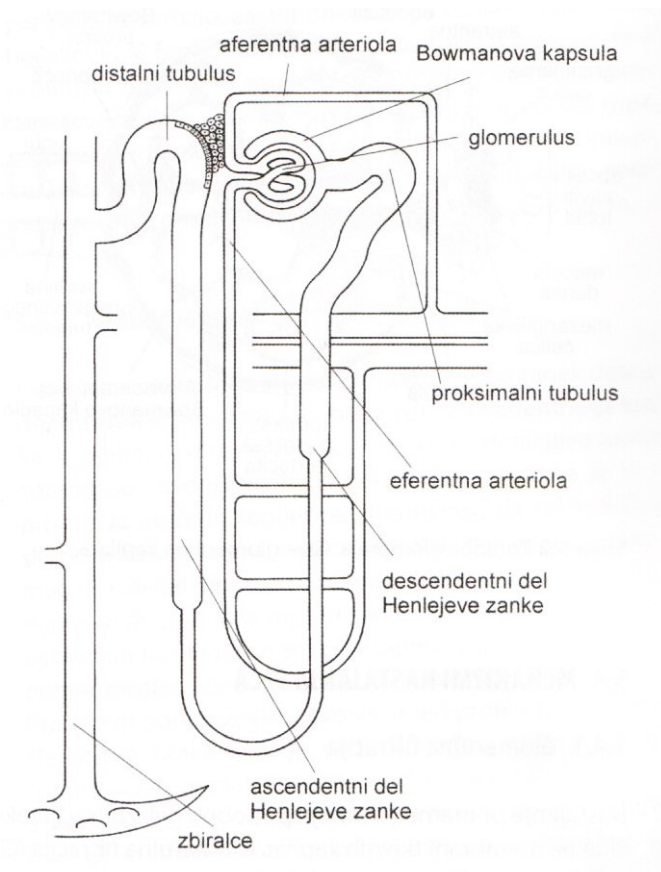
Različne snovi, ki jih vsakodnevno vnašamo v telo, prehajajo v celice, ki iz njih proizvajajo za telo koristne ali škodljive oziroma odvečne produkte. Slednje telo izloča na različne načine, eden izmed njih je uriniranje. Sečila so najpomembnejši organ za izločanje odvečnih snovi iz telesa, kot so npr. končni produkti presnove proteinov in telesu tujih snovi (¹). V sistem sečil uvrščamo ledvici (*ren, nefros*), sečevoda (*urether*), sečni mehur (*vesica urinaria*) in sečnico (*urethra*) (²). Bistveni organ sečil so ledvice, a na izločanje moramo gledati kot del širše funkcije – vzdrževanje homeostaze. Vzdržujejo stalnost volumna in sestave telesnih tekočih, vzdržujejo acidobazno ravnotežje in pH telesnih tekočin, sodelujejo pa tudi pri uravnavanju arterijskega tlaka (³).

Funkcije ledvic za vzdrževanje zgoraj omenjenih nalog so izločanje vode, izločanje neorganskih topljencev s hrano vnesenih v telo (npr. elektroliti, minerali), izločanje organskih končnih produktov presnove nastalih v telesu (sečnina, kreatinin, urat) in presnovkov telesu tujih snovi (zdravila, strupi), izločanje H^+ in HCO_3^- za uravnavanje acidobaznega ravnovesja telesnih tekočin (³). Funkcija ledvic je med drugim tudi tvorba nekaterih hormonov, npr. renina, ki sodeluje pri uravnavanju krvnega tlaka, ter eritropoetina, ki spodbuja nastajanje eritrocitov v kostnem mozgu. Prav tako so ledvice mesto, kjer poteka aktivacija vitamina D (²).

Ledvici pri ljudeh ležita v zgornjem delu trebušne votline pod trebušno prepono zadaj levo in desno od hrbtenice. Ščitijo ju spodnja rebra in maščobno tkivo v katerega sta ugreznjeni, le-ta pa skupaj z vlaknatim vezivnim tkivom pritrja ledvici na pravo mesto. Na zgornjem delu obeh ledvic ležita nadledvični žlezi (*glandula suprarenalis*). Desna ledvica leži nekoliko nižje od leve zaradi lege jeter. Tik pod površino ledvice je ledvična skorja, ki je obrobni sloj ledvice, v notranjosti pa se nahaja ledvična sredica. V ledvični skorji se nahajajo kroglaste tvorbe – ledvična telesca, iz katerih izhajajo sečne cevke. Obe strukturi skupaj tvorita nefron, ki je osnovna gradbena in funkcionalna enota ledvic, v vsaki ledvici pa je približno milijon nefronov (^{1,2}).

V skorji nefrona so glomeruli (Malpigijeva telesca) ter zviti in ravni proksimalni in distalni tubusi, v sredici pa so Henlejeve zanke in zbiralca. Del proksimalnega tubusa, ki sega v

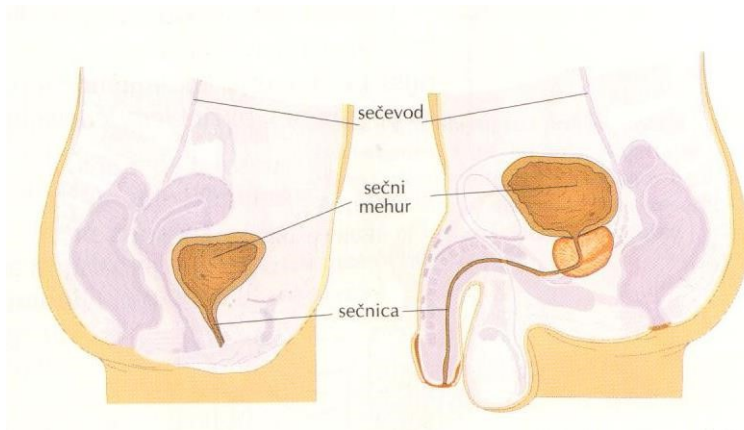
Malpigijevo telesce, se imenuje Bowmanova kapsula, ki skupaj z glomerulnimi kapilarami tvori bazalno membrano. Zaradi mikroskopskih por Malpigijevo telesce omogoča filtriranje krvne plazme in tako v krvi zadrži krvne proteine in nanje vezane snovi, ter krvne celice. Tekočina, ki iz kapilar glomerula vstopi v kapsularni prostor in priteče v proksimalni tubus je primarni seč. Proces imenujemo glomerulna filtracija. Skozi ledvice vsako minuto teče približno 1,2 L krvi, dnevno pa nastane 150-200 L primarnega seča (³), od katerega se nato skozi proksimalne zvite tubule in Henlejeve zanke ponovno resorbira približno 150 L, skozi distalne zvite tubule pa še 28 L litrov vode (⁴). Pri prehodu primarnega seča skozi različne dele tubulov tako nastane končni sekundarni seč, ki ga dnevno izločimo med 1 in 2 L (³). Kompleksno zgradbo nefrona prikazuje slika 1.



Slika 1: Zgradba nefrona, povzeto po (³)

Pod ledvično skorjo se nahaja ledvična sredica, ki jo oblikujejo piramide, vzdolž katerih potekajo proksimalne zvite ledvične cevke, ki se nadaljujejo v Henlejevo zanko, te pa dalje v distalne zvite cevke, ki se zlivajo v zbiralce. Več le-teh se nato združi na vrhovih piramid, katere obdajajo ledvične čaše. Seč, ki torej priteka iz zbiralc v ledvične čaše, se nato zbere v osrednji votlini ledvic, v ledvičnem mehu. Ledvični meh se nadaljuje v sečevod, po katerem se seč odvaja v sečni mehur (^{1,3,4}). Odtokanje seča iz sečnega mehurja preprečujeta mišici zapiralki,

pri čemer se notranja sprosti kadar je stena polnega mehurja raztegnjena, zunanja pa pod vplivom naše volje. Seč se iz sečnega mehurja izloča skozi sečnico, ki je pri moških dosti daljša kot pri ženskah, saj le-ta poteka skozi prostato ter po vsej dolžini spolnega uda ^(1,2), kar lahko vidimo na sliki 2.



Slika 2: Sečni sistem pri ženskah (levo) in pri moških (desno), povzeto po ⁽¹⁾

1.1.1 SEČNI MEHUR

Sečni mehur je mišičast in elastičen votli organ medeničnega dna. Deluje kot kratkotrajno zbirališče urina, ki vanj priteka po sečevodih iz ledvic in vsebuje odpadne produkte metabolizma. Pri moških leži nad prostato in pred danko, pri ženskah pa pred maternico ^(2,5).

Steno mehurja sestavljajo adventicija – zunanja ožiljena vezivna ovojnica (*tunica adventitia*), plast mišic – *tunica muscularis*, plast intersticijskega veziva med sluznico in mišično plastjo (*submucosa*) in epitelij sečnega mehurja (urotelij), ki obdaja notranjo steno mehurja ⁽⁶⁾. Sestavljen je iz več plasti različno oblikovanih in različno velikih celic. Notranja sluznica je blede rožnate barve in je pri praznem mehurju nagubana, pri polnem pa izravnana oziroma gladka. Mišična plast je iz gladkih mišic, vlakna potekajo krožno, vzdolžno in spiralno. Sečni mehur se z raztezanjem prilagaja spremembam volumna urina. Sprejme lahko okoli pol litra urina, a je pri tem potreba po uriniranju že zelo velika. Vezivna ovojnica na površini omogoča raztezanje pri polnjenju ⁽²⁾. Najpomembnejša naloga sečnega mehurja je preprečevanje prehajanja toksičnih substanc iz urina v kri, kar mu med drugim omogočajo tudi urotelijski plaki, ki pokrivajo 90 % apikalne površine dežnikastih celic in tvorijo zelo učinkovito pregrado, ki pa zaradi ne odebeljenih predelov membrane sečnemu mehurju še vseeno omogoča raztezanje in krčenje. Nastanek plakov je možen le v diferenciranih celicah, zato v primeru

njihove odsotnosti ali spremembe glikozilacije sumimo na napake v diferenciaciji celic urotelija – npr. rak sečnega mehurja, okužbe sečil (7).

1.2 BOLEZNI SEČIL

Okužbe urinarnega trakta, kronična vnetna stanja in rak sečnega mehurja so najpogostejša obolenja sečnega mehurja in predstavljajo velik tako ekonomski kot socialni problem (8).

