



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2025



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

lek. Marcin Kurant

**Ocena stężeń metaloproteinaz macierzy i ich inhibitorów oraz α_2
makroglobuliny u pacjentów ze zdiagnozowanym powierzchownym
nowotworem pęcherza moczowego**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Michał Wiciński

Bydgoszcz 2025

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi
Panu Profesorowi Michałowi Wicińskiemu
za cenne uwagi, okazaną życzliwość i wsparcie podczas pisania niniejszej pracy.*

Spis treści

1. Wstęp.....	8
2. Rokowania w raku pęcherza moczowego i wskaźniki przeżycia.....	11
3. Nowe trendy w zakresie diagnostyki raka pęcherza moczowego.....	11
4. Znaczenie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) i ich inhibitorów (TIMPs) w procesie kancerogenezy.	13
4.1. Charakterystyka MMP-1.....	16
4.2. Charakterystyka MMP-9.....	18
4.3. Charakterystyka MMP-14 i MMP-15	21
4.4. Charakterystyka i znaczenie alfa2-makroglobuliny	23
4.5. Inhibitory metaloproteinaz macierzy TIMPs – rola i znaczenie w procesie metastazy.	25
4.6. Wpływ wybranych ksenobiotyków i trybu życia na poziom MMPs oraz TIMPs	27
5. Cele pracy.....	32
6. Materiał i metoda	33
6.1 Analiza statystyczna	34
7. Wyniki badań.....	36
7.1. Analiza stężeń metaloproteinaz macierzy MMPs i ich inhibitorów TIMPs w surowicy pacjentów ze zdiagnozowanym powierzchownym nowotworem rakiem urotelialnym przed i po elektroresekcji guza.	36
7.2. Ocena korelacji pomiędzy stężeniami MMPs, TIMPs oraz $\alpha 2$ makroglobuliną w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego przed i po interwencji chirurgicznej.....	48
8. Podsumowanie wyników badań.....	55
9. Dyskusja.....	56
10. Wnioski.....	68
11. Streszczenie	69
12. Summary	71
13. Piśmiennictwo	73
14. Spis rycin	88
15. Spis tabel	90
16. Załączniki	91

Wykaz skrótów:

α 2M – *alpha2-Macroglobulin* (α 2-Makroglobulina)

α 3 β 1 – *integrin alpha-3 beta-1* (integryna alfa-3 beta-1)

ADAM – *a disintegrin-like and metalloproteinase* (dezintegryny i metaloproteinazy)

ADAMS – *a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motifs*
(dezintegryny i metaloproteinazy z motywem trombospondyny)

BC – *bladder carcinoma* (nowotwór pęcherza moczowego)

BMI – *Body Mass Index* (wskaźnik masy ciała)

cdc2 – *cell division cycle 2* (cykl podziału komórkowego 2)

cdc25a – *cell division cycle 25 homolog A* (homolog A cyklu podziału komórkowego 25)

CDK4 – *cyclin-dependent kinase 4* (kinaza zależna od cykliny 4)

CIS – *carcinoma in situ* (rak przedinwazyjny)

CSCC – *cutaneous squamouscell carcinoma cancer* (rak kolczystokomórkowy skóry)

DHA – *docosahexaenoic acid* (kwas dokozaheksaenowy)

DNA – *deoxyribonucleic acid* (kwas dezoksyrybonukleinowy)

EAU – *European Association of Urology* (Europejskie Towarzystwo Urologiczne)

ECM – *extracellular matrix* (macierz zewnątrzkomórkowa)

EGF – *epidermal growth factor* (naskórkowy czynnik wzrostu)

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* (test immunoenzymatyczny)

EMT – *Epithelial Mezenchymal Transition* (przemiana nabłonkowo-mezenchymalna)

ER(+) – *estrogen receptor positive* (receptor estrogenowy pozytywny)

FISH – *Fluorescent In Situ Hybridization* (Fluorescencyjna Hybrydyzacja In Situ)

G1-G4 – *grading* (złośliwość histologiczna)

GES-1 - *human gastric epithelial cell line* (linia komórek nabłonka błony śluzowej żołądka)

GF – *growth factor* (czynnik wzrostu)

hEGF – *human epidermal growth factor* (ludzki czynnik wzrostu naskórka)

IL-1 β – *interleukin 1 β* (interleukina 1 β)

IL-6 – *interleukin 6* (interleukina 6)

IL-8 – *interleukin 8* (interleukina 8)

IL-18 – *interleukin 18* (interleukina 18)

JAK/STAT – *Janus kinases/signal transducer and activator of transcription proteins* (kinazy janusowe/białka STAT)

JNK – *c-Jun N-terminal kinases* (kinazy aktywowane stresem)

LDL-c - *low-density lipoprotein cholesterol* (cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości)

MAPK/Erk - *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase* (kinaza białkowa aktywowana mitogenem/kinaza regulowana sygnałem międzykomórkowym)

MIBC - *muscle invasive bladder cancer* (rak pęcherza moczowego naciekający mięśniówkę)

miRNA – *microRNA* (mikroRNA)

MMPs – *matrix metalloproteinases* (metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej)

NF- κ B – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (czynnik jądrowy kappa B)

NMIBC - *non-muscle invasive bladder cancer* (rak pęcherza moczowego nienaciekający mięśniówki)

NMP-22 – *Nuclear Matrix Protein 22*

p21 – *protein 21* (białko p21)

p27 – *protein 27* (białko p27)

p53 – *protein 53* (białko p53)

PAR-1 – *proteinase-activated receptor 1* (receptor typu pierwszego aktywowany proteinazą)

PDGF – *platelet-derived growth factor* (płytkopochodny czynnik wzrostu)

PI3K/AKT – *Phosphoinositide 3-kinases/Protein kinase B pathway* (szlak kinazy 3-fosfatydoinozytolu i kinazy białkowej AKT)

PSA – *Prostate Specific Antigen* (swoisty antygen sterczowy)

PUNLMP – *papillary urothelial neoplasm of low malignant potential* (nowotwór przejściowonabłonkowy o małym potencjale złośliwości)

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

SHP-1 – *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1* (fosfataza tyrozynowa zawierająca domenę regionu 2 homologii Src)

sIL-6R – *soluble interleukin 6 receptor* (rozpuszczalny receptor interleukiny 6)

SP1 – *specificity protein 1* (czynnik transkrypcyjny SP1)

TAM – *tumor-associated macrophages* (makrofagi związane z guzem)

TGF- β – *transforming growth factor β* (transformujący czynnik wzrostu beta)

TIMPs – *tissue inhibitors of metalloproteinases* (tkankowe inhibitory metaloproteinaz)

TME – *tumor microenvironment* (mikrośrodowisko guza)

TNF- α – *tumor necrosis factor α* (czynnik martwicy nowotworów α)

TNM – *tumor, node, metastasis* (guz, węzeł, przerzut nowotworowy)

VEGF – *vascular endothelial growth factor* (czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego)

1. Wstęp

Nowotwory pęcherza moczowego (BC) w większości przypadków wywodzą się z tkanki nabłonkowej dróg moczowych i są coraz częstszym problem w krajach wysoko rozwiniętych. Szacuje się, że stanowią około 3% wszystkich nowotworów. Dane opublikowane przez *European Association of Urology* (EAU) wskazują, że BC jest siódmym najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie wśród mężczyzn, jednocześnie klasyfikuje się na dziesiątej pozycji dla całej populacji. Wskaźniki zachorowalności wynoszą 9,5 dla mężczyzn i 2,4 dla kobiet na 100 000 osobolat, natomiast współczynniki śmiertelności – odpowiednio 3,3 vs. 0,86 [Babjuk i wsp. 2022]. Wczesna diagnoza istotnie poprawia rokowania u chorych. Wskaźniki przeżywalności są mniej korzystne w inwazyjnych postaciach tego nowotworu. W krajach Unii Europejskiej istnieją pewne rozbieżności w poszczególnych rejestrach, dotyczące częstości występowania BC i wskaźników pięcioletniego okresu przeżywalności. Wynika to z różnej dostępności do badań przesiewowych i procedur klinicznych, a także analizy pozyskanych danych cząstkowych.

W etiopatogenezie BC należy uwzględnić zarówno wpływ czynników genetycznych i środowiskowych [Taheri i wsp. 2020].

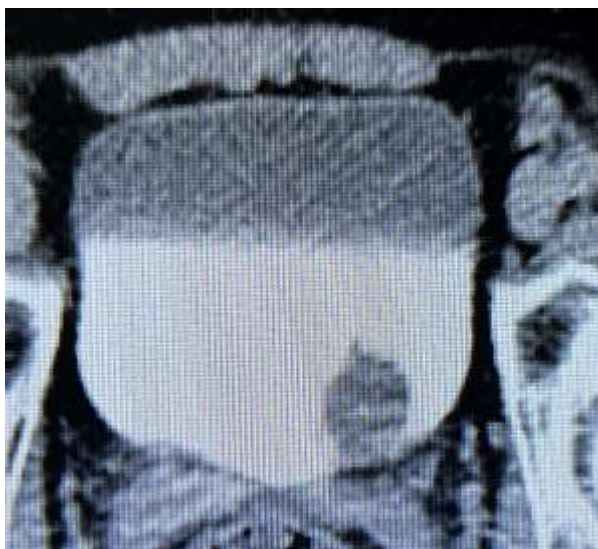
Obciążenie rodzinne ma znikomy wpływ na bezpośrednie ryzyko BC, jednak predyspozycje genetyczne wtórnie zwiększają podatność na inne czynniki ryzyka. Obserwujemy takie tendencje wśród krewnych pierwszego i drugiego stopnia [Martin i wsp. 2018]. Nawyki żywieniowe wydają się mieć ograniczony wpływ w profilaktyce raka pęcherza moczowego. Sugerowano ochronne działanie flawonoidów i diety śródziemnomorskiej. Wysokie spożycie warzyw i tłuszczów nienasyconych (oliwa z oliwek) oraz umiarkowane spożycie białka stanowią pewien element profilaktyki. Korzyści ze zwiększonego spożycia owoców odnotowano tylko u kobiet [Jochems i wsp. 2020; Vieira i wsp. 2015; Rossi i wsp. 2019; Witlox i wsp. 2020]. Dane te mają pewien charakter szacunkowy i nie odgrywają kluczowej roli w stratyfikacji ryzyka BC.

Spośród pacjentów ze zdiagnozowanym BC prawie połowa potwierdza w wywiadzie palenie tytoniu, który stanowi najważniejszy modyfikowalny czynnik ryzyka. Policykliczne węglowodory i aminy aromatyczne zawarte w dymie tytoniowym, metabolizowane są w wątrobie przy udziale izoenzymów cytochromu *P450* i wydalone z moczem. Występowanie BC w populacji wykazuje korelację z czasem i intensywnością palenia. Tłumaczy to częstsze występowanie nowotworu u mężczyzn. Palenie papierosów o niskiej zawartości substancji smolistych nie wiąże się z mniejszym ryzykiem rozwoju BC. Ekspozycja zawodowa na aminy

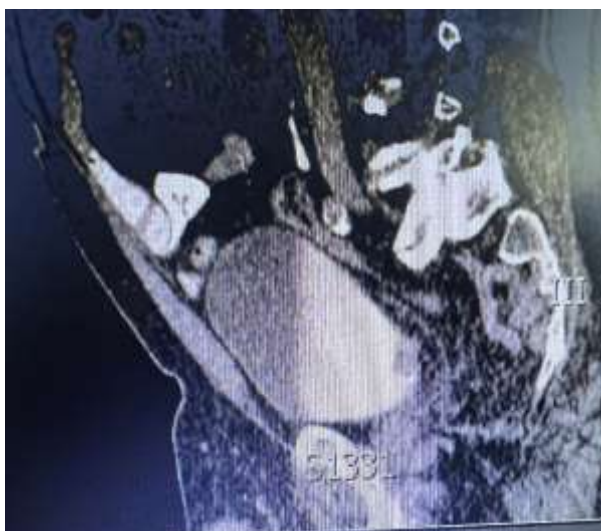
aromatyczne, nitrozaminy, związki arsenu i kadmu to drugi najważniejszy czynnik ryzyka, przyczyniający się do około 10% wszystkich zdiagnozowanych przypadków. Narażeni są głównie pracownicy zakładów przemysłowych, mający bezpośredni kontakt z farbami, barwnikami, metalami ciężkimi i ropą naftową [Burger i wsp. 2013; Teoh i wsp. 2020; Colt i wsp. 2014; Pesch i wsp. 2013].

W praktyce klinicznej pacjenci z podejrzeniem BC zgłaszają się do poradni z bezobjawowym krwimoczem, objawami podrażnieniowymi z dolnych dróg moczowych. Zwykle towarzyszą temu objawy dyzuryczne, ból podczas mikcji, parcie na mocz czy uczucie dyskomfortu w podbrzuszu. Zgodnie z rekomendacjami EAU zaleca się wykonanie badania USG, cystoskopię i cytologię osadu moczu. Diagnostyka obrazowa może być uzupełniona o tomografię jamy brzusznej oraz miednicy/klatki piersiowej. Celem dokładnej oceny zaawansowania miejscowego można wykonać mpMRI. W przypadku podejrzenia zmian nowotworowych wykonuje się biopsję pobierając materiał do badania histopatologicznego lub materiał pozyskuje się podczas elektroresekcji przezcewkowej guza. Potwierdzenie zmian na tym etapie upoważnia do postawienia diagnozy. Obrazowanie USG podobnie jak cystoskopia, pozwalają na wykrycie wczesnych zmian ogniskowych w obrębie pęcherza moczowego, jednak ogniska o małej średnicy mogą zostać niezauważone i pominięte [Gharibvand i wsp. 2017].

W aktualnych wytycznych *European Association of Urology* klasyfikacja TNM nowotworów pęcherza moczowego praktycznie nie zmieniła się w porównaniu z wcześniejszymi opracowaniami. Charakterystyka guza pierwotnego nowotworu oparta jest na czterostopniowej skali (T1-T4: T1a/b; T2a/b; T3a/b i T4a/b) uwzględniającej stopień naciekania otaczających tkanek. Wyróżniamy także: Tx/T0 - brak możliwości jego wskazania lub stwierdzenia. Do nowotworów nienaciekających błony mięśniowej (NMIBC), klasyfikujemy nowotwory w stadium - Ta – nienaciekający rak brodawczakowaty, Tis – rak śródnabłonkowy (carcinoma in situ – CIS), T1- nowotwór pęcherza naciekający podścielisko–podnabłonkową tkankę łączną, T2-guz nacieka mięśniówkę (T2a-połowę wewnętrzną warstwy mięśniowej, T2b guz nacieka całą mięśniówkę).



Ryc. 1. Rak urotelialny pęcherza moczowego (28 mm, pT1; high grade) – materiał własny.



Ryc. 2. Rak urotelialny pęcherza moczowego (11 mm, pTa; low grade) – materiał własny.

Pod względem histopatologicznym wśród nienaciekających brodawczakowatych zmian nabłonka urotelialnego wg klasyfikacji WHO z 2004 r. rozróżniamy: brodawczakowaty nowotwór urotelialny o niskim potencjale złośliwości PUNLMP (*papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*), rak brodawczakowaty niskiego ryzyka (*low grade*), oraz rak brodawczakowaty wysokiego ryzyka (*high grade*).

2. Rokowania w raku pęcherza moczowego i wskaźniki przeżycia.

Powołując się na dane opublikowane przez *National Cancer Institute* rokowanie w przypadku raka pęcherza moczowego determinuje wiele czynników. Za istotne klinicznie uznaje się stadium raka, w tym to, czy nie nacieka on warstwy mięśniowej pęcherza (NMIBC), czy jest rakiem naciekającym mięśniówkę lub rozprzestrzeniającym się poza pęcherz moczowy (MIBC). Innymi czynnikami są: liczba guzów, wielkość guza, częstość nawrotów, współistnienie CIS, oraz stopień złośliwości guza (low grade/high grade), a także wiek i ogólny stan pacjenta. Wskaźniki 5-letniego przeżycia chorych ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego są następujące: 71% u chorych z niezaawansowanym rakiem pęcherza moczowego (nowotwór ograniczony do pęcherza moczowego), 39 % z przerzutami do regionalnych narządów lub węzłów chłonnych, 8% z przerzutami odległymi. [<https://www.cancer.gov/types/bladder/survival>].

3. Nowe trendy w zakresie diagnostyki raka pęcherza moczowego.

Pomimo istotnej poprawy w zakresie nowych metod obrazowania i technik zabiegów chirurgicznych u pacjentów z rakiem urotelialnym pęcherza moczowego jakie dokonały się w ciągu ostatnich lat, istnieją pewne rozbieżności w ocenie rokowań opartych wyłącznie o wyniki badania histopatologicznego. Istotne zatem wydaje się podjęcie kwestii uzupełnienia standardowej diagnostyki o panel biochemiczny, na podstawie którego precyzyjnie można by określić strategię dalszego leczenia, optymalizację farmakoterapii czy ryzyko metastazy w przypadku nowotworów *in situ*.

Diagnostyka ta wymaga szerszego spojrzenia na złożoność patomechanizmów tworzenia przerzutów nowotworowych na poziomie molekularnym. Zaburzenia przekazywania sygnału na każdym etapie karcynogenezy mogą manifestować się zmianami stężeń określonych biomolekuł w płynach ustrojowych. Z punktu widzenia pragmatycznego, poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych powinno opierać się na realnych możliwościach ich oznaczenia w płynach ustrojowych, przy stosunkowo niskiej inwazyjności całej procedury. Kryteria te spełniają zarówno krew i mocz [Sugeeta i wsp. 2021; Maas i wsp. 2019]. Ważne też, aby marker wykazywał dużą czułością i swoistością dla danego typu nowotworu oraz posiadał wartość prognostyczną lub predykcyjną. Wydaje się mało prawdopodobne aby jedna molekula posiadał wszystkie te cechy. Dlatego w ostatnich latach

podjęto próby wdrożenia złożonych paneli diagnostycznych, w skład których wchodzi co najmniej kilka związków aktywnych biologicznie. Należy zaznaczyć, że w nowotworach nienaciekających błon podstawnych, mających charakter lokalny, zmiana stężenia/aktywności danego biomarkera w płynach ustrojowych może wykazywać zbyt małe różnice, a ich detekcja nie odzwierciedlać zaawansowania choroby [Diamandis 2014].

W dostępnej literaturze możemy wyróżnić pewne trendy związane z poszukiwaniem nowych metod diagnostycznych na poziomie molekularnym. Pierwszy dotyczy wykazania związku pomiędzy konkretnymi mutacjami sekwencji DNA, kodującymi głównie białka regulujące aktywność poszczególnych faz cyklu komórkowego, raczej o znaczeniu predykcyjnym [Zhang i wsp. 2015]. Kolejny kierunek badań obejmuje poszukiwanie nowych biomolekuł wskaźnikowych, których aktywność bądź stężenie w płynach ustrojowych zmienia się zależnie od stopnia zaawansowania nowotworu. I tu często analizowane są złożone panele enzymatyczne lub z nowszych trendów – ekspresja transkryptów sekwencji miRNAs [Grimaldi i wsp. 2022].

Potwierdzono zaburzoną ekspresję wybranych fragmentów miRNAs u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem pęcherza moczowego. Transkrypty te regulują ekspresję docelowych genów głównie poprzez wiązanie z ich regionami 3', które nie ulegają translacji. Zwiększoną ekspresję onkogennych miRNAs wykryto w tkankach BC, krwi obwodowej i próbkach moczu pacjentów. Potencjał onkogenny tych fragmentów wynika z modulowania przemian nabłonkowo-mezenchymalnych (EMT). Proces ten prowadzi to do utraty przez komórki nowotworowe typowych cech nabłonkowych i ich przemiany w komórki mezenchymalne, ze zwiększonym potencjałem replikacyjnym i zdolnością angiogenezy. W innym mechanizmie onkogenego działania miRNAs postuluje się też bezpośredni wpływ transkryptów na szlaki PI3K/AKT, JAK/STAT i NF-κB/Snail. miRNAs mogą być w przyszłości obiecującymi biomarkerami u chorych z BC [Taheri i wsp. 2020].

Pomimo szeroko zakrojonych badań w tej dziedzinie, nie osiągnięto konsensus w sprawie opracowania odpowiednich paneli diagnostycznych miRNAs. Analiza *in silico* dostarcza przydatnych informacji uzupełniających rutynową diagnozę, jednak mają one charakter doniesień wstępnych i na tym etapie badań użyteczność tej metody jest niewielka. Żaden z markerów molekularnych wykrywanych w moczu nie uzyskał pełnej akceptacji do rutynowej diagnostyki. W odniesieniu do istniejących testów komercyjnych można stwierdzić, że ich czułość jest zwykle wyższa niż swoistość w porównaniu z cytologią moczu. Problemem jest też niska powtarzalność wyników, kosztowne i skomplikowane metody analityczne. Stanowisko EAU wskazuje w tej kwestii, że pozytywny wyniki cytologii, testy:

UroVysion (FISH), *Nuclear Matrix Protein (NMP)22[®]*, *Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR)3/TERT* oraz analiza markerów mikrosatelitarnych u pacjentów z ujemnym wynikiem cystoskopii, należy traktować jako uzupełnienie rekomendowanej diagnostyki. Testy te mogą wspomóc w identyfikacji pacjentów z większym prawdopodobieństwem wystąpienia lub wznowy nowotworu (klasa zalecenia 2b) [Babjuk i wsp. 2022].

Wyznaczony kierunek badań powinien przede wszystkim mieć na celu realne możliwości wdrożenia danego panelu diagnostycznego do praktyki klinicznej. Nie bez znaczenia pozostaje tu łatwość technik analitycznych i koszt całej procedury. Mając powyższe na uwadze, podjęto próbę oceny zastosowania wybranych metaloproteinaz macierzy pozakomórkowych (MMPs) i ich inhibitorów - (TIMPs) we krwi i moczu chorych z powierzchownym rakiem uroterialnym pęcherza moczowego (Ta/T1-CIS/Tis).

4. Znaczenie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) i ich inhibitorów (TIMPs) w procesie kancerogenezy.

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej to rodzina strukturalnie pokrewnych, zależnych od Zn^{2+} endopeptydaz, syntetyzowane jako preproenzymy wykazujące zdolność degradacji zasadniczo wszystkich składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Zawiera ona wiele składników: włókna (kolagen, elastyna, fibronektyna), proteoglikany (syndekan-1 i agrekan), glikoproteiny (witronektyna i entaktyna) oraz kwas hialuronowy, wspólnie zapewniając wsparcie strukturalne cytoszkieletu [Laronha i wsp. 2020].

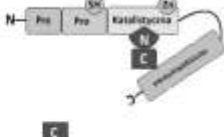
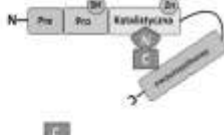
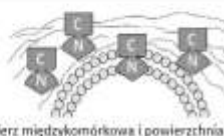
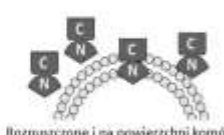
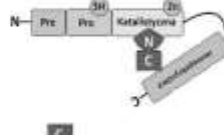
Ta dość niejednorodna strukturalnie grupa enzymów reguluje liczne procesy fizjologiczne, chociażby morfogenezę tkanek i ich regenerację, inwolucję poporodową czy angiogenezę. MMPs zostały po raz pierwszy opisane w 1949 roku, jako enzymy depolimeryzujące, ułatwiające wzrost guza, tworząc podścielisko tkanki łącznej [Gersh i wsp. 1949]. Istotne w aspekcie klinicznym wyniki badań pojawiły się jednak dopiero na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. MMPs odgrywają również ważną rolę w stanach patologicznych, którym towarzyszy degradacja ECM, tj. reumatoidalne zapalenie stawów, choroba zwyrodnieniowa kręgosłupa, pęknięcie blaszki miażdżycowej, choroby autoimmunologiczne, tętniak aorty oraz naciekanie guza nowotworowego i tworzenie przerzutów [Saarialho-Kere i wsp. 1992].

Zaburzona aktywność MMPs występuje praktycznie we wszystkich stadiach rozwoju nowotworu, począwszy od wzrostu guza, różnicowania komórek, angiogenezy, infiltracji, migracji, a także na poziomie układu immunologicznego [Zhang i wsp. 2022; Yadav i wsp. 2014].

Dotychczas zidentyfikowano 28 izoform metaloproteinaz, z czego 23 w tkankach ludzkich. Uwzględniając strukturę przestrzenną i biochemiczną MMPs możemy określić pięć grup. Do MMPs których aktywność nie jest regulowana furyną należą: MMP-1, -3, -7, -8, -10, -12, -13, -20 i -27, posiadające trzy domeny homologiczne z fibronektyną w domenie katalitycznej: MMP-2 i -9, metaloproteinazy zakotwiczone w błonie komórkowej przez ugrupowanie C-końcowego glikozylofosfatydilinozytolu: MMP-11, -17 i -25 oraz posiadające domenę transbłonową MMP-11, -17 i -25 oraz pozostałe: MMP-19, -21, -23, -26 i -28 [Cerofolini i wsp. 2019].

Rak urotelialny rozwija się ze stadium przedinwazyjnego do raka inwazyjnego, zdolnego do tworzenia przerzutów. MMPs stanowią jeden z kluczowych elementów złożonych mechanizmów umożliwiających przejście z nieinwazyjnego raka urotelialnego do postaci inwazyjnej, naciekającej otaczające tkanki i tworzącej przerzuty do węzłów chłonnych [Brockmeyer i wsp. 2016]. Aktywność MMPs w warunkach fizjologicznych jest hamowana przez swoiste inhibitory tkankowe metaloproteinaz (TIMPs).

Tabela 1. Powinowactwo inhibitorów metaloproteinaz tkankowych TIMPs do MMPs.
(Zmodyfikowano na podstawie Cabral-Pacheco i wsp. 2020)

	Lokalizacja	Inhibicja
TIMP-1	 Rozpuszczone i na powierzchni komórki	 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9  ADAM-10
TIMP-2	 Rozpuszczone i na powierzchni komórki	 MMP-2, MMP-9, MMP-14, MT1-MMP  ADAM-12
TIMP-3	 Macierz międzykomórkowa i powierzchnia komórki	 MMP-2, MMP-9  ADAM-17, ADAM-10, ADAMTS4
TIMP-4	 Rozpuszczone i na powierzchni komórki	 MMP-2, MMP-20, MT1-MMP  ADAM-28

W pewnym uproszczeniu można założyć, że ostateczne efekty procesów fizjologicznych regulowanych przez MMPs i swoiste dla nich inhibitory są przeciwstawne.

Inhibitory tkankowe metaloproteinaz to rodzina białek (TIMP-1–4) złożonych z 184-194 aminokwasów o masie cząsteczkowej ≈ 21 kDa, które regulują skład ECM poprzez hamowanie aktywności MMPs i pokrewnych dezintegryn oraz metaloproteinaz z motywem trombospondyny ADAMTS (ryc. 3). Ponadto TIMPs regulują również uwalnianie glikoprotein błonowych - proces znany jako zrzucanie ektodomeny, poprzez hamowanie dezintegryn i metaloproteinaz (ADAM). Cztery izoformy TIMPs ulegają ekspresji u ssaków. Wszystkie mają charakterystyczny kształt klina z dwoma odrębnymi domenami N- i C-końcowymi, które łączą się z miejscem aktywnym metaloproteinaz [Costa i wsp. 2022].

TIMPs są obecne w macierzy zewnątrzkomórkowej w postaci rozpuszczalnej, z wyjątkiem TIMP-3, który jest związany z ECM. Wszystkie inhibitory hamują metaloproteinazy poprzez odwracalne wiązanie, tworząc kompleksy stechiometryczne 1:1 [Jackson i wsp. 2017].

Prawidłowa regulacja aktywności metaloproteinaz przez TIMPs ma kluczowe znaczenie dla utrzymania proteostazy, a tym samym fizjologicznego obrotu ECM [Murphy i wsp. 2008]. Poprzez integrację ze strukturami macierzy zewnątrzkomórkowej TIMPs ma istotny wpływ na fenotyp komórkowy, cząsteczki adhezji, cytokiny czy czynniki wzrostu [Cabral-Pacheco i wsp. 2020].

4.1. Charakterystyka MMP-1

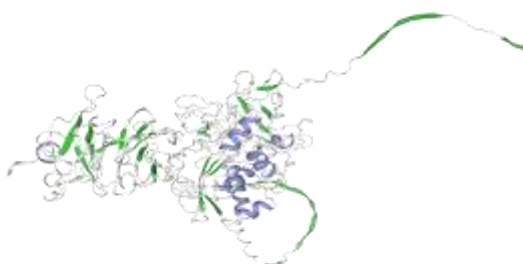
Metaloproteinaza macierzy-1 (MMP-1) to enzym z grupy kolagenaz, kodowany przez gen MMP1 (chromosom 11q22.3) o masie cząsteczkowej około 54 kDa [Pendás i wsp. 1996]. Zwiększoną ekspresję MMP-1 i jej wartość prognostyczną obserwowano w raku jelita grubego, raku płaskonabłonkowym szyjki macicy, czerniaku błony naczyniowej oka i raku okrężnicy. Ponadto MMP-1 został zidentyfikowany jako onkogen ułatwiający proliferację i migrację komórek raka kolczystokomórkowego skóry (CSCC) poprzez aktywację szlaku Wnt. Dodatkowo, obniżenie aktywności MMP-1 hamuje szlak PI3K/Akt/c-myc zaangażowany w transformację nabłonkowo-mezenchymalną (EMT). Proces ten został uznany w ostatnich latach za jeden z kluczowych mechanizmów w regulacji migracji komórek nowotworowych [Zhang i wsp. 2022; Bakir i wsp. 2020].

