

PLA полиморфизм гена *GP3A* — новый прогностический фактор рака почки

О.Б. Лоран¹, А.В. Серегин¹, Г.И. Мяндина²,
К.Ю. Кашинцев¹, Н.А. Шуститский¹, А.А. Серегин¹

¹Кафедра урологии и хирургической андрологии РМАПО, Москва;

²кафедра биологии и общей генетики РУДН, Москва

PLA POLYMORPHISM OF GP3A GENE IS A NEW PROGNOSTIC FACTOR OF RENAL CANCER

O.B. Loran, A.V. Seregin, G.I. Myandina, K. Yu. Kashintsev, N.A. Shustitsky, A.A. Seregin

Urology Department, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia

Introduction & Objectives. Cell adhesion molecules play an important role in the pathogenesis of renal cell carcinoma (RCC). Glycoprotein IIIa gene (*gp3A*) encodes the beta chain of integrin receptor and contains *PIIIA* (Leu33Pro) polymorphism. The authors have earlier investigated a role of *GP3A* polymorphism in prostate cancer and determined that the *PLA2* polymorphism of *gp3A* gene increased the risk of prostate cancer development and invasion. The aim of the study was to examine an association of *PLA* polymorphism with sporadic RCC patients in the Moscow region.

Material and methods. We determined the genotype of *gp3A* of 100 patients with RCC and 30 age-matched controls, by using polymerase chain reaction was used.

Results. The distribution of *PLA* polymorphism in the Moscow population was 76% of *PLA1/A1* allele, 22% of *PLA1/A2* allele and 2% of *PLA2/A2* allele.

Sixty (60%) patients with RCC had *PLA1/A1* allele, 33 (33%) had *PLA1/A2* allele and 4 (4%) had *PLA2/A2* allele. The frequency of *PLA1/A2* allele was significantly higher in RCC patients (33%) than in the population (22%) ($p < 0,02$). Analyzing the genotype subject to TNM stage in patients with localized cancer ($T1-2N0M$), allele *PLA1/A1* was determined in 27 (60%), *PLA1/A2* in 15 (35,6%), and *PLA2/A2* in 2 (4,4%). Among the patients with invasive cancer ($T3-4N0-2M0$), 23 (82,1%) and 5 (17,9%) had *PLA1/A1* allele and *PLA1/A2*, respectively. Also, 13 (48%) patients of those with metastatic cancer had *PLA1/A1*; 12 (44,5%) and 2 (7,5%) had *PLA1/A2* and *PLA2/A2* alleles, respectively. As for the metastatic group, the frequency of *PLA1/A2* genotype was significantly higher (44,5%) than that in the population (22%) ($p = 0,02$).

The OR RCC development for *PLA1/A2* genotype as compared to *PLA1/A1* was 2,1 for localized cancer and 3,17 for the metastatic group.

Conclusions. *PLA2* polymorphism of *gp3A* gene increases the risk of RCC and metastasis. The course of RCC in patients carrying *PLA2* polymorphism is characterized by a more rapid metastatic progression. Comparison of the results of the invasive and metastatic groups can lead to some conclusions. *PLA2* polymorphism may be of more considerable importance in metastatic processes than in the development of RCC. The determination of *PLA* polymorphism seems to be a new predictor of RCC and it is useful and suitable for screening of high-risk patients.

На долю рака почки (РП) приходится 3% от всех онкологических новообразований; он занимает одно из ведущих мест по темпам прироста среди онкоурологических заболеваний. Приблизительно у половины пациентов болезнь приобретает системный характер в разные сроки после оперативного лечения [1—3]. РП практически нечувствителен к традиционной химио- и лучевой терапии; иммунотерапия же, единственный практически значимый до недавнего времени вид системного лечения, эффективна лишь в небольшом проценте случаев [4]. Таким образом, интерес к исследованиям в сфере молекулярно-генетических изменений при РП вызван как необходимостью разработки новых этиопатогенетически обоснованных методов терапии почечно-клеточного рака, так и возможностью выработки более эффективных подходов к диагностике и прогнозированию клинического течения РП.

