

Молекулярные маркеры рака мочевого пузыря: от частного к целому

А.А. Заболотнева¹, Н.М. Гайфуллин², А.А. Буздин¹, Б.Я. Алексеев³, Ю.Ю. Андреева³,
П.В. Шегай³, Д.Г. Соков⁴, И.Г. Русаков³

¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

²факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова;

³МНИОИ им. П.А. Герцена;

⁴Московский городской онкологический диспансер

Контакты: Антон Александрович Буздин anton@humgen.siobc.ras.ru

Рак мочевого пузыря (РМП) занимает 2-е место по распространенности среди злокачественных опухолей мочеполовой системы. Ранняя диагностика РМП, как правило, существенно повышает вероятность успешного лечения пациента. В статье рассмотрены методы неинвазивной диагностики РМП и приводится база данных известных молекулярных маркеров этого заболевания.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, молекулярная диагностика, биомаркерные молекулы, специфичность, чувствительность

Molecular markers of bladder cancer: from the particular to the general

A.A. Zabolotneva¹, N.M. Gaifullin², A.A. Buzdin¹, B.Ya. Alekseyev³, Yu.Yu. Andreyeva³,
P.V. Shegai³, D.G. Sokov⁴, I.G. Rusakov³

¹Acad. M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow;

²Faculty of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University;

³P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute;

⁴Moscow City Oncology Dispensary

Bladder cancer (BC) is the second most common urinary tract malignancy. Early diagnosis of BC generally increases the probability of successful treatment in a patient. The paper considers noninvasive diagnosis methods for BC and gives a database of the known molecular markers of this disease.

Key words: bladder cancer, molecular diagnosis, biomarker molecules, specificity, sensitivity

По распространенности среди опухолей мочевыделительной системы рак мочевого пузыря (РМП) занимает 2-е место, а среди всех злокачественных новообразований — 9-е место в мире. Ежегодно диагностируется около 356 тыс. новых случаев РМП [1]. У мужчин заболеваемость выше. Частота выявления заболевания сильно варьирует в зависимости от географической области (от 1,8 до 27,1 заболевших на 100 тыс. человек у мужчин и от 0,5 до 4,1 у женщин) и достигает максимальных значений в странах с преобладанием европеоидного населения [2].

РМП составляет 3,1 % общей смертности от злокачественных новообразований у мужчин и 1,8 % у женщин. Выделены 3 группы наиболее значимых факторов риска развития РМП: систематическое воздействие некоторых химических веществ на организм, хронические заболевания мочевого пузыря, а также специфические молекулярно-генетические особенности организма пациента.

Наиболее значимый фактор — это курение табака, служащее причиной РМП в 50–65 % случаев у мужчин и 20–30 % у женщин. Второй по значению фактор риска РМП (20–25 % всех случаев) — связанный с про-

фессиональной деятельностью контакт с некоторыми химическими веществами: производными аминов, анилиновыми красителями, нитритами и нитратами, акролеином и мышьяком.

Хронические повреждения мочевого пузыря, такие как хроническая инфекция мочевыводящих путей (ИМП), дистанционная лучевая терапия (ДЛТ) на область малого таза и длительное ношение мочевого катетера, также увеличивают риск возникновения РМП. Инвазивный РМП напрямую связан с хроническими ИМП. Также сообщалось о 2–4-кратном увеличении риска развития вторичных злокачественных опухолей мочевого пузыря после применения ДЛТ при гинекологических и онкоурологических злокачественных опухолях [3]. Генетические факторы включают мутации и отклонения от нормы в экспрессии некоторых генов, контролирующих клеточный цикл и дифференцировку.

Более 90 % опухолей мочевого пузыря составляют переходно-клеточные карциномы, 5 % — плоскоклеточные карциномы и менее 2 % — аденокарциномы [4]. По классификации, принятой ВОЗ в 2004 г., уротелиальные опухоли разделяют на 4 категории: па-

пилярную, уротелиальную опухоль с низким злокачественным потенциалом, уротелиальный рак низкой (low grade carcinoma) и высокой степени злокачественности (high grade carcinoma).