MMP-1 degradowe kolagen typu I macierzy pozakomórkowej, a także aktywuje PAR-1 (receptor typu pierwszego aktywowany proteazą), stanowiący istotną komponentę w mechanizmie angiogenezy. PAR-1 został po raz pierwszy zidentyfikowany jako onkogen przez Whiteheada i wsp. w 1995 r. Wykazano, że bierze on udział w remodeling naczyń krwionośnych, umożliwiając infiltrację komórek nowotworowych. Ligandem wykazującym powinowactwo do PAR-1 jest też trombina. Istnieje wyraźna zależność pomiędzy wzrostem ekspresji MMP-1 i PAR-1 w mikrośrodkowisku tkankowym, a nasileniem procesów inwazyjnych i przerzutowych wielu nowotworów złośliwych [Whitehead i wsp. 1995; Fan i wsp. 2015]. Aktywność MMP-1 nie jest swoista dla BC, co może stanowić w przyszłości ważne ograniczenie w rekomendowaniu jej oznaczania jako uzupełnienie standardowego panelu diagnostycznego. W komórkach raka piersi MCF-7 i MDA-MB-231 wykazano, że MMP-1 odgrywa kluczową rolę w procesie metastazy. Poziom MMP-1 w tkankach raka piersi ze zwiększoną ekspresją receptorów estrogenowych ER(+) oraz hEGF jest wyraźnie niższy. Z kolei ekspresja MMP-1 wzrasta w komórkach nowotworowych i zrębowych raka piersi z przerzutami do węzłów chłonnych, czego nie obserwuje się w tkankach bez

przerzutów. Mechanizmy te wtórnie wskazują na znaczenie estrogenów i czynników troficznych w regulacji aktywności MMP-1 [Wang i wsp. 2019].

Dysponujemy jednak nielicznymi danymi dotyczącymi związku MMP-1 z podatnością na wystąpienie raka pęcherza moczowego. Również niejednoznaczna jest rola MMP-1 jako czynnika predykcyjnego, chociaż coraz więcej dowodów wskazuje na to, że polimorfizmy genów kodujących MMP-1 mogą mieć istotne znaczenie w tym procesie.

MMP-1 ulega ekspresji w komórkach nowotworowych, zarówno w guzach powierzchniowych jak i nowotworach naciekających warstwy mięśniowe pęcherza. Największą zawartość metaloproteinazy odnotowano w guzach o wysokim stopniu zaawansowania miejscowo, co wskazuje na wiodącą rolę enzymu w progresji nowotworu. Nie wykazano jednak związku pomiędzy ekspresją MMP-1 a przeżyciem pacjentów, natomiast wyższą ekspresję tkankową odnotowano w przypadku nawrotu choroby. MMP-1 wykryto także w moczu pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego, jednak pozytywne wyniki uzyskano jedynie u 26% pacjentów [Durkan i wsp. 2001; Młynarczyk i wsp. 2017].



Ryc. 3. Struktura przestrzenna MMP-1

(<https://swissmodel.expasy.org/repository/>)

Najczęściej analizowaną sekwencją polimorfizmu MMP-1 jest rs1799750 w obrębie promotora genu kodującego [Liao i wsp. 2021]. Polimorfizm insercyjny (2G) MMP-1 prowadzi ostatecznie do zwiększonej aktywności transkrypcyjnej MMP-1 oraz wyższego stężenia metaloproteinazy w surowicy [Tower i wsp. 2003]. Już w 1979 roku wykazano, że tkanki nowotworowe pęcherza naciekające mięśnie, wykazują wyższą aktywność MMP-1 niż ich nieinwazyjne odpowiedniki [Wirl i wsp. 1979]. Późniejsze badania potwierdziły, że w moczu pacjentów ze zdiagnozowanym BC stężenie MMP-1 było istotnie wyższe i korelowało ze stopniem zaawansowania choroby, a także krótszym czasem przeżycia [Nutt i wsp. 1998].

Metaanaliza danych związana z określeniem wpływu polimorfizmu genów kodujących MMP-1 a podatnością występowania raka pęcherza moczowego, dostarczyła pewnych dowodów w tej kwestii. W odniesieniu do polimorfizmu 1G/2G MMP-1-1607 stwierdzono związek z podatnością na raka pęcherza jedynie w modelu recesywnym. Nie potwierdzono związku występowania BC z innymi polimorfizmami [Yan i wsp. 2014].

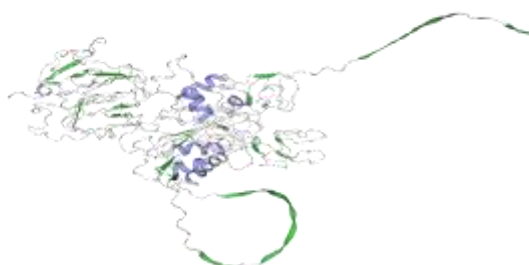
MMP-1 wykryto w próbkach moczu u większego odsetka pacjentów z guzami T2-T4 i G(3) niż w przypadku guzów cis/Ta/T1 lub G(1)-G(2) pęcherza moczowego. U pacjentów z wykrywalnym stężeniem MMP-1 w moczu obserwowano znacznie szybszą progresję choroby i wyższy wskaźnik zgonów z powodu raka pęcherza. W przypadku wykrycia w moczu MMP-1 istnieje większe ryzyko wystąpienia guza pęcherza moczowego w zaawansowanym stadium lub stopniem zaawansowania [Durkan i wsp. 2001].

Mechanizmy metastazy zależne od MMP-1 nie zostały ostatecznie zdefiniowane i mogą być specyficzne dla danej tkanki. Metaloproteinazy pochodzące z makrofagów związanych z guzem (TAM) stanowią niezbędny czynnik w progresji raka jelita grubego poprzez aktywację cyklu komórkowego z fazy G0/G1 do fazy S i G2/M. Dodatkowo egzogenna MMP-1 aktywuje kompleksy cdc25a/CDK4-cyklina D1 i p21/cdc2-cyklina B1. Hamowanie PAR1 lub blokowanie sygnalizacji MAPK/Erk eliminuje proliferację indukowaną przez egzogenną MMP-1 *in vitro* i *in vivo*. Parakrynowo – cytokinowy mechanizm oddziaływania między komórkami nowotworowymi a makrofagami związanymi z guzem. Pętka sprzężenia zwrotnego MMP-1/PAR1/Erk1/2/ETV4 może stanowić istotny element nowoczesnej farmakoterapii, a aktywność jej poszczególnych elementów ważny czynnik prognostyczny [Yu i wsp. 2021]. W procesie tym nie można też wykluczyć innych mechanizmów zależnych od MMP-1, poprzez zmiany w obrębie przejścia nabłonkowo – mezenchymalnego i szlak Akt [Wang i wsp. 2020].

4.2. Charakterystyka MMP-9

Ludzka MMP-9 (kolagenaza typu IV; żelatynaza B) składa się z czterech domen: prodomeny końcowej zakończonej grupą aminową -NH₂, domeny katalitycznej, łącznikowej oraz końcowej, homologicznej z hemopeksyną. Struktury te łączą się, tworząc nieaktywny proenzym o masie 92 kDa, masa aktywnej formy u ssaków wynosi 88-kDa. Domena katalityczna MMP-9 zawiera dwa jony cynku, pięć jonów wapnia i trzy powtórzenia homologiczne do modułu typu II fibronektyny [Papazafiropoulou i Tentolouris 2009]. MMP-9 ma znaczenie w szerokim spektrum procesów fizjologicznych i patologich. Ekspresja

MMP-9 wpływa na implantację zarodka, począwszy od inwazji trofoblastycznej we wczesnym okresie ciąży. MMP-9 jest obecna w rozwijających się tkankach mięśnia sercowego u ludzi i ulega ekspresji między 16 a 18 dniem embriogenezy. Wykazano, że enzym odgrywa ważną rolę w neowaskularyzacji poprzez proteolityczną degradację białek w blaszce podstawnej naczyń krwionośnych i uwalnianie aktywnej postaci czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego – VEGF [Yabluchanskiy i wsp. 2013]. Nie wydaje się aby występowała istotna klinicznie zależność pomiędzy polimorfizmem genów kodujących MMP-9 a ryzykiem występowania nowotworów pęcherza moczowego [Yan i wsp. 2014].



Ryc. 4. Struktura przestrzenna MMP-9

(<https://swissmodel.expasy.org/repository/>)

Kluczowe etapy karcynogenezy, obejmujące między innymi migrację, inwazję, przerzuty i angiogenezę, są ściśle związane ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym. Ponieważ MMP-9 odgrywa ważną rolę w przebudowie macierzy i degradacji białek błonowych, jest ona powszechnie powiązana z patologiami nowotworowymi. MMP-9 w większości przypadków sprzyja rozwojowi i progresji nowotworu ale w niektórych nowotworach, którym towarzyszy nasilona komponenta zapalna, takich jak rak okrężnicy, może również odgrywać rolę hamującą progresję nowotworu. Oprócz nowotworów, wzrost ekspresji MMP-9 jest też charakterystyczny dla chorób autoimmunologicznych i chorób układu krążenia [Hang 2018].

Komórki nowotworowe produkują w nadmiarze MMP-9, co prowadzi do degradacji kolagenu typu IV i błony podstawnej, zaburzając mikroarchitekturę i funkcję tkanki. Dotychczas przeprowadzone badania są zgodne i podkreślają rolę MMP-9 w raku pęcherza moczowego. Wskaźniki ekspresji MMP-9 u pacjentów z BC są podwyższone. MMP-9 ulega

ekspresji głównie w makrofagach, neutrofilach i mastocytach. Odpowiedź zapalna wiąże się z zaawansowaną neoplazją, która może również zwiększać biosyntezę MMP-9 [Zamilpa i wsp. 2012]. Stężenie MMP-9 w surowicy stanowi ważny biomarker molekularny, za pomocą którego możemy identyfikować inicjację oraz w pewnym stopniu przewidywać progresję raka pęcherza moczowego. Oprócz istotnie wyższych stężeń MMP-9 w tkance nowotworowej, stężenie MMP-9 wzrasta wraz ze stopniem złośliwości BC i wiąże się z kliniczno-patologicznymi cechami raka pęcherza moczowego [Zeng i ws. 2016].

W aktualnych obszarach badawczych, skupiających się głównie na MMP-9 dostrzegamy pewną dwutorowość. Z jednej strony analizuje się rolę molekuly jako potencjalnego markera, przy pomocy którego można by monitorować przebieg nowotworu lub określić ryzyko jego wystąpienia w danej grupie pacjentów. Raczej nie jako pojedynczy czynnik predykcyjny, tylko uzupełnienie złożonego panelu diagnostycznego. Drugi nurt badań dotyczy opracowania swoistych inhibitorów MMP-9. Do chwili obecnej nie opracowano skutecznego w praktyce klinicznej, specyficznego inhibitora dla MMP-9. Ze względu na podobieństwo całej rodziny metaloproteinaz, osiągnięcie wysokiej swoistości inhibicyjnej MMP-9 w celu uniknięcia działań niepożądanych, stanowi duże wyzwanie dla badaczy [Liang i Chang 2018; Roy i wsp. 2009].

Ekspresja MMP-9 jest zwiększona, szczególnie w przypadku nowotworów o wysokim stopniu złośliwości. Uwzględniając strukturę MMP-9 wydaje się, że odgrywa ona ważniejszą rolę w mechanizmie tworzenia przerzutów nowotworowych niż MMP-2 [Kudelski i wsp. 2023].

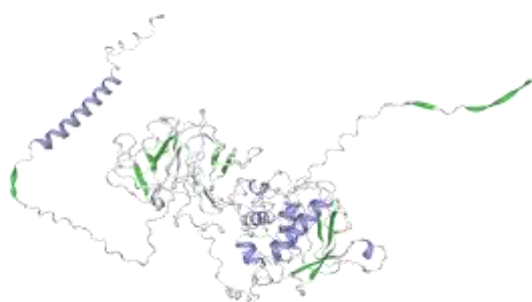
Użyteczność diagnostyczną oznaczeń panelu MMPs w moczu, w tym MMP-9 analizował zespół włoskich badaczy. Poziom MMP-9 był znacząco podwyższony u pacjentów z nowotworami wysokoinwazyjnymi (pT2, pT3), podczas gdy w moczu osób zdrowych, praktycznie niewykrywalny lub bardzo niski. W próbkach moczu pacjentów z powierzchownymi guzami pęcherza moczowego stężenia te były także podwyższone, co sugeruje zasadność oznaczeń MMP-9 już we wczesnych etapach choroby [Sier i wsp. 2000].

Analiza retrospektywna tkanek pobranych od pacjentów z rozpoznaniem BC wykazała, że stopień ekspresji MMP-9 był wyższy w porównaniu z materiałem kontrolnym. Częstość występowania MMP-9 korelowała ze stopniem złośliwości guza. Ekspresja MMP-9 była niższa w nowotworach G1/G2 w porównaniu z G3. Także wzrost jej ekspresji wiązał się z progresją nowotworu [Wu i wsp. 2018].

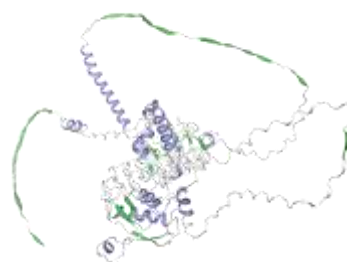
4.3. Charakterystyka MMP-14 i MMP-15

Metaloproteinaza typu błonowego MT-1-MMP (14q11.2) z charakterystycznymi domenami katalitycznymi, biorąca udział w degradacji macierzy pozakomórkowej w procesach fizjologicznych, takich jak rozwój embrionalny, reprodukcja i przebudowa tkanek. Zwiększoną aktywność enzymu obserwuje się w procesach chorobowych przebiegających z towarzyszącym stanem zapalnym, np. RZS. MMP-14 wydzielana jest w postaci nieaktywnego proenzymu, aktywowanego przez proteiny zewnątrzkomórkowe. W zaburzonych mechanizmach regulacji cyklu komórkowego, MMP-14 poprzez aktywację pro-MMP-2 zwiększa tendencję guza do naciekania otaczających tkanek [ncbi.nlm.nih.gov/gene/4323].

a)



b)



Ryc. 5. Struktura przestrzenna MMP-14 (a) i MMP-15 (b)

(<https://swissmodel.expasy.org/repository/>)

Biosynteza MMP-14 jest ściśle regulowana, począwszy od transkrypcji, poprzez liczne modyfikacje potranslacyjne i kompartmentalizację [Gifford i Itoh 2019]. Ekspresja genu kodującego MMP-14 jest regulowana epigenetycznie poprzez modyfikację histonów, przebudowę chromatyну i czynniki transkrypcyjne wrażliwe na metylację DNA, takie jak SP1. Stopień metylacji promotora MMP-14 odwrotnie koreluje z ekspresją genów i migracją komórek *in vitro*, przy czym hipometylacja promotora i histonu H3 powiązana jest z wysokim poziomem ekspresji MMP-14 [Niland i wsp. 2021].

Ekspresję MMP-14 obniża protoonkogen p53, przeciwnie do IL-6, która przyczynia się do wzrostu poziomu metaloproteinazy. Aktywacja szlaku cytokin prozapalnych zwiększa degradację p53, umożliwiając w ten sposób transkrypcję genów kodujących MMP-14

za pośrednictwem Sp-1. Mechanizm onkogennego działania MMP-14, wynika z uprzedniej aktywacji metaloproteinazy przez IL-6. Wyznacza to potencjalnie nową strategię terapeutyczną, w poszukiwaniu synergistycznych inhibitorów MMP-14 i IL-6 o działaniu przeciwnowotworowym [Cathcart i wsp. 2016].

Poziom MMP-14 wzrasta w przypadku kilku typów nowotworów, promując angiogenezę, stan zapalny, inwazję komórek nowotworowych i tworzenie przerzutów. Co zaskakujące, chociaż MMP-14 w kontekście raka badano głównie w guzach nabłonkowych, jego rola w mięsakach pozostaje praktycznie niejasna. Pojedyncze badania wskazują na wyraźny wzrost aktywności MMP-14 u tych chorych [Gonzalez-Molina i wsp. 2019]. W genetycznie zmodyfikowanych modelach mysich nadekspresja MMP-14 indukuje między innymi powstanie raka pęcherza moczowego, gruczolakoraka gruczołu sutkowego i rozwój raka trzustki. W przypadku innych nowotworów nabłonkowych również potwierdzono zwiększoną ekspresję MMP-14, szczególnie w obrębie mikrośrodowiska guza (TME). W modelach mysich raka piersi ze zmniejszoną ekspresją MMP-14 wykazano zahamowanie tworzenia przerzutów, co przypisuje się zmniejszonej degradacji kolagenu I przez fibroblasty zrębowe. Wykazano na mysim modelu ortotopowym raka jelita grubego, że makrofagi związane z TME cechują się wysoką ekspresją MMP-14 i angażują w remodeling macierzy [Afik i wsp. 2016]. Zwiększona ekspresja MMP-14 wydaje się być powiązana z wysokim stopniem złośliwości, agresywnością i niekorzystnym rokowaniem, dotyczącym przeżycia u pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego. Aktywność MMP-14 i MMP-15, wykazuje większą supresję MMP-14 w raku pęcherza moczowego o niskim stopniu złośliwości. Oznaczenie aktywności MMP-14 w tkance BC może służyć jako predyktor ryzyka przerzutów [Kudelski i wsp. 2022]. Hamowanie MMP-14 wydaje się kluczowe nie tylko u pacjentów onkologicznych. MMP-14 promuje limfangiogenezę i infiltrację makrofagów w procesie zapalnym oraz zwiększa ekspresję VEGF-C i VEGF-3R. W aspekcie klinicznym może to zapewnić realne leczenie odrzucenia przeszczepu i innych zaburzeń limfatycznych [Du i wsp. 2016].

Metaloproteinaza macierzy-15; MMP-15 znana też zgodnie z obowiązującą nomenklaturą MT2-MMP, kodowana jest przez gen zlokalizowany na chromosomie 16q21. Enzym pod względem strukturalnym wykazuje homologię z MMP-14. Zatem znaczenie obu MMPs jest podobne. Najwyższą ekspresję MMP-15 odnotowano w dwunastnicy, pęcherzyku żółciowym, sercu, łożysku i tarczycy. W pęcherzu moczowym ekspresja ta jest istotnie niższa [ncbi.nlm.nih.gov/gene/4324]. Zwiększona aktywność enzymu, jak w przypadku MMP-14

wiąże się z niekorzystnym rokowaniem w zakresie przeżycia. Wynika to z wtórnej aktywacji przez MM2-MMP pozostałych metaloproteinaz macierzy [Pietrzak i wsp. 2021].

Badania opublikowane na początku 2024 roku przyczyniły się do zdefiniowania mechanizmów onkogenego działania MMP-15, wynikających głównie z aktywacji szlaku JNK/Sp1. Wykazały one, że magnolina - substancja wyizolowana z magnolii, wykazuje działanie przeciwnowotworowe, indukowane hamowaniem transkrypcji i translacji MMP-15 za pośrednictwem JNK/Sp1. Nadekspresja JNK/Sp1 przywraca ekspresję MMP15 [Lin i wsp. 2024].

W rakach pęcherza moczowego o niskim i wysokim stopniu złośliwości, wykazano znacznie wyższe ilości MMP-14 oznaczone jako całkowita zawartość enzymu/kg masy białkowej badanej tkanki, tj. prawie 35% więcej enzymu w przypadku nowotworów o niskim stopniu złośliwości. Szczególnie wysoki, bo około 10-krotny wzrost występuje w przypadku nowotworów o wysokim stopniu złośliwości. Zawartość MMP-15 w prawidłowej ścianie pęcherza moczowego jest trzykrotnie większa w porównaniu z MMP-14 w tej samej tkance. Rak pęcherza moczowego o niskim stopniu złośliwości cechuje się znacznie większą ekspresją MMP-15 w homogenacie tkankowym, natomiast jego zawartość w raku o wysokim stopniu złośliwości jest niższa w odniesieniu do zdrowej tkanki pęcherza moczowego. Oznaczanie poziomu MMP-14 w raku pęcherza moczowego, może służyć jako dodatkowy czynnik predykcyjny oszacowania ryzyka przerzutów [Kudelski i wsp. 2020].

4.4. Charakterystyka i znaczenie alfa2-makroglobuliny

Alfa2-makroglobulina ($\alpha 2M$) stanowi proteinę o właściwości inhibitora endoproteaz, w tym także MMPs, o stosunkowo niskiej swoistości substratowej. Oprócz roli regulatora proteolizy zewnątrzkomórkowej, $\alpha 2$ -makroglobulina pełni także inne funkcje, takie jak przełączanie proteolizy w stronę substratów o niskiej masie cząsteczkowej, ułatwianie migracji komórek oraz wiązanie cytokin, czynników wzrostu i białek zewnątrzkomórkowych. Funkcje te wydają się szczególnie ważne w kontekście stanu zapalnego [Vandooren i Itoh 2021].

Chociaż w diagnostyce marker ten jest powszechnie znany, a wzrost jego stężenia obserwuje się między innymi w marskości wątroby, cukrzycy czy zespole nerczycowym, doniesienia dotyczące zasadności oznaczania $\alpha 2$ -makroglobuliny w chorobach nowotworowych są raczej znikome. Warto zauważyć, że w zakażeniach którym towarzyszy ogólnoustrojowy stan zapalny, a także w fibrynolizie parametr ten wzrasta. U pacjentów

w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej, ryzyko powikłań zakrzepowozatorowych jest większe. Tym ogólnoustrojowym zmianom towarzyszy często wzrost aktywności cytokin prozapalnych, tj.: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α [Autenshlyus i wsp. 2021]. Jednak ich swoistość w diagnostyce onkologicznej jest niewielka, niezależnie od rodzaju badanego materiału.

Wcześniejsze badania potwierdzają koncepcję, że α 2-makroglobulina stanowi białko nośnikowe dla TGF- β i pozwala działać temu czynnikowi jako autokrynnny regulator funkcji steroidogennych kory nadnerczy. Chociaż α 2M zapobiega wiązaniu się TGF- β z jego receptorami błonowymi, długotrwała inkubacja α 2M z komórkami kory nadnerczy powoduje zahamowanie wytwarzania kortyzolu, podobne do obserwowanego w obecności samego TGF- β [Feige i wsp. 1996].

Istnieje dobrze udokumentowany związek pomiędzy poziomem antygenu specyficznego dla prostaty (PSA) a α 2-makroglobuliną. Komórki raka prostaty wytwarzają PSA, który jest enzymatycznie aktywny w mikrośrodku guza. We krwi aktywność ta wyraźnie maleje, ze względu na tworzenie kompleksów antygenu z α 1-antychymotrypsyną oraz α 2-makroglobuliną. Kompleksów PSA- α 2M nie można oznaczyć standardowymi testami diagnostycznymi, ponieważ są one stosunkowo szybko usuwane z krążenia. W praktyce klinicznej uniemożliwia to określenie dokładnej wielkości wytwarzania PSA przez komórki nowotworowe. PSA skompleksowany z α 2-makroglobuliną traci zdolność degradacji dużych kompleksów białkowych, zachowując ograniczoną możliwość rozszczepiania małych substratów polipeptydowych. W zaawansowanym stadium nowotworu może znajdować się wystarczająca ilość kompleksów PSA- α 2M, aby wpłynąć na całkowity poziom α 2-makroglobuliny we krwi i hydrolizować hormony peptydowe. Proces ten wpływa na stężenie wielu czynników troficznych, takich jak: IL-6, TGF- β , EGF (naskórkowy czynnik wzrostu) i PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostu). Zmiany w poziomach tych cytokin wydają się być kluczowe i mogą odgrywać decydującą rolę w procesie metastazy. Złożoność mechanizmów skupia się głównie na kompleksowaniu PSA z alfa2-makroglobuliną u chorych z nowotworem prostaty, chociaż nie można wykluczyć na tym etapie możliwości tworzenia nietrwałych kompleksów z innymi peptydami [Kostova i wsp. 2018]. Warto jednak nadmienić, że podobny proces, obejmujący modulowanie aktywności innych proteaz serynowych przez α 2M może zachodzić u chorych z nowotworem pęcherza moczowego, gdzie nie PSA, a chymotrypsyna, tripsyna czy trombina będą odgrywały analogiczną rolę.

Zmiana poziomu biomolekuł może być specyficzna dla danego stadium rozwoju nowotworu pęcherza moczowego. Spośród licznych inhibitorów proteaz, α 2-makroglobulina cechuje się wyraźnym wzrostem stężenia w surowicy w pierwszym i trzecim stadium BC. W początkowym stadium obserwowany wzrost może stanowić mechanizm ochronny przed naciekaniem błony podstawnej, w późniejszym zaś wskazywać na proces kompensacji hamujący wzrost guza [Dmytryk i wsp. 2020].

Nowe spojrzenie w tym aspekcie rzuca niedawno opublikowana praca, podnosząca kwestię oznaczania alfa2-makroglobuliny jako nowego biomarkera diagnostycznego w raku pęcherza moczowego. Ponieważ mocz ma bezpośredni kontakt z mikrośrodowiskiem guza badacze założyli, że miejscowe zmiany mikroarchitektury guza mogą odzwierciedlać aktywność α 2M. Wykazano zwiększoną ekspresję biomarkera w moczu chorych pacjentów [Lee i wsp. 2022].

Z potencjalnych nowych glikoprotein do diagnostyki uzupełniającej BC należy uwzględnić oprócz alfa2-makroglobuliny też kadherynę-13 i klusterynę. Jednak to α 2M cechuje się znacznie wyższą swoistością, a odnotowane różnice stężeń pomiędzy pacjentami zdrowymi i ze zdiagnozowanym BC są znacznie większe, w porównaniu z pozostałymi biomarkerami [Park i wsp. 2022].

4.5. Inhibitory metaloproteinaz macierzy TIMPs – rola i znaczenie w procesie metastazy.

Dotychczas scharakteryzowano cztery rodzaje inhibitorów metaloproteinaz tkankowych, oznaczonych jako TIMP-1, TIMP-2, TIMP3 i TIMP-4. TIMP-1 i TIMP-2 wykazują zdolność hamowania wszystkich metaloproteinaz macierzy, co wiąże się z ich kluczową rolą w regulacji homeostazy macierzy zewnątrzkomórkowej w wielu procesach fizjologicznych.

Masa cząsteczkowa TIMPs wynosi w przybliżeniu 21kDa i zawierają one domenę N-kończową i C-kończową. W przeciwieństwie do TIMP-1 i TIMP-3, domena C-kończowa TIMP-2 i TIMP-4 posiada ładunek ujemny. Ponadto TIMP-1 oraz TIMP-3 zawierają w swoich domenach miejsca glikozylacji, przez co wykazują większe powinowactwo do MMP oraz większą ochronę przed endocytozą i degradacją [Su i wsp. 2019].

Przyspieszony obrót ECM ma miejsce w stanach zapalnych, przewlekłych stanach zwyrodnieniowych i inwazji nowotworu. TIMP-2 spowalnia wzrost nowotworu, inwazję oraz

przerzuty w licznych modelach eksperymentalnych. Działanie to wynika z nieswoistego hamowania MMPs i angiogenezy w obrębie guza [Gomez i wsp. 1997].

Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że TIMP-2 hamuje wzrost guza pierwotnego nawet do 50% i przerzuty do płuc (92%) w raku piersi. TIMP-2 zakłóca krytyczne szlaki sygnalizacji komórkowej, m.in.: Wnt - zaangażowanej w przejście epitelialno – mezenchymalne oraz PI3K oddziałującej z protoonkogenem p27. Mechanizmy te wskazują zarówno na bezpośrednie, jak i ogólnoustrojowe działanie przeciwnowotworowe inhibitora [Peeney i wsp. 2020]. Dane przedkliniczne, oparte o argumentację na poziomie biochemicznym, nie zawsze można ekstrapolować w obszarze klinicznym, nawet w przypadku tych samych rodzajów nowotworu.

Rola jaką odgrywa TIMP-2 w nowotworach jest dość kontrowersyjna i niejednoznaczna. Badacze z Liege negują pozytywną rolę inhibitora w nowotworze piersi u ludzi. Wysoki poziom TIMP-2 koreluje zarówno ze skróconym okresem wolnym od choroby, jak i zwiększoną śmiertelnością. W pierwotnych rakach piersi poziomy TIMP-2 nie wykazywały żadnego związku z wielkością guza ani stanem węzłów pachowych, ale były odwrotnie skorelowane z poziomem receptorów estrogenowych [Remacle i wsp. 2000].

Dane dotyczące roli TIMP-1 są sprzeczne i niejednoznaczne. TIMP-1 może wspomagać przeżycie i migrację komórek ostrej białaczki szpikowej niezależnie od powinowactwa do MMPs a poprzez szlak PI3K/Akt/p21 [Forte i wsp. 2017]. U pacjentów z rakiem pęcherza moczowego stężenia TIMP-1 są wyższe i korelują z cechami klinicznymi – patologicznymi. Zatem poziom TIMP-1 w surowicy, będący wynikiem reaktywnej produkcji w obrębie guza, może stanowić ważny marker oceny klinicznej w ocenie progresji raka pęcherza moczowego [Naruo i wsp. 1994]. Ekspresja TIMP-1 w leukocytach krwi obwodowej wzrasta w nowotworach BC o niskim stopniu zróżnicowania i wysokim stopniu złośliwości (G3), a także ulega obniżeniu w przypadku wczesnego nawrotu [Wieczorek i wsp. 2015]. Związek między stężeniem TIMP-1 w moczu a naciekaniami mięśniówki gładkiej i progresją BC jest sprzeczny z jego rolą jako inhibitora MMPs i wymaga dodatkowych badań.