В настоящее время на разных стадиях испытаний клинической эффективности находятся такие потенциальные молекулярно-генетические маркеры, как ферритин, индекс апоптоза, p53, Ki-67, гелсолин, СА IX, СА XII, PTEN, ЕрСАМ, гамма-энолаза, CD44, CD95, MN/СА9, кадхерин-6, виментин, муцин-1 и парвалбумин [5—7].

Одним из направлений исследований является изучение влияния клеточно-клеточного и клеточно-матриксного взаимодействия, определяемого свойствами молекул клеточной адгезии (МКА) на процессы канцерогенеза. Основные функции МКА — осуществление пространственных связей «клетка — клетка» и «клетка — внеклеточный матрикс», а также участие в процессах «сигналинга» (передача сигналов между клетками и внеклеточным матриксом), что влияет на движение, пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и другие функции клетки [8, 9] (рис. 1).

МКА представлены четырьмя суперсемействами: кадхерины, селектины, иммуноглобулины и интегрины. Ген гликопротеина 3А (*GP3A*) кодирует β -3 субъединицу интегринавого рецептора и может быть рассмотрен как объект изучения влияния МКА на онкогенез РП. *GP3A* содержит PLA (Leu33Pro) полиморфизм и представлен двумя аллельными формами — PLA1 и PLA2 [10]. Ранее нами было продемонстрировано повышение относительного риска заболеваемости раком предстательной железы у носителей гетерозиготного генотипа *PLA1A2* в 2,3 раза при сравнении с носителями генотипа *PLA1A1* [11]. Целью данной работы явилось определение клинического значения PLA полиморфизма гена *GP3A* при РП.

Материалы и методы

В наше исследование были включены 100 больных почечно-клеточным раком (средний возраст 61,3 года; соотношение мужчины/женщины 1,13/1,0), которые получали лечение в урологической клинике РМАПО на базе ГКБ им. Боткина в период с ноября 2005 г. по ноябрь 2006 г., и 30 пациентов с мочекаменной болезнью, доброкачественной гиперплазией предстательной железы или воспалительными заболеваниями мочевых путей, составивших группу контроля. Диагноз РП был установлен на основе комплексного обследования (УЗИ в режимах цветного и энергетического доплеровского картирования, компьютерная томография — КТ — почек, по показаниям — экскреторная урография, магнитно-резонансная томография — МРТ — почек и костей скелета, рентгенография костей скелета, КТ легких) и последующего гистологического

исследования опухоли с определением степени дифференцировки опухоли.

Произведен анализ аллельного распределения *GP3A* по группам сравнения, составленным исходя из стадии TNM и степени клеточной анаплазии (G). При сравнении по стадии TNM в 1-ю группу ($n=47$) вошли пациенты с локализованным РП (T1—2N0M0), во 2-ю ($n=28$) — пациенты с местно-распространенным процессом (T3a—4N1—2M0), 3-ю ($n=25$) — больные с метастатическим РП (TxNxM+). Степень клеточной анаплазии была определена только у 96 пациентов, оперированных в нашей клинике, так как 4 пациента были оперированы в более ранние сроки в других клиниках и информации о степени злокачественности их опухолей мы не имели. Пациентов с высокодифференцированными опухолями (G1) было 23, умеренно дифференцированными (G2) — 47, низкодифференцированными (G3—4) — 26.

Для определения генотипа пациентов по *GP3A* использовалась методика полимеразной цепной реакции (ПЦР). Фрагмент *GP3A*, содержащий области анализируемого полиморфизма, получали в ходе ПЦР-амплификации при помощи олигонуклеотидных пар праймеров с последовательностями 5-ttctgattgtctggactctctt-3 и 5-tctctccscatggcgaagagt-3; для идентификации точечной замены в гене использовали олигонуклеотидный зонд cttacaggcsctgcctc.