1.2.1 OKUŽBE URINARNEGA TRAKTA

Vnetja sečil sodijo med najpogostejše bakterijske okužbe. Do infekcije pride zaradi vdora bakterij skozi sečnico. Pogostejši so pri ženskah zaradi krajše sečnice, kar bakterijam omogoča lažje prodiranje v notranjost proti sečnemu mehurju (4).

Delimo jih na vnetja spodnjih (npr. cistitis) in na vnetja zgornjih (npr. pielonefritis) sečil (4,9). V primeru, da gre za okužbo pri sicer zdravih ženskah brez strukturnih ali nevroloških posebnosti sečil, vnetja obravnavamo kot nezapletena. V nasprotnem primeru, pri strukturnih ali nevroloških posebnostih sečil pri katerem koli spolu, vnetje označimo kot zapleteno (8).

Najpogosteje je povzročitelj okužbe ena sama vrsta bakterije, razen pri kateteriziranih bolnikih in pri ljudeh z strukturnimi ali nevrološki posebnostmi sečil določimo več različnih povzročiteljev infekcije. V 80-90 % vseh okužb pridobljenih v domačem okolju je povzročitelj vnetja uropatogena bakterija *Escherichia coli* (UPEC), prav tako lahko 30-50 % vnetij pridobljenih v bolnišnici pripišemo ravno njej. Ostali povzročitelji uroinfektov so lahko še bakterije *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* in streptokoki skupine B. Vnetja lahko povročijo tudi glive (npr. *Candida albicans*) in virusi (npr. adenovirus) (8,9).

Vzrok za nezapleteno okužbo je običajno kontaminacija periuretralnega področja s patogenim mikroorganizmom, ki se sicer nahaja v črevesju. Nato pride do kolonizacije patogenov v sečnici in prodiranja v sečni mehur, kjer se nadalje pritrjujejo in razraščajo. Ali bo patogeni mikroorganizem nato uspešno koloniziral sečni mehur oziroma ali bo prišlo do njegove odstranitve je odvisno od interakcij med gostiteljem in patogenom (9).

Mnoge bakterije s svojimi adhezini prepoznajo receptorje na uroteliju, se nanje vežejo in nato vdrejo v urotelij, ob čemer tvorijo toksine in proteaze. Na tak način povzročijo sproščanje hranil iz gostiteljeve celice. Določeni uropatogeni so sposobni tudi sinteze sideroforjev, s pomočjo

katerih privzemajo železo, kar je posebej pomembno za fakultativne anaerobe (npr. UPEC). Bakterije nato ob multiplih delitvah zaobidejo gostiteljev imunski sistem in s pomočjo adhezinov kolonizirajo tudi epitelij ledvic. Ob večjih poškodbah tkiva lahko preidejo tudi v krvožilni sistem in povročijo bakteriemijo (⁹).

1.2.1.1 Dejavniki tveganja in epidemiologija

Vsako leto zabeležimo okužbo urinarnega trakta pri kar 150 milijonih ljudeh po vsem svetu. Okužba osemkrat pogosteje prizadene ženske kot moške in sicer med 15. in 29. letom starosti, bolj dovzetni za okužbo so tudi starostniki obeh spolov. Dejavniki tveganja, ki povečujejo tveganje za okužbo so torej ženski spol, spolna aktivnost, predhodne okužbe urinarnega trakta, uporaba spermicidov, vaginalna vnetja, sladkorna bolezen, urinarna inkontinenca, trajni urinski kateter, uporaba antibiotikov ter strukturne in nevrološke posebnosti sečil. V kolikor je okužba prisotna dvakrat v šestih mesecih ali več kot trikrat v enem letu, okužbo označimo kot ponavljajočo. V splošnem takšna okužba kar 50-60 % žensk prizadene najmanj enkrat v življenju (⁸).

1.2.1.2 Diagnostika in zdravljenje

Prvi znak vnetja so pogostejša in boleča odvajanja urina. Značilnim simptomom se lahko pridružijo še povišana telesna temperatura, topa bolečina v ledvenem predelu, splošno slabo počutje in slabost. Bolnika napotimo na odvzem urina, opravimo osnovno urinsko analizo ter mikroskopski pregled sedimenta. V sedimentu je ob okužbah vidno povečano število levkocitov ter bakterij (⁴). Okužbe urinarnega trakta zdravimo z ustreznim antibiotikom, ki ga po dobljenih izvidih urinokulture po potrebi zamenjamo.

1.2.2 RAK SEČNEGA MEHURJA

1.2.2.1 Epidemiologija

Rak sečnega mehurja (RSM) je kar deveti najpogostejši rak na svetu in sedmi najpogostejši rak v Sloveniji in je med tumorji na sečilih takoj za rakom prostate. Leta 2018 je na svetu za RSM zbolelo približno 549.000 ljudi in umrlo 200.000 ljudi. Žal sodi med maligna rakasta obolenja, ki so v porastu, a vzpodbuden napredek na področju zdravljenja pacientom omogoča vse večjo kakovost življenja. Predstavniki moškega spola obolevajo kar trikrat pogosteje kot ženske. Glede na podatke Registra raka za Slovenijo je bila med leti 2006 in 2010 povprečna incidenčna stopnja zbolelosti za RSM v Sloveniji 20 primerov na 100.000 pri moških in 7,5 primerov na

100.000 pri ženskah. Tekom naslednjih štirih let se je le-ta dvignila na 24 primerov na 100.000 pri moških in 8,1 primerov na 100.000 pri ženskah. V letu 2018 je stopnja incidence narastla na 27 primerov na 100.000 pri moških in 9 primerov na 100.000 pri ženskah. Leta 2014 je bilo v Sloveniji kar 334 na novo odkritih bolnikov z RSM, v letu 2015 pa je zaradi RSM umrlo kar 133 moških in 52 žensk ⁽¹⁰⁾. Na podlagi epidemioloških podatkov so Wong in sodelavci v letu 2018 izdelali napovedni model iz katerega je razvidno, da naj bi se stopnja incidence RSM v Sloveniji še povečala – do leta 2030 za 92 % pri moških in 256 % pri ženskah ⁽¹¹⁾.

1.2.2.2 Dejavniki tveganja

Najpomembnejši dejavnik tveganja za nastanek RSM je kajenje, ki predstavlja vzrok za razvoj raka pri kar polovici vseh primerov. Z urinom se namreč izločajo aromatski amini in policiklični aromatski ogljikovodiki, ki jih vsebuje tobak ⁽⁸⁾.

Med druge dejavnike tveganja uvrščamo tudi izpostavljenost kemičnim karcinogenom v industriji (kemična, lesna, usnjarska, gumarska industrija), ki predstavlja vzrok za razvoj raka pri približno 10% vseh primerov RSM, a se podjetja v zadnjih letih trudijo to tveganje zmanjšati z uvedbo ustreznih varnostnih smernic. Poleg naštetega med dejavnike tveganja prištevamo tudi okužbe s paraziti (npr. povezava nastanka RSM s shistosomiazozo in posledično nastanka ploščatoceličnega karcinoma sečnega mehurja) ⁽⁸⁾, dolgotrajna izpostavljenost ultravijoličnim žarkom, ionizirajočemu sevanju ali radioaktivnim elementom ter zlorabo nekaterih zdravil (analgetikov).

1.2.2.3 Bolezenski znaki

Postavitev točne diagnoze včasih predstavlja težavo, saj so simptomi podobni vnetju mehurja ali prostatitisu. Pri 85% bolnikov se pojavi neboleča krvavitev, ki je tudi najpogostejši, a tudi nespecifičen simptom, saj še vseeno 80-95 % pacientov s hematurijo nima prisotnega RSM. Vzrok zanjo je najpogosteje okužba sečil, sečni kamni, benigna hiperplazija prostate, policistična bolezen ledvic in drugo.

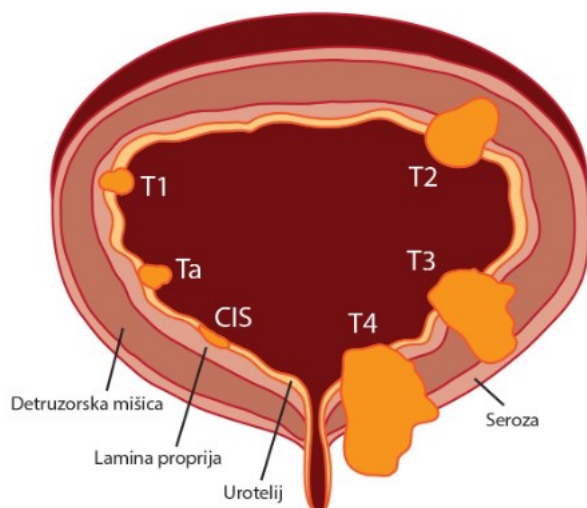
Značilno je pogostejše odvajanje vode, ki je lahko pekoče. Bolečine se pojavijo šele v že napredovalih stadijih kot posledica lokalno razraslega tumorja ali zapore sečevoda. Če se je bolezen že razširila v trebušne bezgavke, se pojavi oteklina spodnjih okončin in spolovila.

1.2.2.4 Klasifikacija

Prehodnocelični (urotelijski) karcinomi predstavljajo več kot 90 odstotkov malignih tumorjev sečnega mehurja ⁽¹²⁾. Manj pogosti so adenokarcinomi, ploščatocelični karcinom ter drobnocelični karcinom sečnega mehurja ⁽⁸⁾. Glede na globino invazije jih delimo v dve skupini, ki sta prognostično in terapevtsko zelo pomembni - površinski RSM in mišično invazivni RSM, ki vraščajo v mišično plast detruzorja ⁽⁴⁾. Ob diagnozi je kar 75 % vseh primerov RSM mišično neinvazivnih (boljša prognoza in višja stopnja preživetja), pri ostalih 25 % primerov je ob diagnozi mišično invazivnih ali metastatskih RSM kljub napredku v medicini stopnja preživetja nizka ⁽⁸⁾. Za točno postavitev diagnoze pri bolniku moramo opraviti cistoskopijo (pregled sečnega mehurja s cistoskopom) in biopsijo tumorja. Za klasifikacijo stopnje invazije uporabljamo TNM (ang. *tumor, node, metastasis*) klasifikacijo malignih tumorjev. Če v bioptu ne prepoznamo rakavo spremenjenega tkiva, se bolezen po klasifikaciji TNM glede na kategorijo »T« uvrsti v stadij T0. Sicer pa TNM površinske RSM deli še v razrede Tis (CIS), Ta in T1, infiltrativne pa na T2, T3 in T4 ^(8,11).

