

## РОЛЬ РОСТОВЫХ И ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ МЫШЕЧНО-ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Е.А. Усынин<sup>1</sup>, Л.В. Спирина<sup>1</sup>, Е.М. Слонимская<sup>1,2</sup>, И.В. Кондакова<sup>1</sup>,  
Е.Г. Григорьев<sup>1</sup>, А.К. Горбунов<sup>1</sup>

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск<sup>1</sup>

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск<sup>2</sup>  
634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5. E-mail: gusi70@list.ru<sup>1</sup>

### Аннотация

Проведен анализ молекулярных маркеров, ассоциированных с эффективностью предоперационной химиотерапии у больных с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря. **Цель исследования** – изучение связи уровня экспрессии транскрипционных факторов, сосудистого эндотелиального фактора роста, активности протеасом и кальпаинов в опухоли с эффективностью неoadъювантной химиотерапии больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря. **Материал и методы.** В исследование включены 50 больных с переходно-клеточным раком мочевого пузыря T<sub>2a-3b</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>(G<sub>2</sub>-G<sub>3</sub>) стадии. Содержание транскрипционных и ростовых факторов изучено методом ИФА, активность протеасом-флюорометрическим методом. **Результаты.** Достижение частичной регрессии новообразований после цитостатической терапии сопряжено с высокой активностью ростовых (VEGF) и транскрипционных (NF-κB, HIF-1) факторов в ткани опухоли. На фоне высокой активности ростовых и транскрипционных факторов отмечается низкая активность 26S протеасомного комплекса по отношению к пациентам со стабилизацией опухолевого процесса. **Заключение.** Выявлены дополнительные молекулярные критерии, которые могут рассматриваться в качестве предикторов неoadъювантной химиотерапии рака мочевого пузыря.

**Ключевые слова:** рак мочевого пузыря, транскрипционный фактор HIF-1α, VEGF, транскрипционный фактор NF-κB, протеасомы, кальпаины.

В 2014 г. в России зарегистрировано 14 908 новых случаев рака мочевого пузыря (РМП). Доля РМП в общей структуре онкологической заболеваемости составляет 4,9 %. В период с 2004 по 2014 г. заболеваемость выросла на 27,51 % у женщин, на 14,13 % – у мужчин и на 16,70 % – у лиц обоих полов [1, 2]. Согласно рекомендациям по лечению мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2015; European association of Urology (EAU), 2016), тактика лечения определяется при участии уролога, химиотерапевта и радиолога, которые оценивают целесообразность проведения неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) и возможности органосохраняющего лечения. Предоперационная химиотерапии обладает рядом преимуществ, она позволяет воздействовать на микрометастазы на ранних этапах лечения, потенциально отражает чувствительность к химиопрепаратам *in vivo*. Предположительно пациенты, ответившие на предоперационную химиотерапию, могут обладать более благоприятным прогнозом в отношении исхода заболевания [3–6]. На основании анализа

более 3000 случаев доказано, что у пациентов с локализованным раком мочевого пузыря, не выходящим за пределы органа, НАХТ значительно улучшает безрецидивную выживаемость на 9 %, а общую выживаемость – на 5 % по сравнению с радикальной цистэктомией [7, 8].

Ведется поиск лабораторных, клинических, морфологических и молекулярно-генетических параметров, позволяющих предсказывать эффективность неoadъювантной химиотерапии. В исследовании R. Takata et al. [9] было включено 27 пациентов РМП с T<sub>2a-3b</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> стадией, которые получали 2 курса неoadъювантной химиотерапии по схеме M-VAC. На основании биопсии опухоли, полученной при трансуретральной резекции, была изучена панель из 2 764 814 генов с использованием микрочипов. Авторы выделили 14 генов у 9 пациентов с регрессией опухоли в результате НАХТ. На основании профиля экспрессии этих генов была создана система прогнозирования эффективности химиотерапии. У пациентов с эффективным лечением показатели 3-летней безрецидивной выживаемости составили 57 %. У

больных, не ответивших на лечение, показатели 3-летней безрецидивной выживаемости составили 12 %. В связи с небольшим числом наблюдений было рекомендовано продолжить исследование.