Достоверность различия распределения относительных частот гена *GP3A* в исследуемых группах от популяционных значений проводили по методике сравнения наблюдаемых и ожидаемых значений (χ^2) и t -критерия достоверности Стьюдента, значение $p<0,05$ считалось статистически достоверным.

Результаты

Первоначально мы установили, что аллельное распределение *GP3A* в контрольной группе не отличалось от популяционного. Популяционные значения распределения PLA полиморфизма составляют 76% для носителей генотипа *PLA1A1*, 22% — *PLA1A2* и 2% — *PLA2A2* [10]. У пациентов, страдающих раком почки, аллельное распределение PLA полиморфизма статистически значимо отличалось от популяционного: генотип *PLA1A1* выявлен у 63 (63%; 95% ДИ 53,4—72,6) больных РП, генотип

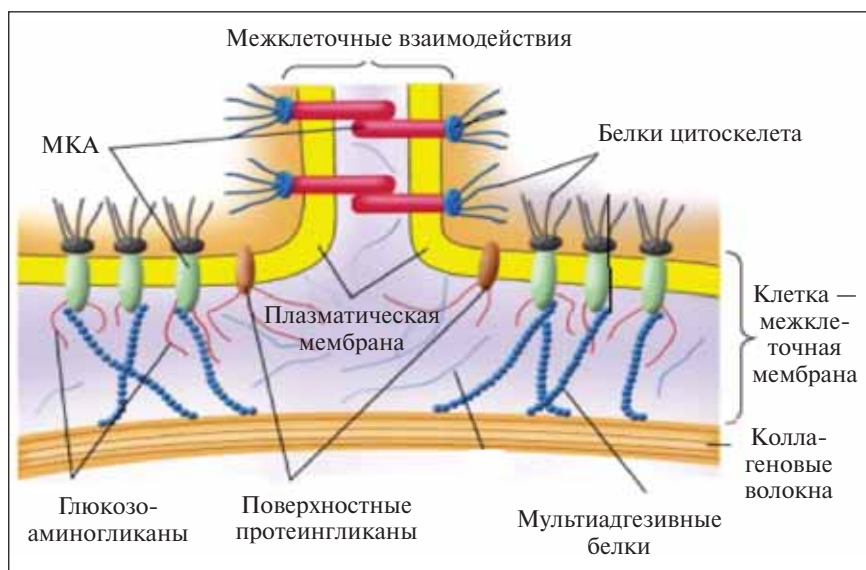


Рис. 1. Структура и функции МКА

PLA1A2 — у 33 (33%; 95% ДИ 23,6–42,4), генотип *PLA2A2* — у 4 (4%; 95% ДИ 0,08–7,92). При анализе наблюдаемых и ожидаемых частот аллельное распределение гена *GP3A* у больных почечно-клеточным раком статистически значимо отличалось от такового в популяции ($p < 0,05$; см. таблицу).

При анализе распределения аллелей *GP3A* в зависимости от стадии заболевания были получены следующие результаты (рис. 2): в группе больных локализованным РП выявлено 28 (59,5%; 95% ДИ 45,3–73,7) носителей генотипа *PLA1A1*, 17 (36,2%; 95% ДИ 22,6–49,8) носителей генотипа *PLA1A2* и 2 (4,3%; 95% ДИ 0–10,28) носителя генотипа *PLA2A2*. В группе местно-распространенного РП генотип *PLA1A1* выявлен у 23 (82,1%; 95% ДИ 67,3–96,9) пациентов, *PLA1A2* — у 5 (17,9%; 95% ДИ 3,1–32,7), а в группе пациентов с метастатическим РП у 12 (48%; 95% ДИ 27,8–68,7) пациентов выявлен генотип *PLA1A1*, у 11 — *PLA1A2* (44%; 95% ДИ 24,4–65,1), у 2 — *PLA2A2* (8%; 95% ДИ 1–26).