По классификации TNM, утвержденной в 2002 г. Международным противораковым союзом, выделяют 4 стадии в зависимости от степени повреждения или инвазии в мочевой пузырь. Примерно 70 % вновь диагностируемых случаев переходно-клеточного РМП представлено поверхностными опухолями (стадии Ta, T1) или преинвазивными карциномами (Tis), при этом 50–70 % из них рецидивируют и около 10–20 % прогрессируют до стадий T2–T4 — инвазии в мышечный слой, окружающие ткани. У пациентов со стадией Ta и высокой степенью дифференцировки опухоли 15-летняя выживаемость без прогрессии опухоли составляет 95 %. При аналогичной стадии заболевания, но низкой степени дифференцировки опухоли выживаемость составляет 61 %, а при стадии T1 — уже 44 %.

Применяемые в клинике методы диагностики РМП. Используемые сегодня в клинике методы диагностики РМП можно разделить на 2 основные группы: инвазивные и неинвазивные. К неинвазивным методам относятся обнаружение в физиологических жидкостях маркеров РМП, трансабдоминальная ультрасонография, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, цитологическое исследование мочи или промывной жидкости [5].

К наиболее часто применяемым инвазивным методам диагностики относят цистоскопию, позволяющую визуализировать опухоль и провести комплексное исследование с биопсией подозрительных участков слизистой оболочки мочевого пузыря [6]. Несмотря на то что цистоскопическое исследование связано с высокой стоимостью, дискомфортом для пациента и низкой чувствительностью, оно является основным и наиболее достоверным методом диагностики в современной клинической практике. Все применяемые системы диагностики имеют свои недостатки. Инвазивные методы связаны с дороговизной и сложностью выполнения. Неинвазивные методы на сегодняшний день недостаточно чувствительны и специфичны.

В последнее время большое внимание уделяется поиску молекулярно-генетических маркеров РМП. В первую очередь это связано с быстрым развитием методов, позволяющих обнаружить функциональные и структурные генетические изменения. Главный недостаток существующих панелей молекулярных биомаркеров РМП — это их низкая чувствительность. Выделяют следующие группы молекулярных биомаркеров:

- 1) молекулы РНК, по-разному представленные в норме и при РМП;
- 2) маркеры метилирования ДНК;
- 3) маркеры геномной нестабильности;

4) биохимические маркеры, специфические для мочи или крови больных РМП.

Дифференциально экспрессирующиеся РНК. Имеется множество данных по поиску и анализу генов, по-разному работающих в нормальных и опухолевых тканях мочевого пузыря. Интегральный анализ этой информации позволит не только обнаружить значимые для диагностики гены, но и объяснить механизмы развития болезни, спрогнозировать ее течение и назначить адекватную терапию. К наиболее распространенным современным методам поиска дифференциально экспрессирующихся генов относят прямое секвенирование транскриптомов, анализ экспрессии генов на микрочипах, серийный анализ генной экспрессии (SAGE), вычитающую гибридизацию и применение полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией [7–9]. На основе обнаруженных дифференциальных генов создаются панели маркеров, потенциально применимые в клинической практике. В частности, в моче больных РМП зафиксированы повышенные уровни мРНК для генов сурвивина [10], гиалуронидазы [11], теломеразы [12], цитокератина 20 [13], цитокератина 7 и виментина [9]. Основной проблемой этих диагностических панелей является их недостаточная чувствительность. По-видимому, это связано с тем, что наиболее специфические и чувствительные маркерные молекулы пока еще не обнаружены. Создание новых способов молекулярной диагностики на основе дифференциально экспрессирующихся генов остается наиболее перспективным и активно развивающимся направлением в поиске маркеров РМП.