Tabela 1: Klasifikacija stopnje invazije tumorja po TNM – kategorija T

Kategorija	Ocena stanja
T0	Biopt ne vsebuje rakasto spremenjenega tkiva.
Ta	Tumor je omejen na urotelij sečnega mehurja, ne vdira v lamino proprijo.
T1	Tumor vdira v lamino proprijo.
CIS	Tumor omejen na urotelij.
T2	Tumor vrašča v detruzorsko mišico.
T3	Tumor prehaja detruzorsko mišico in vrašča v maščobno tkivo.
T4	Tumor se je iz maščobnega tkiva razširil v sosednje organe ali strukture (npr. prostato, vagino, črevesje, medenico).
TX	Tumorja na podlagi histološke preiskave ni možno uvrstiti v ostale kategorije.



Slika 3: Prikaz različnih tipov tumorjev sečnega mehurja; povzeto po (8)

Po klasifikaciji TNM moramo podati tudi oceno stanja bezgavk (8,11).

Tabela 2: Klasifikacija stopnje invazije tumorja po TNM – kategorija N

Kategorija	Ocena stanja
N0	Tumor ni vdrl v bezgavke.
N1	Metastaza v eni medenični bezgavki.
N2	Tumor je vdrl v več medeničnih bezgavk.
N3	RSM je metastaziral v črevnične bezgavke.

Po klasifikaciji TNM lahko ovrednotimo tudi oceno stanja metastaz (8,11).

Tabela 3: Klasifikacija stopnje invazije tumorja po TNM – kategorija M

Kategorija	Ocena stanja
M0	Do nastanka oddaljenih metastaz ni prišlo.
M1	Do nastanka oddaljenih metastaz je prišlo.

Po WHO klasifikaciji urotelijski karcinom glede na stopnjo anaplazije posameznih celic delimo na:

- prehodnocelični papilom in invertiran papilom (benigna tumorja),
- papilarno prehodnocelično neoplazmo (nizek maligni potencial),

- prehodnocelični karcinom nizkega gradusa in
- prehodnocelični karcinom visokega gradusa.

Kadar gre za neoplazme nizkega malignega potenciala v mikroskopski sliki opazimo pomnoženo število plasti urotelija, manj pa sta izražena anaplazija in pleomorfizem celic. Le rahlo spremenjeno je zorenje urotelnih celic od bazalne plasti proti površini (manjše število mitoz). Bolj izrazito moteno je zorenje celic pri RSM nizkega gradusa (večje število mitoz), razmerje med citoplazmo in jedrom je večje, jedra so pleomorfna, nukleoli pa bolj vidni. Številne mitoze in izrazito pleomorfna jedra so značilna za celice tumorjev visokega gradusa, kjer celice med prehajanjem proti površini ne zorijo (¹³). Glede na gradus oziroma stopnjo diferenciacije tumorje torej razvrščamo v tumorje nizkega ali visokega gradusa. Prvi so relativno dobro diferencirani, rastejo počasi, verjetnost, da se bodo razširili v sosednja tkiva je nizka, za tumorje visokega gradusa pa velja ravno nasprotno (¹¹).

Omenjena klasifikacija temelji na mikroskopskih spremembah na celičnem in tkivnem nivoju. Z dodatnimi raziskavami so ugotovili tudi povezavo na genskem in molekularnem nivoju. Razlikujejo se namreč bistvene stopnje nastanka RSM nizkega ali visokega gradusa. Pri RSM nizkega gradusa gre za izgubo enega ali več genov na kromosomu 9q, pri RSM visokega gradusa pa so znane spremembe na tumor supresorskem genu 53, retinoblastoma genu in spremembe na genu P16 (¹⁴⁻¹⁶).

Pri primerih RSM visokega gradusa je v primerjavi z RSM nizkega gradusa celični cikel bolj pospešen in iztirjen, posledica je agresivnejše in hitrejše lokalno napredovanje bolezni.

Površinski RSM so v trenutku odkritja pogostejši kot mišično-invazivni (delež v času postavitve diagnoze RSM je 75-85 %). V klinični praksi je pomembno razvrščanje v tri skupine (upoštevajoč tveganje za ponovitev in napredovanje bolezni) in sicer na površinski RSM z nizkim, srednjim ali visokim tveganjem (¹⁷). Možnost za ponovitev površinskega RSM je visoka, a je z vidika zdravljenja in prognostičnega vidika pomembnejše napredovanje stopnje invazije in gradusa v časovnem obdobju.

1.2.2.5 Diagnostika raka sečnega mehurja

Potrebna je natančna anamneza o bolniku in klinični pregled. Zlati standard pri diagnostiki in spremljanju RSM je torej cistoskopija, ki jo dopolnimo s citopatološkim pregledom urina. Intravenska urografija se uporablja za izključitev urotelijskega karcinoma v zgornjem delu urinarnega trakta.

Cistoskopija je invaziven in boleč poseg, ki v določeni meri povzroča neželene zaplete kot so vnetja sečil, krvavitve in sečnice, poškodbe sečnice s perforacijo, zožitve sečnice.

Citopatološki pregled urina je neinvazivna preiskava z dobro občutljivostjo (~90 %) in specifičnostjo (>90 %) pri prehodnoceličnih RSM visokega gradusa, kamor spada tudi karcinom *in-situ* (Tis oziroma Cis), ki ga je cistoskopsko težje odkriti. Po drugi strani je občutljivost omenjene preiskave izredno nizka pri številčno najpogostejših RSM nizkega gradusa (20-50 %) (^{10,12}). Citopatološki pregled urina je prav tako subjektivna ocena, saj lahko med citopatologi pri istem vzorcu prihaja do razlik, rezultati pa so razvrščeni v le tri skupine (negativno, sumljivo in pozitivno), kar prav tako otežuje klinično odločanje (¹⁸).

Sicer uporabljamo tudi slikovne preiskave, s katerimi se določa obseg bolezni – UZ (ultrazvok), CT (računalniška tomografija) in/ali MR (magnetna resonanca). Če je tumor mišično invaziven opravimo tudi RTG (rentgen) prsnega koša, če so prisotne bolečine v kosteh pa še scintigrafijo kosti.

1.2.2.6 Zdravljenje

Izbira načina zdravljenja RSM je odvisna od stadija bolezni. Pri mišično neinvazivnih RSM se izvaja delna ali popolna odstranitev tumorja skozi sečnico (transuretralna resekcija), kateri lahko sledi kemoterapija, da zmanjšamo tveganje ponovitve bolezni. Včasih posežemo tudi po imunoterapiji, kjer s cepivom spodbudimo imunski sistem in prav tako zmanjšamo tveganje za ponovitev bolezni. Pri obsežnih tumorjih oziroma če le-ti niso odzivni na terapijo, se opravi odstranitev sečnega mehurja v celoti (radikalna cistektomija).

Pri mišično invazivnih rakih se izvaja radikalna cistektomija z odstranitvijo regionalnih bezgavk, radikalno obsevanje mehurja in področnih bezgavk s sočasno kemoterapijo ter s kemoterapijo oziroma s kombinacijo naštetih načinov zdravljenja.

Rake sečnega mehurja v že napredovalih stadijih se zdravi s kemoterapijo, saj v teh primerih radikalna cistektomija ni smiselna.

Po transuretralni resekciji površinskega RSM je za potek in prognozo bolezni bistveno sledenje z obdobjimi cistoskopijami. Čas med posameznimi cistoskopijami prilagodimo tveganju za ponovitev in napredovanje bolezni. Po priporočilih Evropskega združenja urologov (ang. *European association of urology*, kratica EAU) so pri tumorjih z visokim tveganjem potrebne

cistoskopije vsake tri mesece v prvih dveh letih, nato pa se časovni razmak postopoma povečuje. Kljub temu je v petih letih sledenja pri bolniku z RSM z visokim tveganjem potrebnih kar 15 cistoskopij, pri bolniku z nizkim tveganjem pa 6. Če tekom sledenja pride do ponovitve tumorja, se število invazivnih cistoskopij seveda poveča (¹⁹).

1.3 TUMORSKI OZNAČEVALCI

Tumorski označevalci so snovi, ki nastajajo samo v tumorskih celicah (so produkt malignih celic) ali pod njihovim vplivom in jih lahko dokažemo v telesnih tekočinah. Lahko so snovi, ki so sicer običajno prisotne v organizmu, a v mnogo nižjih koncentracijah, lahko pa so na novo sintetizirane snovi in jih v zdravem organizmu ne najdemo (²⁰). So že uveljavljena onkološka metoda, ki se uporablja predvsem pri spremljanju dinamike zdravljenja in pri odkrivanju ponovitve bolezni.

Idealni tumorski označevalec naj bi bil specifičen za posamezno vrsto tumorja, določitev bi bila možna pri vseh bolnikih z istim tipom tumorja že na začetku razvoja tumorja, njegove koncentracije pa naj bi bile odražale dinamiko rasti tumorja (²¹).

Dober laboratorijski test mora imeti visoko diagnostično specifičnost in občutljivost. Testi z najvišjo občutljivostjo so najboljši za izključitev neke bolezni, medtem ko so tisti z najvišjo specifičnostjo najboljši za potrditev ali izključitev obolenja (²²).

1.3.1 VLOGA TUMORSKIH OZNAČEVALCEV PRI RAKU SEČNEGA MEHURJA

Cistoskopija z belo svetlobo in citopatološki pregled urina torej še vedno veljata za najboljši metodi za spremljanje stanja bolnikov s površinskim RSM, vendar pri obeh metodah obstajajo omejitve:

- nizka občutljivost cistoskopije z belo svetlobo pri površinskih lezijah,
- cistoskopije so neprijetne in lahko povzročijo nelagodje pri pacientu, možne so kratkoročne ali dolgoročne komplikacije,
- nizka občutljivost citologije pri tumorjih nizkega in srednjega gradusa,
- veliko bolnikov zaradi določenih smernic ni deležno vseh priporočenih nadaljnjih pregledov.

