

## Молекулярно-генетические маркеры как факторы прогноза течения поверхностного рака мочевого пузыря

А.Ю. Бабаян<sup>1,4</sup>, С.В. Башкатов<sup>2</sup>, О.Б. Карякин<sup>2</sup>, А.А. Теплов<sup>3</sup>,  
М.П. Головащенко<sup>3</sup>, В.В. Шкарупо<sup>1,4</sup>, Д.В. Залетаев<sup>1,4</sup>, М.В. Немцова<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>НИИ молекулярной медицины ММА им. И.М. Сеченова; <sup>2</sup>МРНЦ РАМН, Обнинск;

<sup>3</sup>МНИОИ им. П.А. Герцена; <sup>4</sup>Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

### MOLECULAR GENETIC MARKERS AS PREDICTORS OF SUPERFICIAL BLADDER CANCER

A.Yu. Babayan<sup>1,4</sup>, S.V. Bashkatov<sup>2</sup>, O.B. Karyakin<sup>2</sup>, A.A. Teplov<sup>3</sup>,

M.P. Golovashchenko<sup>3</sup>, V.V. Shkarupo<sup>1,4</sup>, D.V. Zaletayev<sup>1,4</sup>, M.V. Nemtsova<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Molecular Medicine, I.M. Sechenov Moscow Medical Academy;

<sup>2</sup>Medical Radiology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Obninsk; <sup>3</sup>P.A. Herzen Moscow Research Institute of Oncology; <sup>4</sup>Medical Genetic Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

*A system of clinical and morphological criteria is currently used to determine the pattern of superficial bladder cancer (SBC). However, this system does not completely reflect the clinical potential of SBC and needs additional markers. The purpose of this study was to search for and evaluate molecular genetic disorders as additional markers of the course of SBC. The diagnostic panel included the deletion of the loci 3p14, 9p21, 9q34, 17p13 (TP53), mutations of exon 7 of the FGFR3 gene, and hypermethylation of the promoter regions of the RASSF1, RARB, p16, p14, CDH1 genes. The study was made on 108 matched samples (tumor/peripheral blood) obtained from patients with SBC. The deletions of the loci 3p14, 9p21 and anomalous methylation of the RARB and p16 genes are markers of the worse course of SBC while FGFR3 gene mutation is a marker of better prognosis. In the context of estimation of the relapsing potential of a primary tumor, the 9p21 locus deletion is a marker associated with recurrence within the first year after malignancy resection. The group of molecular genetic markers determined by the authors for poor prognosis in combination with classical clinical and morphological criteria will specify the pattern of the course of the disease and its prognosis.*

**Key words:** superficial bladder cancer, prognosis, molecular genetic markers

Рак мочевого пузыря (РМП) составляет 70% всех опухолей мочевого тракта и 4% случаев всех онкологических заболеваний [1]. На момент установления диагноза у 70–85% больных выявляется поверхностный РМП (ПРМП) [2]. К этой группе относят опухоли, ограничивающиеся слизистым и подслизистым слоем (pTa, pTis, pT1). Стандартная лечебная тактика при ПРМП заключается в трансуретральной резекции (ТУР) опухоли и внутривезикулярной химио- и иммунопрофилактике. Тем не менее до 85% ПРМП рецидивирует после лечения, причем 10–30% развивается в инвазивные и диссеминированные формы рака [3].

С целью определения адекватной тактики лечения РМП Европейским обществом по изучению и лечению рака (ЕОУР) была разработана система балльной оценки рисков рецидивирования и прогрессирования [4]. Основой данной системы служат клиничко-морфологические параметры опухоли. Однако разделение опухолей по морфологическим характеристикам не полностью отражает клинический потенциал ПРМП,

поэтому в последние годы большое внимание уделяется поиску дополнительных факторов прогноза течения заболевания. Определение этих факторов должно привести к созданию цельной прогностической системы, использование которой в клинической практике позволит выделить опухоли с различным клиническим течением, предположить с высокой вероятностью прогрессирование, рецидивирование и метастазирование РМП. В подобную систему могут быть включены биохимические, иммуногистохимические, протеомные и транскриптомные маркеры. Одним из наиболее перспективных направлений является определение молекулярно-генетических изменений в наследственном аппарате клетки, лежащих в основе ее злокачественной трансформации, и использование их в качестве клинических маркеров, определяющих характер и прогноз заболевания.