Роль ангиогенеза в прогрессировании и рецидивировании опухолей мочевого пузыря активно изучается [10], VEGF рассматривается как независимый фактор в отношении риска развития рецидивов и метастазов. Установлено, что плотность микрососудов в опухоли является важным признаком, связанным с рецидивированием, опухолевым прогрессированием, метастазированием в лимфоузлы, кроме того, выявлены ассоциации между полиморфизмом гена VEGF и риском развития рецидива рака мочевого пузыря [11, 12]. Есть данные, что развитие злокачественных новообразований тесно связано с активностью факторов транскрипции, комплексом протеаз и кальпаинов, которые определяют такие важные свойства опухолей, как инвазия и метастазирование [13]. Протеасомы играют важную роль в поддержании функциональной активности клеток, в частности, в регуляции работы сигнальных систем, которые активируются при взаимодействии ростовых факторов с соответствующими рецепторами [14–16]. В экспериментальных условиях показано изменение активности и состава пула 26S протеасом в онкогенезе. Активно изучается роль протеасом в патогенезе злокачественных образований различных локализаций, в частности мочевого пузыря [17, 18]. С представленных позиций поиск новых предсказательных молекулярных маркеров, сопряженных с эффективностью неoadьювантной химиотерапии рака мочевого пузыря, является актуальным.

**Цель исследования** – изучение связи транскрипционных факторов, сосудистого эндотелиального фактора роста, активности протеасом и кальпаинов в опухолевой ткани у больных с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря с эффективностью неoadьювантной химиотерапии.

### Материал и методы

В исследование включено 50 пациентов с гистологически верифицированным диагнозом переходно-клеточный рак мочевого пузыря  $T_{2-3b}N_0M_0$ . Комбинированное органосохраняющее лечение пациентов предполагало проведение 2 курсов предоперационной химиотерапии по схеме M-VAC (метотрексат – 30 мг/м<sup>2</sup> в 1, 15 и 22-й дни; винбластин – 4 мг/м<sup>2</sup> в 1, 15 и 22-й дни; цисплатин – 70 мг/м<sup>2</sup> во 2-й день; доксорубин – 30 мг/м<sup>2</sup> во 2-й день), перерыв между курсами составил 4–6 нед. В последующем этим пациентам выполнялась ТУР мочевого пузыря с проведением 2 курсов послеоперационной химиотерапии по той же схеме. Непосредственная эффективность НАХТ оценивалась по шкале RECIST на основании результатов цистоскопии и СКТ/МРТ.

Материалом для исследования явились образцы опухолевой ткани, полученные при выполнении

диагностической биопсии до начала лечения и после хирургического этапа. Они замораживались и хранились при –80°C. В опухолевом материале определяли активность протеасом и кальпаинов, а также количественное содержание VEGF, VEGFR2, HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ Bp50 и NF- $\kappa$ Bp65, phospho-mTOR. Для получения гомогенатов замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфера (рН=7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ хлорид натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000 g и 4°C.

Химотрипсинподобную активность протеасом определяли в гомогенатах опухолевых тканей по гидролизу флуорогенного олигопептида N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin, утилизирующегося химотрипсинподобными центрами протеасом [5], на флуориметре «Hitachi-850» (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Реакционная смесь для определения активности 20S протеасом содержала 20 мМ трис-НСl (рН=7,5), 1 мМ дитиотреитол, 30 мкМ N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin. Реакцию проводили при 37°C в течение 20 мин и останавливали 1 % додецил сульфатом натрия. Для оценки активности примесных протеаз в образцах применяли специфический ингибитор протеасом – MG132. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка.

Образцы осветленных гомогенатов опухолей использовались для определения содержания VEGF (R&D Systems, DSL, США), HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p50 и NF- $\kappa$ B p65 субъединиц (Caymanchem, США) методом твердофазного иммуноферментного анализа на ИФА-анализаторе «Anthos 2020». Приготовление и очистка ядерных экстрактов тканевого гомогената проводились в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя наборов. Уровень белка в гомогенатах и ядерных экстрактах определялся по методу Лоури. Результаты определения содержания VEGF, VEGFR2, phospho-TOR выражали в пг/мг белка, а HIF-1 $\alpha$ , NF $\kappa$ B p50 и NF $\kappa$ B p65 – в условных единицах на мг белка в лунке.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ «Statistica 8.0». В зависимости от вида распределения результаты представлены как  $m \pm M$ , где  $m$  – среднее выборочное,  $M$  – ошибка среднего, или как медиана с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля). Значимость различий исследовали с помощью t-критерия Стьюдента или критерия Манна – Уитни.

