

Маркеры прогноза лимфогенного метастазирования рака мочевого пузыря

Павлов В.Н., Измайлов А.А., Измайлова С.М., Викторова Т.В., Урманцев М.Ф.

Prognostic markers of urinary bladder cancer lymphatic spread

Pavlov V.N., Izmailov A.A., Izmailova S.M., Viktorova T.V., Urmantsev M.F.

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

© Павлов В.Н., Измайлов А.А., Измайлова С.М. и др.

Проанализированы результаты лечения 104 пациентов с инвазивным раком мочевого пузыря за период с 2005 по 2009 г. Проведен молекулярно-генетический анализ полиморфных локусов генов цитохромов P450: *CYP1A1* (A2455G), *CYP1A2* (T-2464delT), глутатион S-трансферазы: *GSTM1* (del), *GSTP1* (A313G); репарации ДНК: *XRCC1* (G28152A) у пациентов с инвазивным раком мочевого пузыря с лимфогенными метастазами и без них. Выявлены генотипы, ассоциированные с риском лимфогенного метастазирования.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, прогноз, генетические маркеры.

Treatment results (2005—2009) for patients with invasive (N=104) urinary bladder carcinoma were analyzed. Molecular genetic analysis of cytochrome gene P450 polymorphous locus carried out: *CYP1A1* (A2455G), *CYP1A2* (T-2464delT), Glutathione S-transferase: *GSTM1* (del), *GSTP1* (A313G); DNA reparation: *XRCC1* (G28152A) for patients with invasive urine bladder carcinoma with and without lymphogenic metastases was carried out. Genotypes associated with lymphogenic metastasis risk were identified.

Key words: Urine bladder cancer, prognosis, genetic markers.

УДК 616.62-006.6-033.2:611.42

Введение

В последние десятилетия отмечается рост числа всех онкологических заболеваний, в том числе рака мочевого пузыря (РМП). На момент постановки диагноза у 70—85% больных выявляется поверхностный РМП (ПРМП) [1]. После лечения до 85% ПРМП рецидивировать, причем 10—30% прогрессируют в инвазивные и диссеминированные формы [4]. По данным литературы, при первичном инвазивном раке 3-летняя выживаемость не превышает 67%, а при прогрессирующем из поверхностного — в 2 раза меньше (37%) [17].

Радикальная цистэктомия с тазовой лимфаденэктомией является золотым стандартом лечения мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. Выживаемость после радикальной цистэктомии предопределяется стадией, состоянием хирургического края и наличием поражения лимфатических узлов. Общепризнано, что наличие лимфогенного метастазирования значительно ухудшает прогноз заболевания, а существующие методы оценки риска лимфогенного метастазирования

не имеют достаточной достоверности [9, 10, 12—14, 18]. Не прекращаются дискуссии об объеме проведения лимфаденэктомии [9, 18]. Исследователи всего мира ведут поиск дополнительных маркеров прогноза риска лимфогенного метастазирования при РМП [5].

Наиболее перспективным направлением в этой области является, с точки зрения авторов, определение молекулярно-генетических изменений в наследственном аппарате клетки, возникающих в условиях болезни, и использование их в качестве клинических маркеров, определяющих характер и прогноз заболевания [2, 11]. В клетке имеется двойной контроль, предотвращающий развитие мутационного процесса. Это системы, обеспечивающие репарацию ДНК, либо системы, индуцирующие гибель измененной клетки в случае многочисленных повреждений ДНК (апоптоз, некроз). Нарушения в репарационных процессах приводят к накоплению повреждений в ДНК. В случае сбоя в системе, контролирующей и запускающей апоптоз, может происходить формирование жизнеспособного мутагенного генотипа. Ген *XRCC1* расположен на хромосоме 19 в локусе

19q13.2. Продукт гена *XRCC1* является важным компонентом эксцизионной репарации оснований. Он исправляет поврежденные основания и одноцепочечные разрывы, вызванные ионизирующей радиацией и алкилирующими агентами [6, 15, 16, 19, 20].