Da bi izboljšali diagnostiko RSM, so odkrili različne nove tumorske označevalce, ki so prisotni urinu in so namenjeni odkrivanju in sledenju prehodnoceličnih in drugih tumorjev v sečilih. V

kombinaciji s cistoskopijo lahko zmanjšajo vpliv zgoraj naštetih omejitev oziroma bi teoretično lahko nadomestili cistoskopsko spremljanje ali pa vsaj omogočili daljše časovne razmike med cistoskopskimi pregledi. V zadnjih dveh desetletjih je bilo oblikovanih kar nekaj markerjev za odkrivanje RSM, vendar kljub številnim raziskavam še noben od teh ni bil sprejet za uporabo pri postavitvi klinične diagnoze ali pri spremljanju zdravljenja v rutinski praksi. S strani Ameriškega urada za hrano in zdravila (ang: *Food and drug administration*, FDA) je bilo nekaj označevalcev odobrenih za uporabo v presejanju, odkrivanju in sledenju RSM, njihov klinični pomen še ni dorečen. Komercialno so dostopni metoda pretočne citometrije, antigen M344, strukturni jedrni protein 22 (ang. *nuclear matrix protein 22*, NMP22), stat antigen tumorja mehurja - BTA stat test (ang. *bladder tumor antigen stat*), test BTA TRAK, kvantitativna fluorescenčna tehnika, avtokrini motilnostni faktor, aktivnost telomeraze ribonukleotidnega proteina, test razpada fibrina, hialuronska kislina, survivin, CD44v6, vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF), ImmunoCyt in FGFR3 (ang. *fibroblast growth factor receptor 3*), evalvacija mnogih drugih še poteka. Za varno klinično uporabo mora preiskava za ugotavljanje/sledenje RSM visoko občutljivost, kajti časovni zamik pri diagnozi mišično-invazivnega RSM za tri mesece ali več pomembno vpliva na klinični potek bolezni in preživetje bolnikov (¹³⁻¹⁷).

Z uporabo označevalcev ob že ustaljeni metodi cistoskopiji bi se pridobile informacije, ki bi pomagale pri kliničnem odločanju o nadzoru stanja bolnikov z nizkim ali srednjim tveganjem za površinski RSM, hkrati pa bi se določilo, v katerih primerih je koristna uporaba molekularnih markerjev pri pacientih z visoko oceno tveganja za ponovitev in/ali napredovanje karcinoma. S kombinacijo invazivnih in neinvazivnih metod bi lažje dosegali priporočene smernice za spremljanje bolnikov in izboljšali oskrbo pacientov.

1.3.2 Cepheid Xpert Bladder Cancer test

Eden izmed novih testov, ki uporablja tumorske označevalce za detekcijo RSM je Cepheid Xpert Bladder Cancer Monitor test, ki z uporabo metode RT-PCR temelji na zaznavanju izražanja petih za tumor značilnih mRNA v urinu, ki kodirajo naslednje proteine: protein tirozin kinazo ABL1, kortikotropin sproščujoči hormon (ang. *corticotropin-releasing hormone*, kratica CRH), inzulinu podoben rastni faktor 2 (ang. *insulin growth factor 2*, kratica IGF2), uroplakin 1B (UPK1B) in aneksin 10 (ANXA10) (²³). Razen UPK1B, ki je strukturni protein, ki ga najdemo v urotelnih celicah, imajo ostali vlogo pri karcinogenezi in sodelujejo pri proliferaciji, delitvi celic, njihovi diferenciaciji, rasti, adheziji in signalizaciji.

Xpert BC Monitor je neinvazivni biomarker z dokazano klinično občutljivostjo in specifičnostjo za tumorje sečnega mehurja nizkega kot tudi visokega gradusa. Uporablja se v sistemu Cepheid GeneXpert Instrument System.

Sistem je zelo enostaven in hiter za uporabo, saj sama priprava na analizo traja približno 2 minuti, rezultate analize pa dobimo v približno 90 minutah.

Prednosti testa:

- Povečana je negativna napovedna vrednost cistoskopije, kar bi pomembno vplivalo na določitev kontrolnih intervalov med posameznimi cistoskopijami.
- Neinvazivnost testa olajša monitoring bolnikov z RSM.
- Razbremeni se zdravnik, saj lahko test opravijo medicinske sestre ali laboratorijsko osebje.

S pomočjo petih mRNA tumorskih označevalcev lahko razlikujemo med normalnimi in rakavimi celicami sečnega mehurja.

Visoka občutljivost (84 %) in negativna napovedna vrednost (93 %) Xpert BC Monitor testa sta bili podani že leta 2017 kot bistveno boljši v primerjavi s citopatološkim pregledom urina⁽²⁴⁾.

2 NAMEN DELA

Namen študije je ovrednotiti klinično uporabnost Cepheid Xpert Bladder Cancer Monitor testa v urinu za odkrivanje in sledenje RSM pri bolnikih in na tak način zmanjšati število invazivnih cistoskopskih pregledov.

Da bi ta namen dosegli, bomo v študijo vključili 54 pacientov s Kliničnega oddelka za urologijo v UKC Ljubljana, ki bodo v diagnostičnem postopku napoteni na cistoskopijo. Vsi sodelujoči že imajo potrjeno diagnozo RSM. Med njimi so bolniki z novo odkritim RSM, in bolniki, ki so prišli na redni kontrolni pregled.

Pričakujemo torej, da bo test pri pacientih s potrjenim RSM pozitiven oz. negativen pri osebah, ki trenutno nimajo obolenja (oz. ponovitve tumorja).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

Študija je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (0120-566/2018/5), od vsakega od sodelujočih bolnikov smo pridobili informirani pristanek. Študija je potekala od januarja 2019 do oktobra 2019.

Izključitveni kriteriji:

- anamneza sečnih kamnov,
- prisotnost okužbe urinarnega trakta,
- sum na tumor v zgornjem delu sečil,
- vstavljeni umetni materiali v sečilih (nefrostoma ali stent),
- invazivni posegi na sečilih v zadnjih dveh tednih (vstavljanje/odstranjevanje stalnega urinskega katetra, cistoskopija),
- transuretralna resekcija v zadnjih treh mesecih,
- intravezikalna kemoterapija ali imunoterapija v zadnjih treh mesecih,
- sistemsko zdravljenje s kemoterapijo ali radioterapijo v področju medenice.

Sodelovalo je 54 bolnikov, od tega 42 moških in 12 žensk. Vsi so že imeli potrjeno diagnozo RSM. Med njimi so bili bolniki z novo odkritim RSM in so bili hospitalizirani na Kliničnem oddelku za urologijo UKC Ljubljana pred prvo transuretralno resekcijo RSM in bolniki, ki so prišli na redno kontrolno cistoskopijo v cistoskopirnico Kliničnega oddelka za urologijo UKC Ljubljana po predhodni transuretralni resekciji RSM. Oddaja vzorca urina sicer ni invaziven poseg in za bolnike ni pomenil dodatnega varnostnega tveganja.

Za vsakega preiskovanca smo poleg osnovnih podatkov v popisu bolezni pridobili še podatke o predhodnih transuretralnih resekcijah RSM, če so le-te bile opravljene, patohistološke izvide, število ponovitev RSM in napredovanje v višje stopnje glede na klasifikacijo TNM oziroma v višji gradus glede na klasifikacijo WHO. Vse našete podatke bi pridobili tudi za obdobje dveh let po vključitvi bolnika v preiskavo. Spremljali bi tudi potencialna zdravljenja z intravezikalno imunoterapijo ali kemoterapijo.

3.1.1 VAROVANJE OSEBNIH PODATKOV

Vzorci urina preiskovancev smo ustrezno označili s kodirano oznako iz katere identitete preiskovanca ni bilo mogoče razbrati. Seznam oznak je bil dostopen le pooblaščenim osebam v raziskavi. Vsi nadaljnji postopki, preiskave in analize vzorcev so potekali v okviru raziskave na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo UKC Ljubljana.

3.2 MATERIALI

- **Vzorec spontanega urina**
- **Analizator** Cepheid GeneXpert Instrument System
- **Transportni medij z reagentom** Xpert Urine Transport Reagent tube, kamor po odvzemu prenesemo vzorec urina (stabilnost vzorcev v mediju na temperaturi med 2°C in 28°C 7 dni)
- **Reagenčni komplet** (kartuša za analizator) Xpert Bladder Cancer Monitor (hramba na temperaturi med 2°C in 28°C)

3.3 METODE RAZISKAVE

Neposredno pred transuretralno resekcijo RSM oziroma pred kontrolno cistoskopijo so bolniki oddali vzorec spontanega urina za analizo. Frekvenca rednih kontrolnih pregledov je bila določena glede na smernice EAU.

Vzorec urina smo razdelili na dva neenaka dela in sicer za Xpert BC Monitor test smo potrebovali 4,5 mL in za citopatološki pregled najmanj 50 mL spontanega urina. Citopatološki pregled oddanega urina je potekal v citopatološkem laboratoriju Inštituta za patologijo na Medicinski fakulteti v Ljubljani, rezultati so bili podani glede na pariške smernice za klasifikacijo citologije urina in sicer je bil rezultat podan kot negativen, sumljiv ali pozitiven. Tekom študije smo izvide, označene kot sumljive, in izvide, kjer so bile prisotne atipične celice, vključili v skupino pozitivnih, zaradi primerjave uspešnosti odkrivanja karcinoma.

Ob cistoskopiji smo zabeležili potencialno prisotnost tumorja, število tumorjev in ocenili njihovo velikost. Med posegom smo odvzeli tudi izpirek sečnega mehurja za citopatološko preiskavo, ki je bila prav tako opravljena na Inštitutu za patologijo na Medicinski fakulteti v Ljubljani. Tkivo odvzeto med transuretralno resekcijo RSM so pregledali v histopatološkem laboratoriju Inštituta za patologijo na Medicinski fakulteti v Ljubljani. Tam tudi sicer rutinsko

opravljajo tovrstne analize vzorcev iz Kliničnega oddelka za urologijo UKC Ljubljana. Določili so stopnjo invazije tumorja po klasifikaciji TNM in stopnjo anaplazije po klasifikaciji WHO.

Za Cepheid Xpert BC Monitor test smo potrebovali 4,5 mL urina, ki smo ga po odvzemu prenesli v transportni medij z reagentom. Prenos vzorca iz transportnega medija v kartušo za analizator so izvedli v laboratoriju Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo UKC Ljubljana in analizo izvedli po navodilih proizvajalca.

Na vzorcih urina je bil torej opravljen tako citopatološki pregled urina kot Xpert BC Monitor test. Rezultati so bili primerjani z izvidi cistoskopije in s histopatološkimi rezultati po transuretralni resekciji RSM.

3.3.1 Xpert BC Monitor test

3.3.1.1 Princip metode

V vzorcih urina merimo pet tarčnih mRNA (ABL1, CRH, IGF2, UPK1B, ANXA10) z uporabo metode RT-PCR (verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo v realnem času) po protokolu proizvajalca.