### Результаты и обсуждение

По нашим данным, неoadьювантная полихимиотерапия у больных РМП обладает высокой эффективностью. Из 50 пациентов, включенных в

Таблица

**Уровень экспрессии молекулярных маркеров опухоли в зависимости от непосредственной эффективности неoadъювантной химиотерапии**

Показатель	Частичная регрессия (n=23)		Стабилизация (n=24)		Прогрессирование (n=2)	
	До НАХТ	После НАХТ	До НАХТ	После НАХТ	До НАХТ	После НАХТ
Тотальная активность протеасом, $\times 10^3$ Ед/мг белка	46,0 (38,2–80,0)	54,6 (38,2–84,0)	50,0 (38,2–80,0)	51,6 (40,1–75,3)	50,0	50,5
Активность 26S протеасом, $\times 10^3$ Ед/мг белка	15,6* (10,4–19,3)	20,8** (20,6–25,8)	17,7 (10,9–20,3)	17,3 (10,0–21,6)	16,7	17,8
Активность 20S протеасом, $\times 10^3$ Ед/мг белка	35,0 (24,2–48,5)	38,4 (29,5–46,3)	45,0 (24,2–60,5)	47,1 (24,2–60,5)	43,0	48,0
Общая активность кальпаинов, $\times 10^3$ Ед/мг белка	25,4 (21,5–51,9)	26,2 (29,4–68,5)	34,0 (25,3–68,9)	33,9 (24,2–71,4)	25,0	33,0
NF-κB p65, Ед/мг белка в лунке	22,3* (16,0–42,9)	13,1** (3,9–25,3)	12,6 (6,0–17,9)	10,4 (7,0–16,3)	18,2	22,0
NF-κB p50, Ед/мг белка в лунке	14,8 (10,5–20,25)	11,9 (5,4–42,0)	11,9 (5,65–20,25)	11,5 (5,65–20,25)	11,6	11,8
HIF-1α, Ед/мг белка в лунке	10,2 (6,6–14,3)	5,2 (4,4–10,8)	8,0 (3,6–14,3)	7,2 (3,7–11,3)	10,5	11,3
VEGF, Ед/мг белка в лунке	124,8* (101,5–186,2)	90,2** (81,5–134,7)	73,6 (55,5–140,0)	76,4 (58,0–145,5)	130,8	180,3

Примечание: \* – различия значимы по сравнению с группой больных со стабилизацией (p<0,05); \*\* – различия значимы по сравнению с показателями больных до лечения (p<0,05).

исследование, в 1 (2 %) случае отмечена полная регрессия опухоли, в 23 (46,0 %) – зарегистрирована частичная регрессия (ЧР) первичной опухоли, в 24 (48,0 %) – стабилизация процесса, в 2 (4 %) случаях наблюдалось прогрессирование заболевания.

Был изучен экспрессионный профиль ростовых, транскрипционных факторов, активность протеасом и кальпаинов в зависимости от непосредственной эффективности НАХТ у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (таблица). Установлено, что у пациентов с ЧР исходно наблюдался более высокий пороговый уровень ростовых и транскрипционных факторов по сравнению с больными, у которых зарегистрирована стабилизация процесса. Так, уровень ростового фактора VEGF до лечения у пациентов с частичной регрессией опухоли составил  $124,8 (101,5–186,2) \times 10^3$  Ед/мг белка, со стабилиза-

цией процесса –  $73,6 (55,5–140,0) \times 10^3$  Ед/мг белка (p<0,05). Аналогичная картина отмечена при определении уровня экспрессии NF-κB p65. У больных с частичной регрессией эти показатели составили  $22,3 (16,0–42,9) \times 10^3$  Ед/мг белка, со стабилизацией –  $12,6 (6,0–17,9) \times 10^3$  Ед/мг белка (p<0,05). При определении активности протеасом выявлены достоверные различия активности 26S протеасомного комплекса. Активность 26S протеасом у пациентов с ЧР была ниже, чем у больных со стабилизацией процесса – 15,6 против  $17,7 \times 10^3$  Ед/мг белка (p<0,05).