Tkankowy inhibitor metaloproteinazy-2 (TIMP-2) opisano po raz pierwszy jako endogenny inhibitor MMPs, który zapobiega degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej obserwowanej w chorobach przewlekłych. Badania molekularne przyczyniły się do zdefiniowania odrębnych właściwości i funkcji TIMP-2, niezależnych od ich powinowactwa do MMPs. Obejmują one hamowanie kinaz tyrozynowych poprzez wiązanie się z integralną $\alpha 3\beta 1$ na powierzchni komórki i aktywację fosfatazy tyrozynowej białka Shp-1.

Ten mechanizm inaktywacji heterologicznego receptora powoduje hamowanie proliferacji za pośrednictwem czynnika wzrostu (GF), zarówno śródbłónka i fibroblastów, jak i komórek nowotworowych. Wzrost ekspresji TIMP-2 w komórkach nowotworowych powoduje zahamowanie ich wzrostu *in vivo*, a także blokowanie przejścia nabłonkowo – mezenchymalnego (EMT), które jest związane z agresywnością nowotworu i przerzutami. Odkrycia te sugerują potencjalną korzyść terapeutyczną podawania egzogenego TIMP-2 pacjentom w różnych stadiach choroby nowotworowej. Jednak główną przeszkodą już w fazie przedklinicznej jest opracowanie bioproduktu umożliwiającego produkcję TIMP-2 z dużą wydajnością i czystością preparatu [Chowdhury i wsp. 2017].

TIMP-3 to jedyny przedstawiciel tej grupy, który wiąże się z macierzą zewnątrzkomórkową po jej wydzieleniu. Wiązanie to następuje poprzez oddziaływanie domeny N-końcowej z siarczanem heparanu. Ekspresja TIMP-3 regulowana jest zależnie od fazy cyklu komórkowego i może służyć jako marker końcowego różnicowania.

Powszechnie uważa się, że tkankowe inhibitory metaloproteinaz, hamują aktywność MMPs oraz blisko spokrewnionych strukturalnie enzymów: dezintegrynę i ADAM (transbłonowych i sekrecyjnych metaloendopeptydaz) oraz ADAM z motywami trombospondyny (ADAMTS). TIMPs kontrolują proteolizę w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) przez bezpośrednie hamowanie proteolizy zależnej od MMPs. Ta klasyczna rola TIMPs sugeruje, że podwyższony poziom TIMPs prowadzi do akumulacji ECM lub zwłóknienia, podczas gdy utrata aktywności zwiększa proteolizę macierzy. Jest to jednak daleko idące uproszczenie. Badania dowodzą, że poszczególne izoenzymy TIMPs wykazują często przeciwstawne działanie w procesach, które można określić jako obrót ECM. Ta dychotomiczna funkcja inhibitorów tkankowych zależy od wielu czynników, takich jak rodzaj tkanki i jej środowiska, nasilenia stanu zapalnego czy swoistości substratowej danych typów metaloproteinaz [Arpino i wsp. 2015].

4.6. Wpływ wybranych ksenobiotyków i trybu życia na poziom MMPs oraz TIMPs

Zmiany w obrębie struktury tkankowej są też procesem fizjologicznym i towarzyszą nam nie tylko w stanach patologicznych. Szeroka aktywność kolagenaz musi zatem podlegać modulacji także za pośrednictwem związków pochodzenia naturalnego, zawartych w diecie oraz czynniki fizyczne i chemiczne w naszym otoczeniu.

Polifenole zielonej herbaty i ich główny składnik, galusan epigallokatechiny-3, wykazują właściwości przeciwnowotworowe. Badacze z Kliniki Urologii w Ohio dostarczają mocnych dowodów na to, że mechanizmy epigenetyczne regulują ekspresję MMPs i TIMPs zaangażowanych w progresję nowotworu prostaty. Polifenole zawarte w zielonej herbacie pośredniczą w epigenetycznej aktywacji TIMP-3, który zmniejsza inwazyjności komórek rakowych poprzez przywrócenie równowagi MMPs:TIMPs. Ekspozycja na naturalne polifenole obniża poziom MMP-2 i MMP-9, znosząc zdolność migracji komórek [Deb i wsp. 2019]. Resweratrol występujący w wysokim stężeniu w winogronach i winie czerwonym, w stężeniach 7,8 – 62,5 µg/ml, podobnie jak polifenole zawarte w zielonej herbacie, zmniejsza ekspresję MMP-2 i MMP-9 w modelu raka nerkowokomórkowego [Dai i wsp. 2020]. W raku prostaty resweratrol zmniejsza migrację i inwazję komórek poprzez demetylację aktywującą TIMP-2 i TIMP-3 oraz hamowanie MMP-2 i MMP-9 [Wang i Chen 2020].

Wzrost poziomu MMP-1 następuje poprzez stymulację cytokiny stanu zapalnego oraz reaktywne formy tlenu, zaangażowane w proces starzenia się. Epigallokatechina-3 w dawce 10 µM hamuje ekspresję i wydzielanie MMP-1 indukowane TNF-α [Won i wsp. 2021].

Kwercetyna to naturalny polifenol, popularny jako suplement diety, występuje w wielu owocach i warzywach, a także w winie czerwonym. Ten naturalny barwnik ma właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Badacze z Tajwanu potwierdzili, że kwercetyna znacząco zmniejsza ekspresję MMP-9 indukowaną TNF-α w komórkach GES-1 (linia komórek nabłonka błony śluzowej żołądka) [Hsieh i wsp. 2022]. Kwercetyna hamuje gromadzenie się tłuszczu w komórkach i ekspresję genów związanych z różnicowaniem adipocytów, poprzez hamowanie procesu angiogenezy związanego z MMP-2 i MMP-9. Kwercetyna zależnie od dawki obniża stężenie i aktywność MMP-2 i MMP-9 [Hong i wsp. 2021].

Kemferol – fitozwiązek, trójcyklinczna pochodna flawonolu o gorzkim smaku, wykazuje działanie spazmolityczne i przeciwalergiczne. Występuje głównie w jarmużu, brokułach, szpinaku i szafranie. W komórkach nowotworowych inkubowanych z kemferolem dochodzi do obniżenia przeżywalności oraz tempa migracji i liczby komórek transbłonowych. Efekt ten przypisuje się obniżonej ekspresji MMP-1, MMP-2 i MMP-9 w obecności kemferolu [Zhang i wsp. 2022]. Zawartość kwasów omega-3 w diecie ma też wpływ na poziom MMPs. Ekstrakty ze skóry i wątroby ryb antarktycznych: dorsza marmurkowego (*Nototothenia rossii*) i makrełowca (*Champscephalus gunnari*) hamują ekspresję MMP-1 w ludzkich fibroblastach skóry eksponowanych na działanie UVB. Jednak wyraźnie większy

efekt występuje w przypadku *N. rossi*, ze względu na wyższą całkowitą zawartość kwasów omega-3 [Lee i Koo 2022]. Podobne działanie, wykazuje kawior z jesiotra, źródło fosfolipidów, szczególnie kwasu dokozaheksaenowego (DHA). Ekstrakt z kawioru zmniejsza poziom ekspresji mRNA dla MMP-1 w fibroblastach [Lee i wsp. 2020]. Znana już w starożytności kurkuma z rodziny imbirowatych, zwana także szafranem indyjskim znalazła szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Kurkumina, główny składnik rośliny stosowana też jako żółty barwnik, posiada właściwości antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe. Problemem klinicznym stanowi jej niska biodostępność i wchłanianie z przewodu pokarmowego po podaniu doustnym. Indyjscy badacze ocenili działanie analogu: bis-demetoksykurkuminy jako środka chemioterapeutycznego. Zarówno kurkuma i jej pochodna zmniejszają ekspresję MMP-9 i zwiększają TIMP-2 [Mohankumar i wsp. 2021]. Zastosowanie syntetycznych analogów kurkuminy przyczynia się do uzyskania równowagi pomiędzy MMPs:TIMPs. Pochodne kurkuminy o większym wychwycie komórkowym modulują poziom pro-MMP-2 i MMP-9 oraz TIMP-1 [Bośca i wsp. 2019]. Nadmierna konsumpcja alkoholu przyczynia się do zaburzenia aktywności pomiędzy metaloproteinazami i ich inhibitorami. Zatrucie alkoholowe istotnie zwiększa stężenie MMP-9 i TIMP-1 bez wpływu na wartość współczynnika MMP-9/TIMP-1, oraz nie zależy od poziomu alkoholu we krwi. Stężenie MMP-9 i TIMP-1 koreluje z poziomem aminotransferazy alaninowej – ALT i bilirubiną całkowitą [Zdanowicz i wsp. 2022].

Od wielu lat dużą popularnością wśród sportowców cieszy się L-karnityna. Suplement diety posiada liczne badania potwierdzające poprawę wydolności organizmu podczas treningu, poprzez wzrost maksymalnego zużycia tlenu i obniżenie współczynnika oddechowego. Złożone mechanizmy działania L-karnityny stymulujące metabolizm lipidów, korzystnie wpływają na regenerację tkanek, szczególnie w warunkach beztlenowych [Karlic i wsp. 2004]. U kobiet z chorobą zwyrodnieniową stawu biodrowego suplementacja L-karnityna w dawce 750 mg/dzień przez osiem tygodni obniża w surowicy stężenie MMP-1 i IL-1 β , bez istotnego wpływu na MMP-13. W modelu doświadczalnym kardiomiopatii indukowanej niedoborem choliny, suplementacja L-karnityny nie wpływa na poziom MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 [Strilakou i wsp. 2015]. L-karnityna może hamować neurozapalenie towarzyszące ekspozycji na stres psychospołeczny. Mechanizm jej działania wiąże się z obniżeniem poziomu kortykosteronu w surowicy oraz MMP-2 i MMP-9. Zmiany te z punktu widzenia neurologicznego wydają się być istotne [Rababa'h i wsp. 2023].

U osób z nadwagą i otyłością ćwiczenia interwałowe o wysokiej intensywności już w czasie 25h zwiększają poziom MMP-3 ale nie mają wpływu na MMP-2 [Raman i wsp. 2023]. U sportowców uprawiających sporty zimowe i pływaków nie obserwuje się istotnych różnic stężeń MMP-9 i TIMP-1. Jednak stosunek MMP-9/TIMP-1 w surowicy jest wyższy w sezonie letnim u sportowców uprawiających sporty zimowe [Bougault i wsp. 2023]. Przegląd piśmiennictwa z lat 2000-2017 przeprowadzony przez włoskich badaczy z Palermo, wykazał, że w biopsjach mięśni następuje wczesna stymulacja transkrypcji genu kodującego MMP-9 przy ostrym wysiłku, podczas gdy transkrypcja MMP-2 i TIMPs wynika z regularnego powtarzania ćwiczeń w czasie. Większość badań dotyczących wpływu treningu na MMPs wskazuje tendencję do obniżania aktywności metaloproteinaz we krwi, szczególnie MMP-9. Aktywność fizyczna redukuje stan zapalny w organizmie a efekt ten jest szczególnie widoczny gdy trening składa się z aktywności aerobowych [Lo Presti i wsp. 2017]. U myszy z niedoborem ApoE pływanie zmniejsza rozwój blaszek miażdżycowych, w wyniku współdziałania kilku mechanizmów, w tym obniżenie poziomu MMP-9 i MMP-14 [Zhang i wsp. 2021].

Witaminy dostarczane z pożywieniem, a także w postaci suplementów diety mogą bezpośrednio wpływać na równowagę pomiędzy metaloproteinazami i ich inhibitorami. Wydaje się to szczególnie istotne w kontekście zrównoważonej diety jako ważnego czynnika w profilaktyce wybranych jednostek chorobowych.

Dieta bogata w cholesterol zmniejsza zawartość kolagenu w naczyniach tętniczych poprzez zwiększenie aktywności MMP-1. Proces ten zostaje zahamowany w obecności witaminy C i E zapewniając stabilizację blaszki miażdżycowej [Orbe i wsp. 2003].

Zwiększoną ekspresję MMP-2 i MMP-9 obserwuje się w uszkodzeniu mięśnia sercowego spowodowanego stresem, w wyniku apoptozy kardiomiocytów. Zmianom tym zapobiega witamina C, zmniejszając poziom obu metaloproteinaz [Kim i wsp. 2013].

U pacjentów w początkowej fazie sepsy dochodzi do wzrostu poziomu MMP-9 w surowicy, po którym następuje bardziej znaczący wzrost TIMP-1. Dodatnia korelacja między poziomami MMP-9 i TIMP-1 wiąże się z większym ryzykiem zgonu. Witamina C podawana dożylnie w terapii adiuwantowej w dawce 50 mg/kg mc. (60 minut co 12 godzin) przez trzy dni obniża stężenie MMP-9, ale nie wykazuje istotnego wpływu na śmiertelność przy wystąpieniu niewydolności wielonarządowej [Lubis i wsp. 2022].

Liczne badania donoszą, że witamina D jest istotnym czynnikiem modulującym poziom MMPs i TIMPs. Na niedobory witaminy D narażeni są głównie starsi, otyli pacjenci. W tej grupie obserwuje się bardzo często stężenia <20 ng/ml. Warto zauważyć, że praktycznie

te same czynniki prozapalne regulowane przez MMPs/TIMPs są podwyższone u osób otyłych.

U chorych z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc w porównaniu z osobami niepalącymi i zdrowymi palaczami, poziom MMP-9 jest wyższy, podobnie jak TIMP-1, i wykazuje odwrotną zależność do stężenia witaminy D w surowicy [Arbaningsih i wsp. 2019].

Badania przeprowadzone w grupie pacjentów z WZW typu C wskazują, że suplementacja witaminy D w przypadku jej niedoboru może odwracać procesy związane ze zwłóknieniem wątroby. Lokalna kontrola postępującego lub odwracalnego bliznowacenia zależy od równowagi TIMPs i aktywności enzymów przeciwzwłóknieniowych – MMPs. W okresie sześciu tygodni od rozpoczęcia suplementacji, poziom TIMP-1 obniża się, natomiast MMP-2 i MMP-9 wzrasta. MMP-9 ułatwia degradację zwłóknienia i przebudowę tkanek [Kamolmit i wsp. 2017].

W surowicy pacjentów z chorobą wieńcową obserwuje się niższe stężenie witaminy D oraz podwyższony poziom MMP-9. Stężenie metaloproteinazy w tej grupie wykazuje dodatnie korelacje z LDL-C. Niedobór witaminy D może przyczynić się do zaburzenia równowagi pomiędzy MMP-9/TIMP-1 prowadząc do tworzenia się i pęknięcia blaszek miażdżycowych [Akbari i wsp. 2023].

5. Cele pracy

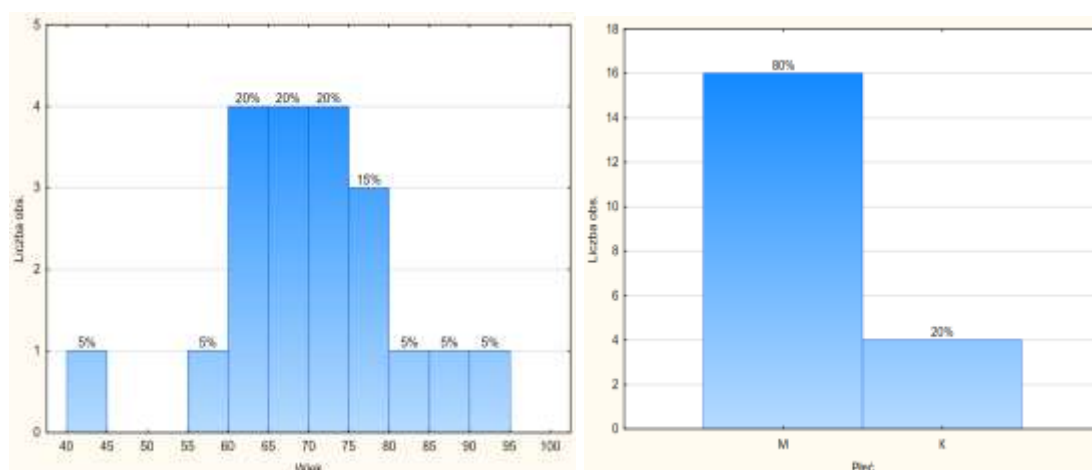
1. Ocena stężenia w surowicy krwi i w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego potencjalnych biomarkerów profilowania diagnostycznego: MMP-1, MMP-9, MMP-14, MMP-15 i ich inhibitorów (TIMPs 1-4) oraz α 2-makroglobuliny.
2. Analiza korelacji badanych parametrów oraz wskazanie preferowanego materiału do badań diagnostycznych.
3. Uzyskanie wieloczynnikowego modelu biomarkerów, stanowiącego uzupełnienie standardowego panelu diagnostycznego u chorych ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego.

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) i TIMPs nie są rutynowo oznaczane u chorych ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego ze względu na wysokie koszty badania i brak danych potwierdzających zasadność ich oznaczania. Pilotażowy charakter badań może przyczynić się w przyszłości do zmian rekomendacji EUA, poszerzając tym samym rekomendowany panel diagnostyki biochemicznej.

6. Materiał i metoda

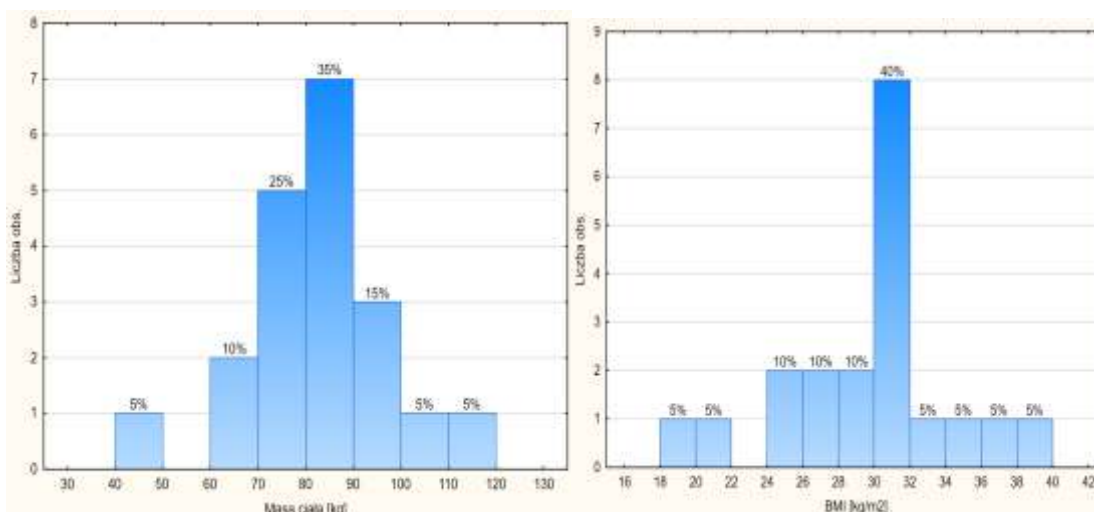
Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy UMK, Collegium Medicum w Bydgoszczy, dnia 19.01.2021 roku (nr KB 9/2021). Kwalifikację do badania oraz pobieranie i zabezpieczenie materiału (surowicy i moczu) przeprowadzono w Szpitalu Specjalistycznym im. J.K. Łukowicza w Chojnicach; Oddział Urologii i Onkologii Urologicznej w Chojnicach w latach 2021-2022. Osoby kwalifikowane były informowane o przebiegu badania oraz miały możliwość zadawania pytań, po zapoznaniu się z pisemną informacją o planowanym badaniu. Dokonano też wszelkich formalności dotyczących ochrony danych osobowych, zgodnie z obowiązującymi przepisami RODO.

Do badań zakwalifikowano pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego $n=20$ (pTa/pT1 HG/LG), u których dokonano dwukrotnego pobrania materiału do analizy – krwi w objętości około 10 ml i moczu maksymalnie 100 ml (łącznie 80 próbek), przed i w okresie trzech miesięcy po elektroresekcji guza (badanie nr I i II). Zestawienie danych dotyczących wieku i płci pacjentów uczestniczących w badaniu przedstawiono na rycinie nr 6. Dane antropometryczne ilustruje rycina nr 7.



Ryc. 6. Analiza wieku i płci pacjentów uczestniczących w badaniu.

Średnia wieku uczestników badania wynosiła 70,7 lat (45 – 91; SD=9,97). Wśród pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego 80% stanowili mężczyźni.



Ryc. 7. Analiza masy ciała oraz BMI [kg/m²] pacjentów uczestniczących w badaniu.

Masa ciała pacjentów uczestniczących w badaniu wynosiła 83,35 kg (SD=15,95). Największy odsetek, bo aż 60%, stanowili pacjenci o masie ciała od 70–90 kg. Dla większości badanych wartość BMI mieściły się w przedziale 30-32 [kg/m²], wartość średnia wynosiła 29,6 [kg/m²]; (18,42-38,1).

Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy bez zdiagnozowanej choroby nowotworowej (n=10). Obie grupy nie różniły się istotnie statystycznie pod względem wieku, masy ciała i BMI. Krew pobrano w pozycji siedzącej, za pomocą zestawu próżniowego, przez wykwalifikowany personel medyczny. Mocz dostarczany był przez pacjentów w standardowych sterylnych pojemnikach o objętości 100 ml. Badania laboratoryjne przeprowadzono w Katedrze Farmakologii i Terapii Collegium Medicum UMK. W obu grupach oznaczono metodą ELISA stężenia: MMP-1, MMP-9, MMP14 i MMP-15 oraz inhibitorów, tj. TIMPs (1-4), a także stężenie $\alpha 2$ makroglobuliny. Żaden z uczestników badania nie zgłosił reakcji niepożądanych związanych z wykonanymi procedurami.

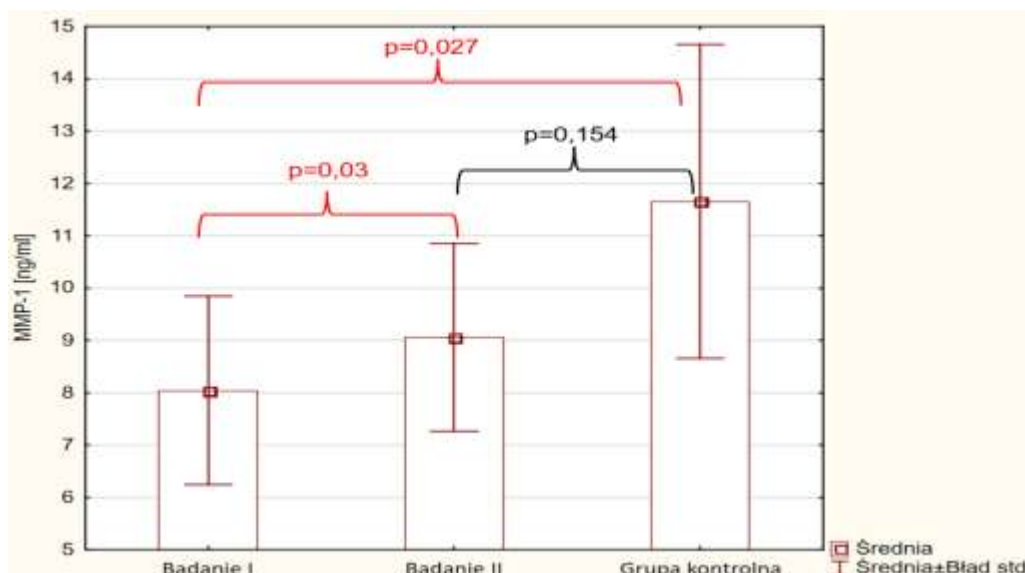
6.1 Analiza statystyczna

Analizę danych przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.3. Wyniki zostały zaprezentowane jako wartość średnia z błędem standardowym i medianą. Zgodność dystrybucji z rozkładem normalnym wyników badania krwi i moczu przed i po resekcji guza oszacowano za pomocą test Shapiro-Wilka. Znamienność statystyczną oceniono przy pomocy testu nieparametrycznego - kolejności par Wilcoxa. Poziom istotności ustalono na poziomie

$p < 0,05$. Ze względu na rozkład danych zastosowano test korelacji rang Spearmana oraz test Pearsona, dla korelacji o charakterze liniowym.

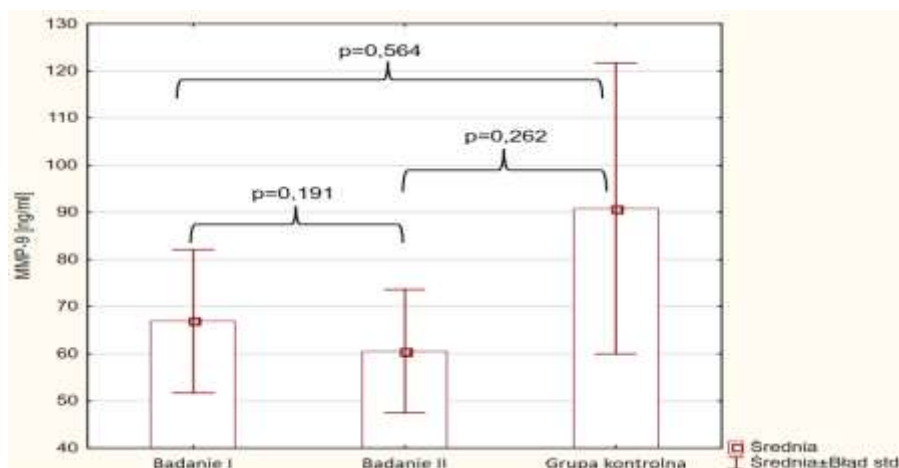
7. Wyniki badań

7.1. Analiza stężeń metaloproteinaz macierzy MMPs i ich inhibitorów TIMPs w surowicy pacjentów ze zdiagnozowanym powierzchownym nowotworem rakiem urotelialnym przed i po elektroresekcji guza.



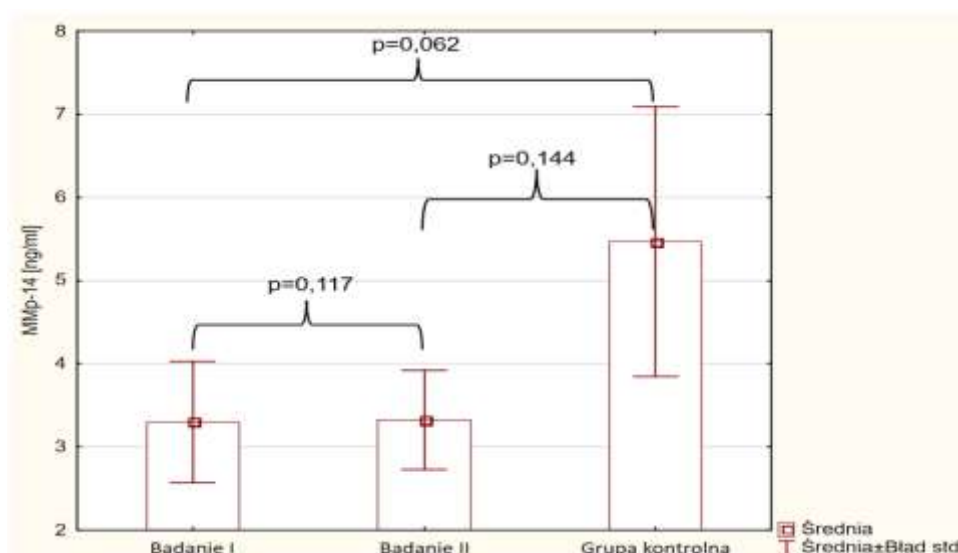
Ryc. 8. Stężenie MMP-1 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

U pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego, stężenie MMP-1 w surowicy wynosiło 8,03 ng/ml i istotnie wzrosło po trzech miesiącach po elektroresekcji guza – 9,05 ng/ml ($p=0,03$). Stężenie MMP-1 w surowicy osób z grupy kontrolnej było istotnie wyższe i miało wartość 11,65 ng/ml. Pomędzy stężeniami MMP-1 w surowicy chorych po resekcji guza a zdrowymi pacjentami nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie. W badaniu wykazano, że stężenie MMP-1 w surowicy osób zdrowych było istotnie wyższe w porównaniu ze stężeniami uzyskanymi w grupie pacjentów przed elektroresekcją guza (8,03 ng/ml vs. 11,65 ng/dl; $p=0,027$).



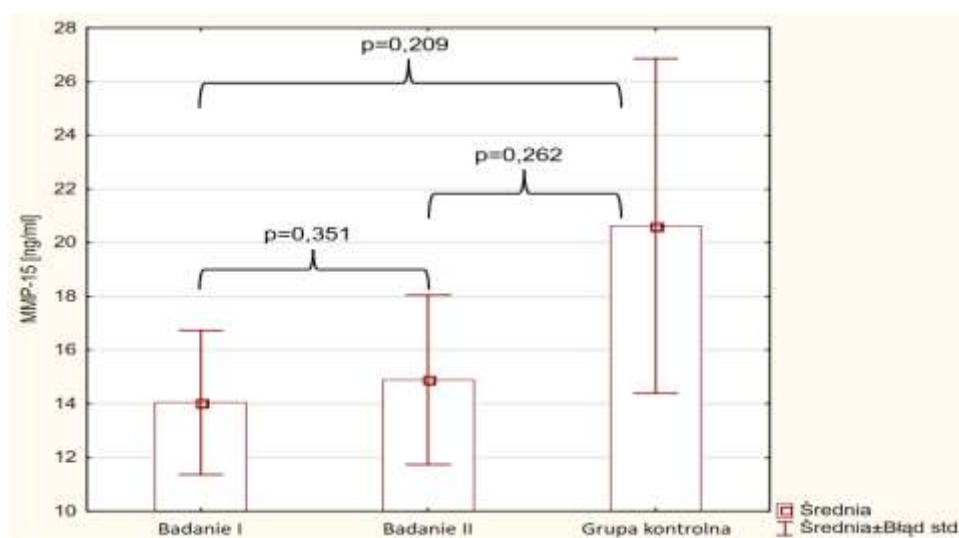
Ryc. 9. Stężenie MMP-9 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

U pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego średnie stężenie MMP-9 w surowicy wynosiło 66,89 ng/ml (badanie nr I). Po elektroresekcji guza nie zaobserwowano istotnych zmian w stężeniach metaloproteinazy – 60,53 ng/ml ($p=0,191$). Nie wykazano także istotnych różnic MMP-9 w surowicy pomiędzy badaniem po trzech miesiącach od resekcji guza a zdrowymi ochotnikami. W oznaczonym materiale, pomimo istotnych różnic średnich wartości pomiarów, zaobserwowano wysokie wartości błędu standardowego (60,53 ng/dl vs. 90,83 ng/ml; $p=0,262$).