3.3.1.1.1 RT-PCR

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je razmeroma enostavna, hitra in pogosto uporabljena tehnika za ojačanje in zaznavanje DNA in RNA zaporedij. Vendar s PCR pomnožujemo le DNA, zato moramo mRNA predhodno prepisati v enoverižno DNA molekulo, ki je komplementarna mRNA (cDNA).

PCR z reverzno transkripcijo torej omogoča uporabo RNA kot predloge (matrike). Dodaten korak v procesu omogoča ojačanje in zaznavanje RNA. RNA se z reverzno transkriptazo prepiše v komplementarno DNA (cDNA). Od tu dalje se za ojačanje cDNA uporablja standardni PCR postopek.

Za uspešni RT-PCR sta pomembni kvaliteta in čistost matrike RNA.

3.3.1.2 Način dela

Vzorec urina volumna 4,5 mL mora biti najkasneje v roku 1 ure dodan transportnemu mediju z reagentom (Xpert Urine Transport Reagent Kit), nakar posodo trikrat obrnemo, da se vzorec pomeša z medijem. Vzorci v mediju morajo biti hranjeni na temperaturi med 2°C in 28°C in so

stabilni 7 dni. Nato 4 mL vzorca pomešanega z medijem za analizo prenesemo v kartušo za analizator, ki vsebuje vse potrebne reagente za pripravo vzorca in kasnejši RT-PCR. Avtomatiziran proces vključuje ujetje celic na filtru, sonifikacija povzroči lizo celic, dodatek nukleinskih kislin povzroči dehidracijo reagentov RT-PCR. Temu sledi transfer v reakcijsko komoro in pomnoževanje z metodo RT-PCR ter na koncu detekcija signala.

Vsaka kartuša za analizator vsebuje notranje kontrole, ki sistemu omogočijo zaznavo potencialnih napak oziroma okvar znotraj posamezne kartuše. Prva tarča ABL1 služi kot nadzor ustreznosti vzorca, saj zagotavlja prisotnost človeških celic in človeške RNA v vzorcu. Signal ABL1 mora biti prisoten, da so rezultati veljavni. V primeru negativnega rezultata za ABL1 v vzorcu ni prisotnih dovolj človeških celic oziroma so le-te razpadle in je izvid zato neveljaven. Druga notranja kontrola zazna potencialno zaviranje reakcije RT-PCR v posameznem vzorcu. Kontrola probe oziroma sonde (meritev fluorescenčnega signala sonde) se opravi pred analizo vzorcev, da preverimo rehidracijo, polnjenje reakcijske cevi, integriteto sonde in stabilnost barvila. Vsaka od naštetih kontrol je uspešno opravljena, če le-ta izpolnjuje določena merila sprejemljivosti.

3.3.1.3 Podajanje rezultatov

Cepheid Expert BC Monitor test je kvalitativen, rezultat je podan kot pozitiven ali negativen in temelji na rezultatih algoritma linearne diskriminantne analize (ang. *linear discriminant analysis*, kratica LDA). Uporabljeni so rezultati cikla praga detekcije (ang. *cycle of treshold*, kratica Ct) petih mRNA tarč: ABL1, CRH, IGF2, UPK1B, ANXA10 (skupni izračun LDA). Ct predstavlja cikel, kjer je fluorescenca ozadja presežena s strani fluorescence nastalega produkta in s tem prečka linijo fluorescenčnega praga.

Skupna vrednost LDA mora biti znotraj veljavnega območja od -20 do 20. Mejna vrednost skupne vrednosti LDA 0,50 je določena s strani proizvajalca in je bila določena na podlagi statistične analize večjega števila vzorcev.

Pozitiven rezultat je dosežen kadar:

1. skupna vrednost LDA je enaka ali večja od mejne vrednosti ($\geq 0,50$);
2. ABL1 Ct in skupna vrednost LDA sta znotraj veljavnega območja;
3. vzorec opravi kontrolo probe;
4. rezultati notranje kontrole Cepheid so prezrti (testne tarče v pozitivnih vzorcih lahko interferirajo s to kontrolo).

Za pozitiven rezultat testa ni nujno potrebno detektirati vseh tarč mRNA.

Negativen rezultat je dosežen kadar:

1. skupna vrednost LDA je manjša od mejne vrednosti ($< 0,50$);
2. ABL1 Ct je znotraj veljavnega območja;
3. notranja kontrola Ct je znotraj veljavnega območja;
4. opravljena so vsa preverjanja prob.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Podatke smo statistično obdelali s programom SPSS (ang. *Statistical package for the social sciences*). Normalno porazdelitev smo preverili s pomočjo Shapiro-Wilk testa za spremenljivke, razlike v skupni vrednosti LDA pa smo primerjali s pomočjo Mann-Whitney U testa, in sicer benigne in maligne histološke skupine, negativne in pozitivne cistoskopske skupine in negativne in pozitivne citološke skupine. Optimalna mejna vrednost skupne vrednosti LDA je bila določena s pomočjo Youdenovega indeksa, nato pa je bila krivulja karakteristike delovanja sprejemnika (ang. *receiver operating characteristic*, kratica ROC) izračunana za določitev uspešnosti delovanja Cepheid Xpert BC Monitor testa. Diagnostično vrednost Cepheid Xpert BC Monitor testa in citopatološkega pregleda smo ovrednotili z določitvijo občutljivosti (število resnično pozitivnih testov / vsota števila resnično pozitivnih in lažno negativnih testov), specifičnosti (število resnično negativnih testov / vsota števila resnično negativnih in lažno pozitivnih testov) ter pozitivne napovedne vrednosti (PNV – število resnično pozitivnih testov / vsota števila resnično pozitivnih in lažno pozitivnih testov) in negativne napovedni vrednosti (NNV – število resnično negativnih testov / vsota števila resnično negativnih in lažno negativnih testov). Vrednost $p < 0,05$ je statistično značilna.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Vseh 54 pacientov, ki so bili naročeni na kontrolno cistoskopijo, je oddalo vzorec spontanega urina, na katerem je bil opravljen tako citološki pregled kot tudi Xpert BC Monitor test.

Tabela 4: Demografski podatki pacientov

Spol pacientov	Število pacientov	Povprečna starost, Leta ± SD
<i>Moški</i>	42 (77,8 %)	70,5 ± 8,7
<i>Ženske</i>	12 (22,2 %)	70,5 ± 9,6
Skupaj	54 (100,0 %)	70,5 ± 8,8

V tabeli 5 smo povzeli pridobljene rezultate. V teoriji "resnično pozitivne" paciente prepoznamo kot preiskovance s prisotno boleznijo, ne zaznamo pa nekaterih s prisotno boleznijo – "lažno negativni". Po drugi strani se lahko zgodi, da nekatere zdrave preiskovance uvrstimo med bolne – "lažno pozitivni", večino zdravih pa bo negativnih – "resnično negativni" (22).

Tabela 5: Povzetek pridobljenih rezultatov

Neinvaziven test / Standardni (invaziven) diagnostični postopek	Število pacientov z RP, LN, RN in LP rezultatom neinvazivnega testa			
	RP	LN	RN	LP
Xpert BC Monitor test / cistoskopija				
LDATC 0,4923	9	3	40	2
LDATC 0,5	8	4	40	2
Citološki pregled urina / cistoskopija	5	7	41	1
Xpert BC Monitor test / histologija				
LDATC 0,4923	10	3	40	1
LDATC 0,5	9	4	40	1
Citološki pregled urina / histologija	5	8	40	1

RP = resnično pozitiven, LN = lažno negativen, RN = resnično negativen, LP = lažno pozitiven, LDATC = mejna vrednost skupne vrednosti LDA

4.1 REZULTATI

Glede na izvide cistoskopije so indikacije za transuretralno resekcijo bile:

- viden ponavljajoči se tumor pri 12 pacientih
- atipična citologija pri 1 pacientu
- zgrešen ponavljajoči se tumor pri 1 pacientu (odkrit pozneje s cistoskopijo)

Histološko poročilo transuretralne resekcije smo pridobili za 12 pacientov. Pri dveh pacientih je bil vidni tumor odstranjen s pomočjo elektrokoagulacije in smo jih v nadaljevanju prišteli k skupini z malignimi rezultati. Izmed vseh 12 histoloških poročil je bilo 11 rezultatov malignih in le eden benignen. Paciente, pri katerih transuretralna resekcija po kontrolni cistoskopiji ni bila potrebna, smo uvrstili v skupino negativnih oz. benignih rezultatov.

Naredili smo tri primerjave glede na vrsto preiskave znotraj dveh skupin:

- primerjava rezultatov cistoskopije (pozitivna/negativna skupina) – med seboj se statistično razlikujeta
- primerjava rezultatov citologije (pozitivna/negativna skupina) – med seboj se statistično razlikujeta
- primerjava rezultatov histologije (pozitivna/negativna skupina) – med seboj se statistično razlikujeta

Rezultati so podani v tabelah 6 in 7.