Необходимость определения прогностического значения молекулярно-генетических маркеров послужила основанием для проведения данной работы.

**Материалы и методы**

В работе исследованы 108 парных образцов опухоль/периферическая кровь пациентов с установленным диагнозом ПРМП. Материал получен от пациентов отделения лучевого и хирургического лечения урологических заболеваний Медицинского радиологического научного центра РАМН (Обнинск) и отделения онкоурологии Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена.

Медиана возраста пациентов составила  $58,5 \pm 11,5$  года (26—75 лет); соотношение мужчины/женщины — 6/1.

Распределение больных в соответствии с клинико-морфологическими характеристиками опухоли представлено в табл. 1.

Категория pT и степень гистопатологической дифференцировки (G) опухоли окончательно определялись на основании заключений двух морфологов.

Средний срок наблюдения за пациентами составил 13,3 (интервал 3—30) мес. За время наблюдения у 12 (12,1%) больных возникли рецидивные опухоли. Из них 8 случаев — первый рецидив, развившийся в течение первого года после операции, у 3 пациентов наблюдалось повторно рецидивирующее течение РМП.

**Диагностическая панель**, исследуемая в опухолевом материале, включала анализ делеций хромосомных локусов *3p14*, *9p21*, *9q34*, *17p13*

(*TP53*), мутаций экзона 7 гена *FGFR3* и аномального метилирования генов *RASSF1*, *RARB*, *p16*, *CDH1*.

**Геномную ДНК** из ткани опухоли и лимфоцитов периферической крови выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [5]. **Анализ метилирования CpG-островков** исследуемых генов проводили методом метилчувствительной полимеразной цепной реакции (ПЦР) [6, 7]. Анализ делеций хромосомных локусов осуществляли на парных образцах ДНК из опухоли и лимфоцитов периферической крови с использованием STR-маркеров: D9S942, D9S169 и D9S2136 (*9p21*), D3S1234 и D3S1300 (*3p14* — локус гена *FHIT*), D9S313 (*9q34* — локус гена *LAMC3*), D17S1353 и IVS1 (*17p13* — локус гена *TP53*). Условия ПЦР и последовательности праймеров взяты из базы данных UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu>). **Мутации** в гене *FGFR3* определяли методами SSCP-анализа и прямого секвенирования. [8]. **Статистический анализ результатов** включал сравнение клинических групп с помощью двустороннего точного критерия Фишера (уровень значимости  $\alpha=0,05$ ), вычисление показателя отношения рисков (ОР), соответствующих 95% доверительных интервалов (95% ДИ) и проведение анализа соответствий при помощи программы Statistica v. 6.0.

**Результаты**

Полученные нами результаты приведены в табл. 2.

В рамках данной работы мы исследовали связь таких клинических факторов, как скорость рецидивирования, глубина инвазии, степень гистопатологической дифференцировки, размер и количество опухолей с молекулярно-генетическими изменениями, определяемыми в клетках опухоли. В результате проведенного исследования выявлено, что раннее появление рецидивов в группе первичного ПРМП ассоциировано с делецией локуса *9p21* ( $p=0,049$ ; ОР 8,70; 95% ДИ 1,15—65,97), тогда как метилирование гена *RARB* достоверно чаще выявляется в группе опухолей, не рецидивировавших в течение ближайшего года после операции ТУР ( $p=0,038$ ; ОР 11,49; 95% ДИ 0,61—217,66). В группе неинвазивных карцином (Ta) повышена частота активирующей мута-