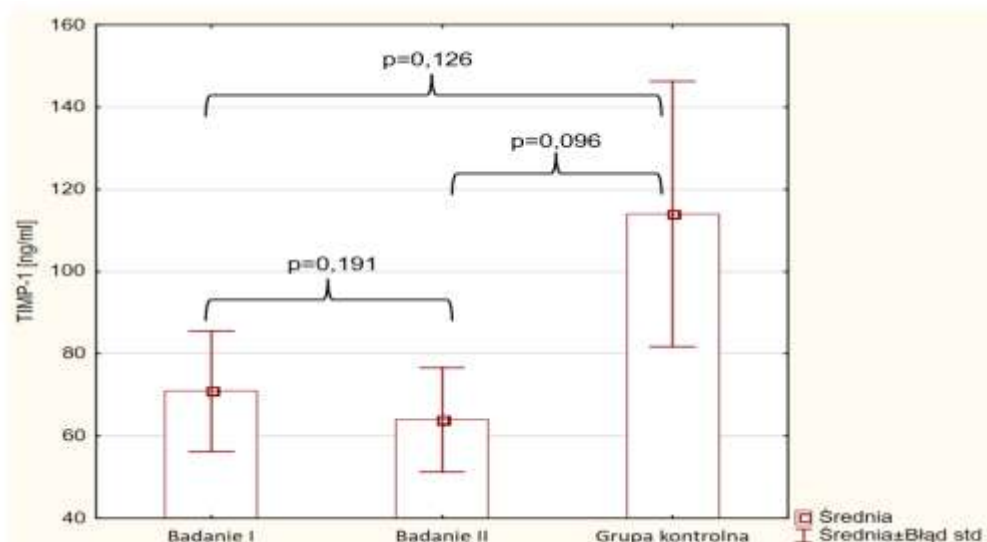
Ryc. 10. Stężenie MMP-14 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Przeprowadzone badania potwierdziły, że u pacjentów ze zdiagnozowanym powierzchownym nowotworem pęcherza moczowego stężenie MMP-14 w surowicy było niskie i wynosiło 3,30 ng/ml. Po elektroresekcji guza nie zaobserwowano istotnych zmian MMP-14 ($p=0,117$). Nie wykazano także różnic w stężeniach biomarkera po trzech miesiącach od resekcji guza a stężeniami MMP-14 u zdrowych ochotników (3,32 ng/ml vs. 5,47 ng/ml; $p=0,144$). Odnotowano natomiast niższe stężenia MMP-14 w surowicy chorych przed i po elektroresekcji guza w porównaniu z grupą kontrolną. Jednak przy tak dużych rozrzutach, wartości te nie wykazują klinicznie istotnych różnic.



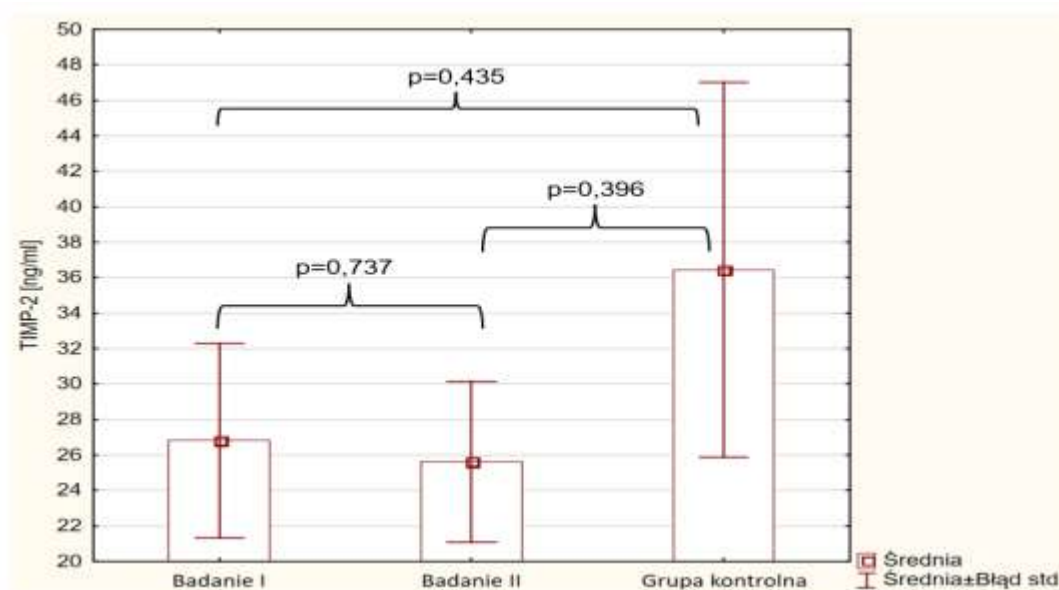
Ryc. 11. Stężenie MMP-15 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Analiza stężeń MMP-15 w surowicy krwi osób z grupy kontrolnej i pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem urotelialnym pęcherza moczowego nie wykazała istotnych różnic pomiędzy stężeniami metaloproteiny. Wartości te wynosiły odpowiednio 14,05 ng/ml i 14,89 ng/ml ($p=0,351$) w grupie pacjentów onkologicznych. Nie zaobserwowano żadnych różnic pomiędzy stężeniem metaloproteiny pomiędzy zdrowymi ochotnikami a pacjentami przed i po elektroresekcji guza (kontrola vs. badanie I – $p=0,209$; kontrola vs. badanie II – $p=0,262$).



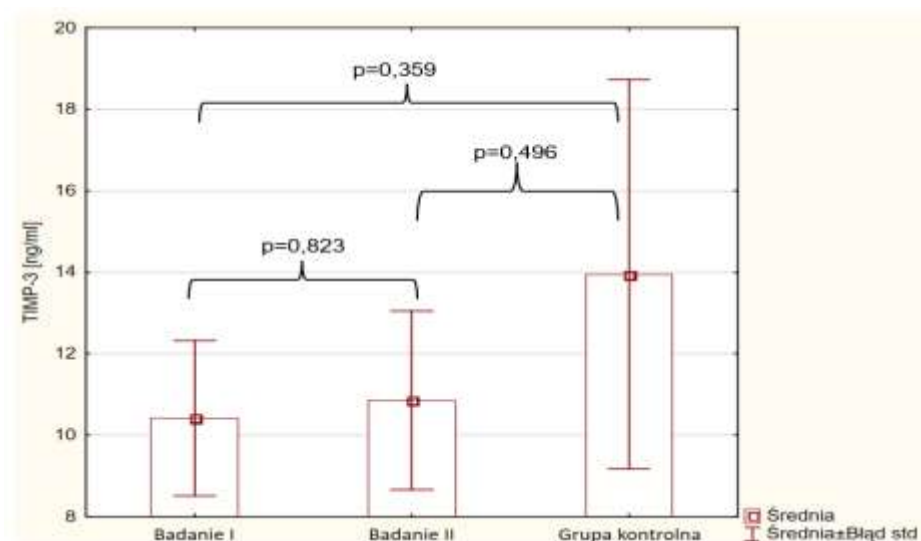
Ryc. 12. Stężenie TIMP-1 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

U pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego średnie stężenie TIMP-1 w surowicy wynosiło 70,89 ng/ml (badanie nr I). Po elektroresekcji guza nie zaobserwowano różnic w stężeniu inhibitora – 64,0 ng/ml ($p=0,191$). Nie wykazano także istotnych zmian stężeń TIMP-1 w surowicy po trzech miesiącach od resekcji guza a zdrowymi ochotnikami (64,0 ng/ml vs. 114,08 ng/ml; $p=0,096$), jak i pomiędzy pacjentami przed interwencją chirurgiczną a grupą kontrolną (70,89 ng/ml vs. 114,09 ng/ml; $p=0,126$).



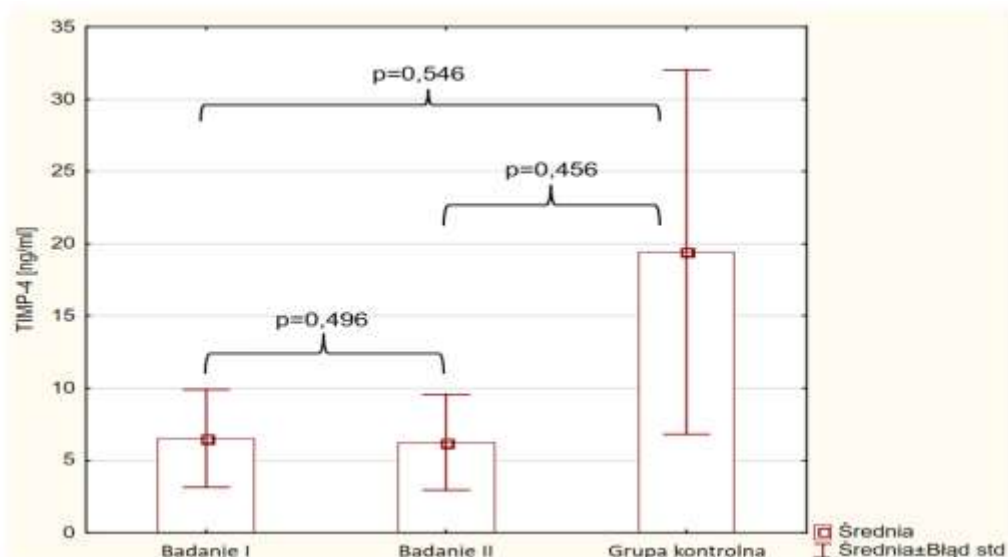
Ryc. 13. Stężenie TIMP-2 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Przeprowadzone badania wykazały, że u pacjentów ze zdiagnozowanym powierzchownym nowotworem pęcherza moczowego stężenie TIMP-2 w surowicy wynosiło 26,82 ng/ml. Po elektroresekcji guza nie zaobserwowano istotnych zmian ($p=0,737$). Ponadto nie zaobserwowano różnic w stężeniu TIMP-2 po trzech miesiącach od elektroresekcji guza a wartościami w grupie kontrolnej (25,62 ng/ml vs. 36,45 ng/dl; $p=0,396$). Wykazano natomiast niższe stężenia TIMP-2 w surowicy chorych przed i po resekcji guza w porównaniu z grupą kontrolną. Aczkolwiek przy tak dużych rozrzutach, wartości te nie wykazują klinicznie istotnych różnic (kontrola vs. badanie I – $p=0,435$).



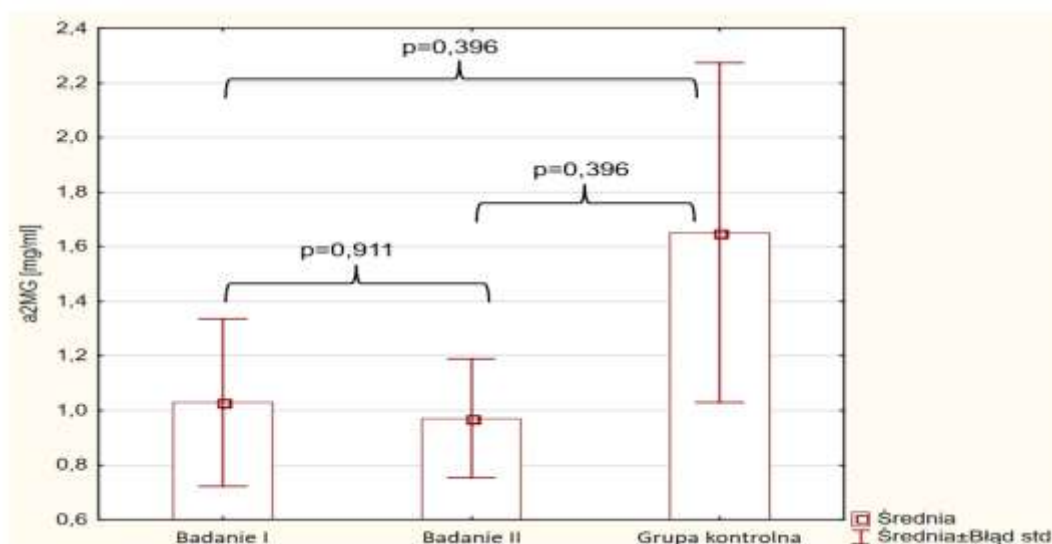
Ryc. 14. Stężenie TIMP-3 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Stężenia TIMP-3 w surowicy krwi osób z grupy kontrolnej i pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem urotelialnym pęcherza moczowego wynosiły odpowiednio 13,95 ng/ml i 10,42 ng/ml. Nie zaobserwowano znamienych różnic pomiędzy zdrowymi uczestnikami badania a pacjentami przed i po elektroresekcji guza (kontrola vs. badanie I – $p=0,359$; kontrola vs. badanie II – $p=0,496$). Stężenia TIMP-3 u pacjentów onkologicznych przed i po interwencji chirurgicznej nie wykazywały znamienych różnic (10,42 ng/ml vs. 10,95 ng/ml; $p=0,823$).



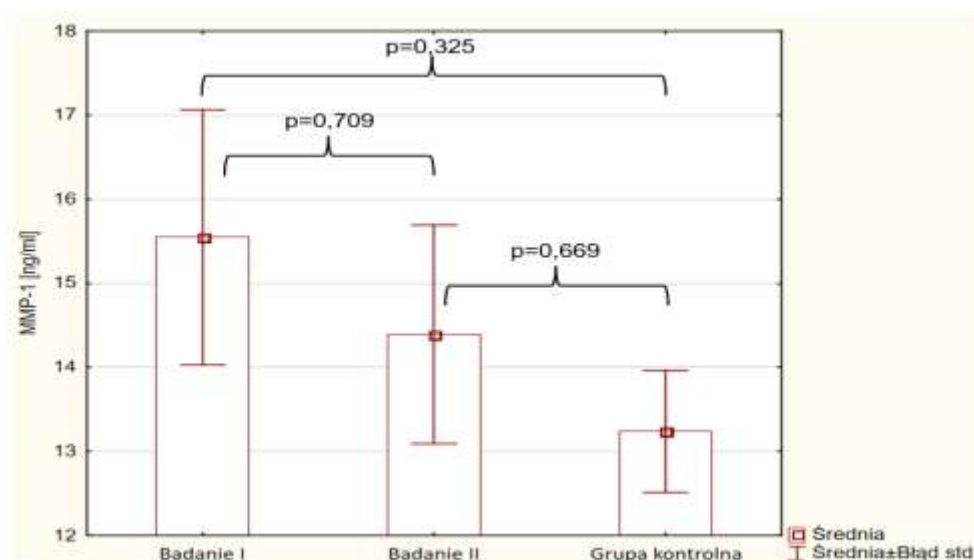
Ryc. 15. Stężenie TIMP-4 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

U pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego, stężenie TIMP-4 w surowicy wynosiło 6,5 ng/ml i nie zmieniło się istotnie po trzech miesiącach po elektroresekcji guza – 6,24 ng/ml ($p=0,496$). Stężenie TIMP-4 w grupie kontrolnej było wyższe i miało wartość 19,41 ng/ml. Jednak zaobserwowano tu duży rozrzut wyników. Pomiedzy stężeniami TIMP-4 w surowicy chorych po resekcji guza a zdrowymi pacjentami, również nie zaobserwowano znamienych różnic (6,24 ng/ml vs. 19,41 ng/ml $p=0,456$).



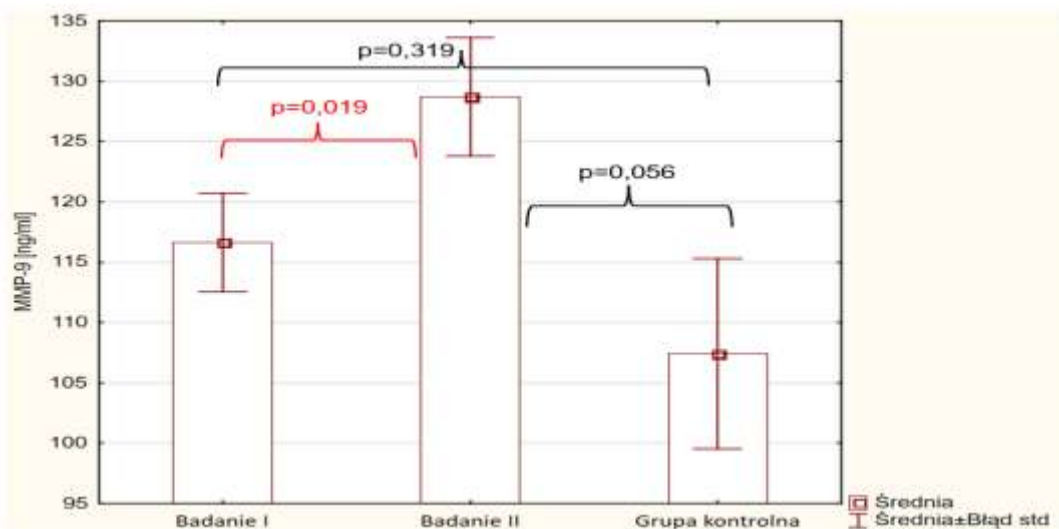
Ryc. 16. Stężenie α2 makroglobuliny [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Stężenie $\alpha 2$ makroglobuliny w surowicy pacjentów przed resekcją guza wynosiło 1,03 ng/ml. Po elektroresekcji wartości stężeń były zbliżone ($p=0,911$). Nie wykazano też znamienych różnic w stężeniach $\alpha 2$ makroglobuliny po trzech miesiącach od elektroresekcji guza a wartościami obserwowanymi w grupie zdrowych ochotników (0,97 ng/ml vs. 1,65 ng/ml; $p=0,396$).



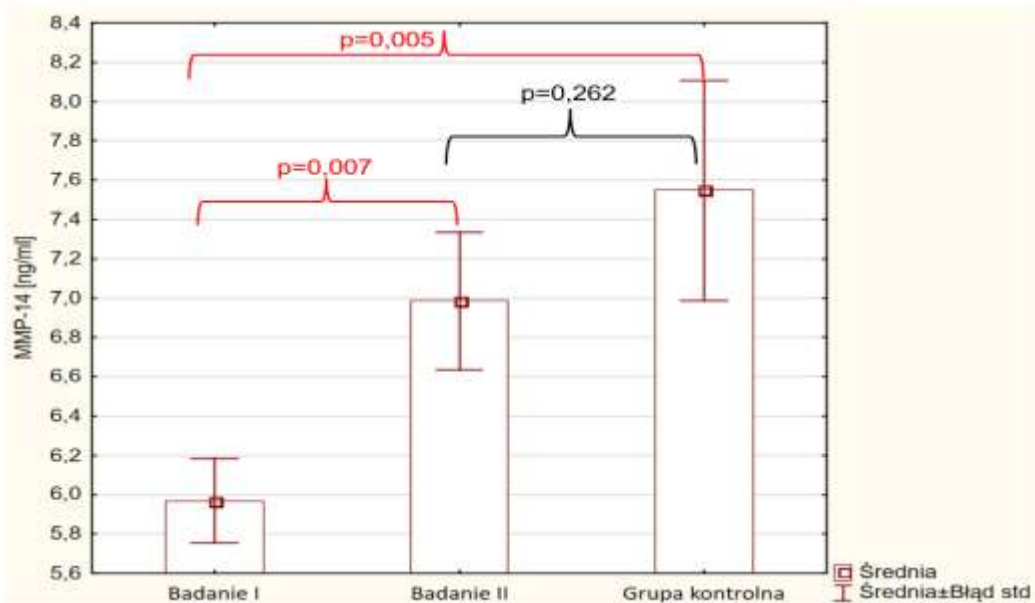
Ryc. 17. Stężenie MMP-1 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Przeprowadzone badania wykazały, że u pacjentów z powierzchownym nowotworem pęcherza moczowego stężenie MMP-1 w moczu wynosiło 15,55 ng/ml. Po elektroresekcji guza nie zaobserwowano istotnych zmian ($p=0,709$). Nie wykazano też różnic w stężeniach MMP-1 po trzech miesiącach od elektroresekcji guza a wartościami w grupie kontrolnej (14,39 ng/ml vs. 13,24 ng/ml; $p=0,669$).



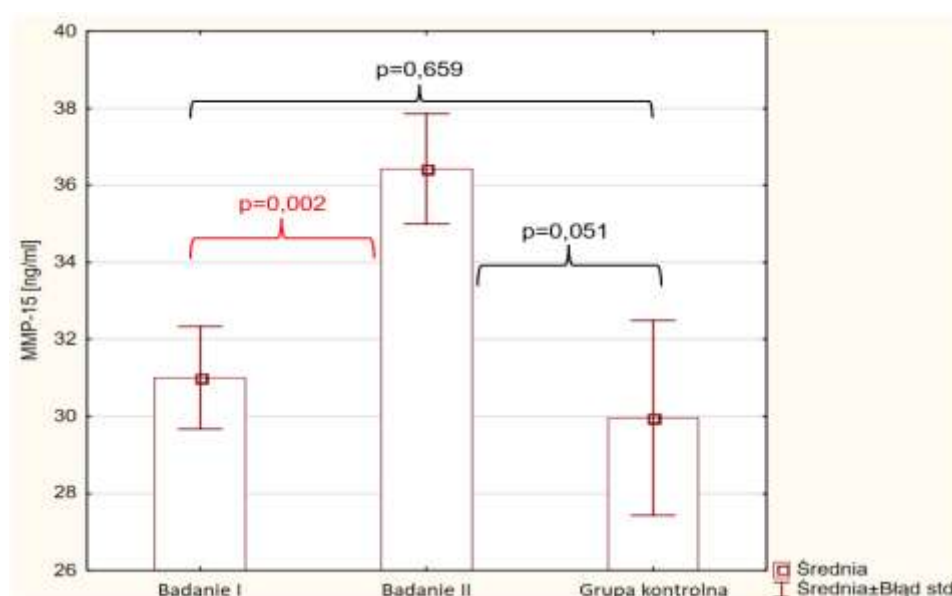
Ryc. 18. Stężenie MMP-9 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

U pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego średnie stężenie MMP-9 w moczu wynosiło 116,64 ng/ml. Po elektroresekcji guza zaobserwowano istotny wzrost stężenia metaloproteinazy do wartości 128,71 ($p=0,019$). Nie wykazano istotnych różnic w stężeniach MMP-9 pomiędzy pacjentami po trzech miesiącach od resekcji guza a zdrowymi ochotnikami (128,71 ng/ml vs. 107,73 ng/ml). Należy podkreślić, że pomimo dużych rozrzutów stężeń MMP-9 w grupie zdrowych ochotników ($SD=7,89$) zmiany te cechowały się pewnym trendem w kierunku znamienności statystycznej ($p=0,056$).



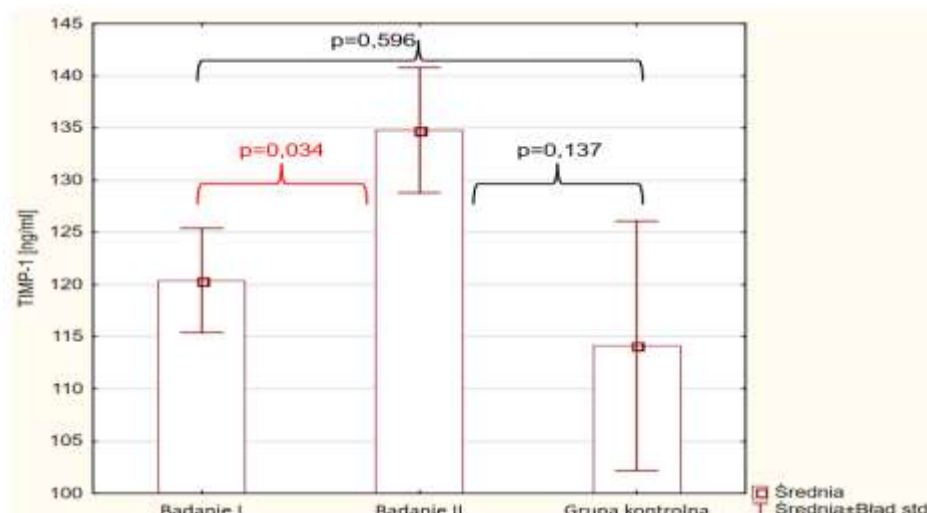
Ryc. 19. Stężenie MMP-14 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Przeprowadzone badania wykazały, że u pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego średnie stężenie MMP-14 w moczu było stosunkowo niskie i wynosiło 5,97 ng/ml. Po elektroresekcji guza zaobserwowano istotny wzrost stężenia MMP-14 ($p=0,007$). Nie wykazano jednak istotnych różnic w stężeniach MMP-14 pomiędzy pacjentami po trzech miesiącach od resekcji guza a zdrowymi ochotnikami, którzy wzięli udział w badaniu (6,98 ng/dl vs. 7,55 ng/dl; $p=0,262$). Zaobserwowano niższe stężenia MMP-14 w moczu pacjentów przed i po elektroresekcji guza w porównaniu z grupą kontrolną. Szczególnie istotne są różnice w stężeniach średnich wartości MMP-14 uzyskane w grupie zdrowych pacjentów a pacjentami przed operacją (5,967 ng/ml vs. 7,55 ng/ml; $p=0,005$).



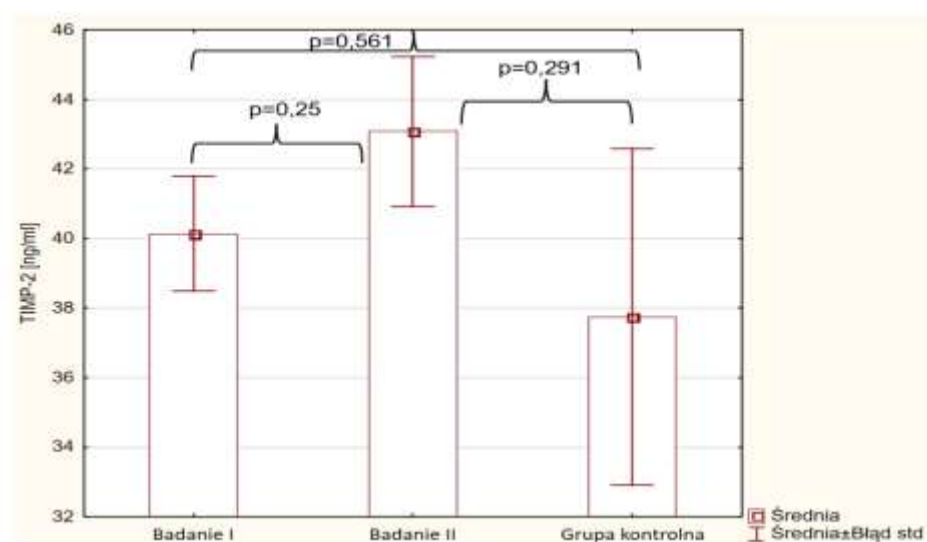
Ryc. 20. Stężenie MMP-15 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ocena stężeń MMP-15 w moczu osób z grupy kontrolnej i chorych ze zdiagnozowanym nowotworem urotelialnym pęcherza moczowego, wskazuje na istotne różnice pomiędzy stężeniami MMP-15 u chorych przed i po resekcji guza. Wartości te wynosiły odpowiednio 31,01 ng/dl i 36,42 ng/ml ($p=0,002$). Nie zaobserwowano znamiennych różnic stężeń metaloproteiny pomiędzy zdrowymi ochotnikami a pacjentami przed elektroresekcją guza ($p=0,659$). Pewien trend w kierunku znamienności statystycznej wystąpił pomiędzy wartościami stężeń MMP-15 u chorych po resekcji guza (badanie II) a stężeniami w grupie zdrowych ochotników (36,42 ng/ml vs. 29,96 ng/ml; $p=0,051$).