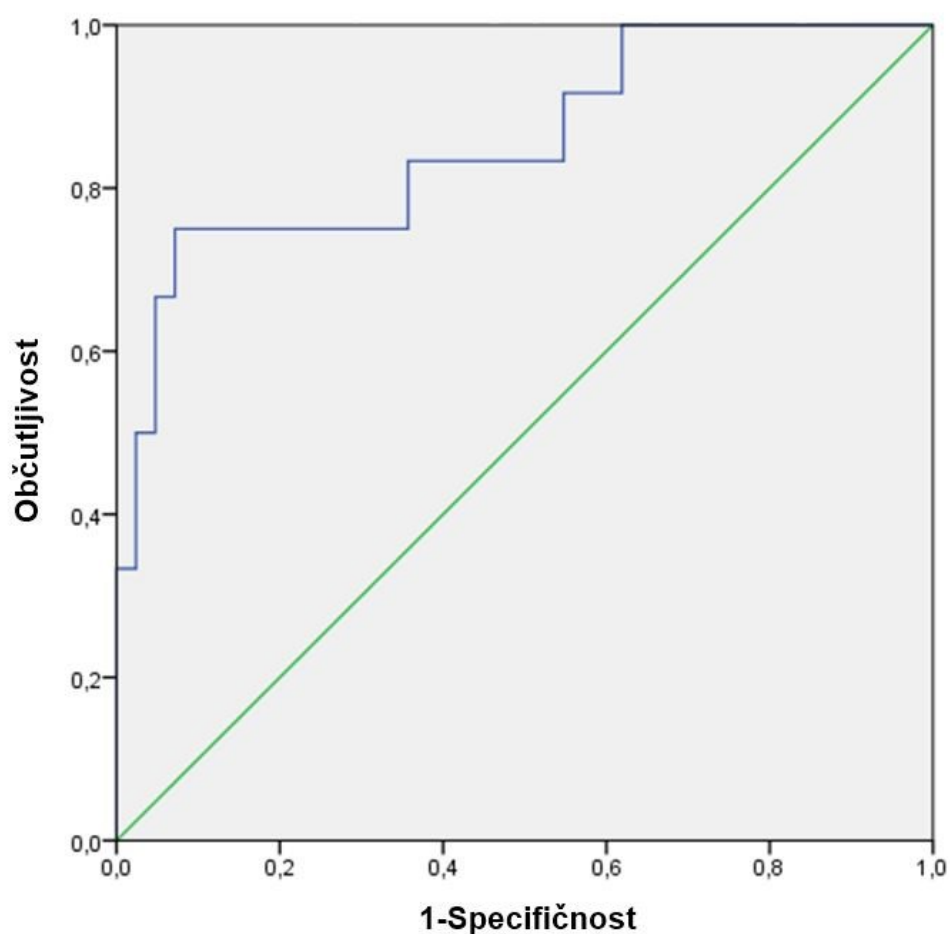
Tabela 6: Primerjava izračunanih median skupne vrednosti LDA pozitivne in negativne skupine pacientov glede na posamezno preiskavo

	Izvid	Razpon vrednosti	Mediana skupne vrednosti LDA
Cistoskopija	<i>negativen</i>	0,1331 - 0,3617	0,2474
	<i>pozitiven</i>	0,4367 - 1,1836	0,8102
Citologija	<i>negativen</i>	0,1286 - 0,3685	0,2486
	<i>pozitiven</i>	0,8872 - 1,866	0,9869
Histologija	<i>negativen (benigen)</i>	0,1357 - 0,3578	0,2467
	<i>pozitiven (maligen)</i>	0,5904 - 1,2642	0,9273

Tabela 7: Rezultati statistične analize z Mann-Whitneyevim U testom ter izračunane p vrednosti

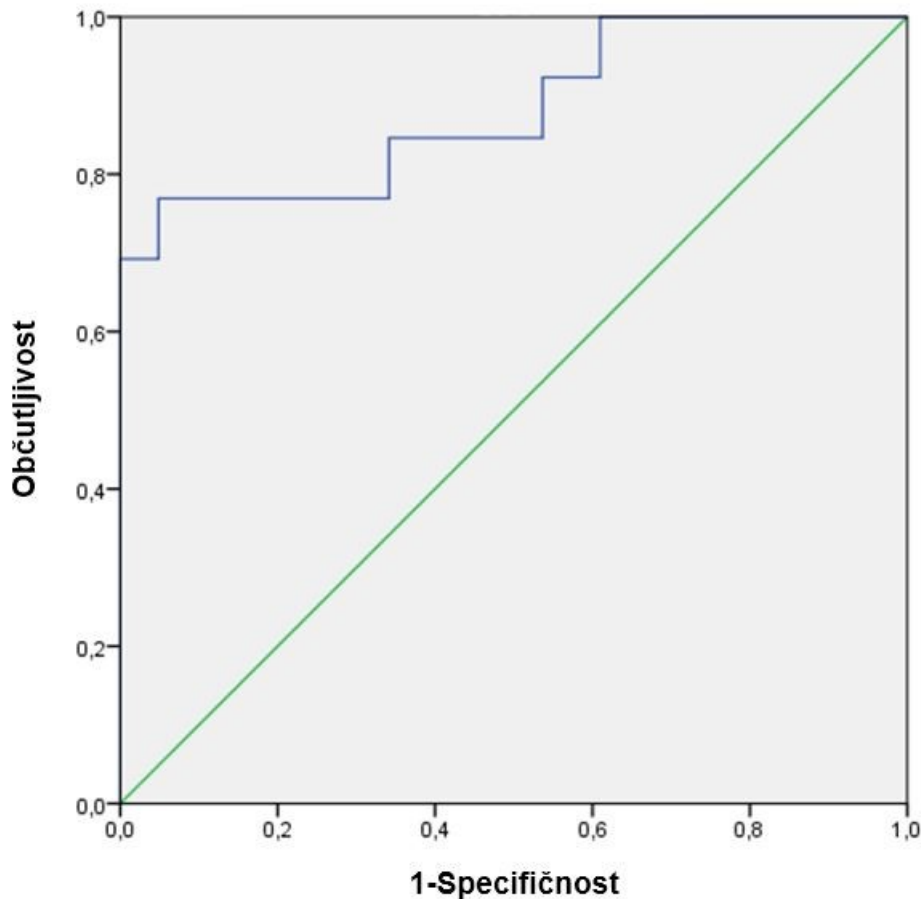
Primerjava za:	Mann-Whitney U test	Stopnja značilnosti (p)
cistoskopijo	73,00	p<0,000
citologijo	12,00	p<0,000
histologijo	63,00	p<0,000

Območje pod ROC krivuljo za Xpert BC Monitor test za napoved rezultatov cistoskopije je bila 0,855 z 95% intervalom zaupanja med 0,722 in 0,998 (n = 54). Krivulja je prikazana na sliki 4.



Slika 4: ROC krivulja za Xpert BC Monitor test za napoved pozitivnih rezultatov cistoskopije.

Območje pod ROC krivuljo za Xpert BC Monitor test za napoved rezultatov histologije je bila 0,882 z 95% intervalom zaupanja med 0,759 in 1,000 (n = 54). Krivuljo prikazuje slika 5.



Slika 5: ROC krivulja za Xpert BC Monitor test za napoved pozitivnih/malignih rezultatov histologije.

Optimalna mejna vrednost 0,4923 za skupno vrednost LDA je bila določena z Youdenovim indeksom iz ROC krivulje za napoved rezultatov cistoskopije in histologije. Občutljivost in specifičnost za napoved pozitivnih rezultatov cistoskopije so znašale 75,0 % in 95,2 % za Xpert BC Monitor test (pri optimalni mejni vrednosti 0,4923) in 41,7 % in 97,6 % za citološki pregled urina. Občutljivost in specifičnost za napoved pozitivnih oz. malignih rezultatov histologije so znašale 76,9 % in 97,5 % za Xpert BC Monitor test (pri optimalni mejni vrednosti 0,4923) in 46,2 % in 97,5 % za citološki pregled urina. Združitev rezultatov obeh omenjenih metod ne kaže izboljšanja odkrivanja tumorjev na mehurju, saj s citološkim pregledom urina nismo prepoznali nobenega dodatnega pacienta, ki ni bil prepoznan kot "pozitiven" že pri Xpert BC Monitor testu. Rezultati so prikazani v tabelah 8 in 9.

Tabela 8: Občutljivost, specifičnost ter pozitivna in negativna napovedna vrednost neinvazivnih urinskih testov za napoved pozitivnih cistoskopskih rezultatov

Test	Občutljivost	Specifičnost	PNV (<i>pozitivna napovedna vrednost</i>)	NNV (<i>negativna napovedna vrednost</i>)
Xpert BC Monitor test				
LDATC 0,4923	75,0 % (9/12)	95,2 % (40/42)	81,8 % (9/11)	93,0 % (40/43)
LDATC 0,5	66,7 %	95,2 %	80,0 %	90,9 %
Citološki pregled urina	41,7 % (5/12)	97,6 % (41/42)	83,3 % (5/6)	85,4 % (41/48)
Xpert BC Monitor test + Citološki pregled urina	75,0 % (9/12)	95,2 % (40/42)	81,8 % (9/11)	93,0 % (40/43)

LDATC = mejna vrednost skupne vrednosti LDA

Tabela 9: Občutljivost, specifičnost ter pozitivna in negativna napovedna vrednost neinvazivnih urinskih testov za napoved pozitivnih histoloških rezultatov

Test	Občutljivost	Specifičnost	PNV (<i>pozitivna napovedna vrednost</i>)	NNV (<i>negativna napovedna vrednost</i>)
Xpert BC Monitor test				
LDATC 0,4923	76,9 % (10/13)	97,5 % (40/41)	90,9 % (10/11)	93,0 % (40/43)
LDATC 0,5	69,2 %	97,5 %	90,0 %	90,0 %
Citološki pregled urina	46,2 % (6/13)	97,5 % (40/41)	85,7 % (6/7)	85,1 % (40/47)
Xpert BC Monitor test + Citološki pregled urina	76,9 % (10/13)	97,5 % (40/41)	90,9 % (10/11)	93,0 % (40/43)

LDATC = mejna vrednost skupne vrednosti LDA

Posamezne stopnje občutljivost Xpert BC Monitor testa so bile 0,0 %, 66,7 %, in 100,0 % za papilarno urotelno neoplazmo nizkega malignega potenciala ter za tumorje nizkega in visokega gradusa, medtem ko so bile občutljivosti citološkega pregleda urina za enake razrede tumorjev 0,0 %, 66,7 % in 42,9 %.

Posamezne stopnje občutljivost Xpert BC Monitor testa so bile 100,0 %, 80,0 %, 100,0 % in 100,0 % za stadije tumorjev CIS, Ta, T1 in T4, medtem ko so bile občutljivosti citološkega pregleda urina za enake stadije tumorjev 50,0 %, 40,0 %, 50,0 % in 100,0 %. Podatki so prikazani v tabelah 10 in 11.

Tabela 10: Občutljivost neinvazivnih urinskih testov glede na razred tumorja.