При оценке относительного риска установлено, что у пациентов с генотипом *PLA1A2* относительный риск развития РП в 1,8 раза (95% ДИ 1,44–2,23) выше, чем у носителей генотипа *PLA1A1*. Кроме того, относительный риск развития метастатической формы почечно-клеточного рака у носителей генотипа *PLA1A2* возрастает в 3,17 раза (95% ДИ 2,02–4,9) по сравнению с носителями генотипа *PLA1A1*.

Аллельное распределение (в %) *GP3A* при РП в группе контроля и в популяции

Группа	<i>A1A1</i>	<i>A1A2</i>	<i>A2A2</i>	<i>p</i>
РП (100)	63 (63)	33 (33)	4 (4)	< 0,05
Контроль (30)	73,4 (22)	23,3 (7)	3,3 (1)	0,85
Популяция	76	22	2	—

Примечание. В скобках — число больных.

При анализе аллельного распределения *GP3A* в зависимости от степени дифференцировки получены следующие данные (рис. 3): в группе пациентов с высокой степенью клеточной анаплазии (G1) генотип *PLA1A1* обнаружен у 16 человек (69,6%; 95% ДИ 47,1–86,8), *PLA1A2* — у 5 (21,7%; 95% ДИ 7,5–43,7), *PLA2A2* — у 2 (8,7%; 95% ДИ 0,1–21,9). При умеренно дифференцированном РП (G2) генотип *PLA1A1* выявлен у 27 (57,4%; 95% ДИ 50,2–64,6) больных, *PLA1A2* — у 18 (38,3%; 95% ДИ 31,2–45,4), *PLA2A2* — у 2 (4,3%; 95% ДИ 1,35–7,3), а при выраженной степени клеточной анаплазии (G3–4) генотип *PLA1A1* был выявлен у 16 (61,5%; 95% ДИ 40,6–79,8) больных, *PLA1A2* — у 10 (38,5%; 95% ДИ 20,2–59,4).

Аллельное распределение *GP3A* при высокодифференцированном почечно-клеточном раке (G1) статистически не отличается от популяционного ($p = 0,94$). При РП умеренной (G2) степени дифференцировки статистически достоверно повышается частота носительства генотипа *PLA1A2*, а *PLA1A1* соответственно снижается ($p < 0,05$), в группе же низкодифференцированных