Другими маркерными молекулами, способными служить целям молекулярной диагностики, являются малые РНК. С их помощью регулируется экспрессия по крайней мере каждого 3-го гена человека [14]. Малые РНК также участвуют в канцерогенезе, выступая в роли онкогенных или онкосупрессорных молекул. Поэтому их дифференциальная экспрессия, в том числе микроРНК (miRNA), служит важным показателем для определения и прогнозирования заболевания. Известны miRNA, дифференциально экспрессирующиеся при РМП, причем различаются профили экспрессии miRNA для прогрессирующих и не прогрессирующих опухолей, а также для опухолей различных стадий [15]. Однако из-за высокой сложности анализа этот метод диагностики пока не получил распространения в клинике.

Маркеры метилирования ДНК. Известно, что на работу генов влияет метилирование регуляторных областей ДНК. В промоторных областях многих генов находятся многократно повторяющиеся последовательности CG-динуклеотидов — CpG-островки. При раке часто отмечаются их аномальное метилирование и связанное с этим изменение генной экспрес-

сии. Гипо- или гиперметилирование CpG-островков генов обнаружено для самых разных типов опухолей, включая РМП. Например, при РМП гиперметилованы промоторные области онкосупрессорных генов *p14^{ARF}* и *p16^{INK4a}* [16], *VHL*, *MLH1*, *RASSF1* [17], *BCL2*, *DAPK*, *PYCARD* [18]. Между тем метилирование этих локусов иногда обнаруживается и в нормальном уро-телии, причем количество заметилированных CpG-островков увеличивается с возрастом и под действием некоторых внешних факторов, например курения [19]. Это существенный недостаток для разработки диагностик, поскольку максимальное число больных РМП приходится на пожилой возраст — 70–80 лет, при этом наибольшую долю составляют курящие [2].

Маркеры геномной нестабильности. Общепринята теория образования злокачественных опухолей путем накопления в геноме множественных изменений, приводящих к активации онкогенов и репрессии онкосупрессорных генов. Часто причиной измененной работы генов при раке служат мутации и хромосомные aberrации. Обнаружение генных делеций, вставок, амплификаций, а также потери/возникновения копий хромосом — важный диагностический критерий. Хромосомные перестройки, широко встречающиеся при РМП, эффективно обнаруживают с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [20]. Более чем в 50 % всех случаев РМП в 9-й хромосоме обнаруживаются делеции. Примерно в 20 % случаев

имеются потери участков 10p, 11p и Y-хромосом [21]. На основе этих изменений рассматриваются различные механизмы возникновения болезни и этиологические варианты РМП. Известно также, что утрата участка 9p21, несущего онкосупрессорный ген *p16*, — одно из самых ранних и наиболее частых изменений при РМП. В клинической практике проводят FISH-гибридизацию с 4 флуоресцентными зондами к центромерным участкам хромосом 3, 7 и 17, а также к локусу 9p21 (тест UroVision). Обнаруженная амплификация хромосом или потеря локуса 9p21 указывает на присутствие раковых клеток.

Как альтернативный подход предлагается анализ перестроек в микросателлитных последовательностях генома, поскольку микросателлитная нестабильность (МН) служит одним из маркеров рака [22]. Однако этот метод нельзя считать универсальным, поскольку популяции различной этнической принадлежности характеризуются разными маркерами МН [23]. Кроме того, даже у одних и тех же пациентов известно обнаружение МН в совершенно разных геномных локусах, если сравнивать первичные опухоли с рецидивирующими новообразованиями. С риском развития РМП могут быть также связаны однонуклеотидные полиморфизмы ДНК (single nucleotide polymorphisms — SNP) [24]. Например, в гене белка фактора некроза опухоли известен SNP, связанный с предрасположенностью к РМП и с его повышенной агрессивностью.

