

# Молекулярные маркеры рака мочевого пузыря: от частного к целому

А.А. Заболотнева<sup>1</sup>, Н.М. Гайфуллин<sup>2</sup>, А.А. Буздин<sup>1</sup>, Б.Я. Алексеев<sup>3</sup>, Ю.Ю. Андреева<sup>3</sup>,  
П.В. Шегай<sup>3</sup>, Д.Г. Соков<sup>4</sup>, И.Г. Русаков<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова;

<sup>3</sup>МНИОИ им. П.А. Герцена;

<sup>4</sup>Московский городской онкологический диспансер

**Контакты:** Антон Александрович Буздин [anton@humgen.sioc.ras.ru](mailto:anton@humgen.sioc.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. Zabolotneva<sup>1</sup>, N.M. Gaifullin<sup>2</sup>, A.A. Buzdin<sup>1</sup>, B.Ya. Alekseyev<sup>3</sup>, Yu.Yu. Andreyeva<sup>3</sup>,  
P.V. Shegai<sup>3</sup>, D.G. Sokov<sup>4</sup>, I.G. Rusakov<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Faculty of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University;

<sup>3</sup>P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute;

<sup>4</sup>Moscow 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-

пиллярную, 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<sup>ARF</sup>* и *p16<sup>INK4a</sup>* [16], *VHL*, *MLH1*, *RASSF1* [17], *BCL2*, *DAPK*, *PYCARD* [18]. Между тем метилирование этих локусов иногда обнаруживается и в нормальном уротели, причем количество заметилованных CpG-островков увеличивается с возрастом и под действием некоторых внешних факторов, например курения [19]. Это существенный недостаток для разработки диагностикумов, 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 antigene)	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

- Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2):74–108.
- 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.
- 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.
- Kaufman D.S., Shipley W.U., Feldman A.S. Bladder cancer. *Lancet* 2009; 374(9685):239–49.
- O' Donoghue P.M., McSweeney S.E., Jhaveri K. Genitourinary imaging: current and emerging applications. *J Postgrad Med* 2010;56(2):131–9.
- 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.
- Sanchez-Carbayo M. Use of high-throughput DNA microarrays to identify biomarkers for bladder cancer. *Clin Chem* 2003;49(1):23–31.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Carrington J.C., Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 2003;301(5631):336–8.
- Dyrskjot L., Ostensfeld 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Knowles M.A. Molecular pathogenesis of bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 2008; 13(4):287–97.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Babjuk M., Soukup V., Pesl M. et al. Urinary cytology and quantitative BTA and UBC tests in surveillance and quantitative BTA and UBC tests in surveillance of patients with pTapT1 bladder urothelial carcinoma. *Urology* 2008;71(4):718–22.
- 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.
- Lodde M., Mian C., Complog 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.
- Miyayama 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.