Генетический полиморфизм в генах системы биотрансформации ксенобиотиков, ассоциированный с изменением соответствующих ферментов, может влиять на характер роста опухоли, частоту рецидива РМП, частоту лимфогенного метастазирования. Особого внимания заслуживают гены семейства цитохрома P450 [3, 7, 8]. Цитохромы P450 1A1 осуществляют биологическую активацию проканцерогенов, в частности бензапирена, и некоторых других полиароматических углеводов. По литературным данным, полиморфизм A2455G гена *CYP1A1* ассоциирован с повышенным риском развития РМП [8]. Наиболее функционально значимыми полиморфизмами гена *CYP1A2* являются *CYP1A2*1D* (T-2467delT) и *CYP1A2*1F* (C-163A) [8, 9]. Установлено, что полиморфизм интрона 1 гена *CYP1A2*1F* приводит к изменению каталитической активности фермента и увеличению его индуцибельности.

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

Материал и методы

Проанализированы результаты лечения 104 пациентов с инвазивным РМП (ИРМП), находившихся на стационарном лечении в клинике Башкирского государственного медицинского университета, РКОД и РКБ г. Уфы в период с 2005 по 2009 г. Средний возраст больных составил ($59,71 \pm 6,21$) года. Все обследованные принадлежали к русской этнической группе.

Всем больным ИРМП была выполнена радикальная цистэктомия с одномоментной реконструктивной операцией. Разделение больных на группы производилось в зависимости от результатов гистологического исследования лимфатических узлов. Контрольную группу ИРМП составили больные, не имевшие лимфогенной инвазии (44 пациента), основную группу ИРМП — пациенты с гистологически подтвержденным поражением лимфоузлов (60 человек).

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из лимфоцитов периферической венозной крови. Для выделения ДНК

использовался стандартный метод фенольно-хлороформной экстракции с небольшими модификациями (микрометод). Анализ полиморфных локусов генов цитохромов P450: *CYP1A1* (A2455G), *CYP1A2* (T-2464delT) (номенклатура аллелей приведена согласно данным, приведенным на сайте [www.imm.ki.se/CYPalleles/Human Cytochrome P-450 \(CYP\) genes: a web page for the nomenclature of alleles](http://www.imm.ki.se/CYPalleles/Human%20Cytochrome%20P-450%20genes), созданном 9 сентября 2008 г.); глутатион S-трансферазы *GSTM1* (del) и *GSTP1* (A313G); репарации ДНК: *XRCC1* (G28152A) проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на термодинамическом цикле в автоматическом режиме с использованием локуспецифических олигонуклеотидных праймеров. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в полиакриламидном неденатурированном геле.

Статистическая обработка цифровых данных проводилась при помощи программы Statistica 6.0. Разницу в распределении частот генотипов между группами рассчитывали с использованием непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йейтса. Определяли показатели отношения рисков (ОР), соответствующих 95%-му доверительному интервалу (95%-й ДИ). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведен анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов *CYP1A1*, *CYP1A2*, *GSTM1*, *GSTP1*, *XRCC1* у больных ИРМП (таблица).

Сравнительный анализ у больных ИРМП с наличием лимфогенных метастазов и без них выявил статистически значимые различия в распределении частот генотипов ($\chi^2 = 9,36$; $p = 0,01$) и аллелей ($\chi^2 = 8,26$; $p = 0,01$) маркера A2454G гена *CYP1A1* между этими группами больных (таблица). Частота аллеля *2C у больных с лимфогенным метастазированием РМП увеличивалась (33,3%) по сравнению с выборкой больных без лимфогенного метастазирования РМП (14,8%), а аллель *1A чаще выявлялся у больных без лимфогенного метастазирования (85,2 против 66,7% у больных с лимфогенным метастазированием РМП). Отмечена тенденция к увеличению частоты генотипа *1A*2C у больных с лимфогенным метастазированием РМП (46,7%) по сравнению с больными без такового (25,0%) ($\chi^2 = 4,20$; $p = 0,04$). У больных без лимфогенного метастазирования генотип *1A*1A выяв-

лялся чаще (72,7%), чем у больных с лимфогенным метастазированием (43,3%) ($\chi^2 = 7,74$; $p = 0,01$).