Используемые в клинической практике неинвазивные диагностические тесты для обнаружения РМП

Тест	Маркер	Чувствительность, %	Специфичность, %
Цитологическая диагностика	Опухолевые клетки, обнаруживаемые в моче	7–17 — для высокодифференцированных опухолей, стадии Ta–T1; 53–90 — для низкодифференцированных	90–98
BTA Stat и BTA TRAK	Антиген, связанный с РМП (bladder tumor antigen)	50–80	50–75
NMP-22	Ядерный белок, высвобождаемый при апоптозе	50 — для неинвазирующих опухолей; 90 — для инвазирующих	70–85
ImmunoCyt	Высокомолекулярные карциноэмбриональные антигены и муцины	50–95	60–85
UroVision (FISH)	Флуоресцентные зонды на хромосомы 3, 7, 17, 9p21	70–100	66–93
FDP	Продукты деградации фибрина	78–91	75–90
CYFRA 21.1	Уровень цитокератина 19	73	41
ГК-ГИ	Уровень гиалуроновой кислоты и гиалуронидазы	86	61
UBC	Уровень цитокератинов 8 и 18	54	97
CK20	Уровень цитокератина 20	85	76
Survivin	Уровень сурвивина	82	90
LeX	Уровень антигена Льюиса	75	85

стью [25]. Однако из-за высокой вариабельности SNP у разных индивидуумов и разных популяций чувствительность этого метода невысока.

Биохимические маркеры РМП. Биохимическими маркерами РМП служат прежде всего белки и продукты белковой деградации. Эти молекулы обнаруживаются в моче или крови больного и не детектируются или обнаруживаются в значительно меньшей концентрации у здорового человека [26]. Для обнаружения маркерных молекул в моче или плазме крови используют иммуноферментный анализ (ИФА). На основе ИФА создан ряд доступных систем диагностики РМП (см. таблицу) [27–30]. Эти и другие методы диагностики, основанные на ИФА, обладают недостаточно высокой чувствительностью (см. таблицу), в связи с чем на нынешнем этапе нельзя отказаться от проведения инвазивной цистоскопии. По-видимому, в будущем важным шагом на пути к созданию универсального неинвазивного диагностического РМП будет комбинирование нескольких панелей биомаркеров.

Методы поиска новых биомаркеров. Современные методы поиска биомаркерных молекул основаны на генетическом, протеомном, эпигенетическом, а также имму-

нологическом анализе. Методы генетического анализа включают в себя поиск дифференциально экспрессирующихся генов, мутантных геномных локусов, а также хромосомных аномалий и полиморфизмов ДНК. Эпигенетические изменения обнаруживают с помощью анализа малых РНК и метилирования геномной ДНК. Протеомный и иммунологический анализ позволяет найти белковые, пептидные и другие маркерные биомолекулы.