Таблица 1. Распределение больных в соответствии с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. CIS — carcinoma in situ

Показатель	Число больных	
	абс.	%
Категория pT:		
Ta	24	22,2
T1	84	77,8
Число опухолей:		
1	61	56,7
>1	45	41,7
нет данных	2	1,6
Размер опухоли, см:		
<3	81	75,0
>3	23	21,3
нет данных	4	3,7
Степень дифференцировки (ВОЗ, 1973):		
G <sub>1</sub>	41	38,0
G <sub>2</sub>	43	39,8
G <sub>3</sub>	13	12,0
нет данных	11	10,2
CIS уротелия:		
сопутствующая CIS	4	3,7
нет	93	86,1
нет данных	11	10,2

Таблица 2. Результаты исследования

Показатель	Всего	17з13 (з53)	FGFR3	3p14	9p21	9q34	RASSF	RARb	p16	p14	CDH1
Рц за 1 год*	8	1/6	2/8	2/6	3/8	1/5	2/8	0/8	0/8	0/8	1/8
Б/рц за 1 год*	31	1/27	5/31	5/19	2/31	4/16	13/31	12/30	6/31	4/30	7/31
<i>p</i>					0,049			0,038			
Стадия:											
Ta	24	1/22	9/24	2/14	4/23	2/13	6/24	7/23	5/24	1/22	8/23
T1	84	9/69	9/84	11/45	11/78	10/45	23/82	18/82	8/82	7/69	15/81
<i>p</i>			0,004								
Степень дифференцировки:											
G <sub>1</sub>	41	3/33	6/41	2/22	8/39	4/15	13/51	5/41	5/41	3/37	7/38
G <sub>2</sub>	43	4/38	10/43	5/25	4/39	7/29	11/43	16/42	4/43	5/39	12/42
G <sub>3</sub>	13	2/11	0/13	4/8	3/12	1/8	4/12	3/12	4/12	0/11	2/13
<i>p</i>											
G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>								0,01			
G <sub>1</sub> /G <sub>3</sub>				0,029							
G <sub>2</sub> /G <sub>3</sub>									0,058		
(G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> )/G <sub>3</sub>				0,042					0,055		
G <sub>1</sub> /(G <sub>2</sub> +G <sub>3</sub> )								0,016			

**Примечание.** Рц — рецидивирование в течение первого года после операции, Б/рц — безрецидивное течение заболевания в течение первого года после операции. \*При определении скорости рецидивирования в группы были включены пациенты с первичным РМП, у которых за время наблюдения (12 мес) развился или не развился рецидив. Указано число определенных изменений по отношению к числу информативных случаев в группе.

ции гена *FGFR3* (экзон 7) по сравнению с группой минимально инвазивных опухолей — T1 ( $p=0,004$ ; ОР 5,00; 95% ДИ 1,70—14,69). При исследовании связи молекулярно-генетических изменений со степенью дифференцировки отмечено увеличение частоты встречаемости делеции локуса *3p14* при нарастании степени клеточной анаплазии, причем в группе G<sub>3</sub> частота делеция *3p14* поднимается до 50% по сравнению с объединенной группой — G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub> ( $p=0,042$ ; ОР 5,71; 95% ДИ 1,51—28,36). Также в группах G<sub>2</sub>—G<sub>3</sub> возрастает частота метилирования генов *RARb* [ $p=0,016$ ; ОР 3,91; 95% ДИ 1,31—11,62 при сравнении G<sub>1</sub> против (G<sub>2</sub>+G<sub>3</sub>)] и *p16* [ $p=0,055$ ; ОР 4,17; 95% ДИ 1,04—16,62 при сравнении (G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>) против G<sub>3</sub>]. Нам не удалось обнаружить статистически значимых ассоциаций между молекулярно-генетическими изменениями и такими клинико-морфологическими параметрами, как размер и число опухолей.