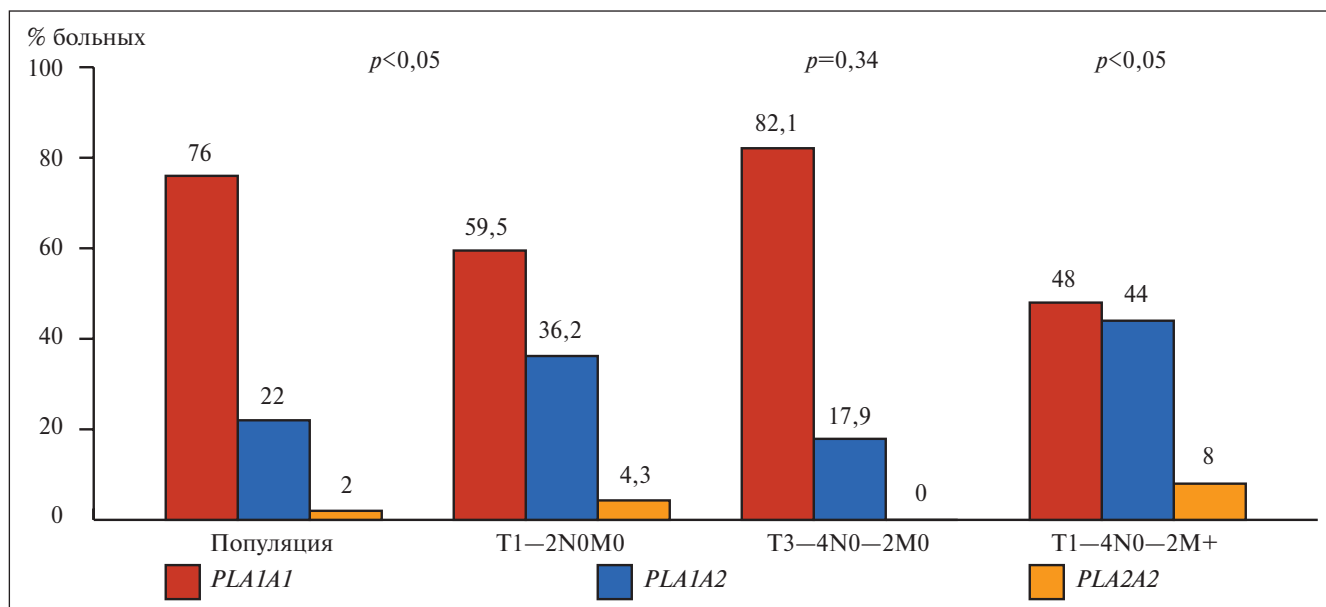


Рис. 2. Зависимость аллельного распределения *GP3A* от стадии TNM у больных РП

(G3—4) опухолей достоверных различий не выявлено ($p=0,07$), что могло быть связано с небольшим размером выборки. При объединении для анализа пациентов 2-й и 3-й групп оказалось, что при опухолях со степенью дифференцировки ниже G1 имеется статистически достоверное различие аллельного распределения PLA полиморфизмов *GP3A* в сравнении с популяционными величинами ($p<0,05$).

Обсуждение

Изучение молекулярно-генетических изменений, происходящих при РП, преследует две основные цели. Первая — разработать новые подходы к системному лечению РП; так, например, уже начальное понимание некоторых аспектов онкогенеза позволило создать принципиально новую группу препаратов, уже используемую для терапии РП — ингибиторы неангиогенеза (сорafenиб, сунитиниб, бевацизумаб, эрлотиниб) [12]. Второй целью является разработка на основе знания молекулярной биологии РП новых генетико-протеомических номограмм, способных заменить имеющиеся в настоящий момент так называемые классические факторы прогноза.

Появление и рост раковой опухоли — процесс комплексный и многоэтапный, в котором участвует множество генов, ответственных за определенные процессы, происходящие в клетке. Даже при наличии такого хорошо изученного гена-супрессора, каким является *VHL*, имеются многочисленные указания на наличие иного *VHL*-независимого пути канцерогенеза почечно-клеточного рака. Так, W. Huber и соавт. [13] описывают 389 генов и порядка 1700 белковых фрак-

ций, показатели которых изменяются в клетках почечно-клеточного рака в сравнении с нормальными тканями почки.

В связи с этим изучение генов МКА, ответственных за передачу сигналов на уровне «клетка — клетка» и «клетка — межклеточный матрикс», является одним из возможных перспективных направлений использования уже имеющихся сведений о молекулярной биологии раковой опухоли. Опухоль в своем развитии вынуждена использовать нормальные регуляторные и метаболические механизмы клеточных взаимоотношений, следовательно, нормальные генетические варианты (аллельные полиморфизмы) становятся одним из факторов, способных определять возникновение, развитие и исход ракового заболевания. Этиологию РП нельзя объяснить аллельными полиморфизмами в отдельных локусах. В настоящее время наиболее активно изучается значение аллельных полиморфизмов таких суперсемейств МКА, как кадхерины и иммуноглобулины, роль интегринов изучена в меньшей степени. По имеющимся сведениям, наиболее часто клетки почечно-клеточного рака используют комплексы *альфа-3 — бета-1* и *альфа-6 — бета-1*, прослеживается корреляция со степенью дифференцировки опухоли: так, при высокой дифференцировке наиболее часто встречается *альфа-6 — бета-1*, а при G3 (низкодифференцированные опухоли) — *альфа-3 — бета-1* [14].