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов *CYP1A1*, *CYP1A2*, *GSTM1*, *GSTP1*, *XRCC1* у больных инвазивным раком мочевого пузыря

Генотипы и аллели	Основная группа		Контрольная группа		χ^2	<i>p</i>	ОР (95%-й ДИ)
	Абс.	%	Абс.	%			
<i>Полиморфный локус A2455G гена CYP1A1</i>							
*1A*1A	26	43,3	32	72,7	7,74	0,01	0,29 (0,11—0,72)
*1A*2C	28	46,7	11	25,0	4,20	0,04	2,63 (1,04—6,73)
*2C*2C	6	10,0	1	2,3	1,34	0,25	—
*1A	80	66,7	75	85,2	8,26	0,01	0,35 (0,16—0,73)
*2C	40	33,3	13	14,8			2,89 (1,36—6,19)
<i>Полиморфный локус T-2467delT гена CYP1A2</i>							
*1A*1A	16	26,7	25	56,8	8,44	0,01	0,28 (0,11—0,68)
*1A*1D	24	40,0	13	29,5	0,80	0,37	—
*1D*1D	20	33,3	6	13,6	4,26	0,04	3,17 (1,05—9,95)
*1A	56	46,7	63	71,6	11,89	0,01	0,35 (0,19—0,65)
*1D	64	53,3	25	28,4			2,88 (1,54—5,41)
<i>Делеционный полиморфизм гена GSTM1</i>							
+/+	33	55,0	30	68,2	1,34	0,25	—
del	27	45,0	14	31,8			—
<i>Полиморфный локус A313G гена GSTP1</i>							
AA	17	28,33	19	43,2	6,84	0,01	0,30 (0,12—0,76)
AG	33	55,0	21	47,7	2,98	0,08	—
GG	10	16,7	4	9,1	0,69	0,41	—
A	64	53,3	62	70,5	5,54	0,02	0,48 (0,26—0,89)
G	56	46,7	26	29,6			2,09 (1,12—3,90)
<i>Полиморфный локус G28152A гена XRCC1</i>							
GG	8	13,3	17	38,6	7,57	0,01	0,24 (0,08—0,70)
GA	33	55,0	15	34,1	3,66	0,06	—
AA	19	31,7	12	27,3	0,07	0,79	—
G	49	40,8	49	55,7	3,92	0,047	0,55 (0,30—0,99)
A	71	59,2	39	44,3			1,82 (1,01—3,30)

Сравнительный анализ полиморфного локуса T-2467delT гена *CYP1A2* установил статистически достоверные различия между группами больных ИРМП по распределению частот генотипов ($\chi^2 = 10,31$; $p = 0,01$) и аллелей ($\chi^2 = 11,89$; $p = 0,01$) (см. таблицу). Частота генотипа *1D*1D у больных с лимфогенным метастазированием (33,3%) оказалась выше по сравнению с больными без лимфогенного метастазирования (13,6%) ($\chi^2 = 4,26$; $p = 0,04$). В свою очередь, частота генотипа *1A*1A (56,8%) была больше у больных без лимфогенного метастазирования по сравнению с больными с лимфогенным метастазированием ИРМП (26,7%) ($\chi^2 = 8,44$; $p = 0,01$). Оказалось, что аллель *1D повышает риск развития лимфогенного метастазирования у больных ИРМП (ОР = 2,88; 95%-й ДИ 1,54—5,41).

Сравнительный анализ не выявил статистически значимых различий в распределении частот генотипов

и аллелей делеционного полиморфизма гена *GSTM1* между подгруппами больных с ИРМП ($\chi^2 = 1,34$; $p = 0,25$). В то же время между подгруппами больных ИРМП установлены статистически значимые различия по распределению частот генотипов ($\chi^2 = 8,08$; $p = 0,02$) и аллелей ($\chi^2 = 5,54$; $p = 0,02$) полиморфного локуса A313G гена *GSTP1* (см. таблицу). Частота аллеля G у больных с лимфогенным метастазированием оказалась выше (46,7%) по сравнению с больными без такового (29,6%). В свою очередь, частота аллеля A (70,5%) увеличивалась у больных без лимфогенного метастазирования по сравнению с пациентами с лимфогенным метастазированием ИРМП (53,3%). Частота генотипа AA была выше у больных без лимфогенного метастазирования ИРМП по сравнению с больными с таковым (43,2 и 28,3% соответственно; $\chi^2 = 6,84$; $p = 0,01$).