Таким образом, до начала лечения пациенты имеют различный исходный уровень активности ростовых, транскрипционных факторов и активность протеасом. В случае высокой активности ростовых и транскрипционных факторов в сочетании с низкой активностью протеасом до начала лечения прогнозируется высокая эффективность химиотерапии. При изучении динамики вышеуказанных параметров (рис. 1) после завершения цитостатической терапии отмечено, что у пациентов с частичной регрессией опухоли регистрируется снижение активности ростовых и транскрипционных факторов на фоне возрастающей активности 26S протеасом.

В результате НАХТ у пациентов с частичной регрессией опухоли зарегистрировано снижение активности VEGF от  $124,8 \times 10^3$  Ед/мг белка до  $90,2 \times 10^3$  Ед/мг белка (p<0,05). Активность NF-κB p65 также снижалась от  $22,3 \times 10^3$  Ед/мг белка до  $13,01 \times 10^3$  МЕ/мг белка (p<0,05) после лечения. Активность протеасом возрастала и составила  $20,8 \times 10^3$  Ед/мг белка (p<0,05), что на 25 % выше по отношению к этому показателю до лечения. Сле-

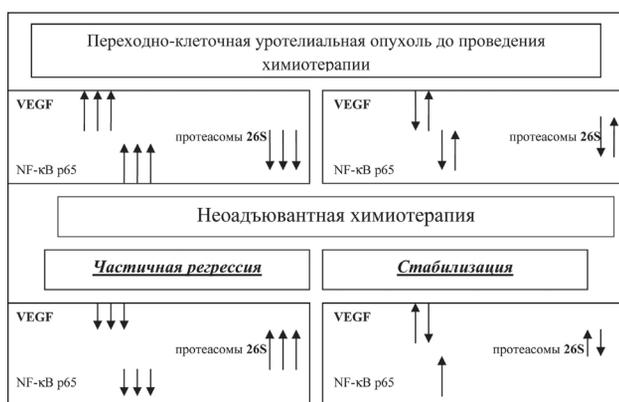


Рис. 1. Взаимосвязь ростовых транскрипторных факторов и протеасомной активности с эффективностью неoadъювантной химиотерапии

дует отметить, что активность ростовых и транскрипционных факторов у пациентов с частичной регрессией опухоли по окончании химиотерапии были выше исходных значений VEGF, NF-κB p65, определяемых у пациентов в группе со стабилизацией. Различия оказались не значимыми, но возможно, что выявленная тенденция позволит объяснить низкую эффективность НАХТ у группы больных со стабилизацией опухолевого процесса. Наиболее полно эффект химиотерапии реализуется на биологически более активных опухолях. В случаях низкой биологической активности опухолевой ткани действие цитостатиков менее эффективно

и не позволяет добиться регрессии опухолевых очагов.