Проведенное нами исследование показало, что носительство генотипа *PLA1A2* является неблагоприятным фактором как возникновения, так и дальнейшего течения РП. В настоящий мо-

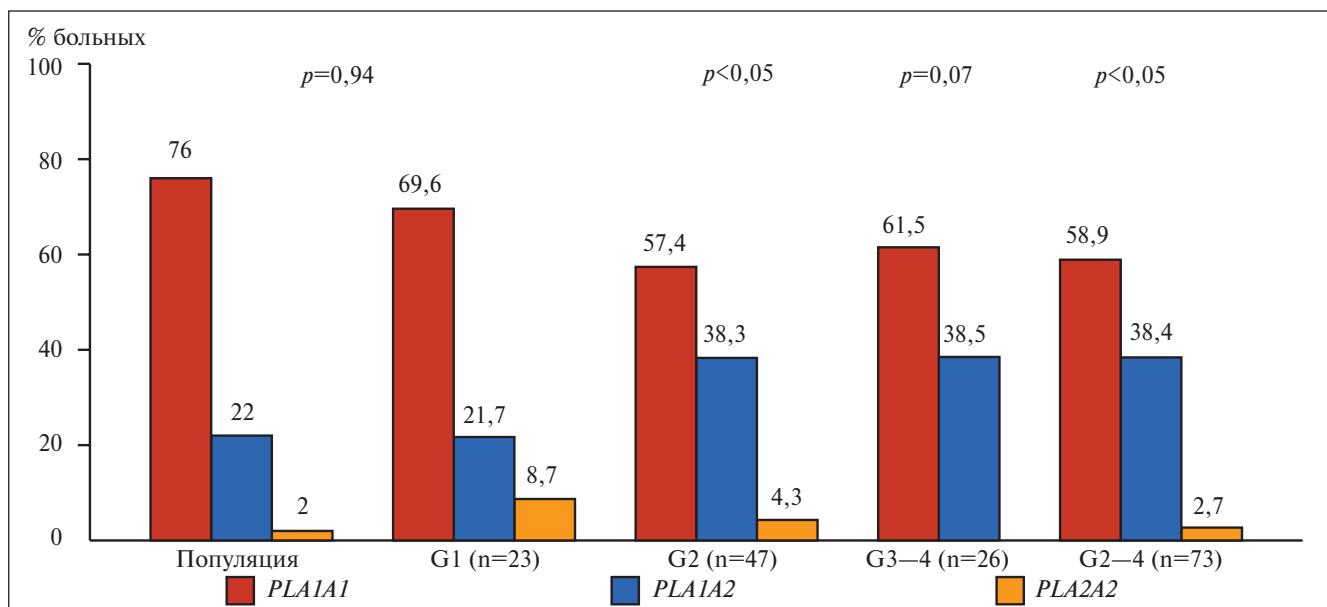


Рис. 3. Распределение генотипа PLA в зависимости от степени клеточной анаплазии (Grade)

мент результаты многих исследований, посвященных проблемам генетики РП, носят противоречивый характер. Это обусловлено как методологическими недоработками, так и несоблюдением размеров исследуемой выборки. Также иногда для анализа используются группы, подобранные по принципу максимального удобства их набора (пациенты одной клиники, члены их семей, доноры и т.д.), что не может быть популяционно значимым. Будущее генетических исследований при РП — за многоцентровыми исследованиями ассоциаций аллельных полиморфизмов, способных объяснить весь многоступенчатый характер патогенеза неопластического процесса в почке. Без сомнения, появление и прогрессия почечно-клеточного рака являются результатом целой серии генетических изменений, и дальнейшие исследования должны выявить все эти ключевые события для объяснения особенностей клинического течения РП.