Test / Razred	Papilarna urotelna neoplazma nizkega malignega potenciala	Nizek gradus	Visok gradus
Xpert BC Monitor test	0,0 % (0/1)	66,7 % (2/3)	100,0 % (7/7)
Citološki pregled urina	0,0 % (0/1)	66,7 % (2/3)	42,9 % (3/7)

Tabela 11: Občutljivosti neinvazivnih urinskih testov glede na stadij tumorja

Test / Stadij	CIS	Ta	T1	T2
Xpert BC Monitor test	100,0 % (2/2)	80,0 % (4/5)	100,0 % (2/2)	100,0 % (1/1)
Citološki pregled urina	50,0 % (1/2)	40,0 % (2/5)	50,0 % (1/2)	100,0 % (1/1)

4.2 RAZPRAVA

S študijo smo ovrednotili dva testa na spontanem vzorcu urina: Xpert BC Monitor test ter citološki pregled urina. Ocenili smo kako se obneseta pri spremljanju tumorjev na sečnem mehurju. Kljub dostopnosti neinvazivnih urinskih testov cistoskopija v kombinaciji s

citološkimi pregledom urina še vedno velja za zlati standard pri spremljanju bolnikov z RSM (¹⁹). Citološka preiskava urina ima nizko občutljivost za tumorje nizkega gradusa, ki pa so najbolj številčni in predstavljajo kar dve tretjini primarno diagnosticiranih tumorjev na sečnem mehurju (²⁵). Leta 2015 je bil uveden Pariški sistem klasifikacije citologije urina, ki narekuje citopatologom, da negativni rezultati veljajo le za tumorje visoke stopnje in da sta v novi klasifikaciji še vedno prisotni kategoriji "sumljiv" in "atipičen" (²⁶). Poleg tega na rezultate citologije vpliva prisotnost drugih benignih bolezni sečil in so odvisni tudi od subjektivne presoje citopatologa (¹⁸). Glede na izračunano tveganje za ponovitev in napredovanje tumorja je v roku petih let od transuretralne resekcije potrebnih kar 6 do 15 postopkov cistoskopij (¹⁹), kar predstavlja mnogo invazivnih posegov v telo ter dodatna tveganja za zaplete pri pacientih, kar je še dodatno zdravstveno in ekonomsko breme. Zamenjava cistoskopije z neinvazivnim, preprostim in cenovno ugodnim testom z zadostno zmogljivostjo lahko spremeni urnik kontrolnih pregledov za sledenje bolnikov z RSM. Tak test bi moral imeti visoko občutljivost za pravočasno odkrivanje majhnih tumorjev visokega razreda in bi tako lahko pravočasno ukrepali in preprečili njihovo razrast in napredovanje v mišično infiltrativni tumor, ki znatno poslabša prognozo in tudi kakovost življenja bolnikov (²⁷).

4.2.1 VLOGA SKUPNE VREDNOSTI LDA

Stopnje izražanja označevalcev kombinirane v LDA se uporabljajo za razvrščanje vzorcev kot negativnih ali pozitivnih z uporabo linearnega modela (²⁸). Medtem ko skupna vrednost LDA služi predvsem kot merilo za pozitiven rezultat Xpert BC Monitor testa pri mejni vrednosti 0,50 predlagani s strani proizvajalca, smo za optimizacijo mejne vrednosti na 0,4923 uporabili ROC krivuljo in Youdenov indeks. Občutljivost se je izboljšala iz 66,7 % na 75,0 %. Glede na skupno vrednost LDA in ne glede na poročanje rezultatov za Xpert BC Monitor test kot pozitivne ali negativne, bi test lahko uporabili tudi v longitudinalnih študijah, kot so to prikazali Hurlle in sodelavci, ki so spremljali skupno vrednost LDA med aktivnim nadzorom bolnikov z ne mišičnim invazivnim rakom med projektom BIAS (ang. *Bladder cancer Italian active surveillance project*). Poročali so, da je povečanje skupne vrednosti LDA pri bolniku povezano z napredujočimi tumorji in bi to lahko bil povod za kontrolno cistoskopijo, ne glede na smernice načrtovanih kontrolnih pregledov. Prav tako so predlagali, da bi v tem primeru mejna vrednost skupne vrednosti LDA bila 0,40 (²⁹).

4.2.2 NAPOVED POZITIVNIH ALI SUMLJIVIH REZULTATOV CISTOSKOPIJE

Iz naših podatkov je razvidno, da je občutljivost Xpert BC Monitor testa za napovedovanje pozitivnega in sumljivega rezultata cistoskopije bistveno večja kot pri citološkem pregledu urina (75,0 % v primerjavi z 41,2 %), boljša je tudi negativna napovedna vrednost (93,0 % v primerjavi z 85,4 %). Rezultati pridobljeni v naši študiji so primerljivi z rezultati študije Van Valenberga in sodelavcev ter Pichlerja in sodelavcev, kjer so občutljivosti Xpert BC Monitor testa znašale 74,0 % in 84,0 %, negativna napovedna vrednost pa je pri obeh znašala 93,0 %^(24,30). Tem podatkom pa nasprotuje študija izvedena s strani Elia in sodelavcev, kjer so poročali le o 46,2 % občutljivosti Xpert BC Monitor testa, a je velika večina odkritih tumorjev (87,0 %) spadala v kategorijo nizkega gradusa⁽³¹⁾. V naši študiji ni noben od bolnikov z negativnim rezultatom Xpert BC Monitor testa imel pozitivne izvide citološke preiskave urina. Dopolnjevanje rezultatov Xpert BC Monitor testa z rezultati citološkega pregleda urina zato ni povečalo občutljivosti, specifičnosti ter negativne in pozitivne napovedni vrednosti, kar so opazili že v študiji Pichler in sodelavci⁽²⁴⁾.

Dokler ne bo opravljenih več študij z Xpert BC Monitor testom, ni možno oceniti točnega obsega občutljivosti in negativnih napovednih vrednosti testa, kljub temu, da naši podatki in že objavljene študije^(24,30) kažejo na uspešnost oziroma vsaj primerljivost testa z že preučeni in preizkušeni biomarkerji. V nedavnem pregledu biomarkerjev za RSM so podatki, pridobljeni in povzeti iz več študij, kazali na večje razlike v občutljivosti testov; za NMP22 od 24 % do 81 %, za BTA stat od 40 % do 72 %, za Immuno Cyt od 50 % do 85 % in za UroVysion od 13 % do 100%. Najverjetneje ravno zaradi raznolikosti rezultatov avtorji te primerjave sklepajo, da sedanji komercialno dostopni testi za določanje biomarkerjev v urinu niso dovolj zanesljivi za širšo uporabo v klinični praksi⁽³²⁾.

Pri dveh naših bolnikih je bil rezultat Xpert BC Monitor testa pozitiven, medtem ko je bil rezultat cistoskopije negativen. Pri prvem bolniku je bila ugotovljena atipična citologija, nato pa je bil po transuretralni resekciji glede na visoko stopnjo invazije tumorja uvrščen v kategorijo T1. Pri drugem bolniku je bil citološki pregled urina negativen, pri kontrolni cistoskopiji po treh mesecih pa je bil ugotovljen in potrjen tumor kategorije T1. Oba primera nakazujeta na to, da je bila cistoskopija, čeprav velja za zlati standard za spremljanje in odkrivanje RSM, dopolnjena z neinvazivnom urinskim testom.

4.2.3 NAPOVED POZITIVNIH / MALIGNIH REZULTATOV HISTOLOGIJE

Visoka diskriminantna moč Xpert BC Monitor testa med malignimi in benignimi histološkimi skupinami je posledica zelo signifikantne razlike med mediano skupne vrednosti LDA v obeh skupinah (0,2486 za benigno in 0,9869 za maligno skupino). Skupna občutljivost in negativna napovedna vrednost Xpert BC Monitor testa za napovedovanje malignega histološkega rezultata znašata 76,9 % in 93,0 % in močno presegata vrednosti citološkega pregleda urina (46,2 % in 85,4 %).

Občutljivosti Xpert BC Monitor testa za posamezne razrede tumorjev so bile primerljive z občutljivostmi citološkega pregleda urina. Znašale so za papilarno urotelno neoplazmo nizkega malignega potenciala 0,0 % in za tumorje nizkega gradusa 66,7 %. Za tumorje visokega gradusa je občutljivost citološkega pregleda urina znašala le 42,6 %, medtem ko z Xpert BC testom nismo zgrešili niti enega tumorja (občutljivost 100,0 %). O učinkovitosti poročajo tudi Pichler in sodelavci, ki so s študijo dokazali znatno večjo občutljivost Xpert BC Monitor testa v primerjavi s citološkim pregledom urina ⁽²⁴⁾. Pri tumorjih nizkega razreda le-ta znaša 77,0 % za Xpert BC Monitor test ter le 2% za citološki pregled urina, pri tumorjih visokega razreda pa 100,0 % v primerjavi z le 25,0 % ⁽²⁴⁾. Pri klasifikaciji tumorjev glede na stadij so naši rezultati kategorij T1 in T2 (100 %) primerljivi z rezultati študije Van Velenberga in sodelavcev ⁽³⁰⁾, kategoriji CIS (100 %) in Ta (80 %) pa z rezultati študije Pichlerja in sodelavcev ⁽²⁴⁾.

Bolniki z RSM s tumorji višjih stadijev imajo v naslednjih petih letih 23 % tveganje za napredovanje bolezni, medtem ko je tveganje znatno nižje pri bolnikih z nižjimi stadiji tumorja (4 %) ⁽³³⁾. Xpert BC Monitor test bi se lahko uporabljal kot neinvaziven urinski test s katerim bi vodili razpored kontrolnih cistoskopij za spremljanje tumorjev, kar so predlagali že Hurle in sodelavci ⁽²⁹⁾.

Ponovitev tumorja kategorije Ta, ki bi ga Xpert BC Monitor test lahko zgrešil, ne predstavlja neposredne nevarnosti za bolnika, saj zgodnje odkrivanje ni bistveno za uspešno terapijo ^(19,34), za tumorje kategorij T1, T2 in CIS pa bo rezultat Xpert BC Monitor testa najverjetneje pozitiven.

4.2.4 OMEJITVE ŠTUDIJE

Kljub visoki občutljivosti in negativni napovedni vrednosti za tumorje visokega gradusa, je sprejetje tega in drugih neinvazivnih molekularnih testov v vsakdanjo klinično prakso odvisno od finančnega stanja zdravstvenega sistema. Molekularni testi so dražji in v povprečju običajno

stanejo tri do petkrat več od citopatološkega pregleda urina (v Sloveniji - Xpert BC Monitor test 250 Eur in citopatološki pregled urina 40 Eur).

Glavna omejitev naše študije je majhno število vključenih bolnikov (54), od tega smo pri nadaljnjem spremljanju le pri 14 odkrili ponovitev tumorja (25,9 % vseh bolnikov). To je posledica zasnove študije in nizke stopnje ponovitve. Podoben delež recidiva tumorjev (30,7 %) so opazili v študiji Pichlerja in sodelavcev (²⁴), medtem ko so v največji objavljeni študiji poročali o le 17,0 % stopnji ponovitve (³⁰). Poleg tega je bila le pri enem bolniku z negativnim histološkim rezultatom opravljena transuretralna resekcija, vse ostale smo uvrstili v skupino z negativnimi rezultati na podlagi negativnega rezultata cistoskopije, čeprav se je morda zgodila manjša skrita lezija ali pa lezija v zgornjem delu urinarnega trakta.