Анализ полиморфного локуса G28152A гена *XRCC1* у пациентов ИРМП с учетом лимфогенного метастазирования представлен в таблице. Установлены статистически значимые различия между группами в распределении частот генотипов ($\chi^2 = 9,33$; $p = 0,01$) и аллелей ($\chi^2 = 3,92$; $p = 0,047$). Аллель А маркера G28152A данного гена в группе больных ИРМП с лимфогенным метастазированием встречался достоверно чаще (59,2%), тогда как у больных без такового его частота составила 44,3% ($p = 0,047$). В то же время встречаемость гомозиготного генотипа АА оказалась выше у больных без лимфогенного метастазирования — 38,6% по сравнению с таковой в подгруппе с лимфогенным метастазированием — 13,3% ($p = 0,01$).

Как известно, золотым стандартом лечения ИРМП считается радикальная цистэктомия. При ее выполнении хирург стоит перед дилеммой, какой объем лимфодиссекции произвести: стандартный или расширенный. С одной стороны, расширенная лимфодиссекция позволяет удалить пораженные раком лимфоузлы, с другой — значительно увеличивает время операции и тяжесть самого вмешательства. При этом существующие методы дооперационного обследования (компьютерная и магнитно-резонансная томография) не всегда дают ответ на вопрос о наличии или отсутствии лимфогенной инвазии. В современной литературе работы, посвященные изучению ассоциации генетических маркеров с лимфогенной инвазией ИРМП, отсутствуют. В то же время выполненные исследования показали, что именно такие маркеры, как аллель *2С (ОР = 2,89; 95%-й ДИ 1,36—6,19) и генотип *1А*2С (ОР = 2,63; 95%-й ДИ 1,04—6,73) полиморфного локуса A2455G гена *CYP1A1*; аллель *1D (ОР = 2,88; 95%-й ДИ 1,54—5,41) и генотип *1D*1D (ОР = 3,17; 95%-й ДИ 1,05—9,95) полиморфного локуса T-2467delT гена *CYP1A2*; аллель G (ОР = 2,09; 95%-й ДИ 1,12—3,90) полиморфного локуса A313G гена *GSTP1*; аллель А (ОР = 1,82; 95% CI 1,01—3,30) полиморфного локуса G28152A гена *XRCC1*, предрасполагают к развитию лимфогенного метастазирования у больных ИРМП.

Заключение

Таким образом, ценность полученной информации состоит в том, что диагностика данных генети-

ческих маркеров у пациентов с ИРМП позволяет планировать объем лимфодиссекции при радикальной цистэктомии.