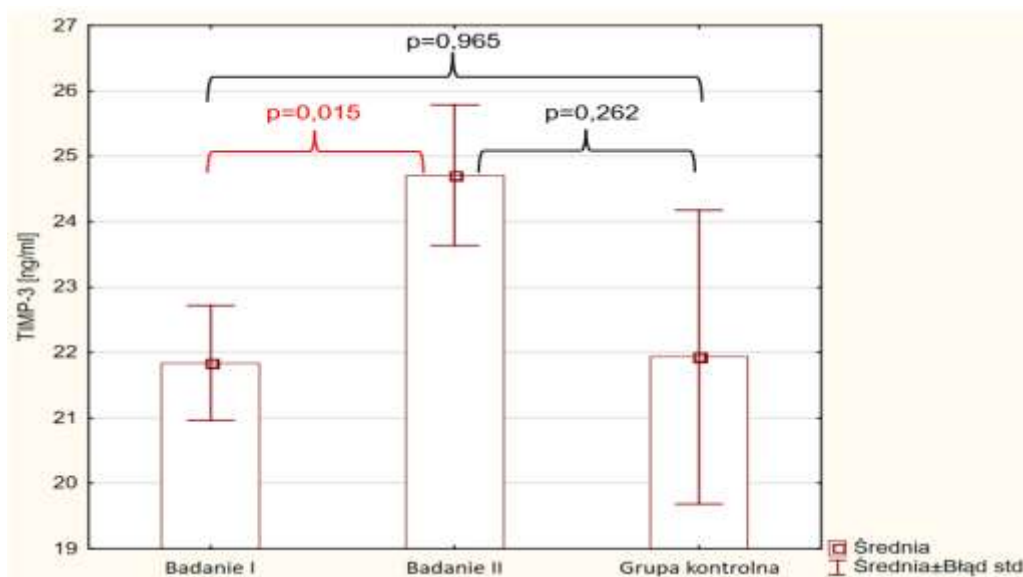
Ryc. 21. Stężenie TIMP-1 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

W analizowanym materiale zaobserwowano istotne różnice w stężeniach TIMP-1 u chorych przed i po elektroresekcji guza pęcherza moczowego. Wartości te wynosiły odpowiednio 120,37 ng/ml i 134,78 ng/ml trzy miesiące po ingerencji chirurgicznej ($p=0,034$). W porównaniu z grupą kontrolną (badanie II) stężenie TIMP-1 w moczu było niższe – 114,14 ng/ml ale cechowało się dużym rozrzutem wyników ($p=0,137$). Zbliżone wartości stężeń TIMP-1 uzyskano u chorych przed interwencją chirurgiczną i w grupie zdrowych osób (120,37 ng/ml vs. 114,14 ng/dl; $p=0,596$).



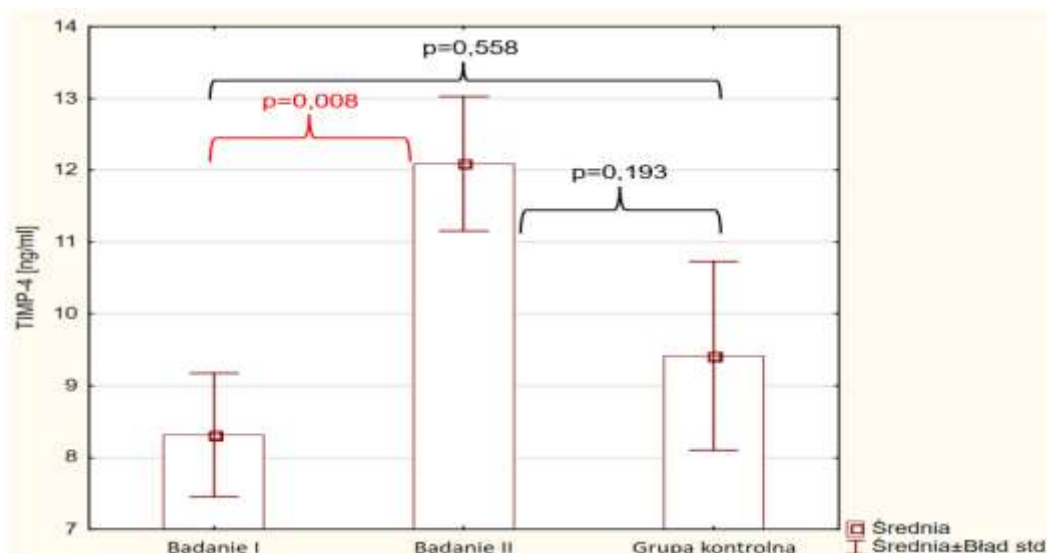
Ryc. 22. Stężenie TIMP-2 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Analiza stężeń TIMP-2 w moczu osób z grupy kontrolnej i pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem urotelialnym pęcherza moczowego nie wykazała istotnych różnic. Wartości te wynosiły odpowiednio 40,14 ng/ml i 37,75 ng/dl ($p=0,561$). Nie zaobserwowano też istotnych różnic pomiędzy stężeniami TIMP-2 w moczu pomiędzy zdrowymi ochotnikami a pacjentami po elektroresekcji guza (badanie II vs. kontrola - $p=0,291$).



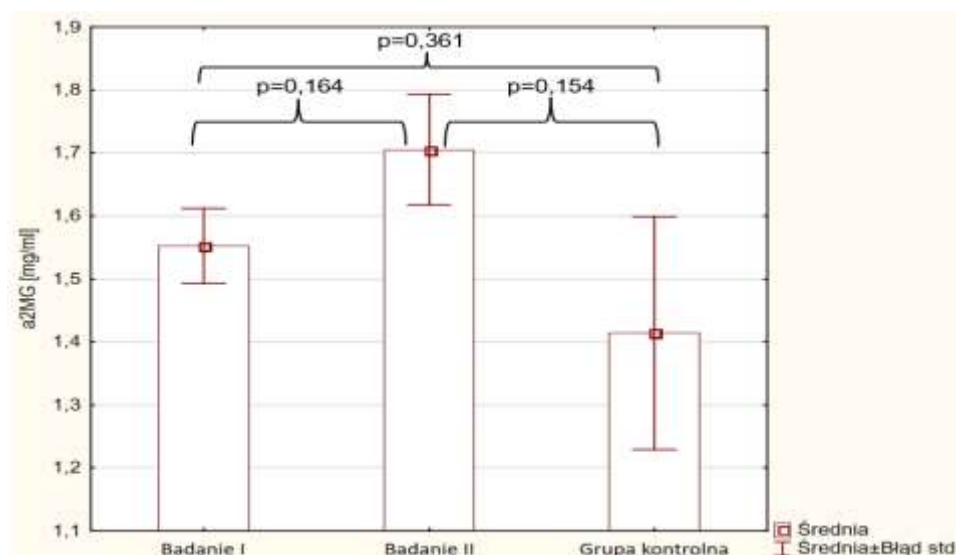
Ryc. 23. Stężenie TIMP-3 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Odnotowano wyższe stężenia TIMP-3 u pacjentów po elektroresekcji guza 24,71ng/ml vs. 21,84 ng/ml; $p=0,015$). Wartości stężeń TIMP-3 w pozostałych grupach nie różniły się znacząco ($p=ns$).



Ryc. 24. Stężenie TIMP-4 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

W analizowanych próbkach moczu zaobserwowano istotne różnice w stężeniach TIMP-4 u chorych przed i po elektroresekcji guza pęcherza moczowego. Wartości te wynosiły odpowiednio 8,31 ng/ml i 12,09 ng/ml; ($p=0,008$). W porównaniu z grupą kontrolną (badanie II) stężenie TIMP-4 w moczu było niższe – 9,41 ng/dl ($p=0,193$). Średnie wartości stężeń TIMP-4 u chorych przed interwencją chirurgiczną oraz w grupie osób zdrowych były zbliżone (8,31 ng/ml vs. 9,41 ng/ml; $p=0,558$).



Ryc. 25. Stężenie α2 makroglobuliny [mg/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

U pacjentów z powierzchownym nowotworem pęcherza moczowego stężenie α 2-makroglobuliny w moczu wynosiło 1,55 ng/ml. Po elektroresekcji guza nie zaobserwowano istotnych zmian ($p=0,164$). Nie wykazano też znamiennych różnic w stężeniach α 2-makroglobuliny po trzech miesiącach od elektroresekcji guza a wartościami obserwowanymi w grupie zdrowych ochotników (1,71 ng/ml vs. 1,41 ng/ml; $p=0,154$).

7.2. Ocena korelacji pomiędzy stężeniami MMPs, TIMPs oraz α 2 makroglobuliną w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego przed i po interwencji chirurgicznej.

	MMP-1 [ng/ml]	MMP-9 [ng/ml]	MMP-14 [ng/ml]	MMP-15 [ng/ml]	TIMP-1 [ng/ml]	TIMP-2 [ng/ml]	TIMP-3 [ng/ml]	TIMP-4 [ng/ml]	a2MG [mg/ml]
MMP-1 [ng/ml]		0,551880	0,790977	0,720301	0,487218	0,709774	0,610526	0,430402	0,615038
MMP-9 [ng/ml]	0,551880		0,723308	0,627068	0,729323	0,732331	0,627068	0,748868	0,634586
MMP-14 [ng/ml]	0,790977	0,723308		0,804511	0,796992	0,825564	0,645113	0,722066	0,846617
MMP-15 [ng/ml]	0,720301	0,627068	0,804511		0,688722	0,748872	0,727820	0,665310	0,685714
TIMP-1 [ng/ml]	0,487218	0,729323	0,796992	0,688722		0,778947	0,529323	0,677922	0,781955
TIMP-2 [ng/ml]	0,709774	0,732331	0,825564	0,748872	0,778947		0,769925	0,693688	0,790977
TIMP-3 [ng/ml]	0,610526	0,627068	0,645113	0,727820	0,529323	0,769925		0,632202	0,658647
TIMP-4 [ng/ml]	0,430402	0,748868	0,722066	0,665310	0,677922	0,693688	0,632202		0,756751
a2MG [mg/ml]	0,615038	0,634586	0,846617	0,685714	0,781955	0,790977	0,658647	0,756751	

*korelacja rang Spearmana

Ryc. 26. Ocena korelacji pomiędzy stężeniami MMPs, TIMPs oraz α 2 makroglobuliny w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego przed operacją (badanie nr I).

	MMP-1 [ng/ml]	MMP-9 [ng/ml]	MMP-14 [ng/ml]	MMP-15 [ng/ml]	TIMP-1 [ng/ml]	TIMP-2 [ng/ml]	TIMP-3 [ng/ml]	TIMP-4 [ng/ml]	a2MG [mg/ml]
MMP-1 [ng/ml]		0,190977	0,376833	0,172932	0,263158	0,257143	0,311278	0,529725	0,169237
MMP-9 [ng/ml]	0,190977		0,440015	0,329323	0,687218	0,141353	0,251128	0,379952	0,664160
MMP-14 [ng/ml]	0,376833	0,440015		0,612260	0,496427	0,225649	0,781497	0,616668	0,749812
MMP-15 [ng/ml]	0,172932	0,329323	0,612260		0,589474	0,305263	0,720301	0,532878	0,684468
TIMP-1 [ng/ml]	0,263158	0,687218	0,496427	0,589474		0,299248	0,503759	0,446167	0,543814
TIMP-2 [ng/ml]	0,257143	0,141353	0,225649	0,305263	0,299248		0,396992	0,402024	0,269274
TIMP-3 [ng/ml]	0,311278	0,251128	0,781497	0,720301	0,503759	0,396992		0,670040	0,636329
TIMP-4 [ng/ml]	0,529725	0,379952	0,616668	0,532878	0,446167	0,402024	0,670040		0,631651
a2MG [mg/ml]	0,169237	0,664160	0,749812	0,684468	0,543814	0,269274	0,636329	0,631651	

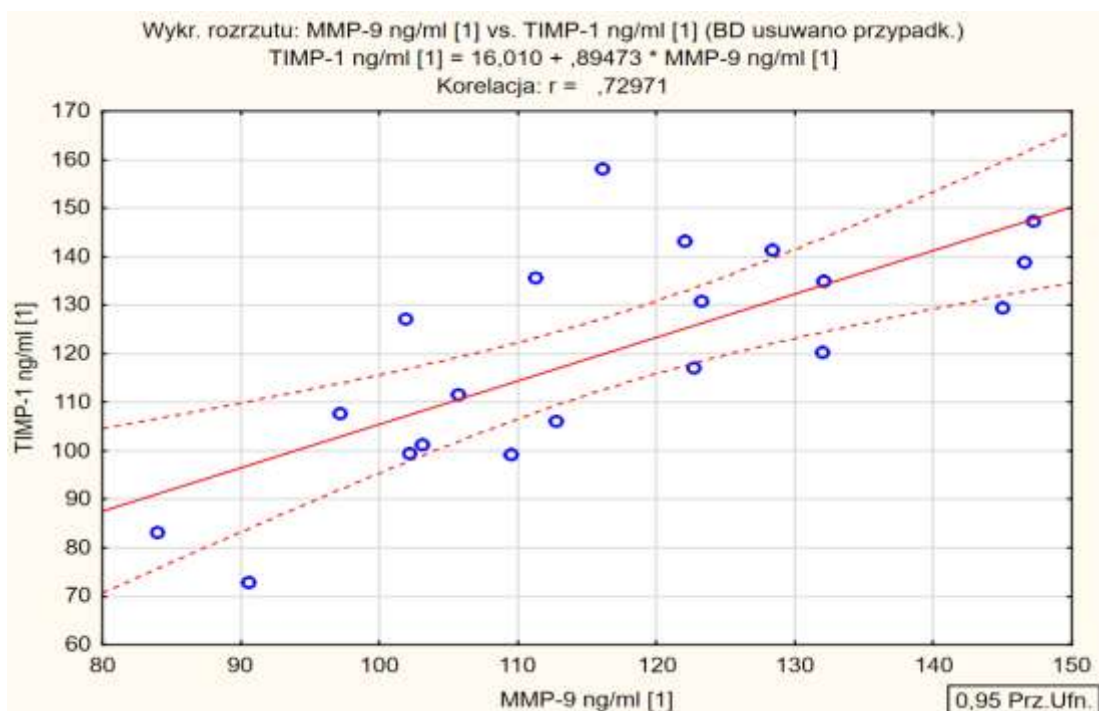
* korelacja rang Spearmana

Ryc. 27. Ocena korelacji pomiędzy stężeniami MMPs, TIMPs oraz α 2 makroglobuliny w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego po elektroresekcji guza (badanie nr II).

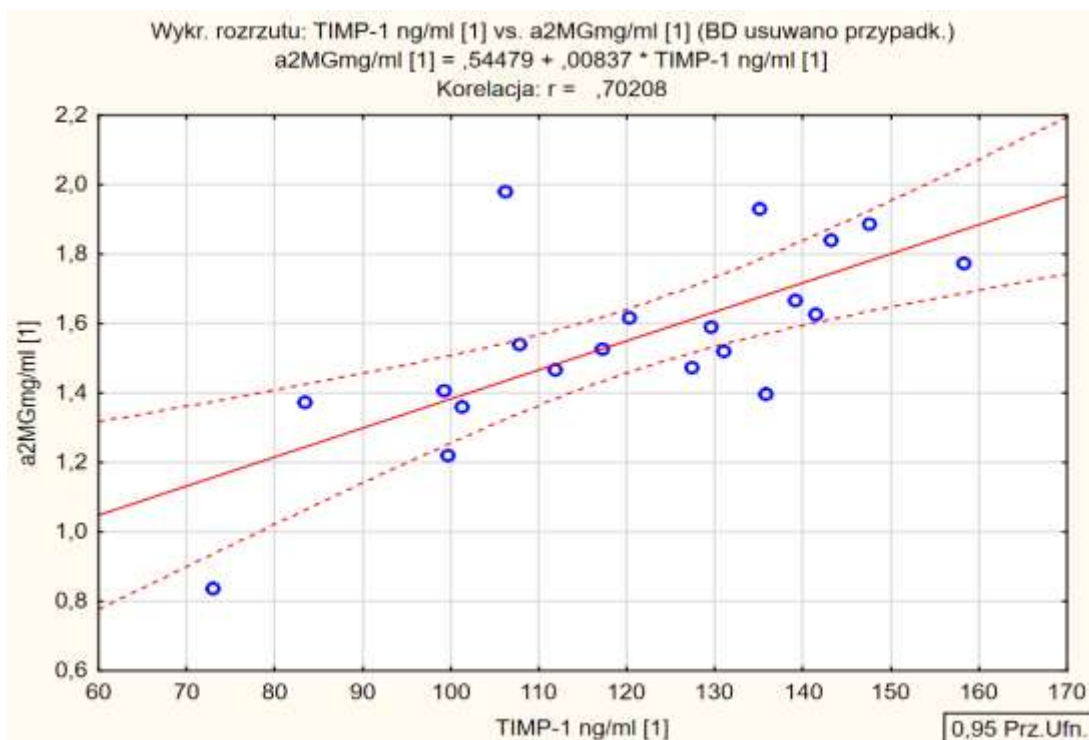
	MMP-9 [ng/ml]	MMP-14 [ng/ml]	TIMP-1 [ng/ml]	TIMP-2 [ng/ml]	TIMP-3 [ng/ml]	TIMP-4 [ng/ml]	a2MG [mg/ml]
MMP-9 [ng/ml]		,2574 p=,273	,7297 p=,000	,6182 p=,004	,1932 p=,414	-,0383 p=,873	,6282 p=,003
MMP-14 [ng/ml]	,2574 p=,273		,5575 p=,011	,6337 p=,003	,6456 p=,002	,4058 p=,076	,4389 p=,053
TIMP-1 [ng/ml]	,7297 p=,000	,5575 p=,011		,5436 p=,013	,4411 p=,052	,1662 p=,484	,7021 p=,001
TIMP-2 [ng/ml]	,6182 p=,004	,6337 p=,003	,5436 p=,013		,4417 p=,051	,4036 p=,078	,5909 p=,006
TIMP-3 [ng/ml]	,1932 p=,414	,6456 p=,002	,4411 p=,052	,4417 p=,051		,3527 p=,127	,5580 p=,011
TIMP-4 [ng/ml]	-,0383 p=,873	,4058 p=,076	,1662 p=,484	,4036 p=,078	,3527 p=,127		,1844 p=,436
a2MG [mg/ml]	,6282 p=,003	,4389 p=,053	,7021 p=,001	,5909 p=,006	,5580 p=,011	,1844 p=,436	

*Korelacja liniowa Pearsona

Ryc. 28. Analiza korelacji pomiędzy stężeniami MMPs, TIMPs oraz α2 makroglobuliny w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego przed elektroresekcją guza (badanie nr I).



Ryc. 29. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-1 a MMP-9 w moczu pacjentów przed elektroresekcją guza (badanie nr I).

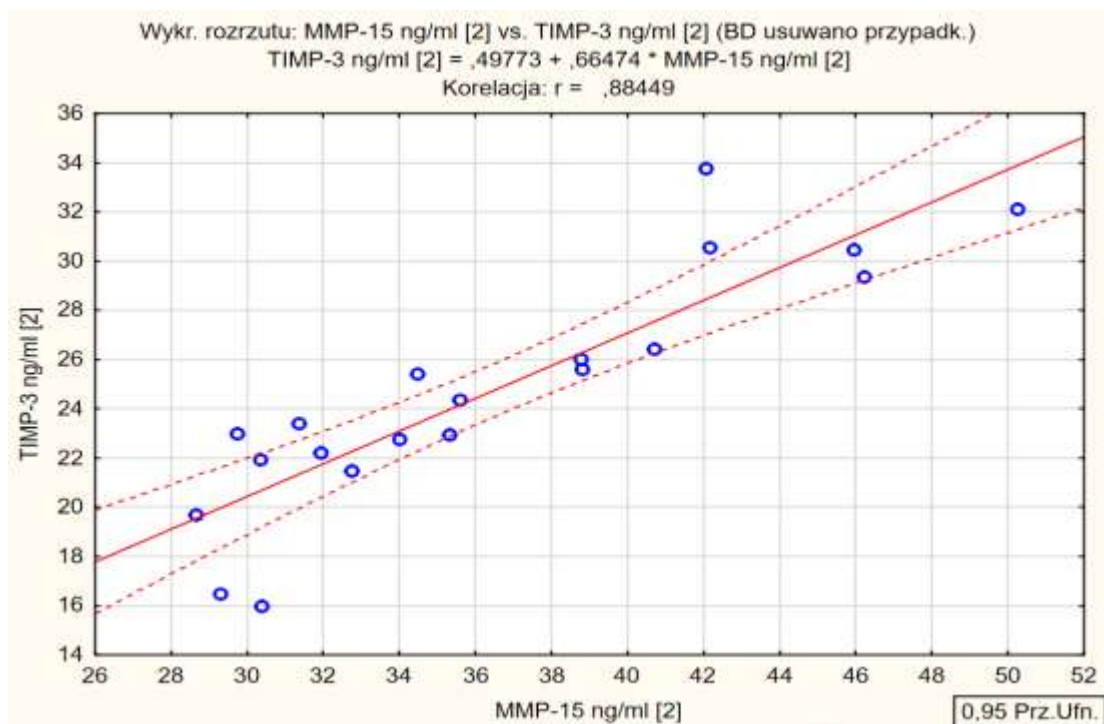


Ryc. 30. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-1 a $\alpha 2$ makroglobuliną w moczu pacjentów przed elektroresekcją guza (badanie nr 1).

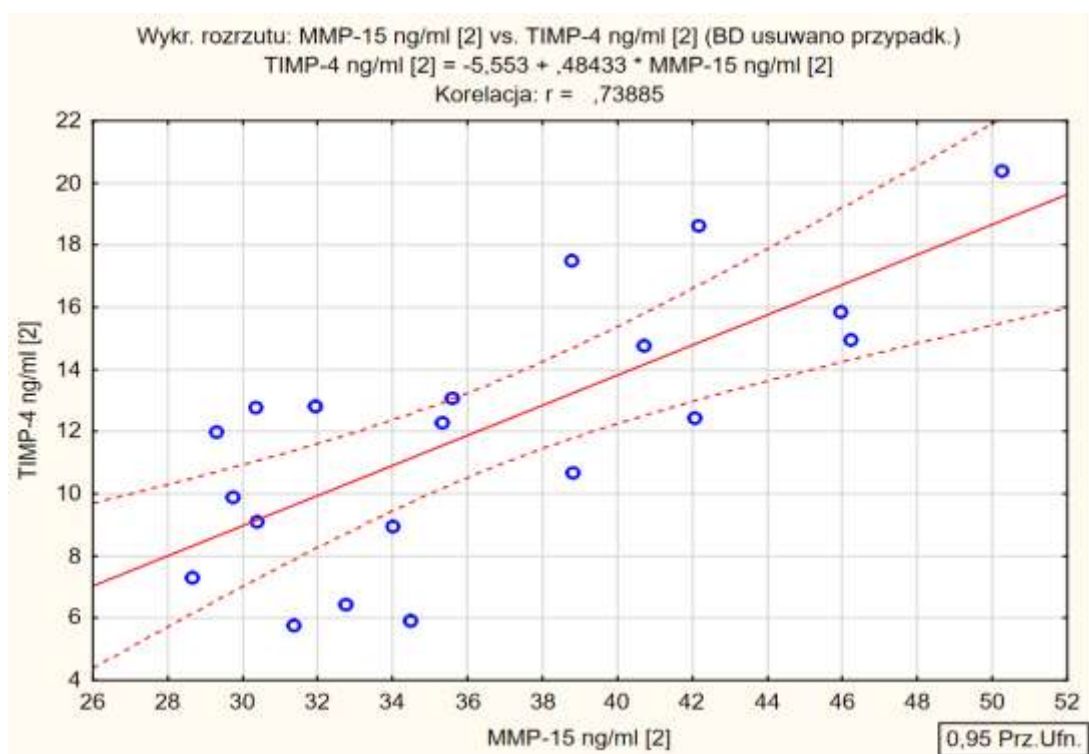
	MMP-1 [ng/ml]	MMP-9 [ng/ml]	MMP-15 [ng/ml]	TIMP-1 [ng/ml]	TIMP-2 [ng/ml]	TIMP-3 [ng/ml]	TIMP-4 [ng/ml]	a2MG [mg/ml]
MMP-1 [ng/ml]		,4513 p=,046	,2615 p=,265	,3429 p=,139	-,5178 p=,019	,3774 p=,101	,1217 p=,609	,0749 p=,754
MMP-9 [ng/ml]	,4513 p=,046		,5341 p=,015	,5864 p=,007	,1521 p=,522	,6384 p=,002	,2910 p=,213	,5068 p=,023
MMP-15 [ng/ml]	,2615 p=,265	,5341 p=,015		,5123 p=,021	,4092 p=,073	,8845 p=,000	,7389 p=,000	,6076 p=,004
TIMP-1 [ng/ml]	,3429 p=,139	,5864 p=,007	,5123 p=,021		,3296 p=,156	,5422 p=,014	,5493 p=,012	,5063 p=,023
TIMP-2 [ng/ml]	-,5178 p=,019	,1521 p=,522	,4092 p=,073	,3296 p=,156		,3047 p=,192	,4823 p=,031	,3607 p=,118
TIMP-3 [ng/ml]	,3774 p=,101	,6384 p=,002	,8845 p=,000	,5422 p=,014	,3047 p=,192		,5958 p=,006	,6191 p=,004
TIMP-4 [ng/ml]	,1217 p=,609	,2910 p=,213	,7389 p=,000	,5493 p=,012	,4823 p=,031	,5958 p=,006		,5323 p=,016
a2MG [mg/ml]	,0749 p=,754	,5068 p=,023	,6076 p=,004	,5063 p=,023	,3607 p=,118	,6191 p=,004	,5323 p=,016	

*Korelacja liniowa Pearsona

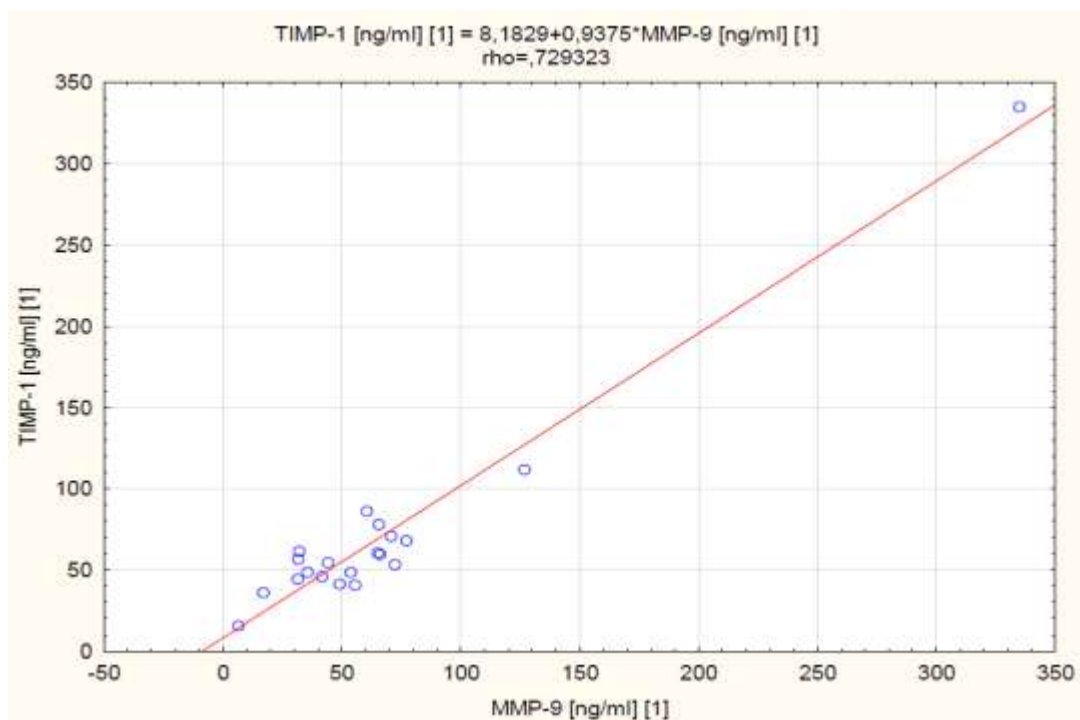
Ryc. 31. Ocena korelacji pomiędzy stężeniami MMPs, TIMPs oraz $\alpha 2$ makroglobuliny w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego po elektroresekcji guza (badanie nr II).



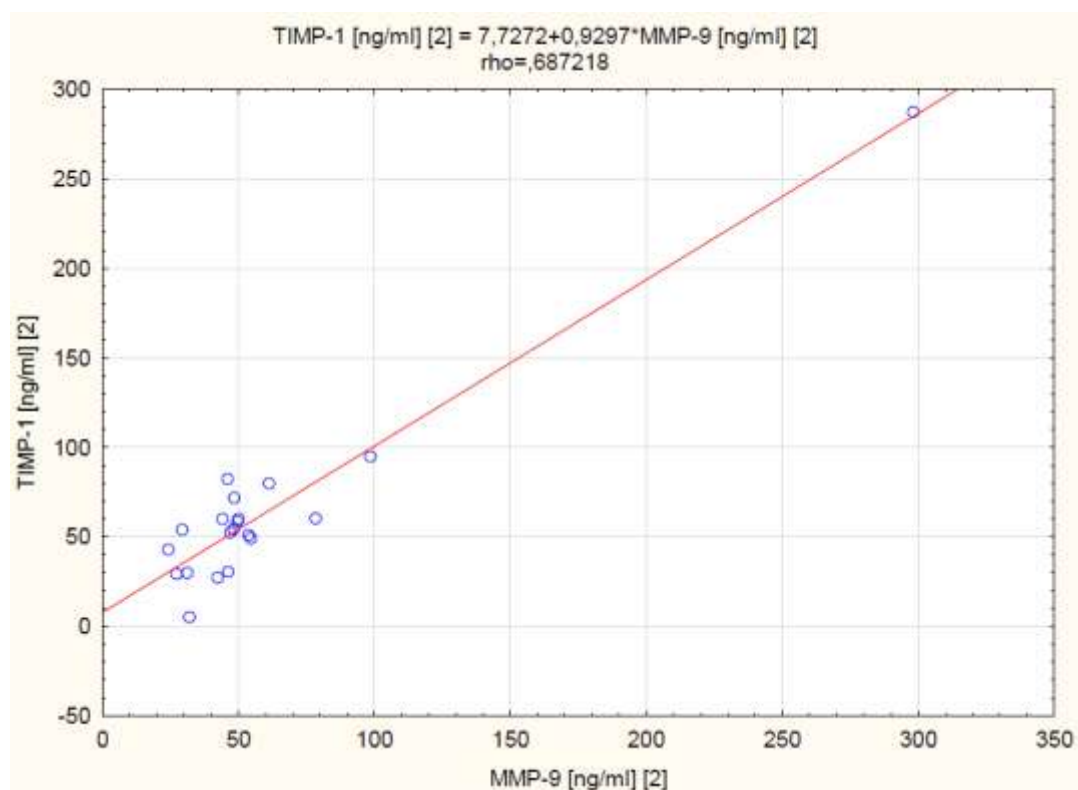
Ryc. 32. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-3 a MMP-15 w moczu pacjentów po elektroresekcji guza (badanie nr II).