5 SKLEP

Namen magistrske naloge je bil ovrednotiti klinično uporabnost Xpert BC Monitor testa pri odkrivanju in spremljanju RSM. Z uporabo testa v rutinski praksi bi lahko zmanjšali število invazivnih cistoskopij, ki so za bolnika zelo neugodne.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko podamo naslednje ugotovitve:

- Xpert BC Monitor test je pokazal bistveno večjo občutljivost in negativno napovedno vrednost v primerjavi s citološkim pregledom urina.
- Kombinacija obeh testov, Xpert BC Monitor testa in citološkega pregleda urina, ne izboljša same zmogljivosti Xpert BC Monitor testa.
- Njegova sposobnost odkrivanja ponovitve tumorjev bi lahko spremenila nadaljnje urnike kontrolnih cistoskopij.
- Pri bolnikih z negativnim rezultatom Xpert BC Monitor testa bi lahko povečali priporočene intervale med posameznimi cistoskopijami.

V dveh primerih je Xpert BC Monitor test po zmogljivostih celo "prehitel" cistoskopijo, saj je dva izmed bolnikov uvrstil v skupino pozitivnih, kljub negativnemu izvidu cistoskopije. Kasneje, v nadaljnjih preiskavah, sta obema pacientoma bila ugotovljena tumorja kategorije T1.

Visoki skupna občutljivost in negativna napovedna vrednost Xpert BC Monitor testa za napovedovanje pozitivnega/malignega izvida histologije močno presegata vrednosti citološkega pregleda urina. Kljub primerljivosti občutljivosti našega testa z občutljivostmi citološkega pregleda urina za tumorje nizkih razredov, z Xpert BC testom nismo zgrešili niti enega tumorja visokega gradusa, medtem ko je občutljivost citološkega pregleda urina bila v tej kategoriji več kot za polovico manjša. Za tumorje višjih kategorij, ki za paciente predstavljajo večjo nevarnost, bi bil Xpert BC test torej najverjetneje pozitiven in bi z njegovo pomočjo lahko hitreje in na manj invaziven način odkrili tumor, ter posledično tudi prej ukrepali in tako pomembno pripomogli k zdravju našega bolnika.

Menim, da bi za več rezultatov, ki bi še boljše prikazali kakovost Xpert BC Monitor testa morali odpraviti glavno omejitev naše študije – vključiti bi morali večje število pacientov.

6 LITERATURA

1. Stušek P: Biologija Človeka : [Za Gimnazije]. DZS; 2006.
2. Dolinar M, Cunk Manić V, Tarman-Šmit I: Anatomija in Fiziologija Človeka : Učbenik Za Programe Zdravstvena Nega, Farmaceutski Tehnik, Zobotehnik, Kozmetični Tehnik in Tehnik Laboratorijske Biomedicine. Pipinova knjiga; 2015.
3. Bajrović F: Temelji Patofiziologije s Fiziologijo Za Študente Zdravstvenih Ved. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo; 2015.
4. Kukovec M: Pomen Določanja Tumorskega Označevalca Cyfra 21-1 Pri Raku Sečnega Mehurja = The Significance of Defining the Tumour Marker Cyfra 21-1 for Bladder Cancer. Fakulteta za farmacijo; 2009.
5. Hoffman M: The Bladder (Human Anatomy): Function, Picture, Location, Definition. WebMD. Accessed January 11, 2021. <https://www.webmd.com/urinary-incontinence-oab/picture-of-the-bladder>
6. Layers of the Bladder Wall | SEER Training. Accessed January 11, 2021. <https://training.seer.cancer.gov/bladder/anatomy/layers.html>
7. Železnik Ramuta T: Vloga Amnijske Membrane Pri Zaviranju Rasti Rakavih Urotelijskih Celic in Uropatogene Bakterije Escherichia Coli : Magistrsko Delo = The Role of Amniotic Membrane in Inhibiting Growth of Cancer Urothelial Cells and Uropathogenic Bacteria Escherichia Coli. Biotehniška fakulteta; 2016.
8. Železnik Ramuta T: Analiza učinka pripravkov iz amnijske membrane na rakave urotelijske celice in uropatogene bakterije : doktorska disertacija = Analysis of the effect of amniotic membrane-derived preparations in cancer urothelial cells and uropathogenic bacteria. Biotehniška fakulteta; 2020.
9. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ: Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(5):269-284.
10. Zadnik V: Osnovni podatki o raku v Sloveniji. Onkološki inštitut Ljubljana; 2018.

11. Sobin LH, Wittekind C: TNM Classification of Malignant Tumours. Wiley-Liss; 2002.
12. Lau P, Chin JL, Pautler S, Razvi H, Izawa JI: NMP22 is predictive of recurrence in high-risk superficial bladder cancer patients. *Can Urol Assoc J.* 2009;3(6):454-458.
13. Miyamoto H, Miller JS, Fajardo DA, Lee TK, Netto GJ, Epstein JI: Non-invasive papillary urothelial neoplasms: The 2004 WHO/ISUP classification system. *Pathology International.* 2010;60(1):1-8.
14. Takahashi T, Habuchi T, Kakehi Y: Clonal and Chronological Genetic Analysis of Multifocal Cancers of the Bladder and Upper Urinary Tract. *Cancer Res.* 1998;58(24):5835.
15. Spruck CH, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M: Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 1994;54(3):784-788.
16. Reznikoff CA, Kao C, Messing EM, Newton M, Swaminathan S: A molecular genetic model of human bladder carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1993;4(3):143-152.
17. Jamshidian H, Kor K, Djalali: Urine concentration of nuclear matrix protein 22 for diagnosis of transitional cell carcinoma of bladder. *Urol J.* 2008;5(4):243-247.
18. Raitanen M-P, Aine R, Rintala E: Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol.* 2002;41(3):284-289.
19. Babjuk M, Böhle A, Burger M: EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol.* 2017;71(3):447-461.
20. Novaković S: Pregled pomembnejših tumorskih označevalcev v klinični onkologiji. Onkološki inštitut; 2000.
21. Bizjak M: Klinični Pomen Določanja Prekurzorja Prostatno Specifičnega Antigena Pri Bolnikih z Nizko Celokupno Plazemsko Koncentracijo Specifičnega Antigena = Clinical Value of Precursor Prostate Specific Antigen in Patients with Low Plasma Concentration of Prostate Specific Antigen. Fakulteta za farmacijo; 2016.

22. Osredkar J, Marc J: Laboratorijska Medicina I.: Učbenik Za Študente Medicine, Farmacije in Laboratorijske Biomedicine. Fakulteta za farmacijo; 2012.
23. Bubendorf L, Dalquen P, Savic S: Zytologie der ableitenden Harnwege. Pathologe. 2009;30(2):173.
24. Pichler R, Fritz J, Tulchiner G: Increased accuracy of a novel mRNA-based urine test for bladder cancer surveillance. BJU Int. 2018;121(1):29-37.
25. Hentschel AE, van Rhijn BWG, Bründl J: 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;38(5):440-448.
26. Rosenthal DL, Wojcik EM, Kurtycz DFI: The Paris System for Reporting Urinary Cytology. Springer
27. Stenzl A, Cowan NC, De Santis M: The Updated EAU Guidelines on Muscle-Invasive and Metastatic Bladder Cancer. European Urology. 2009;55(4):815-825.
28. Wallace E, Higuchi R, Satya M: Development of a 90-Minute Integrated Noninvasive Urinary Assay for Bladder Cancer Detection. J Urol. 2018;199(3):655-662.
29. Hurle R, Casale P, Saita A: Clinical performance of Xpert Bladder Cancer (BC) Monitor, a mRNA-based urine test, in active surveillance (AS) patients with recurrent non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC): results from the Bladder Cancer Italian Active Surveillance (BIAS) project. World J Urol. 2020;38(9):2215-2220.
30. Valenberg FJP van, Hiar AM, Wallace E: Prospective Validation of an mRNA-based Urine Test for Surveillance of Patients with Bladder Cancer. European Urology. 2019;75(5):853-860.
31. D Elia C, Pycha A, Folchini DM: Diagnostic predictive value of Xpert Bladder Cancer Monitor in the follow-up of patients affected by non-muscle invasive bladder cancer. J Clin Pathol. 2019;72(2):140-144.
32. Soria F, Droller MJ, Lotan Y: An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. World J Urol. 2018;36(12):1981-1995.

33. Holmäng S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C, Johansson SL: Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol.* 2001;165(4):1124-1128; diskusija 1128-1130.
34. Sun Y, He D, Ma Q: Comparison of seven screening methods in the diagnosis of bladder cancer. *Chin Med J (Engl).* 2006;119(21):1763-1771.
35. Sullivan P, Chan J, Levin M, Rao J: Urine cytology and adjunct markers for detection and surveillance of bladder cancer. *American journal of translational research* 2010; 2(4): 412-440.
36. Hutterer G, Karakiewicz P, Zippe C, Lüdecke, Boman G; Sanchez-Carbayo: Urinary cytology and nuclear matrix protein 22 in the detection of bladder cancer recurrence other than transitional cell carcinoma. *BJU International* 2008; 101: 561-565.
37. Ferlay J, Parkin D, Steliarova-Foucher E: Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer* 2010; 46(4): 765-781.
38. Novaković S, Zakotnik B, Žgajnar J: Izzivi v multidisciplinarni obravnavi bolnikov z rakom sečnega mehurja, prostate, ledvic in mod: zbornik. *Onkološki inštitut Ljubljana*, 2013.
39. Kramer F: Rak sečnega mehurja: zbornik predavanj. *Oddelek za urologijo, Splošna bolnišnica Slovenj Gradec*, 2005.
40. Tan W. S, Tan W. P: Urinary biomarker for the detection of recurrence following nonmuscle invasive bladder cancer: Are we there yet? *AME Publishing Company*, 2018.
41. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: *Interna medicina. Littera picta: Slovensko medicinsko društvo*, 2011.
42. Alvarez A, Lokeshwar V. B: Bladder cancer biomarkers: current developments and future implementation. *Current opinion in urology* 2017, 17(5): 341-346.
43. Neidler S: What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR and RT-qPCR? Accessed January 11, 2021. <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/>