Литература

1. Аль-Шукри С.А., Ткачук В.Н., Волков Н.М., Дубина М.В. Прогностические молекулярно-генетические маркеры рака мочевого пузыря (обзор литературы) // Онкология. 2009. № 2. С. 78—84.
2. Глыбочко П.В., Понукалин А.Н., Шахназян Н.К., Захарова Н.Б. Значение маркеров опухолевого роста и ангиогенеза в диагностике рака мочевого пузыря // Онкология. 2009. № 2. С. 56—60.
3. Androutsopoulos V.P., Tsatsakis A.M., Spandidos D.A. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention // BMC Cancer. 2009. V. 9. P. 187—189.
4. Babjuk M., Oosterlinck W., Sylvester R. et al. Guidelines on TaT1 (non-muscle invasive) bladder cancer. European Association of Urology (EAU) // Eur. Urol. 2008. Aug. V. 54 (2). P. 303—314.
5. Brauers A., Buettner R., Jakse G. Second resection and prognosis of primary high risk superficial bladder cancer: is cystectomy often too early? // J. Urology. 2001. Mar. V. 165 (3) P. 808—810.
6. Gao W., Romkes M., Zhong S. et al. Genetic polymorphisms in the DNA repair genes *XPD* and *XRCC1*, *p53* gene mutations and bladder cancer risk // Oncol. Rep. 2010. Jul. V. 24 (1). P. 257—262.
7. Golka K., Hermes M., Selinski S. et al. Susceptibility to urinary bladder cancer: relevance of rs9642880[T], *GSTM1* 0/0 and occupational exposure // Pharmacogenet. Genomics. 2009. Nov. V. 19 (11). P. 903—906.
8. Grando J.P., Kuasne H., Losi-Guembarovski R. et al. Association between polymorphisms in the biometabolism genes *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* in bladder cancer // Clin. Exp. Med. 2009. Mar. V. 9 (1). P. 21—28.
9. Herr H., Lee C., Chang S., Lerner S. Bladder Cancer Collaborative Group. Standardization of radical cystectomy and pelvic lymph node dissection for bladder cancer: a collaborative group report // J. Urology. 2004. V. 171. P. 1823—1828.
10. Herr H.W., Faulkner J.R., Grossman H.B. et al. Surgical factors influence bladder cancer outcomes: a cooperative group report // J. Clin. Oncol. 2004. V. 22. P. 2781—2789.
11. Kim Y.K., Kim W.J. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer // J. Int. Urology. 2009. Jan. V. 16 (1). P. 17—22.
12. Grando J.P., Kuasne H., Losi-Guembarovski R. et al. Association between polymorphisms in the biometabolism genes *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* in bladder cancer // Clin. Exp. Med. 2009. Mar. V. 9 (1). P. 21—28.
13. Leissner J., Allhoff E.P., Hohenfellner R., Wolf H.K. Ranking of pelvic lymphadenectomy in therapy and prognosis of carcinoma of the bladder // Akt. Urol. 2003. V. 34. P. 392—397.
14. Leissner J., Ghoneim M.A., Abol-Eneim H. et al. Extended radical lymphadenectomy in patients with urothelial bladder cancer: results of a prospective multicenter study // J. Urology. 2004. V. 171. P. 139—144.
15. Leissner J., Hohenfellner R., Thüroff J.W., Wolf H.K. Lymphadenectomy in patients with transitional cell carcinoma of

Павлов В.Н., Измайлов А.А., Измайлова С.М. и др. Маркеры прогноза лимфогенного метастазирования рака мочевого пузыря

- the urinary bladder: significance for staging and prognosis // BJU Int. 2000. V. 85. P. 817—821.
16. *Mittal R.D., Singh R., Manchanda P.K. et al.* XRCC1 codon 399 mutant allele: a risk factor for recurrence of urothelial bladder carcinoma in patients on BCG immunotherapy // Cancer Biol. Ther. 2008. May. V. 7 (5). P. 645—650.
17. *Somali Sanyal, Petra J. de Verdier, Gunnar Steineck et al.* Polimorphisms in XPD, XPC and the risk of death in patients with urinary bladder neoplasms // Acta Oncologica. 2007. V. 46. P. 31—41.
18. *Stenzl A., Cowan N.C., De Santis M. et al.* Update of the Clinical Guidelines of the European Association of Urology on muscle-invasive and metastatic bladder carcinoma // Actas Urol. Esp. 2010. Jan. V. 34 (1). P. 51—62.
19. *Steven K., Poulsen A.L.* Radical cystectomy and extended pelvic lymphadenectomy: survival of patients with lymph node metastasis above the bifurcation of the common iliac vessels treated with surgery only // J. Urology. 2007. V. 178. P. 1218—1223.
20. *Wang C., Sun Y., Han R.* XRCC1 genetic polymorphisms and bladder cancer susceptibility: a meta-analysis // J. Urology. 2008. Oct. V. 72. P. 869—872.

Поступила в редакцию 15.12.2011 г.

Утверждена к печати 20.01..2012 г.

Сведения об авторах

В.Н. Павлов — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой урологии с курсом ИПО БГМУ (г. Уфа).

А.А. Измайлов — канд. мед. наук, доцент кафедры урологии с курсом ИПО, зав. отделением урологии клиники БГМУ (г. Уфа).

С.М. Измайлова — канд. мед. наук, кафедра биологии БГМУ (г. Уфа).

Т.В. Викторова — д-р мед. наук, кафедра биологии БГМУ (г. Уфа).

М.Ф. Урманце, кафедра урологии с курсом ИПО БГМУ (г. Уфа).

Для корреспонденции

Измайлов Адель Альбертович, e-mail: Izmailov75@mail.ru