**Заключение.** Эффективность химиотерапии у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря ассоциируется с исходно высокими уровнями транскрипционных факторов NF-κB p65, ростового фактора VEGF при низкой активности 26S протеасом в опухоли. В процессе противоопухолевого лечения при частичной регрессии новообразования отмечается снижение экспрессии NF-κB p65 и ростового фактора VEGF на фоне нарастающей активности 26S протеасомного комплекса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Тахауов Р.М., Чойнзонов Е.Л., Писарева Л.Ф., Карнов А.Б., Одинцова И.Н. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения Томской области. Здравоохранение Российской Федерации. 2003; 2: 30–32.
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2014 году. М., 2016; 236.
3. Винтисенко С.И., Слонимская Е.М., Усынин Е.А., Юрмазов З.А., Хурсевиц Н.А. Неoadъювантная химиотерапия в органосохранном лечении мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. Сибирский онкологический журнал. 2009; 2: 21–24.
4. Волкова М.И., Матвеев В.Б., Медведев С.В., Носов Д.А., Физурин К.М., Хмелевский Е.В., Черняев В.А. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком мочевого пузыря. М., 2014.
5. Попов А.М., Карякин О.Б. Органосохраняющее лечение инвазивного рака мочевого пузыря. Российский онкологический журнал. 2005; 3: 49–52.
6. Sternberg C.N. Neo-adjuvant and adjuvant chemotherapy of bladder cancer: Is there a role? Ann Oncol. 2002; 13 Suppl 4: 273–9.
7. Griffiths G., Hall R., Sylvester R., Raghavan D., Parmar M.K. International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial. J Clin Oncol. 2011 Jun 1; 29 (16): 2171–7. doi: 10.1200/JCO.2010.32.3139.
8. Grossman H.B., Natale R.B., Tangen C.M., Speights V.O., Vogelzang N.J., Trump D.L., deVere White R.W., Sarosdy M.F., Wood D.P. Jr., Raghavan D., Crawford E.D. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. N Engl J Med. 2003 Aug 28; 349 (9): 859–66.
9. Takata R., Obara W., Fujioka T. Study of the prediction system for clinical response to M-VAC neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer. Aktuelle Urol. 2010 Jan; 41 Suppl 1: S41–5. doi: 10.1055/s-0029-1224655.
10. Fergelot P., Rioux-Leclercq N., Patard J.J. Molecular Pathways of tumour angiogenesis and new targeted therapeutic approaches in renal cancer. Prog Urol. 2005; 15 (6): 1021–1029.
11. García-Closas M., Malats N., Real F.X., Yeager M., Welch R., Silverman D., Kogevinas M., Dosemeci M., Figueroa J., Chatterjee N., Tardón A., Serra C., Carrato A., García-Closas R., Murta-Nascimento C., Rothman N., Chanock S.J. Large-scale evaluation of candidate genes identifies association between VEGF polymorphism and bladder cancer risk. PLoS Genet. 2007 Feb 23; 3 (2): e29. doi: 10.1371/journal.pgen.0030029.
12. Goddard J.C., Sutton C.D., Furness P.N., O'Byrne K.J., Kockelbergh R.C. Microvessel density at presentation predicts subsequent muscle invasion in superficial bladder cancer. Clin Cancer Res. 2003 Jul; 9 (7): 2583–6.
13. Juvekar A., Manna S., Ramaswami S., Chang T.P., Vu H.Y., Ghosh C.C., Celiker M.Y., Vancuriva I. Bortezomib induces nuclear translocation of IκBα resulting in gene-specific suppression of NF-κB-dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL. Mol Cancer Res. 2011 Feb; 9 (2): 183–94. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0368.
14. Spirina L.V., Kondakova I.V., Choyznov E.L., Chigevskaya S.Y., Shishkin D.A., Kulbakin D.Y. Expression of vascular endothelial growth factor and transcription factors HIF-1 and NF-κB expression in squamous cell carcinoma of head and neck; association with proteasome and calpains activity. J Cancer Res Clin Oncol. 2013 Apr; 139 (4): 625–33. doi: 10.1007/s00432-012-1366-0.
15. Wu W.K., Volta V., Cho C.H., Wu Y.C., Li H.T., Yu L., Li Z.J., Sung J.J. Repression of protein translation and mTOR signaling by proteasome inhibitor in colon cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Sep 4; 386 (4): 598–601. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.080.
16. Yue C.X., Ma J., Zhou H.J., Tang Q.L., Li L.L., Bi F., Xue Y. The effect of RhoA and proteasome inhibitor MG132 on angiogenesis in tumors. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2011 Jul; 42 (4): 445–50.
17. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А., Винтисенко С.И. Регуляция ангиогенеза при злокачественных новообразованиях почки и мочевого пузыря. Сибирский онкологический журнал. 2008; 28: 65–70.
18. Кондакова И.В., Спирина Л.В., Коваль В.Д., Шашова Е.Е., Чойнзонов Е.Л., Иванова Э.В., Коломиец Л.А., Чернышова А.Л., Слонимская Е.М., Усынин Е.А., Афанасьев С.Г. Химотрипсинподобная активность и субъединичный состав протеасом в злокачественных опухолях человека. Молекулярная биология. 2014; 48 (3): 444–451.

Поступила 4.07.16

Принята в печать 30.10.16

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Усынин Евгений Анатольевич**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения общей онкологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: gusi70@list.ru. SPIN-код: 1804-0292.

**Спирина Людмила Викторовна**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: spirinalv@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 1336-8363.

**Слонимская Елена Михайловна**, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения общей онкологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; профессор кафедры онкологии, Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-код: 7763-6417.

**Кондакова Ирина Викторовна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии опухолей, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 9338-4149.

**Григорьев Евгений Геннадьевич**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения лучевой диагностики, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: adresprostoy@gmail.com. SPIN-код: 2079-2370.