Исследованная нами диагностическая панель включала 10 молекулярно-генетических изменений. Лишь для 5 из них (мутация *FGFR3*, делеции *3p14* и *9p21*, метилирование *RARb* и *p16*) удалось выявить связь с клиническими характеристиками опухоли, тогда как для остальных 5 изученных повреждений (делеции *9q34* и локуса *p53*, метилирование *p14*, *RASSF1A* и *CDH1*) подобные связи не обнаружены.

Таким образом, можно утверждать, что делеции локусов *3p14*, *9p21* и метилирование генов

*RARb* и *p16* являются неблагоприятными маркерами течения ПРМП, а мутация гена *FGFR3* — прогностический признак, ассоциированный с более благоприятным течением заболевания. С точки зрения определения рецидивного потенциала первичной уротелиальной карциномы метилирование *RARb* является позитивным маркером, а делеция *9p21* — негативным.

#### Обсуждение результатов

Задача определения дополнительных маркеров прогноза при РМП крайне актуальна в настоящее время. С этой целью в различных отраслях медицины и биологии активно исследуются многочисленные изменения, происходящие с клеткой в процессе ее злокачественной трансформации. Однако не все исследуемые маркеры имеют высокую прогностическую ценность. Для определения прогностической значимости выбранных нами молекулярно-генетических маркеров был проведен многомерный разведочный анализ (анализ соответствий). Подобный анализ позволяет судить о взаимосвязи тестируемых клинических и молекулярных параметров. Объединение точек, соответствующих клиническим и молекулярным маркерам, в одной группе указывает на наличие тесной связи между ними и оказывает влияние на прогноз заболевания. Для проведения анализа соответствий молекулярно-генетические маркеры были закодированы следующим образом: кодировка «0» означает отсутствие изменения, «1» — его наличие.

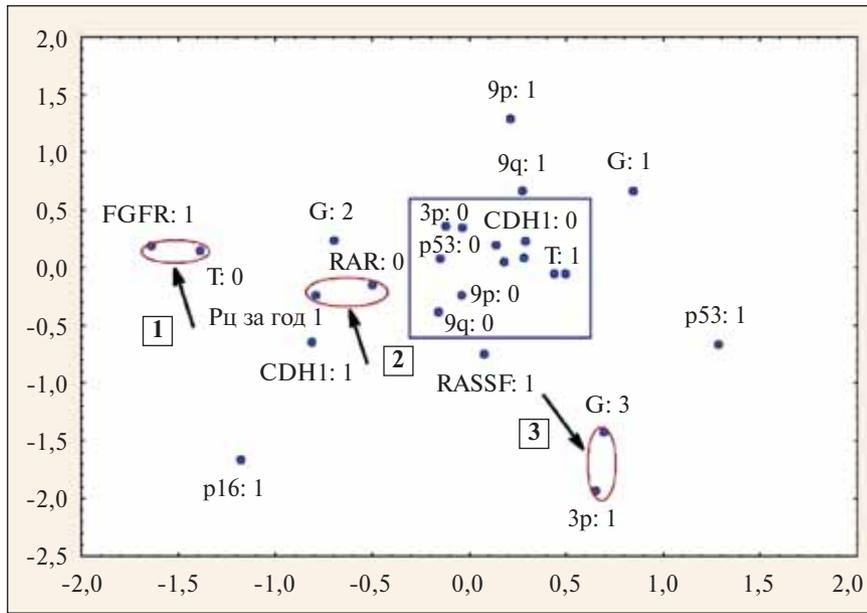


Рис. 1. Результаты анализа соответствий между клинико-морфологическими параметрами опухоли и молекулярно-генетическими изменениями в ее ткани

Для клинических параметров была использована следующая система: рТ: 0 — Та, 1 — Т1; G: 1 — G<sub>1</sub>, 2 — G<sub>2</sub>, 3 — G<sub>3</sub>. Рецидивирование в течение первого года: 0 — отсутствие рецидивирования, 1 — наличие рецидива. Результаты продемонстрированы на рис. 1. Для более детального рассмотрения плотного скопления точек в центре приведенного графика этот фрагмент был увеличен и представлен отдельно на рис. 2.