Наши результаты еще раз подтверждают целесообразность изучения аллельных полиморфизмов генов МКА в возникновении и прогрес-

сии злокачественных новообразований. Накопление сведений о генетических изменениях при РП и осмысление их участия в многоступенчатых процессах канцерогенеза, происходящих в почке, может быть использовано в создании новых препаратов этио- и патогенетически направленного действия, а также компьютерных алгоритмов прогнозирования течения злокачественного процесса в почке, определении на их основе оптимального вида лечения и тактики послеоперационного ведения пациентов.

Заключение

Проведенное нами исследование показало, что у носителей гетерозиготного генотипа *PLA1A2* гена *GP3A* относительный риск развития РП выше, чем у носителей генотипа *PLA1A1*. Кроме того, установлено, что носительство аллели *PLA2* способствует как развитию более низкодифференцированной раковой опухоли почки, так и приобретению ею метастатического фенотипа. В связи с этим целесообразным представляется дальнейшее изучение особенностей влияния генотипа *GP3A* на клиническое течение РП.

Литература

1. Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями мочевых и мужских половых органов в России в 2003 г. Онкоурология 2005;(1):6—9.
2. Atkins M.B., Avigan D.E., Bukowski R.M. et al. Innovations and challenges in renal cancer: consensus statement from the first international conference. Clin Cancer Res 2004;10(18 Pt 2):6277S—81S.
3. Linehan W.M., Zbar B. Focus on kidney cancer. Cancer Cell 2004;6(3):223—8.
4. Atkins M.B., Regan M., McDermott D. Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. Clin Cancer Res 2004;10(18 Pt 2):6342S—6S.
5. Potter C., Harris A.L. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumor hypoxia, survival pathway and therapy target. Cell Cycle 2004;3:164—7.
6. Bamias A., Chorti M., Deliveliotis C. et al. Prognostic significance of CA 125, CD 44 and epithelial membrane antigen in renal cell carcinoma. Urology 2003;62(2):368—73.
7. Kim H.L., Stigson D., Liu X. et al. Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. J Urol 2005;173(5):1496—501.
8. Syrigos K.N., Harrington K.J., Pignatelli M. et al. Role of adhesion molecules in bladder cancer: an important part of the jigsaw. Urology 1999;53(2):428—34.
9. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 1991;22(251):1451—5.
10. Bojesen S.E., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B.G. Integrin Leu33Pro homozygosity and risk of cancer. J Natl Cancer Inst 2003;95:1150—7.
11. Серегин А.А. Клиническое значение аллельного распределения гена *GP3A* при раке предстательной железы. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2005.
12. Staehler M., Rohman K., Haseke N., Stief C.G. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. Curr Drug Targets 2005;6(7):835—46.
13. Huber W., Boer J.M., von Heydeberck A. et al. Transcription profiling of renal cell carcinoma. Verh Dtsch Ges Pathol 2002;86:153—64.
14. Wechsel H.W., Petri E., Feil G. et al. Renal cell carcinoma: immunohistological investigation of expression of the integrin alpha v beta 3. Anticancer Res 1999;19(2C):1529—32.

В Н И М А Н И Е !

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

В Издательском доме «АБВ-пресс» готовится к печати книга проф. А.С. Переверзева и проф. М.И. Когана «ИНФЕКЦИИ И ВОСПАЛЕНИЕ В УРОЛОГИИ».

В книге рассматриваются проблемы инфекций в урологии. Охарактеризованы особенности развития и размножения микрофлоры, в том числе процессы тропизма и адгезии. Обсуждаются антибактериальное и комплементарные виды лечения. Особое внимание уделено высокой вариабельности восприимчивости микроорганизмов к антибиотикам. Пропагандируется новый подход к антибактериальному лечению — от эмпирического выбора к доказательным принципам.

Заказать книгу можно по тел.: (495) 252 96 19,
а также на сайте: www.netoncology.ru; www.abvgrp.ru