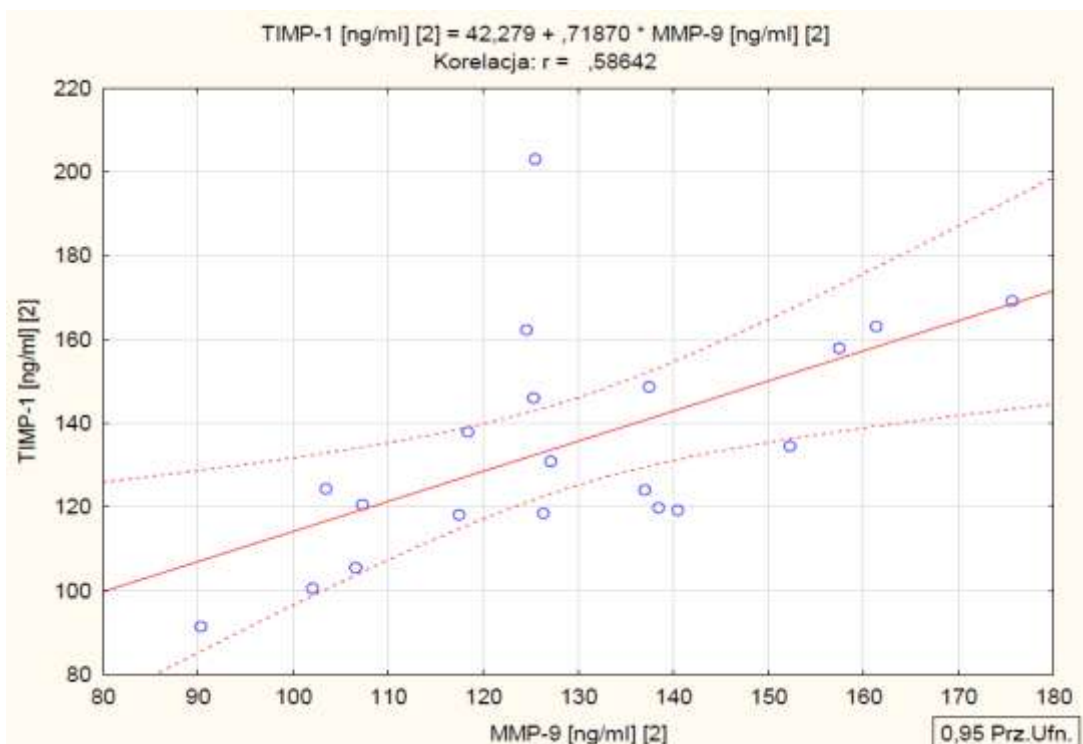
Ryc. 33. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-4 a MMP-15 w moczu pacjentów po elektroresekcji guza (badanie nr II).



Ryc. 34. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-1 a MMP-9 w surowicy pacjentów przed elektroresekcją guza (badanie nr I).



Ryc. 35. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-1 a MMP-9 w surowicy pacjentów po elektroresekcji guza (badanie nr II).



Ryc. 36. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-1 a MMP-9 w moczu pacjentów po elektroresekcji guza (badanie nr II).

Tabela 2. Korelacje rang Spearmana dla poszczególnych markerów we krwi a wielkość guza.

Para zmiennych	Korelacja porządku rang Spearmana			
	Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < ,05000$			
	N Ważnych	R Spearman	t(N-2)	p
MMP-1 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,169709	-0,730611	0,474420
MMP-9 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,197208	-0,853442	0,404629
MMP-14 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	0,003143	0,013334	0,989508
MMP-15 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	0,076212	0,324282	0,749462
TIMP-1 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,168923	-0,727129	0,476498
TIMP-2 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,159495	-0,685454	0,501791
TIMP-3 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,103711	-0,442394	0,663474
TIMP-4 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,130149	-0,556912	0,584446
a2MGmg/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,175994	-0,758520	0,457957

Tabela 3. Korelacje rang Spearmana dla poszczególnych markerów w moczu a wielkość guza.

Para zmiennych	Korelacja porządku rang Spearmana			
	Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < ,05000$			
	N Ważnych	R Spearman	t(N-2)	p
MMP-1 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,282848	-1,25111	0,226911
MMP-9 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,199565	-0,86406	0,398922
MMP-14 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,218421	-0,94961	0,354886
MMP-15 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,400701	-1,85551	0,079975
TIMP-1 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,238064	-1,03992	0,312146
TIMP-2 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,052641	-0,22365	0,825550
TIMP-3 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,674121	-3,87215	0,001117
TIMP-4 ng/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,350942	-1,59005	0,129233
a2MGmg/ml [1] & K_wielkość guza	20	-0,158709	-0,68199	0,503927

8. Podsumowanie wyników badań

1. Stężenie MMP-1 w surowicy wzrosło w drugim badaniu. Stężenie MMP-1 w grupie kontrolnej było wyższe niż w badaniu pierwszym.
2. Stężenia MMP-9 w surowicy nie różniły się pomiędzy grupami.
3. Nie stwierdzono istotnych różnic poziomów MMP-14 w surowicach pacjentów w żadnej z grup.
4. Stężenia MMP-15 w surowicy nie różniły się.
5. Nie wykazano istotnych różnic poziomów TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4 w surowicach pacjentów.
6. Wartości stężeń $\alpha 2$ makroglobuliny w surowicy i były podobne w obu grupach.
7. Poziomy MMP-1 w moczu nie różniły się pomiędzy grupami.
8. Stężenie MMP-9 w moczu wzrosło po resekcji guza i było niższe w grupie kontrolnej.
9. Poziom MMP-14 w moczu wzrósł w drugim badaniu, jednocześnie był niższy u pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem BC w porównaniu z kontrolną.
10. Stężenie MMP-15 w moczu wzrosło po resekcji guza. W grupie kontrolnej wartości stężeń były niższe.
11. Poziom TIMP-1 w moczu wzrósł po usunięciu guza.
12. Stężenia TIMP-2 w moczu nie różniły się pomiędzy grupami.
13. Poziom TIMP-3 i TIMP-4 w moczu wzrósł po resekcji guza
14. Stężenia $\alpha 2$ makroglobuliny w moczu nie różniły się pomiędzy grupami.

9. Dyskusja

Poszukiwanie nowych wskaźników biochemicznych o wysokiej wartości diagnostycznej, których stężenie w badanym materiale odzwierciedlałoby stan kliniczny pacjenta lub na podstawie których można by wnioskować o rokowaniach czy optymalizować schematy terapeutyczne stanowi problem wielopłaszczyznowy. I w takim ujęciu powinien być analizowany. Dostępna diagnostyka gwarantuje wykrycie zmian nowotworowych już na wczesnym etapie, jednak mało swoiste objawy nowotworu pęcherza moczowego, często ignorowane przez pacjenta, skutkują jej zaniechaniem. Konsekwencją tego są wysokie wskaźniki śmiertelności - dane *National Cancer Institute*, przedstawione we wcześniejszym rozdziale. Rekomendowany przez EAU panel diagnostyczny u chorych z podejrzeniem BC, wiąże się z pewną inwazyjnością i dyskomfortem odczuwanym podczas badania, niemniej stanowi złoty standard i jak dotąd jedyną realną szansę wczesnego wykrycia zmian nowotworowych. Wspomniane uprzednio nowe testy molekularne nie uzyskały pełnej akceptacji do stosowania w rutynowej diagnostyce, ze względu na niższą swoistość w porównaniu z cytologią moczu. Należy też podkreślić, że problem stanowią koszty i czasochłonność całej procedury [Babjuk i wsp. 2022]. Stanowiło to asumpt do podjęcia badań w kierunku poszukiwania nowych markerów w surowicy krwi i moczu chorych z powierzchownym nowotworem pęcherza moczowego, użytecznych w realnej praktyce.

Podczas przeglądu baz naukowych znajdziemy liczne publikacje podnoszące kwestię oceny stężeń wielu glikoprotein związanych z BC, jednak dokładna selekcja dostępnych danych skutkowała podjęciem tematu metaloproteinaz tkankowych i ich inhibitorów, jako istotnego w aspekcie klinicznym i diagnostycznym.

Uwzględniając reakcje zachodzące w obecności MMPs można wnioskować, że wzrost stężenia poszczególnych izoform metaloproteinaz prowadzi do nasilenia procesów patologicznych, infiltracji komórek nowotworowych poprzez proteolizę i naciekania głębszych warstw pęcherza moczowego.

Daleko idącym uproszczeniem jest stwierdzenie, że wzrost stężenia poszczególnych izoform TIMPs w każdym przypadku hamuje ten proces. Złożoność fizjologicznych funkcji i wzajemnych oddziaływań TIMPs nie jest tak prosta i jednoznaczna w interpretacji. Uogólnienie prowadzące do wniosku, że wzrost TIMPs traktujemy zawsze jako pożądany, w niektórych przypadkach może być błędne. Świadczą o tym wyniki badań klinicznych, w których wysokie stężenia inhibitorów metaloproteinaz wiązały się z niższymi wskaźnikami przeżycia wolnego od progresji oraz zwiększoną śmiertelnością [Remacle i wsp. 2000;

Durkan i wsp. 2001]. Wynika to z promowania neowaskularyzacji przez TIMPs za pośrednictwem VEGF [Yamada i wsp. 2001]. Fakt ten wydaje się interesujący, ponieważ większość badaczy neguje podobny efekt i wskazuje przeciwną rolę inhibitorów metaloproteinaz [Ebrahim i wsp. 2013].

Nie należy oczekiwać, że istotną wartość diagnostyczną u pacjentów w BC dostarczy analiza zmian stężeń pojedynczego markera w badanym materiale. Raczej jednoczesna ocena poziomów kilku czynników, wraz z korelacjami między nimi, wydają się mieć w tym przypadku kluczowe znaczenie. Pacjenci kwalifikowani do naszych badań mieli zdiagnozowany powierzchowny nowotwór pęcherza moczowego. Zmiany zachodzące we wczesnym etapie choroby mają zwykle charakter miejscowy, a obserwowane różnice stężeń, nawet znamienne statystycznie, nie przekładają się na jednoznaczną i łatwą interpretację kliniczną. Nie można również wykluczyć, że sama elektroresekcja guza spowodowała nasilenie stanu zapalnego (drugi pomiar), który zaburzył równowagę układu metaloproteinaza/inhibitor. Problem ten rozwiązano, porównując uzyskane wartości stężeń nie tylko w obrębie pacjentów przed i po resekcji guza ale też z grupą kontrolną. Jednak brak wysokiej swoistości enzymów stanowi pewne utrudnienie diagnostyczne. Praktycznie zmiany ich poziomów obserwowane są w licznych chorobach z towarzyszącą komponentą zapalną [Cabral-Pacheco i wsp. 2020]. Liczne czynniki egzo- i endogenne omówione w rozdziale 4.1 wpływają ostatecznie na homeostazę w obrębie układu MMPs/TIMPs. Brak swoistości badanych biomarkerów i duża podatność na zmiany stężeń stanowi pewną niedogodność w interpretacji wyników lecz nie wyklucza ich diagnostycznej użyteczności.

Przeprowadzone badania wykazały, że stężenie w surowicy MMP-1 u pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem powierzchownym pęcherza moczowego wzrosło istotnie po elektroresekcji guza. Pewnym zaskoczeniem są wyższe wartości stężeń metaloproteiny obserwowane w grupie zdrowych pacjentów (ryc. 8). W moczu osób chorych, poziomy MMP-1 przed i po zabiegu oraz w grupie kontrolnej nie różniły się (ryc. 17). Wyniki te są zgodne z danymi opublikowanymi przez Młynarczyk i wsp. 2017. Autorzy konkludują, że obecność w moczu MMP-1 tylko u 26% badanych pacjentów z rozpoznaniem nowotworem, wskazuje na znikomą przydatność oznaczania enzymu w diagnostyce raka pęcherza moczowego [Młynarczyk i wsp. 2017]. Do przeciwnych wniosków dochodzi w swoich badaniach Durkan i wsp., wskazując na związek pomiędzy stężeniem MMP-1 w moczu a ryzykiem wystąpienia i stopniem zaawansowania guza. Jednak badania przeprowadzone przez nasz zespół tego nie potwierdzają. Wynika to zapewne z odmiennych kryteriów włączenia do badania. Nasz zespół kwalifikował jedynie chorych z nowotworami

miejscowymi – pTa/low *grade*, z reguły dobrze rokującymi. Obserwowany wzrost stężenia MMP-1 w surowicy może wynikać bezpośrednio z ingerencji chirurgicznej i nasilenia stanu zapalnego. Wydzielanie MMP-1 podlega ścisłej regulacji zależnej od cytokin prozapalnych: IL-1 β i TNF- α [Tasaki i wsp. 2003].

Poziomy proMMP-1 i MMP-1 są wyższe we krwi pacjentów z sepsą, a MMP-1 bezpośrednio koreluje ze śmiertelnością u chorych [Lee i Kim 2022]. Inna z hipotez zakłada niekorzystny wzrost MMP-1 spowodowany progresją nowotworu. Taka sytuacja wskazywałaby na istnienie mikroognisk wtórnych, niewykrytych podczas procedur diagnostycznych. Wysoka ekspresja MMP-1 w tkankach nowotworowych w porównaniu ze zdrową tkanką otaczającą guz, zwiększa ryzyko przerzutów limfatycznych oraz wykazuje ścisły związek ze stopniem TNM [Wang i wsp. 2020].

Monitorowanie występowania przerzutów czy ocena przeżywalności chorych po elektroresekcji wykraczają poza zakres naszych badań. Jednak większość danych zawartych w piśmiennictwie podkreśla niekorzystne rokowania przy wzrastających poziomach MMP-1 [Nutt i wsp. 1998; Zhang i wsp. 2022]. Wyższe wartości uzyskane w surowicy krwi osób zdrowych wynikają z braku swoistości enzymu. Należy uwzględnić, że do zmian ekspresji MMP-1 dochodzi nie tylko w przypadku chorych z BC, ale też w większości chorób z towarzyszącą komponentą zapalną, chorób neurodegeneracyjnych czy kardiometabolicznych. Biorąc pod uwagę średni wiek uczestników badania, nie można wykluczyć pozostałych czynników, które pośrednio przyczyniły się do uzyskania takiego wyniku.

MMP-1 jako pojedynczy marker uzupełniający diagnostykę BC, niezależnie od analizowanego materiału, nie spełnia wymaganych kryteriów. Należy jednak rozważyć złożony panel diagnostyczny uwzględniający korelację po elektroresekcji guza pomiędzy stężeniami MMP-1 i MMP-9 ($r=0,45$; $p=0,046$) w moczu (ryc. 31). Uzyskane wyniki nie wykazały znaczenia MMP-1 w zestawieniu z pozostałymi MMPs jako użytecznego markera w badaniach skriningowych (ryc. 28).

W przypadku MMP-9 nie zaobserwowano istotnych zmian poziomów w surowicy zarówno przed jak i po elektroresekcji guza. Wartości te wynosiły odpowiednio 66,89 ng/ml i 60,53 ng/ml ($p=0,191$), i nie różniły się względem grupy kontrolnej (ryc. 9). W badanych próbkach moczu wykazano natomiast znamienny wzrost stężenia MMP-9 w drugim pomiarze – 116,64 ng/ml vs. 128,71 ng/ml (ryc. 18), co uzasadnia wybór moczu jako materiału uzupełniającego standardową diagnostykę.

Obserwowane różnice wynikają bezpośrednio z roli jaką odgrywa MMP-9 w tworzeniu przerzutów nowotworowych. Wysoka aktywność proteolityczna enzymu umożliwia uszkodzenie struktur błon podstawnych i ich naciekanie, a także aktywuje mechanizmy proangiogenne. Kluczową rolę enzymu w kancerogenezie tłumaczyć należy ponad dziesięciokrotnie wyższym poziomem MMP-9 w porównaniu z MMP-1, MMP-14 i MMP-15 zarówno we krwi jak i w moczu (ryciny 8-11 oraz 17-20).

Niższe wartości stężeń w grupie zdrowych uczestników (pomimo braku istotnych statystycznie różnic – $p=0,056$), wymagają dalszego omówienia. Obserwowany trend wskazuje na duży rozrzut wyników w tej grupie przy jednocześnie stosunkowo wysokich stężeniach w badanych próbkach.

W aspekcie klinicznym może to wskazywać na zasadność doboru do panelu diagnostycznego tylko biomarkerów wykazujących wysoką aktywność w moczu i surowicy. Lokalny charakter zmian poziomów metaloproteinaz w obrębie guza, przy jednocześnie bardzo niskich stężeniach w płynach ustrojowych, stanowi poważny problem w aspekcie interpretacji wyniku. Zmiany stężeń w odniesieniu do całkowitej objętości krwi krążącej czy objętości wydalanego moczu mogą być zbyt niskie, aby na ich podstawie jednoznacznie wnioskować. Biorąc pod uwagę wiek pacjentów, należy założyć, że ich parametry hemodynamiczne oraz przepływy nerkowe różnią się. Stanowi to pewien czynnik ograniczający badanie, w praktyce jednak dość trudny do wyeliminowania ze względu na dużą heterogenność grupy badanej.

W złożonym panelu diagnostycznym BC, MMP-9 może okazać się pomocniczym wskaźnikiem diagnostycznym. Wykazano znamienne dodatnie korelacje pomiędzy MMP-9 a MMP-1 i MMP-15 w moczu pacjentów po elektroresekcji guza (ryc. 31).

Wskazuje to na aktywny proces przebudowy w obrębie tkanek pęcherza moczowego, zachodzący po dokonanej interwencji chirurgicznej. Z dużym prawdopodobieństwem można założyć, że jest to zjawisko niepożądane, świadczące o obecności mikroognisk nowotworowych, które nie zostały usunięte z marginesem zdrowej tkanki. Na tym etapie zmiany morfologiczne w obrębie błony śluzowej i podnabłonkowej tkanki łącznej pęcherza moczowego są praktycznie niewykrywalne w badaniu USG czy cystoskopii.

Ostatecznie symultaniczne działanie kolagenaz doprowadza do infiltracji komórek nowotworowych. Te niekorzystne procesy wiążą się z reguły ze znaczenie gorszymi rokowaniami dla pacjentów [Kudelski i wsp. 2023].

W kolejnym etapie badań analizowano poziom MMP-14 w surowicy krwi i moczu pacjentów ze zdiagnozowanym BC. Podobnie jak w przypadku MMP-9 nie zaobserwowano

istotnych zmian stężenia MMP-14 w surowicy osób chorych przed i po resekcji guza - 3,30 ng/dl i 5,47 ng/dl. Wykazano natomiast nieznacznie wyższe stężenia metaloproteiny w grupie kontrolnej ($p=ns$). Oznaczenia przeprowadzone w próbkach moczu wykazały znamienne wyższe stężenia MMP-14 po usunięciu guza (ryc. 10 i 19). Zwiększoną ekspresję MMP-14 wykazano w licznych nowotworach pochodzenia nabłonkowego i z reguły wiąże się ona z niekorzystnym rokowaniem dla pacjenta [Kudelski i wsp. 2022].

Wyniki naszych badań są zgodne z większością danych prezentowanych przez inne ośrodki badawcze. Dane zawarte w piśmiennictwie, przedstawione w rozdziale 4.3 wskazują na tożsame z pozostałymi MMPs mechanizmy degradacji macierzy komórkowej. Warto podkreślić, że MMP-14 jest indukowana przez IL-6. Istnieje zatem wyraźny związek pomiędzy miejscowym stanem zapalnym a remodelingiem umożliwiającym infiltrację komórek guza i tworzeniem przerzutów [Cathcart i wsp. 2016]. Źródła IL-6 nie są ograniczone do mikrośrodowiska guza, ale mogą być też wytwarzane przez komórki macierzyste i progenitorowe układu krwiotwórczego. W procesie metastazy znaczenie klasycznego szlaku sygnalizacyjnego – tj. wiązanie IL-6 z receptorem błonowym wydaje się mało istotne, ze względu na ekspresję IL-6R jedynie w obrębie neutrofili, hepatocytów, monocytów i niektórych makrofagów. Odkrycie alternatywnego szlaku wiązania IL-6 z jej rozpuszczalnym receptorem osoczym – sIL-6R ma kluczowe znaczenie, zarówno we wzroście guza jak i naciekanii węzłów chłonnych. Działanie to wykazuje synergizm z MMP-14, szczególnie w nowotworach związanych z długotrwałym stanem zapalnym. Bezpośrednia stymulacja komórek nowotworowych IL-6 pobudza komórki podścieliska i układu odpornościowego do produkcji VEGF, IL-1 β oraz MMP-14. Te złożone interakcje regulujące aktywność podziałową komórek zachodzące na poziomie MMP-14 a cytokinami zapalnymi wymagają dalszych badań. Wyniki uzyskane przez nasz zespół wykazały wzrost stężenia MMP-14 w analizowanych próbkach moczu u pacjentów po resekcji guza, jednak w protokole badawczym nie uwzględniono oceny stężenia sIL-6R. Jednoczesna ocena poziomu MMP-14 i sIL-6R może poszerzyć i wzbogacić dotychczasową diagnostykę pacjentów z powierzchownym nowotworem pęcherza moczowego [Rašková i wsp. 2022].

Stężenia MMP-15 w surowicy nie różniły się istotnie zarówno przed, jak i po usunięciu guza i były zbliżone do wartości uzyskanych w grupie kontrolnej (ryc. 11). W badanych próbkach moczu wykazano natomiast znamienny wzrost stężenia MMP-15 w drugim pomiarze – 31,01 ng/ml vs. 36,42 ng/ml; ($p=0,002$). Stężenia w grupie kontrolnej były porównywalne ze średnimi wartościami uzyskanymi u chorych przed resekcją guza (ryc. 20). Wykazano też, że stężenie MMP-15 w moczu chorych po resekcji guza koreluje

ze stężeniem MMP-9 ($r=0,534$; $p=0,015$). Obserwacja ta wskazuje na toczący się remodeling zachodzący w obszarze usuniętej zmiany nowotworowej, w który zaangażowane są obie metaloproteinazy. Proces ten należy analizować w dwóch aspektach: jako korzystną kompensację fizjologiczną, w celu przywrócenie prawidłowej struktury tkanki oraz potencjalny predyktor wznowy nowotworowej, świadczący o obecności mikroprzerzutów w węzłach chłonnych. Dane zawarte w piśmiennictwie potwierdzają drugą z powyższych hipotez. Zwiększona ekspresja MMP-15 wiąże się z istotnie krótszym okresem przeżycia chorych [Pietrzak i wsp. 2021]. Wynika to z możliwości aktywacji pozostałych MMPs przez MMP15, co wykazano również w naszych badaniach.

Korelację dla poszczególnych MMPs i TIMPs we krwi i moczu z wielkością guza zostały ocenione przed resekcją guza. Posłużono się schematem rang: wielkość guza: 0-10 mm - wartość 1; 11-20 mm - wartość 2; 21-30 mm - wartość 3; powyżej 30 mm - wartość 4. Nie wykazano związku pomiędzy stężeniem we krwi MMPs/TIMPs oraz $\alpha 2$ -makroglobuliny a wielkością guza. Pewna ujemna korelacja wystąpiła między stężeniem TIMP-3 w moczu a wielkością guza. Zależność tę należy traktować wyłącznie w kategorii zmiany statystycznej o charakterze przypadkowym, bez implikacji klinicznych.

W przeprowadzonych badaniach dokonano również oceny stężeń TIMPs, regulujących aktywność proteolityczną metaloproteinaz. Dostępne wyniki badań z innych ośrodków są sprzeczne i różnią się praktycznie dla każdego rodzaju nowotworu. Realny problem stanowi też ich ostateczna interpretacja i określenie, jakie znaczenie kliniczne odgrywa zmiana stężeń danej izoformy TIMPs w ujęciu predykcyjnym i prognostycznym. O ile większość badaczy jednoznacznie konkluduje, że wzrost stężenia MMPs prowadzi do nasilenia procesu onkogenezy, to w przypadku TIMPs przeciwne wnioski nie zawsze będą właściwe. Ten dualistyczny aspekt TIMPs wynika z hamowania aktywności kolagenaz z jednej strony, z drugiej natomiast z pewnej możliwości aktywacji szlaków komórkowych (*kinaz tyrozynowych i serynowo-treoninowych*) o potencjale onkogennym [Forte i wsp. 2017; Peeney i wsp. 2020].

Badanie TIMP-1 nie wykazano żadnych różnic pomiędzy stężeniami we krwi chorych w grupie I, II oraz w kontrolnej (ryc. 12). Stężenie TIMP-1 w surowicy chorych przed elektroresekcją guza wynosiło 70,89 ng/ml. Naruo i wsp. w swoich badaniach wykazali przeciwnie, ponad trzykrotnie wyższe wartości TIMP-1 u chorych z BC (średnia - 251,1 ng/ml), a wysokie stężenia przekładały się negatywnie na stan kliniczny pacjentów.

Różnice te mogą wynikać z innych kryteriów kwalifikacji do udziału w badaniu. Zgodnie z naszym protokołem byli to pacjenci z powierzchownym nowotworem

urotelialnym, czyli guzami ograniczonymi do błony śluzowej lub naciekającymi podnabłonkową tkankę łączną. Wśród uczestników badania przeprowadzonego przez zespół z Japonii, byli pacjenci z nowotworami o wyższym stopniu zaawansowania: pT2-4, wielkość guza >3 cm i potwierdzoną metastazą [Naruo i wsp. 1994].

Wnioskowanie autorów oparte wyłącznie o model statystyczny jest w tym przypadku pewnym uproszczeniem. Wysoka ekspresja TIMP-1 łączona jednoznacznie z niekorzystnym rokowaniem chorych, może stanowić pewnego rodzaju pętlę sprzężenia zwrotnego. Należy założyć, że u pacjentów w tak zaawansowanym stadium BC aktywność MMPs będzie podwyższona (autorzy nie wykonali oznaczeń), co pociąga za sobą aktywację mechanizmów kompensacyjnych, między innymi przez TIMP-1. Nawet tak duży wzrost, mający na celu zahamowanie przebudowy mikrośrodowiska guza i jego infiltrację, nie skompensuje aktywności kolagenaz degradujących macierz komórkową. Znaczące różnice wyników w obu badaniach pośrednio wskazują na związek pomiędzy ekspresją TIMP-1 a stopniem zaawansowania nowotworu.

Według Durkana i wsp. stężenie TIMP-1 u wszystkich chorych ze zdiagnozowanym BC jest wyższe w porównaniu z grupą osób zdrowych. Pacjenci z guzami naciekającymi mięśnie mają wyższe stężenia TIMP-1 w moczu niż pacjenci z guzami cis/Ta/T1. Poziomy TIMP-1 wykazują również silną korelację z wielkością guza. Jednak wskaźniki przeżycia wolnego od progresji były niższe u pacjentów ze stężeniami TIMP-1 przekraczającymi medianę (1,8 ng/ml), ale nie wiązały się one z przeżyciem specyficznym dla choroby. U pacjentów z guzami T2-4 i G3 stosunek MMP-1:TIMP-1 w moczu był istotnie niższy niż w przypadku guzów pęcherza moczowego Ta/T1 lub G(1)-G(2) [Durkan i wsp. 2001].

W naszych badaniach wartości TIMP-1 wzrosły tylko w moczu po resekcji guza, i nie różniły się znamiennej pomiędzy grupą kontrolną a pacjentami ze zdiagnozowanym BC. W próbkach moczu stężenia TIMP-1 u pacjentów z BC były wyższe niż w surowicy, zarówno przed i po zabiegu (ryc. 12 i 21), wynosiły one odpowiednio 120,37 ng/ml i 134,48 ng/ml ($p=0,034$). Kliniczna ocena użyteczności tych zmian wymaga uwzględnienia zmian jego ekspresji w odniesieniu do pozostałych markerów – w tym przypadku MMPs. Analiza korelacji wykazała, że w moczu pacjentów przed resekcją guza oprócz TIMP-1 wzrasta jednocześnie MMP-9 ($r=0,72$; $p=0,001$); (ryc. 28 i 29) i zależność ta utrzymywała się jeszcze trzy miesiące po resekcji guza (ryc. 31). Użyteczny klinicznie wydaje się współczynnik MMP-9/TIMP-1, przydatny w ocenie inwazji i przerzutowania nowotworu. Zespół z Collegium Medicum w Bydgoszczy badał te zależności. Nie zaobserwowali tendencji wzrostowej TIMP-1 wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu jak w przypadku MMP-1,

choć słaba korelacja między stężeniami TIMP-1 i MMP-9 występowała. Niezależnie od ekspresji TIMP-1, indeks MMP-9/TIMP-1 był podwyższony, co wskazuje na zaburzenie równowagi między biosyntezą MMP-9 a TIMP-1 w obrębie guza i jego podścieliska [Kopczyńska i wsp. 2007].

W badaniach własnych nie zaobserwowano zmian stężeń TIMP-2 w surowicy osób z grupy badanej zarówno przed jak i po elektroresekcji guza. Wartości te nie różniły się względem grupy kontrolnej (ryc. 13). Nie stwierdzono istotnych różnic stężeń w analizowanych próbkach moczu (ryc. 22). W grupie badanej przed zabiegiem odnotowano dodatnie korelacje TIMP-2 z MMP-9 i MMP-14 oraz TIMP-1 (ryc. 28). Po usunięciu guza TIMP-2 ujemnie korelowało ze stężeniem MMP-1 (ryc. 31). Na tej podstawie nie można stwierdzić, że TIMP-2 pomimo pewnych korelacji z innymi markerami będzie użytecznym markerem diagnostycznym. Tak małe różnice stężeń pomiędzy grupami, praktycznie to wykluczają i wskazują na miejscowy charakter zmian.