При внимательном рассмотрении обоих графиков можно выделить 5 областей, в которых группи-

руются точки, отражающие молекулярно-генетические маркеры и клинические признаки (области указаны стрелками с соответствующими цифрами). Первая область объединяет точки, соответствующие клиническому признаку Та (Т:0) и наличию мутаций гена *FGFR3* (FGFR:1), что указывает на наличие тесной связи между этими параметрами. Вторая область включает точки, отражающие повышенную скорость рецидивирования — рецидив в течение первого года (рц за год:1), и отсутствие метилирования гена *RARB* (RAR:0). Третья группа представляет собой ассоциацию между такими клиническими и молекулярными параметрами, как низкая степень дифференцировки опухоли G<sub>3</sub> (G:3) и делеция локуса *3p14* (3p:1). В четвертую группу вошли точки, отражающие признаки безрецидивного течения заболевания (рц за год:0) и метилирования гена *RARB* (RAR:1). Пятая группа показывает связь между признаками Т1 (T:1) и отсутствием мутации гена *FGFR3* (FGFR:0).

Полученные при анализе соответствий результаты подтверждают приведенные выше данные статистического анализа, выполненного с использованием критерия Фишера, и отражают большую роль таких молекулярно-генетических повреждений, как мутация в экзоне 7 гена *FGFR3*, делеции локусов *3p14* и *9p21* и гиперметилирование генов *p16* и *RARB* как дополнительных маркеров течения ПРМП.

Выбранные нами в качестве основы для диагностической панели 10 молекулярно-генетических изменений являются, по данным литературы, ключевыми событиями, происходящими на разных этапах развития ПРМП [9, 10]. Однако из 10 параметров исследуемой панели, по нашим данным, только 5 (мутации *FGFR3*, делеции *9p21* и *3p14*, метилирование *p16* и *RARB*) связаны с клиническими характеристиками опухоли и, возможно, влияют на клиническое течение заболевания.