**Горбунов Алексей Константинович**, младший научный сотрудник отделения общей онкологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: Goorbunov@gmail.com. SPIN-код: 3590-3479.

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить

## THE ROLE OF GROWTH AND TRANSCRIPTION FACTORS IN EVALUATING THE EFFECTIVENESS OF NEOADYUVANTNOY CHEMOTHERAPY IN PATIENTS WITH MUSCLE-INVASIVE BLADDER CANCER

**E.A. Usynin<sup>1</sup>, L.V. Spirina<sup>1</sup>, E.M. Slonimskaya<sup>1,2</sup>, I.V. Kondakova<sup>1</sup>, E.G. Grigoriev<sup>1</sup>, A.K. Gorbunov<sup>1</sup>**

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia<sup>1</sup>

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia<sup>2</sup>

5, Kooperativny Street, 634009-Tomsk, Russia. E-mail: gusi70@list.ru<sup>1</sup>

### Abstract

The study was undertaken to analyse molecular markers associated with clinical response to preoperative chemotherapy in patients with muscle-invasive bladder cancer. **The purpose of the study** was to determine the relationship between the expression of transcription factors, vascular endothelial growth factor (VEGF), activity of proteasomes and calpains in tumors and the response to neoadjuvant chemotherapy of patients with muscle-invasive bladder cancer. **Material and methods.** The study included 50 patients with histologically verified transitional cell carcinoma of the bladder T<sub>2a-3b</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> (G<sub>2</sub>-G<sub>3</sub>). The levels of transcription and growth factors were determined by an immunoenzymatic assay. Proteasome activity was measured using the fluorometric method. **Results.** Patients who achieved partial tumor regression demonstrated higher levels of VEGF and transcription factors (NF-κB and HIF-1), but lower levels of the 26S proteasome compared to those observed in patients with stable disease. **Conclusion.** Additional molecular markers that can be considered as predictors of response to neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer were identified.

**Key words:** bladder cancer, transcription factor HIF-1α, VEGF, transcription factor NF-κB, proteasomes, calpains.

### REFERENCES

1. *Takhauov R.M., Choinzonov E.L., Pisareva L.F., Karpov A.B., Odintsova I.N.* The incidence of malignant tumors of the population of Tomsk region. *Zdravookhranenie Rossiiskoi Federatsii*. 2003; 2: 30–32. [in Russian]
2. *Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V.* Malignancies in Russia in 2014. Moscow, 2016; 236. [in Russian]
3. *Vintizenko S.I., Slonimskaya E.M., Usynin E.A., Yurmazov Z.A., Khursevich N.A.* Neoadjuvant chemotherapy in the treatment of organ-muscle-invasive bladder cancer. *Siberian Journal of Oncology*. 2009; 2: 21–24. [in Russian]
4. *Volkova M.I., Matveev V.B., Medvedev S.V., Nosov D.A., Figurin K.M., Chmielewski E.V., Chernyaev V.A.* Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of bladder cancer patients. Moscow. 2014. [in Russian]
5. *Popov A.M., Karyakin O.B.* Organ-preserving treatment of invasive bladder cancer. *Russian Journal of Oncology*. 2005; 3: 49–52. [in Russian]
6. *Sternberg C.N.* Neo-adjuvant and adjuvant chemotherapy of bladder cancer: Is there a role? *Ann Oncol*. 2002; 13 Suppl 4: 273–9.
7. *Griffiths G., Hall R., Sylvester R., Raghavan D., Parmar M.K.* International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial. *J Clin Oncol*. 2011 Jun 1; 29 (16): 2171–7. doi: 10.1200/JCO.2010.32.3139.
8. *Grossman H.B., Natale R.B., Tangen C.M., Speights V.O., Vogelzang N.J., Trump D.L., deVere White R.W., Sarosdy M.F., Wood D.P. Jr., Raghavan D., Crawford E.D.* Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med*. 2003 Aug 28; 349 (9): 859–66.
9. *Takata R., Obara W., Fujioka T.* Study of the prediction system for clinical response to M-VAC neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer. *Aktuelle Urol*. 2010 Jan; 41 Suppl 1: S41–5. doi: 10.1055/s-0029-1224655.
10. *Fergelot P., Rioux-Leclercq N., Patard J.J.* Molecular Pathways of tumour angiogenesis and new targeted therapeutical approaches in renal cancer. *Prog Urol*. 2005; 15 (6): 1021–1029.
11. *Garcia-Closas M., Malats N., Real F.X., Yeager M., Welch R., Silverman D., Kogevinas M., Dosemeci M., Figueroa J., Chatterjee N., Tardón A., Serra C., Carrato A., Garcia-Closas R., Murta-Nascimento C., Rothman N., Chanock S.J.* Large-scale evaluation of candidate genes identifies association between VEGF polymorphism and bladder cancer risk. *PLoS Genet*. 2007 Feb 23; 3 (2): e29. doi: 10.1371/journal.pgen.0030029.
12. *Goddard J.C., Sutton C.D., Furness P.N., O'Byrne K.J., Kockelbergh R.C.* Microvessel density at presentation predicts subsequent muscle invasion in superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Jul; 9 (7): 2583–6.
13. *Juvekar A., Manna S., Ramaswami S., Chang T.P., Vu H.Y., Ghosh C.C., Celiker M.Y., Vancuriva I.* Bortezomib induces nuclear translocation of IκBα resulting in gene-specific suppression of NF-κB-dependent