Stężenia TIMP-3 w surowicach pacjentów z BC, podobnie jak TIMP-2, nie różniły się pomiędzy grupami (ryc. 14). W moczu odnotowano wyraźny wzrost stężenia TIMP-3 w drugim pobraniu po resekcji guza (ryc. 23). Analiza danych wykazała, że w moczu pacjentów przed operacją stężenie TIMP-3 dodatnio koreluje z MMP-14; $r=0,64$; $p=0,002$ (ryc. 28). W okresie trzech miesięcy po resekcji guza TIMP-3 znamienne korelowało z MMP-9, MMP-15, TIMP-1 i TIMP-4 (ryc. 31 i 32). Wyniki te dostarczają ważnych informacji o złożoności układów metaloproteinaz i ich inhibitorów w powierzchniowym nowotworze pęcherza moczowego. O ile wzrost MMPs ułatwia naciekanie błon podstawnych i infiltrację komórek rakowych, to wykształcenie mechanizmów sprzężenia zwrotnego ma przeciwdziałać temu procesowi. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że proces taki zachodzi przez jednoczesną aktywację za pośrednictwem TIMP-3 pozostałych czynników wzmacniających to działanie: TIMP-1 oraz TIMP-4. Jednak ten złożony mechanizm ochronny, hamujący nieswoistą aktywność metaloproteinaz, uaktywnia się dopiero w późniejszym czasie po interwencji chirurgicznej. Hoque i wsp. wskazali związek nieprawidłowej metylacji TIMP-3 w osadzie moczu z progresją raka pęcherza moczowego. Ryzyko zgonu u tych chorych było istotnie wyższe. Wieloczynnikowa analiza potwierdziła, że metylacja TIMP-3 była niezależnym czynnikiem prognostycznym przeżycia w raku pęcherza moczowego w zależności od stopnia zaawansowania i przerzutów. Metylacja TIMP-3 wiązała się z prawie dwupółkrotnym wzrostem ryzyka zgonu [Hoque i wsp. 2008]. Kwestia wysokiej ekspresji metylowanych TIMP-3 pozostaje wciąż sporna. U pacjentów z nieinwazyjnym rakiem pęcherza moczowego metylacja TIMP-3 wiązała się z wydłużeniem okresu wolnego

od choroby [Friedrich i wsp. 2005]. Autorzy nie badali jednak stężenia właściwej struktury TIMP-3, co w praktyce ogranicza możliwość zestawienia i porównania prezentowanych wyników z naszymi.

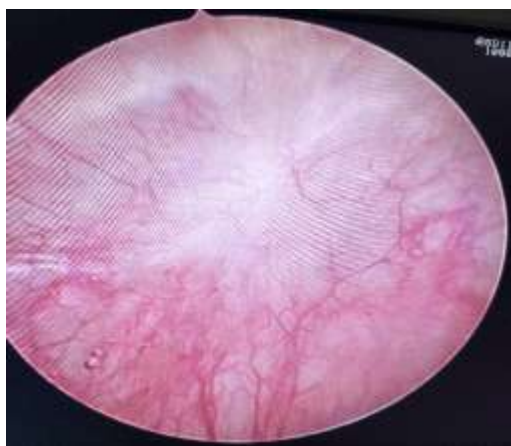
Ocena stężeń TIMP-4 w surowicy krwi pacjentów z BC i grupie kontrolnej nie wykazała istotnych różnic (ryc. 15). Należy zaznaczyć, że były one najniższe spośród wszystkich TIMPs, szczególnie w badaniu I/II w obrębie obu grup - nie przekraczały 10 ng/ml. W próbkach moczu stężenie TIMP-4 również było niskie, ale istotnie wzrosło po resekcji guza (ryc. 24). Analiza danych wykazała dodatnie korelacje TIMP-4 z MMP-15 ($r=0,74$; $p=0,0001$), TIMP1, TIMP-2, TIMP-3 po trzech miesiącach od interwencji chirurgicznej (ryc. 31). Interpretacja uzyskanych wyników jest tożsama z przedstawioną dla TIMP-3. Postuluje się ten sam mechanizm kompensacji układu metaloproteinaz poprzez wzrost aktywności ich inhibitorów. W dostępnym piśmiennictwie jest mało informacji nt. roli TIMP-4 w raku pęcherza moczowego. Zaobserwowano, że podwyższona ekspresja TIMP-4 wiąże się z tendencją do tworzenia guzów nowotworowych [Lizarraga i wsp. 2016]. Wyniki te wskazują na niekorzystne znaczenie czynnika w progresji nowotworu, jednak przedkliniczny charakter publikowanych danych ma znikomą wartość diagnostyczną.

W badaniach własnych oznaczono dodatkowo stężenie $\alpha 2$ -makroglobuliny. Wybór markera do badań podyktowany był licznymi doniesieniami o zmianach stężenia $\alpha 2M$ w chorobach metabolicznych z towarzyszącym stanem zapalny oraz raku prostaty. Pojedyncze doniesienia traktują o znaczeniu markera w nowotworze pęcherza moczowego [Lee i wsp. 2022]. Uzyskane wyniki wykazały bardzo niskie stężenia $\alpha 2M$ (<2 ng/ml) w surowicy i w moczu w grupie kontrolnej oraz w dwóch oznaczeniach w grupie badanej (ryc. 16 i 25). Różnice stężeń pomiędzy grupami nie były znamienne statystycznie. Wykazano dodatnie korelacje w próbkach moczu przed resekcją guza pomiędzy stężeniem $\alpha 2M$ a MMP-9 ($r=0,62$; $p=0,003$), TIMP-1 ($r=0,70$; $p=0,001$), TIMP-2 ($r=0,59$; $p=0,006$) i TIMP-3 ($r=0,55$; $p=0,01$). W złożonym panelu badań przesiewowych, oznaczanie $\alpha 2M$ w moczu znajduje pewne uzasadnienie, tylko w połączeniu z pozostałymi markerami, których stężenie silnie koreluje z $\alpha 2M$ (ryc. 28 i 30). Pewnym problemem są niskie stężenia globuliny, bliskie granicy detekcji i mała swoistość dla BC, co w praktyce wiązałoby się z zupełnie nową standaryzacją metody oznaczeń.

Przeprowadzone badania wniosły pewne ważne spostrzeżenia i rzuciły nowe światło na rolę jaką odgrywają MMPs i TIMPs oraz $\alpha 2M$ w powierzchniowym nowotworem pęcherza moczowego. Podjęty problem badawczy nie jest łatwy, ponieważ w guzach nienaciekających błon podstawnych z reguły dostrzegamy zmiany jedynie na poziomie morfologicznym,

diagnozowane podczas cystoskopii. Wahanie stężeń potencjalnych markerów przy tak małych zmianach miejscowych mogą być niewielkie. Inaczej jest w przypadku chorych w zaawansowanym stadium nowotworu, gdzie zarówno guz i podścielisko wykazują wzmożoną aktywność metaboliczną, co bezpośrednio przekłada się na znacznie większe różnice stężeń biomarkera w badanym materiale, przy założeniu jego swoistości.

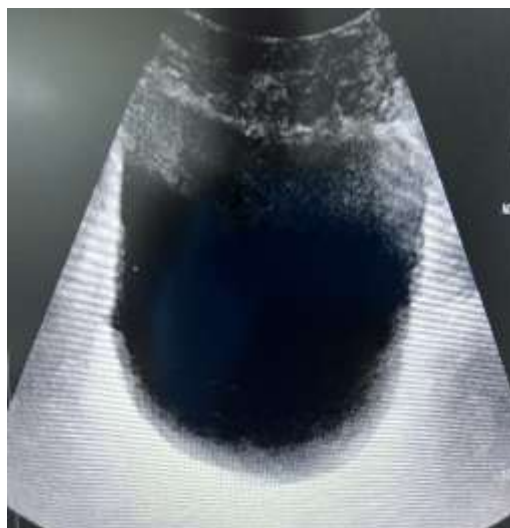
Uzyskane wyniki należy zbiorczo interpretować w aspekcie zmian biochemicznych zachodzących u pacjentów, którzy ze względu na objawy zostali skierowani na cystoskopię, a wykazane istotne różnice wraz z korelacjami, jako potencjalny panel uzupełniający standardową diagnostykę BC. Druga faza badań dostarcza ważnych informacji o remodelingu tkanek zachodzącym w obrębie usuniętego guza po trzech miesiącach od resekcji, determinując tym samym zmiany w obrębie nowotworzonej struktury tkankowej. Liczne prace podnoszą też kwestię znaczenia poziomów markerów w określonych interwałach czasowych i ich związku z czasem przeżycia i ryzykiem wznowy nowotworu. Dane te są jednak sprzeczne i wymagają ostrożnej interpretacji. W cytowanym w niniejszej pracy piśmiennictwie Autorzy często łączą fakt zmiany stężenia markera u chorych z nowotworem pęcherza moczowego z pięcioletnim okresem przeżycia oraz ryzykiem przerzutów. Takie postępowanie nie znajduje uzasadnienia klinicznego. Wiarygodna ocena przeżycia wymaga zestawienia danego markera z całym panelem uznanych czynników prognostycznych o wysokiej swoistości, a nie wybiórczej oceny jednego z nich. W badaniach własnych odstąpiono od takiej analizy ze względu na krótki, bo tylko trzymiesięczny okres obserwacji i niskie ryzyko zgonu. Wszyscy uczestnicy zgłosili się na powtórne badanie po resekcji guza i u żadnego z nich, nawet w przypadku wystąpienia niepokojących objawów i zlecenia cystoskopii czy tomografii pęcherza, nie stwierdzono wznowy nowotworu (ryc. 37-41).



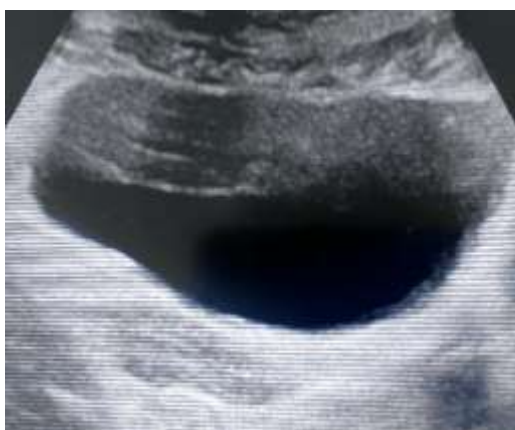
Ryc. 37. Wygojona blizna po elektroresekcji raka pęcherza moczowego (guz 11 mm pTa, low grade)



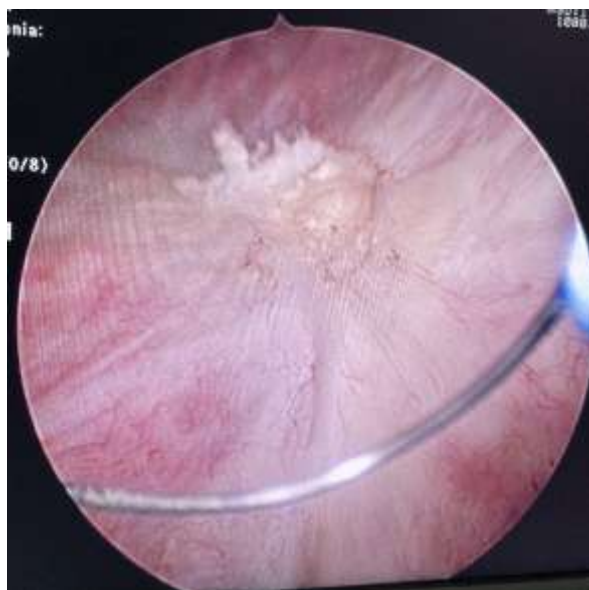
Ryc. 38. Rak urotelialny pęcherza moczowego 28 mm, pT1, *high grade*



Ryc. 39. Sześć tygodni po operacji guza pęcherza moczowego (rak urotelialny 23 mm pTa, *low grade* - ściana prawa pęcherza moczowego).



Ryc. 40. Cztery tygodnie po operacji raka pęcherza moczowego – lewa ściana pęcherza (28 mm pT1, *low grade*) - pęcherz moczowy gładkościenny.



Ryc. 41. Gojąca się rana trzy tygodnie po doszczętnej elektroresekcji raka pęcherza moczowego (guz 3 cm, pT1, *high grade*, ściana lewa pęcherza moczowego).

Zestawiając uzyskane wyniki z grupą zdrowych ochotników nie zaobserwowano znamiennych różnic stężeń MMPs w surowicy za wyjątkiem MMP-1, podobnie dla TIMPs oraz $\alpha 2M$. W badanych próbkach moczu stężenia MMP-1, MMP-9 i MMP-15 nie różniły się względem kontroli, jednak stężenie MMP-14 było znamiennie wyższe w grupie zdrowych ochotników.

Biorąc pod uwagę wiek pacjentów i ryzyko interferencji czynników zakłócających, nie można wykluczyć ich wpływu na uzyskany wynik. W rozdziale 4.6 zwrócono na to uwagę, opisując przykładowe ksenobiotyki i wybrane aspekty stylu życia jako czynniki modulujące poziom metaloproteinaz. Przedstawione w nim dane należy traktować w kategorii pewnych ograniczeń metodologicznych, które w trakcie projektowania badania były praktycznie niemożliwe do wyeliminowania. Można w pewnym uproszczeniu założyć, że rozkład tych czynników jest porównywalny w każdej z grup i nie podlega istotnym fluktuacjom czasowym.

Dowodzi to, że cały proces bliznowacenia tkanek po ingerencji chirurgicznej regulowany jest przez aktywność praktycznie wszystkich typów kolagenaz, a zmniejszenie ich aktywności zależy od dwóch czynników hamujących ten proces: TIMP-3 oraz TIMP-4.

Znaczenie MMPs i TIMPs w nowotworach pęcherza moczowego w różnych stadiach zaawansowania, jak dotąd nie zostało ostatecznie wyjaśnione. Liczne, często wykluczające się wyniki badań odnośnie rokowań i związku stanu klinicznego z poziomem poszczególnych metaloproteinaz utrudniają jednoznaczną interpretację uzyskanych danych.

Potrzebne są dalsze badania, z uwzględnieniem zmian poziomów oznaczanych markerów także w materiale biopsyjnym pobranym bezpośrednio z guza i podścieliska, a także wydłużenie czasu obserwacji po usunięciu nowotworu. Określenie zależności zmian o charakterze miejscowym w obrębie guza i marginesu zdrowej tkanki, skorelowane z wynikami naszych badań w surowicy i w moczu mogą stanowić klinicznie przydatne narzędzie uzupełniające rekomendowane obecnie metody diagnozowania i leczenia chorych z nowotworami pęcherza moczowego.

10. Wnioski

1. Ocena stężeń MMPs i TIMPs w surowicy pacjentów z nowotworem urotelialnym pęcherza moczowego, nie spełnia cech potencjalnego narzędzia wspomagającego diagnostykę chorych.
2. Poziom α 2-makroglobuliny we krwi i moczu nie odzwierciedla zmian zachodzących w obrębie guza pęcherza moczowego i jego środowiska.
3. W rakach urotelialnych pęcherza moczowego należy rozważyć jako uzupełnienie standardowej diagnostyki, ocenę zmian stężeń panelu metaloproteinaz i ich inhibitorów w moczu.
4. Ocena poziomu tylko jednego typu endopeptydazy lub TIMP ma znikomą wartość kliniczną.
5. Wielkość guza nie ma wpływu na poziom poszczególnych MMPs i TIMPs w moczu.
6. Analiza korelacji stężeń w moczu MMPs i TIMPs zarówno przed jak i po elektroresekcji guza może stanowić pomocne narzędzie diagnostyki biochemicznej. Szczególnie: MMP-15/TIMP-3; MMP-15/TIMP-4 oraz MMP-9/TIMP-1.

11. Streszczenie

Według danych opublikowanych przez *European Association of Urology* (EAU) wskazują, że nowotwór pęcherza moczowego jest siódmym najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie wśród mężczyzn, jednocześnie klasyfikuje się na dziesiątej pozycji dla całej populacji. Wskaźniki zachorowalności wynoszą 9,5 dla mężczyzn i 2,4 dla kobiet na 100 000 osobolat, natomiast współczynniki śmiertelności – odpowiednio 3,3 vs. 0,86. Wczesna diagnoza istotnie poprawia rokowania u chorych. Wskaźniki przeżywalności są mniej korzystne w inwazyjnych postaciach tego nowotworu. W krajach Unii Europejskiej istnieją pewne rozbieżności w poszczególnych rejestrach, dotyczące częstości występowania BC i wskaźników pięcioletniego okresu przeżywalności. Wynika to z różnej dostępności do badań przesiewowych i procedur klinicznych, a także analizy pozyskanych danych cząstkowych. Pomimo istotnej poprawy w zakresie nowych metod obrazowania i technik zabiegów chirurgicznych u pacjentów z rakiem urotelialnym pęcherza moczowego, jakie dokonały się w ciągu ostatnich lat, istnieją pewne rozbieżności w ocenie rokowań opartych wyłącznie o wyniki badania histopatologicznego. Istotne zatem wydaje się podjęcie kwestii uzupełnienia standardowej diagnostyki o panel biochemiczny, na podstawie którego precyzyjnie można by określić strategię dalszego leczenia, optymalizację farmakoterapii czy ryzyko metastazy w przypadku nowotworów *in situ*.

Cele pracy: Głównym celem badań była ocena stężenia w surowicy krwi i w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego potencjalnych biomarkerów profilowania diagnostycznego: MMP-1, MMP-9, MMP-14, MMP-15 i ich inhibitorów (TIMPs 1-4) oraz α 2-makroglobuliny. Następnie analiza korelacji badanych parametrów oraz wskazanie preferowanego materiału do badań diagnostycznych. Uzyskanie wieloczynnikowego modelu biomarkerów, stanowiącego uzupełnienie standardowego panelu diagnostycznego u chorych ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego.

Materiał i metoda: Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy UMK, Collegium Medicum w Bydgoszczy, dnia 19.01.2021 roku (nr KB 9/2021). Kwalifikację do badania oraz pobieranie i zabezpieczenie materiału (surowicy i moczu) przeprowadzono w Szpitalu Specjalistycznym im. J.K. Łukowicza w Chojnicach; Oddział Urologii i Onkologii Urologicznej w Chojnicach w latach 2021-2022. Do badań zakwalifikowano pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego n=20 (pTa/pT1 HG/LG), u których dokonano dwukrotnego pobrania materiału do analizy – krwi w objętości około 10 ml i moczu maksymalnie 100 ml (łącznie 80 próbek), przed i w okresie

trzech miesięcy po elektroresekcji guza (badanie nr I i II). Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy bez zdiagnozowanej choroby nowotworowej.

Analiza statystyczna: Analizę danych przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.3. Wyniki zostały zaprezentowane jako wartość średnia z błędem standardowym i medianą. Zgodność dystrybucji z rozkładem normalnym wyników badania krwi i moczu przed i po resekcji guza oszacowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Znamienność statystyczną oceniono przy pomocy testu nieparametrycznego - kolejności par Wilcoxa. Poziom istotności ustalono na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki: Stężenia analizowanych markerów w surowicy pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego nie różniły się i były zbliżone do wartości kontrolnych, za wyjątkiem MMP-1. W badanych próbkach moczu stężenia MMP-1, MMP-9 i MMP-15 nie różniły się względem kontroli, jednak MMP-14 było znamienne wyższe w grupie zdrowych ochotników. Wzrost stężenia po resekcji guza w surowicy chorych z BC zaobserwowano tylko w przypadku MMP-1. W próbkach moczu pacjentów odnotowano natomiast znamienny wzrost MMP-9, MMP-14, MMP-15 oraz TIMP-3 i TIMP-4 po interwencji chirurgicznej.

Wnioski: Ocena stężeń MMPs i TIMPs w surowicy pacjentów z nowotworem urotelialnym pęcherza moczowego, nie spełnia cech potencjalnego narzędzia wspomagającego diagnostykę chorych. Poziom $\alpha 2$ -makroglobuliny we krwi i moczu nie odzwierciedla zmian zachodzących w obrębie guza pęcherza moczowego i jego środowiska. Należy rozważyć jako uzupełnienie standardowej diagnostyki, ocenę zmian stężeń panelu metaloproteinaz i ich inhibitorów w moczu. Jednak ocena poziomu tylko jednego typu endopeptydazy lub TIMP ma znikomą wartość kliniczną. Wykazano, że wielkość guza nie ma wpływu na poziom poszczególnych MMPs i TIMPs w moczu. Analiza korelacji stężeń w moczu MMPs i TIMPs zarówno przed jak i po elektroresekcji guza może stanowić pomocne narzędzie diagnostyki biochemicznej. Szczególnie: MMP-15/TIMP-3; MMP-15/TIMP-4 oraz MMP-9/TIMP-1.

Słowa kluczowe: metaloproteinazy, MMPs, TIMPs, $\alpha 2$ -makroglobulina, rak pęcherza moczowego

12. Summary

According to the data published by *European Association of Urology* (EAU) bladder cancer is the seventh most frequently diagnosed type of cancer in men worldwide, simultaneously the tenth in the whole population. The incidence rates are 9,5 for men and 2,4 for women per 100 000 person-years, while the mortality rates are 3,3 vs. 0,86 respectively. The early diagnosis significantly improves the prognosis for patients. Survival rates are less favorable in invasive forms of this cancer. In the European Union countries there are certain a discrepancy in particular registers, concerning incidence of BC and the five-year survival rate indicator. It results from the varying availability of screening tests and clinical procedures, as well as the analysis of the obtained partial data. Despite significant improvements in new imaging methods and surgical procedure techniques for patients with urothelial bladder cancer that have occurred in recent years, there are certain discrepancies in the assessment of prognosis based solely on histopathological examination results. Therefore, it seems important to take up the issue of supplementing the standard diagnostics with a biochemical panel, based on which the strategy of further treatment, optimization of pharmacotherapy or the risk of metastasis in the case of *in situ* cancers could be precisely determined.

Objective: The main objective of the study was to assess the concentration of potential diagnostic profiling biomarkers in serum and urine of patients with superficial urothelial cancer of the urinary bladder: MMP-1, MMP-9, MMP-14, MMP-15 and their inhibitors (TIMPs 1-4) and α 2-macroglobulin. Then, the correlation analysis of the tested parameters and indication of the preferred material for diagnostic tests. Obtaining a multifactorial model of biomarkers that complements the standard diagnostic panel in patients with diagnosed bladder cancer.

Material and method: The study was approved by the Bioethics Committee at the Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum in Bydgoszcz on 19.01.2021 (no. KB 9/2021). Qualification for the study as well as collection and preservation of the material (serum and urine) were conducted at J.K. Łukowicz Specialist Hospital in Chojnice; Department of Urology and Urological Oncology in Chojnice in 2021-2022. For the study included patients with bladder cancer diagnosis n=20 (pTa/pT1 HG/LG), in which material for analysis was collected twice – blood in a volume of about 10 ml and urine maximum 100ml (total 80 samples), before and within three months after electroresection of the tumor (examination no. I and II). The control group consisted of healthy volunteers without diagnosed cancer.

Statistical analysis: Analysis of the data was performed by using Statistica 13.3 software. The results were presented as mean value with standard error and median. The conformity of the distribution of blood and urine test results before and after tumor resection with the normal distribution was estimated using the Shapiro-Wilk test. Statistical significance was assessed using the non-parametric Wilcoxon signed-rank test. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results: The concentration of analyzed markers in the serum of patients with bladder cancer did not differ and were similar to control values, except for MMP-1. In the tested urine samples, the concentration of MMP-1, MMP-9 and MMP-15 did not differ compared to the control group; however MMP-14 was significantly higher in the group of healthy volunteers. The increase in concentration after tumor resection in the serum of patients with BC was observed only in the case of MMP-1. In the urine samples significant increase of MMP-9, MMP-14, MMP-15 as well as TIMP-3 and TIMP-4 after surgery intervention was observed.

Conclusions: Evaluation of the concentration of MMPs and TIMPs in the serum of patients with urothelial bladder cancer, does not meet the characteristics of a potential tool supporting the diagnosis of patients. The level of α_2 -makroglobulin in blood and urine does not reflect the changes that occur within the bladder tumor and its environment. As a supplement of standard diagnostics, assessment of changes in concentration of a panel of metalloproteinases and their inhibitors in urine should be considered. However, assessment the level of only one type of endopeptidase or TIMP has poor clinical value. It has been shown that the size of the tumor does not impact for the levels of particular MMPs and TIMPs in urine. Correlation analysis of urinary MMPs and TIMPs concentration, both before and after electroresection of tumor, may be a helpful tool for biochemical diagnosis. Particularly: MMP-15/TIMP-3; MMP-15/TIMP-4 and MMP-9/TIMP-1.

Keywords: metalloproteinases, MMPs, TIMPs, α_2 -macroglobulin, bladder cancer

13. Piśmiennictwo

A

Afik R., Zigmond E., Vugman M., Klepfish M., Shimshoni E., Pasmanik-Chor M., Shenoy A., Bassat E., Halpern Z., Geiger T., Sagi I., Varol C.: Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. *J Exp Med.* 2016; 213:2315-2331.

Akbari T., Kazemi Fard T., Fadaei R., Rostami R., Moradi N., Movahedi M., Fallah S. Evaluation of MMP-9, IL-6, TNF- α levels and peripheral blood mononuclear cells genes expression of MMP-9 and TIMP-1 in Iranian patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Thorac Res.* 2023; 15(4):223-230.

Arbaningsih S.R., Syarani F., Ganie R.A., Lelo A. The levels of vitamin D, metalloproteinase-9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 in COPD patients, healthy smokers and non-smokers of Indonesian citizens. *Maced J Med Sci.* 2019; 7(13):2123-2126.

Arpino V., Brock M., Gill S.E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* 2015; 44-46:247-54.

Autenshlyus A., Davletova K., Varaksin N., Marinkin I., Lyakhovich V. Cytokines in various molecular subtypes of breast cancer. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2021; 35: 20587384211034089.

B

Babjuk M., Burger M., Comp  rat E., Gontero P., Liedberg F., Masson-Lecomte A., Mostafid A.H., Palou J., van Rhijn B.W.G., Roupr  t M., Shariat S.F., Sylvester R., Benedicte Gurses I., Wood R., Capoun O., Cohen D., Dominguez Escrig J.L., Seisen T., Soukup V. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU annual congress Amsterdam 2022. ISBN 978-94-92671-16-5.

Bakir B., Chiarella A.M., Pitarresi J.R., Rustgi A.K.: EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis. *Trends in Cell Biology.* 2022; 30(10):764–776.

Boşca A.B., Ilea A., Sorițău O., Tatomir C., Miklášová N., Pârvu A.E., Miha C.M., Melincovici C.S., Fischer-Fodor E. Modulatory effect of curcumin analogs on the activation of metalloproteinases in human periodontal stem cells. *Eur J Oral Sci.* 2019; 127(4):304-312.

Bougault V, Turmel J, Boulet LP. Serum and sputum MMP-9/TIMP-1 in winter sports athletes and swimmers: relationships with airway function. *Biomarkers.* 2022; 27(2):127-137.

Brockmeyer P., Hemmerlein B.: Epigenetic modification suppresses proliferation, migration and invasion of urothelial cancer cell lines. *Oncol Lett.* 2016; 12(3): 1693-1700.

Burger M.Z., Catto J.W., Dalbagni G., Grossman H.B., Herr H., Karakiewicz P., Kassouf W., Kiemeny L.A., La Vecchia C., Shariat S., Lotan Y.: Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 2013; 63(2): 234-241.

C

Cabral-Pacheco G.A., Garza-Veloz I., Castruita-De la Rosa C., Ramirez-Acuña J.M., Perez-Romero B.A., Guerrero-Rodriguez J.F., Martinez-Avila N., Martinez-Fierro M.L. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(24): 9739.

Cathcart J.M., Banach A., Liu A., Chen J., Goligorsky M., Cao J. Interleukin-6 increases matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) levels via down-regulation of p53 to drive cancer progression. *Oncotarget.* 2016; 7:61107-61120.

Cerofolini L., Fragai M., Luchinat C.: Mechanism and inhibition of matrix metalloproteinases. *Curr. Med. Chem.* 2019; 26: 2609–2633.

Chowdhury A., Brinson R., Wei B., Stetler-Stevenson W.G. Tissue Inhibitor of Metalloprotease-2 (TIMP-2): Bioprocess development, physicochemical, biochemical, and biological characterization of highly expressed recombinant protein. *Biochemistry.* 2017; 56(49):6423-6433.

Colt J.S., Friesen M.C., Stewart P.A., Donguk P., Johnson A., Schwenn M., Karagas M.R., Armenti K., Waddell R., Verrill C., Ward M.H., Freeman L.E., Moore L.E., Koutros S., Baris D., Silverman D.T.: A case-control study of occupational exposure to metalworking fluids and bladder cancer risk among men. *Occup Environ Med.* 2014; 71(10): 667-674.

Costa S., Ragusa M.A., Lo Buglio G., Scilabra S.D., Nicosia A.: The repertoire of tissue inhibitors of metalloproteases: evolution, regulation of extracellular matrix proteolysis, engineering and therapeutic challenges. *Life (Basel).* 2022; 12(8): 1145.

D

Deb G., Shankar E., Thakur V.S., Ponsky L.E., Bodner D.R., Fu P., Gupta S. Green tea-induced epigenetic reactivation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 suppresses prostate cancer progression through histone-modifying enzymes. *Mol Carcinog.* 2019; 58(7):1194-1207.