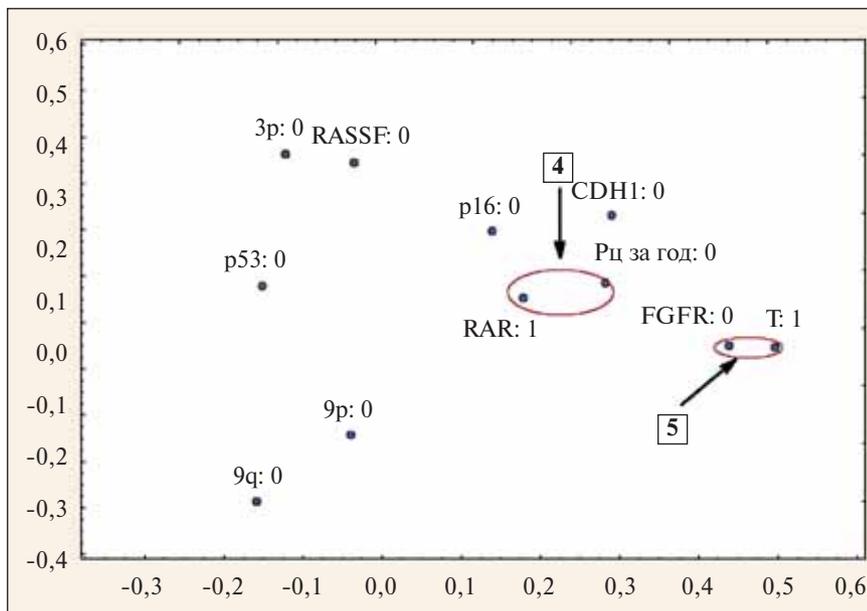


Рис. 2. Увеличенное изображение фрагмента, выделенного синим квадратом на рис. 1

Таким образом, в результате проведенного нами исследования к классическим клинико-морфологическим критериям можно добавить молекулярно-генетические маркеры (рис. 3), определение которых в биопсийных или операционных образцах опухоли позволит выявить группу пациентов с повышенным риском рецидивирования и, следовательно, нуждающихся в более интенсивной терапии и тщательном наблюдении. Исследование указанных маркеров возможно не только в опухолевой ткани, но и в плазме крови и моче пациентов с ПРМП. Подобные методики лежат в основе создания систем ранней неинвазивной диагностики.

**Заключение**

Поверхностные формы РМП обладают выраженной тенденцией к рецидивированию. Показано, что рецидивы ПРМП развиваются с высокой частотой даже после 3 лет безрецидивного течения болезни и могут характеризоваться возрастающим злокачественным и метастатическим потенциалом [11]. В связи с этим одной из ключевых проблем, с которой сталкивается врач при лечении больных ПРМП, является адекватная оценка риска развития рецидива у данного пациента. Во многих исследованиях показана недостаточная прогностическая ценность отдельных клинико-морфологических критериев из рекомендованных EORTC для суммарной системы оценки рисков [12–15]. Считается, что одну из ведущих ролей в определении выживаемости больных играет глубина инвазии новообразования [16]. Однако, несмотря на объединение T<sub>a</sub> (неинвазивной) и T<sub>1</sub> (минимально инвазивной) карцином в одну группу поверхностного РМП, разница между ними чрезвычайно важна, поскольку в группе T<sub>a</sub>-опухолей прогрессия считается относительно редким событием, тогда как T<sub>1</sub>-опухоли даже на ранних стадиях потенциально высокозлокачественны [17]. Тем не менее гистологическая диагностика минимальной инвазии обычно представляет сложности [17]. Часто на светооптическом уровне участки микроинвазии не выявляются, и этим может объясняться более агрессивное поведение группы уротелиальных карцином, классифицированных как неинвазивные [18]. Использование молекулярно-генетических маркеров может оказать помощь в более четком разделении опухолей на T<sub>a</sub>- и T<sub>1</sub>-

подгруппы [17]. Не менее остро стоит проблема выбора тактики лечения у пациентов с высоким риском прогрессии и рецидивирования (T<sub>1</sub>G<sub>3</sub>-группа) [19–23]. Эта проблема также может быть решена при создании системы дополнительных факторов прогноза, которая позволила бы отличать опухоли с высоким риском рецидивирования и прогрессирования от менее агрессивных новообразований и применять дифференцированный лечебный подход [16].

Помимо адекватной оценки клинико-морфологических параметров опухоли, важным аспектом успешной клинической практики является решение проблемы персонификации прогноза. Известно, что в процессе превращения нормальной клетки в злокачественную в ее генетическом аппарате накапливается большое количество различных изменений, как происходящих спонтанно, так и индуцированных канцерогенами, совокупность которых приводит к тому, что злокачественный потенциал опухоли у каждого конкретного пациента может значительно варьировать [14]. Вот почему «поведение» опухоли не может быть однозначно предсказано и описано лишь фенотипическими проявлениями, такими как размер, тип роста и т.д. Происходящие в процессе малигнизации изменения в геноме клетки являются первичным событием по отношению к приобретаемым ею злокачественным свойствам, поэтому обнаружение этих повреждений и установление связи между ними и клиническим поведением опухоли — приоритетное направление на современном этапе развития онкологии. Также очевидна необходимость внедрения их использования в клиническую практику с целью более тщательного и персонифицированного прогноза течения заболевания.