transcription and induction of apoptosis in CTCL. *Mol Cancer Res.* 2011 Feb; 9 (2): 183–94. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0368.

14. *Spirina L.V., Kondakova I.V., Choyzonov E.L., Chigevskaya S.Y., Shishkin D.A., Kulbakin D.Y.* Expression of vascular endothelial growth factor and transcription factors HIF-1 and NF- $\kappa$ B expression in squamous cell carcinoma of head and neck; association with proteasome and calpains activity. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013 Apr; 139(4): 625–33. doi: 10.1007/s00432-012-1366-0.

15. *Wu W.K., Volta V., Cho C.H., Wu Y.C., Li H.T., Yu L., Li Z.J., Sung J.J.* Repression of protein translation and mTOR signaling by proteasome inhibitor in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Sep 4; 386(4): 598–601. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.080.

16. *Yue C.X., Ma J., Zhou H.J., Tang Q.L., Li L.L., Bi F., Xue Y.* The effect of RhoA and proteasome inhibitor MG132 on angiogenesis in tumors. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2011 Jul; 42(4): 445–50.

17. *Spirina L.V., Kondakova I.V., Usynin Y.A., Vintzenko S.I.* Angiogenesis regulation in renal and bladder cancers. *Siberian Journal of Oncology.* 2008; 28: 65–70. [in Russian]

18. *Kondakova I.V., Spirina L.V., Koval V.D., Shashova E.E., Choyzonov E.L., Ivanova E.V., Kolomiets L.A., Chernyshova A.L., Slonimskaya E.M., Usynin E.A., Afanas'ev S.G.* Chymotrypsin-like activity and subunit composition of proteasomes in human cancers. *Mol. Biol.* 2014; 48 (3): 444–451. [in Russian]

Received 4.07.16

Accepted 30.10.16

#### ABOUT THE AUTHORS

**Usynin Evgeny A.**, MD, PhD, Senior Researcher, General Oncology Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Medical Sciences (Tomsk, Russian Federation). E-mail: gusi@list.ru. SPIN-code: 1804-0292.

**Spirina Lyudmila V.**, MD, DSc, Senior Researcher, Laboratory of Tumor Biochemistry, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Medical Sciences (Tomsk, Russian Federation). E-mail: spirinalv@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 1336-8363.

**Kondakova Irina V.**, MD, DSc, Professor, Tumor Biochemistry Laboratory, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Medical Sciences (Tomsk, Russian Federation). E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 9338-4149.

**Slonimskaya Elena M.**, MD, DSc, Professor, Head of General Oncology Department, Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Department of Oncology, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-code: 7763-6417.

**Grigoriev Evgeny G.**, MD, PhD, Senior Researcher, Diagnostic Imaging Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Medical Sciences (Tomsk, Russian Federation). E-mail: adresprostoy@gmail.com. SPIN-code: 2079-2370.

**Gorbunov Alexey K.**, MD, Junior Researcher, General Oncology Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Medical Sciences (Tomsk, Russian Federation). E-mail: Goorbunov@gmail.com. SPIN-code: 3590-3479.

**Authors declare lack of the possible conflicts of interests**