Интегрированная база данных маркеров РМП. Основную задачу этой статьи авторы видят в освещении неинвазивных биомаркерных систем диагностики РМП, либо существующих на настоящий момент, либо потенциально важных в обозримом будущем. Как можно видеть из предложенного обзора, практически все они основаны на анализе молекулярных изменений, происходящих в раковых клетках. Чтобы облегчить систематизацию таких изменений, авторы предлагают к рассмотрению интегрированную базу данных опубликованных молекулярных маркеров РМП. База данных, доступная в Интернете по адресу: <http://cellgenetics.ru/BladderCancerMarkers.xls>, создана на основе поиска всех известных из источников литературы биомаркеров РМП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2):74–108.
2. Ploeg M., Aben K.K., Kiemeny L.A. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* 2009; 27(3):289–93.
3. Jacobs B.L., Lee C.T., Montie J.E. Bladder cancer in 2010: how far have we come? *CA Cancer J Clin* 2010; 60(4):244–72.
4. Kaufman D.S., Shipley W.U., Feldman A.S. Bladder cancer. *Lancet* 2009; 374(9685):239–49.
5. O' Donoghue P.M., McSweeney S.E., Jhaveri K. Genitourinary imaging: current and emerging applications. *J Postgrad Med* 2010; 56(2):131–9.
6. Qu X., Huang X., Wu L. et al. Comparison of virtual cystoscopy and ultrasonography for bladder cancer detection: A meta-analysis. *Eur J Radiol* 2010.
7. Sanchez-Carbayo M. Use of high-throughput DNA microarrays to identify biomarkers for bladder cancer. *Clin Chem* 2003; 49(1):23–31.
8. Junttila T.T., Laato M., Vahlberg T. et al. Identification of patients with transitional cell carcinoma of the bladder overexpressing ErbB2, ErbB3, or specific ErbB4 isoforms: real-time reverse transcription-PCR analysis in estimation of ErbB receptor status from cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14):5346–57.
9. Yang Y.C., Li X., Chen W. Characterization of genes associated with different phenotypes of human bladder cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2006; 38(9):602–10.
10. Kenney D.M., Geschwindt R.D., Kary M.R. et al. Detection of newly diagnosed bladder cancer, bladder cancer recurrence and bladder cancer in patients with hematuria using quantitative rt-PCR of urinary survivin. *Tumour Biol* 2007; 28(2):57–62.
11. Van Tilborg A.A., Bangma C.H., Zwarthoff E.C. Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *Int J Urol* 2009; 16(1):23–30.
12. Eissa S., Swellam M., Ali-Labib R. et al. Detection of telomerase in urine by 3 methods: evaluation of diagnostic accuracy for bladder cancer. *J Urol* 2007; 178(3 Pt 1):1068–72.
13. Christoph F., Muller M., Schostak M. et al. Quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA expression in bladder carcinoma by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Urology* 2004; 64(1):157–61.
14. Carrington J.C., Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 2003; 301(5631):336–8.
15. Dyrskjot L., Ostenfeld M.S., Bramsen J.B. et al. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res* 2009; 69(11):4851–60.
16. Kawamoto K., Enokida H., Gotanda T. et al. p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339(3):790–6.
17. 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(14):4048–53.
18. Friedrich M.G., S. Chandrasoma K.D. Siegmund et al. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur J Cancer* 2005; 41(17):2769–78.
19. Marsit C.J., Houseman E.A., Schned A.R. et al. Promoter hypermethylation is associated with current smoking, age, gender and survival in bladder cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28(8):1745–51.
20. Sarosdy M.F., Schellhammer P., Bokinsky G. et al. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol* 2002; 168(5):1950–4.
21. Knowles M.A. Molecular pathogenesis of bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 2008; 13(4):287–97.
22. Van Rhijn B.W., Lurkin I., Kirkels W.J. et al. Microsatellite analysis—DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: a phase II trial. *Cancer* 2001; 92(4):768–75.
23. Zhang J., Fan Z., Gao Y. et al. Detecting bladder cancer in the Chinese by microsatellite analysis: ethnic and etiologic considerations. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(1):45–50.
24. Goode E.L., Ulrich C.M., Potter J.D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11(12):1513–30.
25. Marsh H.P., Haldar N.A., Bunce M. et al. Polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation. *Br J Cancer* 2003; 89(6):1096–101.
26. Liotta L.A., Petricoin E.F. Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold. *J Clin Invest* 2006; 116(1):26–30.
27. Babjuk M., Soukup V., Pesl M. et al. Urinary cytology and quantitative BTA and UBC tests in surveillance of patients with pT1 bladder urothelial carcinoma. *Urology* 2008; 71(4):718–22.
28. Fernandez-Gomez J., Rodriguez-Martinez J.J., Barmadah S.E. et al. Urinary CYFRA 21.1 is not a useful marker for the detection of recurrences in the follow-up of superficial bladder cancer. *Eur Urol* 2007; 51(5):1267–74.
29. Lodde M., Mian C., Comploj E. et al. uCyt+ test: alternative to cystoscopy for less-invasive follow-up of patients with low risk of urothelial carcinoma. *Urology* 2006; 67(5):950–4.
30. Miyanaga N., Akaza H., Tsukamoto S. et al. Usefulness of urinary NMP22 to detect tumor recurrence of superficial bladder cancer after transurethral resection. *Int J Clin Oncol* 2003; 8(6):369–73.