Рис. 3. Стратификации уровней риска при помощи дополнительных молекулярно-генетических маркеров

## Литература

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2006 году (заболеваемость и смертность). М., 2008.
2. Матвеев Б.П., Фигурин К.Н., Корякин О.Б. Рак мочевого пузыря. М.: Вердана, 2001.
3. Heney N.M., Ahmed S., Flanagan M.J. et al. Superficial bladder cancer. J Urol 1983;130:1083—6.
4. Babjuk M., Oosterlinck W., Sylvester R. et al. Guidelines on TaT1 (non-muscle invasive) bladder cancer. Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology (EAU), 2008.
5. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
6. Землякова В., Жевлова А., Стрельников В. и др. Аномальное метилирование некоторых генов-супрессоров при спорадическом раке молочной железы. Мол Биол 2003;37:696—703.
7. Кекеева Т., Жевлова А., Подистов Ю. и др. Аномальное метилирование генов-супрессоров опухолевого роста и микросателлитная нестабильность в предраковых состояниях шейки матки. Мол Биол 2006;40:224—30.
8. Van Rhijn B.W., Lurkin I., Radvanyi F. et al. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. Cancer Res 2001;61:1265—8.
9. Knowles M.A. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? Carcinogenesis 2006;27:361—73.
10. Mhawech-Fauceglia P., Cheney R.T., Schwaller J. Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma. Cancer 2006;106(6):1205—16.
11. Akagashi K., Tanda H., Kato S. et al. Recurrence pattern for superficial bladder cancer. Int J Urol 2006;13(6):686—91.
12. Chapman E.J., Harnden P., Chambers P. et al. Comprehensive analysis of CDKN2A status in microdissected urothelial cell carcinoma reveals potential haploinsufficiency, a high frequency of homozygous co-deletion and associations with clinical phenotype. Clin Cancer Res 2005;11(16):5740—7.
13. Millan-Rodriguez F., Chechile-Toniolo R., Salvador-Bayarri J. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. J Urol (Baltimore) 2000;163:68—7.
14. Ali-El-Dein B., Sarhan O., Hinev A. et al. Superficial bladder tumours: analysis of prognostic factors and construction of a predictive index. BJU Int 2003;92(4):393—9.
15. Tada Y., Wada M., Taguchi K. et al. The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. Cancer Res 2002;62:4048—53.
16. Карякин О.Б., Башкатов С.В., Немцова М.В. Клиническое значение молекулярно-генетических изменений в клетках уротелия при раке мочевого пузыря. Онкоурология 2006;3:54—58.
17. Sauter G., Mihatsch M.J. et al. Pussycats and baby tigers: non-invasive (pTa) and minimally invasive (pT1) bladder carcinomas are not the same! J Pathology 1998;185:339—41.
18. Effert P.J., Seifer P. Invasive potential of «noninvasive» human bladder carcinoma. Am J Clin Pathol 2003;120:188—93.
19. Kulkarni G.S., Finelli A., Fleshner N.E. et al. Optimal management of high-risk T1G3 bladder cancer. A decision analysis. PLoS Medicine 2007;4(9):1538—49.
20. Thalmann G.N., Markwalder R., Shahin O. et al. Primary T1G3 bladder cancer: organ preserving approach or immediate cystectomy? J Urol 2004;172(1):70—5.
21. Masood S., Sriprasad S., Palmer J.H., Mufti G.R. T1G3 bladder cancer—indications for early cystectomy. Int Urol Nephrol 2004;36(1):41—4.
22. Manoharan M., Soloway M.S. Optimal management of the T1G3 bladder cancer. Urol Clin North Am 2005;32(2):133—45.
23. Metwalli A.R., Kamat A.M. Controversial issues and optimal management of stage T1G3 bladder cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2006;6(8):1283—94.
24. Brandau S., Böhle A. Bladder cancer. I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. Eur Urol 2001;39(5):491—7.