Dai L., Chen L., Wang W., Lin P. Resveratrol inhibits ACHN cells via regulation of histone acetylation. *Pharm Biol.* 2020; 58(1):231-238.

Diamandis E.P.: Towards identification of true cancer biomarkers. *BMC Med.* 2014; 12:156-160.

Dmytryk V., Luhovska T., Yakovlev P., Savchuk O., Halenova T., Raksha N., Ostapchenko L. Proteolytic parameter changes in the plasma of patients with bladder cancer – depending on tumor stage. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences.* 2020; 33(2):67-71.

Du H.T., Liu P. Matrix metalloproteinase 14 participates in corneal lymphangiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2016; 12(4):2120-2128.

Durkan G.C., Nutt J.E., Rajjayabun P.H., Neal D.E., Lunec J., Mellon J.K. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in voided urine samples from patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(11):3450-3456.

E

Ebrahim Q., Qi J.H., Sugimoto M., Ali M., Sears J.E., Cutler A., Khokha R., Vasanji A., Anand-Apte B. Increased neovascularization in mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 52(9):6117-6123.

F

Fan H., Chen Y., Ni B., Wang S., Sun M., Chen D., Zheng J.: Expression of MMP-1/PAR-1 and patterns of invasion in oral squamous cell carcinoma as potential prognostic markers. *Onco Targets Ther.* 2015; 8:1619-1626.

Feige J.J., Negoescu A., Keramidas M., Souhelnitskiy S., Chambaz E.M. Alpha 2-macroglobulin: a binding protein for transforming growth factor-beta and various cytokines. *Horm Res.* 1996; 45(3-5):227-32.

Forte D., Salvestrini V., Corradi G., Rossi L., Catani L., Lemoli R.M., Cavo M., Curti A. The tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) promotes survival and migration of acute myeloid leukemia cells through CD63/PI3K/Akt/p21 signaling. *Oncotarget.* 2017; 8(2):2261-2274.

Friedrich M.G., Chandrasoma S., Siegmund K.D., Weisenberger D.J., Cheng J.C., Toma M.I., Huland H., Jones P.A., Liang G. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur J Cancer.* 2005; 41(17):2769-2778.

G

Gersh I., Catchpole H.R.: Organizacja substancji podstawowej i błony podstawnej oraz jej znaczenie w chorobie i wzroście uszkodzeń tkanek. *Jestem. J. Anat.* 1949; 85: 457–521.

Gharibvand M.M., Kazemi M., Motamedfar A., Sametzadeh M., Sahraeizadeh A.: The role of ultrasound in diagnosis and evaluation of bladder tumors. *J Family Med Prim Care.* 2017; 6(4):840-843.

Gifford V., Itoh Y. MT1-MMP-dependent cell migration: proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Biochem Soc Trans.* 2019; 47(3):811-826.

Gomez D.E., Alonso D.F., Yoshiji H., Thorgeirsson U.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997; 74(2):111-22.

Gonzalez-Molina J., Gramolelli S., Liao Z., Carlson J.W., Ojala P.M., Lehti K. MMP14 in Sarcoma.: A regulator of tumor microenvironment communication in connective tissues. *Cells.* 2019; 28(9): 991.

Grimaldi AM, Lapucci C, Salvatore M, Incoronato M, Ferrari M.: Urinary miRNAs as a diagnostic tool for bladder cancer: A systematic review. *Biomedicines.* 2022; 10(11): 2766-2790.

H

Hong S.Y., Ha A.W., Kim W. Effects of quercetin on cell differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Res Pract.* 2021; 15(4):444-455.

Hoque M.O., Begum S., Brait M., Jeronimo C., Zahurak M., Ostrow K.L., Rosenbaum E., Trock B., Westra W.H., Schoenberg M., Goodman S.N., Sidransky D. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 promoter methylation is an independent prognostic factor for bladder cancer. *J Urol.* 2008; 179(2):743-747.

Hsieh H.L., Yu M.C., Cheng L.C., Chu M.Y., Huang T.H., Yeh T.S., Tsai M.M. Quercetin exerts anti-inflammatory effects *via* inhibiting tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression in normal human gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 2022; 28(11):1139-1158.

Huang H. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances. *Sensors (Basel).* 2018; 18(10): 3249.

J

Jackson H.W., Defamie V., Waterhouse P., Khokha R.: TIMPs: Versatile extracellular regulators in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2017;17: 38–53.

Jochems S.H.J., Reulen R.C., van Osch F.H.M., Witlox W.J.A., Goossens M.E., Brinkman M., Giles G.G., Milne R.L., van den Brandt P.A., White E., Weiderpass E., Huybrechts I., Hémon B., Agudo A., Bueno-de-Mesquita B., Cheng K.K., van Schooten F.J., Bryan R.T., Wesselius A., Zeegers M.P.: Fruit consumption and the risk of bladder cancer: A pooled analysis by the bladder cancer epidemiology and nutritional determinants study. *Int J Cancer*. 2020; 147(8):2091-2100.

K

Karlic H., Lohninger A. Supplementation of L-carnitine in athletes: does it make sense? *Nutrition*. 2004; 20(7-8):709-715.

Kim H., Bae S., Kim Y., Cho C.H., Kim S.J., Kim Y.J., Lee S.P., Kim H.R., Hwang Y.I., Kang J.S., Lee W.J. Vitamin C prevents stress-induced damage on the heart caused by the death of cardiomyocytes, through down-regulation of the excessive production of catecholamine, TNF- α , and ROS production in Gulo(-/-)Vit C-Insufficient mice. *Free Radic Biol Med*. 2013; 65:573-583.

Komolmit P., Kimtrakool S., Suksawatamnuay S., Thanapirom K., Chattrasophon K., Thaimai P., Chirathaworn C., Poovorawan Y. Vitamin D supplementation improves serum markers associated with hepatic fibrogenesis in chronic hepatitis C patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Sci Rep*. 2017; 7(1):8905.

Kopczyńska E., Danciewicz M., Kowalewski J., Roman Makarewicz R., Kardymowicz H., Tyrakowski T. Przydatność wskaźnika MMP-9/TIMP-1 w ocenie inwazji i przerzutowania raka płuca. *Współczesna Onkologia*. 2007; 11(7):355-360.

Kostova M.B., Brennen W.N., Lopez D., Anthony L., Wang H., Platz E., Denmeade S.R. PSA-alpha-2-macroglobulin complex is enzymatically active in the serum of patients with advanced prostate cancer and can degrade circulating peptide hormones. *Prostate*. 2018; 78(11):819-829.

Kudelski J, Młynarczyk G, Darewicz B, Bruczko-Goralewska M, Romanowicz L. Dominative role of MMP-14 over MMP-15 in human urinary bladder carcinoma on the basis of its enhanced specific activity. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99(7):e19224.

Kudelski J., Tokarzewicz A., Gudowska-Sawczuk M., Mroczko B., Chłosta P., Bruczko-Goralewska M., Mitura P., Młynarczyk G. The significance of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and metalloproteinase 2 (MMP-2) in urinary bladder cancer. *Biomedicines*. 2023; 11(3):956.

L

Laronha H., Caldeira J.: Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells*. 2020; 26;9(5):1076.

Lee H.S., Kim W.J. The role of matrix metalloproteinase in inflammation with a focus on infectious diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2022; 23:10546.

Lee J., Park H.S., Han S.R., Kang Y.H., Mun J.Y., Shin D.W., Oh H.W., Cho Y.K., Lee M.S., Park J. Alpha-2-macroglobulin as a novel diagnostic biomarker for human bladder cancer in urinary extracellular vesicles. *Front Oncol*. 2022; 12:976407.

Lee K.E., Nho Y.H., Yun S.K., Park S.M., Kang S., Yeo H. Caviar extract and its constituent DHA inhibits UVB-irradiated skin aging by inducing adiponectin production. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(9):3383.

Lee S., Koo M.H., Han D.W., Kim I.C., Lee J.H., Kim J.H., Sultana R., Kim S.Y., Youn U.J., Kim JH. Comparison of fatty acid contents and MMP-1 inhibitory effects of the two antarctic fish, *Notothenia rossii* and *Champsocephalus gunnari*. *Molecules*. 2022; 27(14):4554.

Liang S., Chang L. Serum matrix metalloproteinase-9 level as a biomarker for colorectal cancer: a diagnostic meta-analysis. *Biomark Med*. 2018; 12(4):393-402.

Liao C.H., Tsai C.W., Chang W.S., Wang Z.H., Gong C.L., Wu H.C., Wang B.R., Hsu S.W., Huang W.C., Shen T.C., Bau D.T. Association of matrix metalloproteinase-1 genotypes with bladder cancer risk. *in vivo*. 2021; 35(5): 2535-2540.

Lin C.L, Ying T.H., Yang S.F., Lin C.L., Chiou H.L., Hsieh Y.H. Magnolin targeting of the JNK/Sp1/MMP15 signaling axis suppresses cervical cancer microenvironment and metastasis via microbiota modulation. *Cancer Lett*. 2024; 583:216584.

Lizarraga F., Espinosa M., Ceballos-Cancino G., Vazquez-Santillan K., Bahena-Ocampo I., Schwarz-Cruz Y Celis A., Vega-Gordillo M., Garcia Lopez P., Maldonado V., Melendez-Zajgla J. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) regulates stemness in cervical cancer cells. *Mol Carcinog.* 2016; 55(12):1952-1961.

Lo Presti R., Hopps E., Caimi G. Gelatinases and physical exercise: A systematic review of evidence from human studies. *Medicine (Baltimore).* 2017; 96(37):e8072.

Lubis B., Lelo A., Amelia P., Prima A. The Effect of thiamine, ascorbic acid, and the combination of them on the levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in sepsis patients. *Infect Drug Resist.* 2022; 15:5741-5751.

M

Maas M, Bedke J, Stenzl A, Todenhöfer T.: Can urinary biomarkers replace cystoscopy? *World J Urol.* 2019; 37(9):1741-1749.

Malek Mahdavi A., Mahdavi R., Kolahi S. Effects of l-carnitine supplementation on serum inflammatory factors and matrix metalloproteinase enzymes in females with knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Am Coll Nutr.* 2016; 35(7):597-603.

Martin C., Leiser C.L., O'Neil B., Gupta S., Lowrance W.T., Kohlmann W., Greenberg S., Pathak P., Smith K.R., Hanson H.A.: Familial cancer clustering in urothelial cancer: A population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 2018; 110(5): 527-533.

Młynarczyk G., Kudelski J., Darewicz B., Galewska Z., Romanowicz L. Matrix metalloproteinases in urinary system tumors. Part II - Matrix metalloproteinases in urinary bladder carcinoma. *Progress in Health Sciences.* 2017; 7(1):169–174.

Mohankumar K., Francis A.P., Pajaniradje S., Rajagopalan R. Synthetic curcumin analog: inhibiting the invasion, angiogenesis, and metastasis in human laryngeal carcinoma cells via NF-kB pathway. *Mol Biol Rep.* 2021; 48(8):6065-6074.

Murphy G., Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol. Aspects Med.* 2008; 29: 290-308.

N

Naruo S., Kanayama H., Takigawa H., Kagawa S., Yamashita K., Hayakawa T. Serum levels of a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in bladder cancer patients. *Int J Urol.* 1994; 1(3):228-31.

Niland S., Riscanevo A.X., Eble J.A. Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression. *Int J Mol Sci.* 2021; 23(1):146.

Nutt J.E., Mellon J.K., Qureshi K., Lunec J. Matrix metalloproteinase-1 is induced by epidermal growth factor in human bladder tumour cell lines and is detectable in urine of patients with bladder tumours. *Br J Cancer.* 1998; 78(2): 215-220.

O

Orbe J., Rodríguez J.A., Arias R., Belzunce M., Nespereira B., Pérez-Ilzarbe M., Roncal C., Páramo J.A. Antioxidant vitamins increase the collagen content and reduce MMP-1 in a porcine model of atherosclerosis: implications for plaque stabilization. *Atherosclerosis* 2003; 167(1):45-53.

P

Papazafiropoulou A., Tentolouris N.: Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Hippokratia* 2009; 13:76–82.

Park J., Lee J, Kang Y., Mun J., Oh H., Cho Y., Lee M. Alpha-2-macroglobulin in urinary extracellular vesicles in a novel protein marker for diagnosis of human bladder cancer. 2022; 207:e38.

Peeney D., Jensen S.M., Castro N.P., Kumar S., Noonan S, Handler C, Kuznetsov A, Shih J, Tran AD, Salomon DS, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 suppresses tumor growth and metastasis in murine model of triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis.* 2020; 41(3):313-325.

Pendás A.M., Santamaría I., Alvarez M.V., Pritchard M., López-Otín C. Fine physical mapping of the human matrix metalloproteinase genes clustered on chromosome 11q22.3. *Genomics*. 1996; 37(2):266-268.

Pesch B., Taeger D., Johnen G., Gawrych K., Bonberg N., Schwentner C., Wellhäusser H., Kluckert M., Leng G., Nasterlack M., Lotan Y., Stenzl A., Brüning T; UroScreen Study Group.: Screening for bladder cancer with urinary tumor markers in chemical workers with exposure to aromatic amines. *Int Arch Occup Environ Health*. 2014; 87(7): 715-724.

Pietrzak J., Szmajda-Krygier D., Wosiak A., Świechowski R., Michalska K., Mirowski M., Żebrowska-Nawrocka M., Łochowski M., Balcerczak E. Changes in the expression of membrane type-matrix metalloproteinases genes (MMP14, MMP15, MMP16, MMP24) during treatment and their potential impact on the survival of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Biomed Pharmacother*. 2022; 146:112559.

R

Rababa'h S.Y., Alzoubi K.H., Hammad H., AlQuraan L., Rababa'h A.M. The protective role of L-carnitine on psychosocial stress-induced changes in gene expression and protein levels of matrix metalloproteinases, serum corticosterone in a rat model. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2023; 22(10):1518-1525.

Raman A., Peiffer J.J., Hoyne G.F., Lawler N.G., Currie A., Fairchild T.J. Exercise-induced responses in matrix metalloproteinases and osteopontin are not moderated by exercise format in males with overweight or obesity. *Eur J Appl Physiol*. 2023;123(5):1115-1124.

Rašková M., Lacina L., Kejík Z., Venhauerová A., Skaličková M., Kolář M., Jakubek M., Rosel D., Smetana K. Jr, Brábek J. The Role of IL-6 in cancer cell invasiveness and metastasis-overview and therapeutic opportunities. *Cells*. 2022; 11(22):3698.

Remacle A., McCarthy K., Noël A., Maguire T., McDermott E., O'Higgins N., Foidart J.M., Duffy M.J. High levels of TIMP-2 correlate with adverse prognosis in breast cancer. *Int J Cancer*. 2000; 89(2):118-21.

Rossi M., Strikoudi P., Spei M.E., Parpinel M., Serraino D., Montella M., Libra M., La Vecchia C., Rosato V.: Flavonoids and bladder cancer risk. *Cancer Causes Control*. 2019; 30(5):527-535.

Roy R., Yang J., Moses M.A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27(31):5287-97.

S

Saarialho-Kere U.K., Chang E.S., Welgus H.G., Parks W.C. Distinct localization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases expression in wound healing associated with ulcerative pyogenic granuloma. *J Clin Invest*. 1992; 90(5):1952-1957.

Sier C.F., Casetta G., Verheijen J.H., Tizzani A., Agape V., Kos J., Blasi F., Hanemaaijer R. Enhanced urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) are associated with early-stage bladder carcinoma: a comparison with clinically used tumor markers. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(6):2333-2340.

Strilakou A., Perelas A., Lazaris A., Papavdi A., Karkalousos P., Giannopoulou I., Kriebardis A., Panayiotides I., Liapi C. Immunohistochemical determination of the extracellular matrix modulation in a rat model of choline-deprived myocardium: the effects of carnitine. *Fundam Clin Pharmacol*. 2016; 30(1):47-57.

Su C.W., Lin C.W., Yang W.E., Yang S.F. TIMP-3 as a therapeutic target for cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2019; 11:1758835919864247.

Sugeeta S.S., Sharma A., Ng K., Nayak A., Vasdev N.: Biomarkers in bladder cancer surveillance. *Front Surg*. 2021; 28(8): 735868.

T

Taheri M., Shirvani-Farsani Z., Ghafouri-Fard S., Davood Omrani M. Expression profile of microRNAs in bladder cancer and their application as biomarkers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020; 131:110703.

Tasaki K, Shintani Y, Saotome T, Andoh A, Fujiyama Y, Hozawa S, Bamba T. Pro-inflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Pancreatology*. 2003; 3(5):414-21.

Teoh J.Y., Huang J., Ko W.Y., Lok V., Choi P., Ng C.F., Sengupta S., Mostafid H., Kamat A.M., Black P.C., Shariat S., Babjuk M., Wong M.C.: Global trends of bladder cancer incidence and mortality, and their associations with tobacco use and gross domestic product per capita. *Eur Urol*. 2020; 78(6):893-906.

Tower G.B., Coon C.I., Brinckerhoff C.E. The 2G single nucleotide polymorphism (SNP) in the MMP-1 promoter contributes to high levels of MMP-1 transcription in MCF-7/ADR breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 82(2):75-82.

W

Wang K., Zheng J., Yu J., Wu Y., Guo J., Xu Z., Sun X. Knockdown of MMP-1 inhibits the progression of colorectal cancer by suppressing the PI3K/Akt/c-myc signaling pathway and EMT. *Oncol Rep*. 2020; 43(4):1103-1112.

Wang K., Chen Z., Shi J., Feng Y., Yu M., Sun Y., Zhuang Q., Liang B., Luo G., Xu X., Fan M. Resveratrol inhibits the tumor migration and invasion by upregulating TET1 and reducing TIMP2/3 methylation in prostate carcinoma cells. *Prostate*. 2020; 80(12):977-985.

Wang Q.M., Lv L., Tang Y., Zhang L., Wang L.F. MMP-1 is overexpressed in triple-negative breast cancer tissues and the knockdown of MMP-1 expression inhibits tumor cell malignant behaviors *in vitro*. *Oncol Lett*. 2019; 17(2):1732-1740.

Whitehead I. Kirk H., Kay R. Expression cloning of oncogenes by retroviral transfer of cDNA libraries.: *Mol Cell Biol*. 1995; 15(2):704–710.

Wieczorek E., Jablonowski Z., Tomasik B., Konecki T., Jablonska E., Gromadzinska J., Fendler W., Sosnowski M., Wasowicz W., Reszka E. MMP, VEGF and TIMP as prognostic factors in recurring bladder cancer. *Clin Biochem*. 2015; 48(18):1235-40.

Wirl G., Frick J. Collagenase - a marker enzyme in human bladder cancer? Urol Res. 1979; 22; 7(2):103-108.

Witlox W.J.A, van Osch F.H.M., Brinkman M., Jochems S., Goossens M.E., Weiderpass E., White E., van den Brandt P.A., Giles G.G., Milne R.L., Huybrechts I., Adami H.O., Bueno-de-Mesquita B., Wesselius A., Zeegers M.P.: An inverse association between the mediterranean diet and bladder cancer risk: a pooled analysis of 13 cohort studies. Eur J Nutr. 2020; 59(1):287-296.

Won HR, Lee P, Oh SR, Kim YM. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of TNF- α -Induced MMP-1 via MAPK/ERK signaling pathways in human dermal fibroblasts. Biol Pharm Bull. 2021; 44(1):18-24.

Wu G.J., Bao J.S., Yue Z.J., Zeng F.C., Cen S., Tang Z.Y., Kang X.L. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 is associated with bladder cancer pathogenesis. J Cancer Res Ther. 2018; 14(Supplement):S54-S59.

V

Vandooren J., Itoh Y. Alpha-2-macroglobulin in inflammation, immunity and infections. Front Immunol. 2021; 12:803244.

Vieira A.R., Vingeliene S., Chan D.S., Aune D., Abar L., Navarro Rosenblatt D., Greenwood D.C., Norat T.: Fruits, vegetables, and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. Cancer Med. 2015; 4(1): 136-146.

Y

Yabluchanskiy A., Ma Y., Iyer R.P., Hall M.E., Lindsey M.L. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. Physiology (Bethesda). 2013; 28(6):391-403.

Yadav L., Puri N., Rastogi V., Satpute P., Ahmad R., Kaur G.: Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2014; 15(3): 1085–1109.

Yamada E., Tobe T., Yamada H., Okamoto N., Zack D.J., Werb Z., Soloway P.D., Campochiaro P.A. TIMP-1 promotes VEGF-induced neovascularization in the retina. *Histol Histopathol.* 2001; 16(1):87-97.

Yan Y., Liang H., Li T., Li M., Li R., Qin X., Li S. The MMP-1, MMP-2, and MMP-9 gene polymorphisms and susceptibility to bladder cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014; 35(4):3047-3052.

Yu J, Xu Z, Guo J, Yang K, Zheng J, Sun X. Tumor-associated macrophages (TAMs) depend on MMP1 for their cancer-promoting role. *Cell Death Discov.* 2021; 7(1):343.

Z

Zamilpa R., Ramirez T.A., Dai Q., Dayah T., Nguyen N., Zhang J., Ahuja S.S., D'Armiento, Jin Y.F., Lindsey M.L.: MMP-9 overexpression in macrophages regulates the post-myocardial infarction inflammatory response through SCYE1. *FASEB J.* 2012; 26(Suppl):399.2.

Zdanowicz K., Kowalczyk-Kryston M., Olanski W., Werpachowska .I, Mielech W., Lebensztejn D.M. Increase in serum MMP-9 and TIMP-1 concentrations during alcohol intoxication in adolescents- a preliminary study. *Biomolecules.* 2022; 12(5):710.

Zeng F.C., Cen S., Tang Z.Y., Kang X.L. Elevated matrix metalloproteinase-9 expression may contribute to the pathogenesis of bladder cancer. *Oncol Lett.* 2016; 11(3):2213-2222.

Zhang L., Chi J., Chen J., Jiang S., Wu D. Effects of swimming on the development of atherosclerosis in mice. *Am J Transl Res.* 2021; 13(12):13759-13767.

Zhang W., Huang X., Huang R., Zhu H., Ye P., Lin X., Zhang S., Wu M., Jiang F. MMP1 Overexpression promotes cancer progression and associates with poor outcome in head and neck carcinoma. *Comput Math Methods Med.* 2022; 5:3058342.

Zhang X., Zhang Y. Bladder cancer and genetic mutations. *Cell Biochem Biophys.* 2015; 73(1): 65-69.

Zhang X., Fan J., Guo F., Huang H., Xue J., Wu X., Li T. Effect of kaempferol on the biological behavior of human colon cancer via regulating MMP1, MMP2, and MMP9. *J Oncol.* 2022; 2022:2841762.

14. Spis rycin

Ryc. 1. Rak urotelialny pęcherza moczowego (28 mm, pT1; high grade) – materiał własny.

Ryc. 2. Rak urotelialny pęcherza moczowego (11mm, pTa; low grade) – materiał własny.

Ryc. 3. Struktura przestrzenna MMP-1

Ryc. 4. Struktura przestrzenna MMP-9

Ryc. 5. Struktura przestrzenna MMP-14 (a) i MMP-15 (b)

Ryc. 6. Analiza wieku i płci pacjentów uczestniczących w badaniu.

Ryc. 7. Analiza masy ciała oraz BMI [kg/m²] pacjentów uczestniczących w badaniu.

Ryc. 8. Stężenie MMP-1 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ryc. 9. Stężenie MMP-9 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ryc. 10. Stężenie MMP-14 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ryc. 11. Stężenie MMP-15 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ryc. 12. Stężenie TIMP-1 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ryc. 13. Stężenie TIMP-2 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ryc. 14. Stężenie TIMP-3 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ryc. 15. Stężenie TIMP-4 [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ryc. 16. Stężenie $\alpha 2$ makroglobuliny [ng/ml] w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ryc. 17. Stężenie MMP-1 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ryc. 18. Stężenie MMP-9 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

Ryc. 19. Stężenie MMP-14 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.

- Ryc. 20. Stężenie MMP-15 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.**
- Ryc. 21. Stężenie TIMP-1 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.**
- Ryc. 22. Stężenie TIMP-2 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.**
- Ryc. 23. Stężenie TIMP-3 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.**
- Ryc. 24. Stężenie TIMP-4 [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.**
- Ryc. 25. Stężenie $\alpha 2$ makroglobuliny [ng/ml] w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.**
- Ryc. 26. Ocena korelacji pomiędzy stężeniami MMPs, TIMPs oraz $\alpha 2$ makroglobuliny w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego przed operacją (badanie nr I) – korelacja rang Spearmana.**
- Ryc. 27. Ocena korelacji pomiędzy stężeniami MMPs, TIMPs oraz $\alpha 2$ makroglobuliny w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego po elektroresekcji guza (badanie nr II).**
- Ryc. 28. Analiza korelacji pomiędzy stężeniami MMPs, TIMPs oraz $\alpha 2$ makroglobuliny w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego przed elektroresekcją guza (badanie nr I).**
- Ryc. 29. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-1 a MMP-9 w moczu pacjentów przed elektroresekcją guza (badanie nr I).**
- Ryc. 30. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-1 a $\alpha 2$ makroglobuliną w moczu pacjentów przed elektroresekcją guza (badanie nr I).**
- Ryc. 31. Ocena korelacji pomiędzy stężeniami MMPs, TIMPs oraz $\alpha 2$ makroglobuliny w moczu pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego po elektroresekcji guza (badanie nr II).**
- Ryc. 32. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-3 a MMP-15 w moczu pacjentów po elektroresekcji guza (badanie nr II).**
- Ryc. 33. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-4 a MMP-15 w moczu pacjentów po elektroresekcji guza (badanie nr II).**
- Ryc. 34. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-1 a MMP-9 w surowicy pacjentów przed elektroresekcją guza (badanie nr I).**

- Ryc. 35. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-1 a MMP-9 w surowicy pacjentów po elektroresekcji guza (badanie nr II).
- Ryc. 36. Korelacja pomiędzy stężeniem TIMP-1 a MMP-9 w moczu pacjentów po elektroresekcji guza (badanie nr II).
- Ryc. 37. Wygojona blizna po elektroresekcji raka pęcherza moczowego (guz 11 mm pTa, *low grade*)
- Ryc. 38. Rak uroterialny pęcherza moczowego 28 mm, pT1, *high grade*
- Ryc. 39. Sześć tygodni po operacji guza pęcherza moczowego (rak uroterialny 23 mm pTa, *low grade* - ściana prawa pęcherza moczowego.
- Ryc. 40. Cztery tygodnie po operacji raka pęcherza moczowego – lewa ściana pęcherza (28 mm pT1, *low grade*) - pęcherz moczowy gładkościenny.
- Ryc. 41. Gojąca się rana trzy tygodnie po doszczętnej elektroresekcji raka pęcherza moczowego (guz 3 cm, pT1, *high grade*, ściana lewa pęcherza moczowego).

15. Spis tabel

Tabela 1. Powinowactwo inhibitorów metaloproteinaz tkankowych TIMPs do MMPs.

Tabela 2. Korelacje rang Spearmana dla poszczególnych markerów we krwi a wielkość guza.

Tabela 3. Korelacje rang Spearmana dla poszczególnych markerów w moczu a wielkość guza.

16. Załączniki

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy

KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 9/2021

Bydgoszcz, 19.01.2021 r.

Działając na podstawie art.29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzenia Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu 19.01.2021 r. przeanalizowała wniosek, który złożył kierownik badania:

dr hab. n. med. Michał Wiciński, prof. UMK
Katedra Farmakologii i Terapii
Szpital Uniwersytecki nr 1 w Bydgoszczy

z zespołem w składzie

- dr hab. n. med. Michał Wiciński, prof. UMK, dr n. med. Stanisław Wroński,
lek. med. Marcin Kurant, lek. med. Paweł Wroński, Małgorzata Gołębiewska,
Małgorzata Kasprzak, Liliana Baran,

w sprawie badania:

„Oznaczenie aktywności MMPs i ich inhibitorów oraz innych potencjalnych markerów diagnostycznych u pacjentów z powierzchownym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania na piśmie uczestników badania w tym również uczestników stanowiących grupę kontrolną o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania, a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej pozytywnej opinii o badaniu;
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- UWAGA! Uczestnicy badania stanowiący grupę kontrolną nie mogą być rekrutowani spośród studentów lub pracowników podlegających zależności służbowej lub dydaktycznej z badaczami.
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych uczestników badania, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu w ramach jednego dokumentu.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także klauzulę, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, zgodnie z obowiązującym prawem (RODO).

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty podjęcia uchwały (19.01.2021 r.) do końca 2023 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

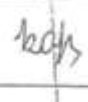
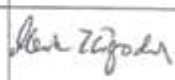
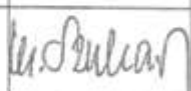
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

dr hab. n. med. Michał Wiciński, prof. UMK
Katedra Farmakologii i Terapii
Szpital Uniwersytecki nr 1 w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 19.01.2021 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący <i>medycyna sądowa</i>	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	Z – ca przewodniczącego <i>prawniczka</i>	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	<i>pediatra, alergologia i gastroenterologia dziecięca</i>	
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń	<i>pediatria, nefrologia</i>	
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec	<i>położnictwo, ginekologia onkologiczna</i>	
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk	<i>chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna</i>	
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK	<i>organizacja ochrony zdrowia, otolaryngologia</i>	
8.	Prof. dr hab. n. med. Maria Kłopotka	<i>choroby wewnętrzne, gastroenterologia</i>	
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM	<i>duchowny</i>	
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska	<i>pediatria, choroby płuc</i>	
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka	<i>prawniczka</i>	
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk	<i>farmaceutka</i>	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	<i>pielęgniarka</i>	