

УДК 616.62-006.6-089-036.868 (476)

М. П. СМАЛЬ<sup>1</sup>, А. И. РОЛЕВИЧ<sup>2</sup>, Т. И. НАБЕБИНА<sup>2</sup>, член-корреспондент С. А. КРАСНЫЙ<sup>2</sup>,  
Р. И. ГОНЧАРОВА<sup>1</sup>

### МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНА *RUNX3* КАК ФАКТОР ПРОГНОЗА ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ БЕЗ МЫШЕЧНОЙ ИНВАЗИИ

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

*M.Smal@igc.by; R.Goncharova@igc.by*

<sup>2</sup>РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Лесной, Беларусь

*alexander.rolevich@gmail.com; nabebina.t@yandex.by; SergeyKrasny@tut.by*

Проведен анализ статуса метилирования гена *RUNX3* в проспективной группе из 262 пациентов, страдающих раком мочевого пузыря (РМП). В отличие от нормального уротелия, в опухолевых клетках мочевого пузыря наблюдалась высокая частота гиперметилирования промоторной области гена *RUNX3*, равная 63 %. Выявлена статистически значимая ассоциация эпигенетических нарушений исследуемого гена с агрессивным опухолевым фенотипом: высокой степенью распространения, низкой степенью дифференцировки и большими размерами опухоли. Установлено, что гиперметилирование гена *RUNX3* являлось независимым фактором риска в отношении прогрессирования и онкоспецифической выживаемости в группе пациентов с РМП без мышечной инвазии.

*Ключевые слова:* рак мочевого пузыря, ген *RUNX3*, гиперметилирование, прогностическое значение.

М. П. СМАЛЬ<sup>1</sup>, А. И. РОЛЕВИЧ<sup>2</sup>, Т. И. НАБЕБИНА<sup>2</sup>, С. А. КРАСНЫЙ<sup>2</sup>, Р. И. ГОНЧАРОВА<sup>1</sup>

### *RUNX3* GENE METHYLATION AS A PROGNOSTIC FACTOR IN NON-MUSCLE-INVASIVE BLADDER CANCER

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

*M.Smal@igc.by; R.Goncharova@igc.by*

<sup>2</sup>N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Lesnoy, Belarus

*alexander.rolevich@gmail.com; nabebina.t@yandex.by; SergeyKrasny@tut.by*

The analysis of the *RUNX3* gene methylation status was conducted in the prospective group of 262 bladder cancer patients. In comparison to normal urothelium, a high frequency (63 %) of *RUNX3* promoter hypermethylation was observed in tumor tissues. A statistically significant association of *RUNX3* epigenetic abnormalities with a more aggressive tumor phenotype – an advanced tumor stage and grade, as well as a large tumor size – was found. We have shown that *RUNX3* hypermethylation is an independent risk factor for progression and cancer-specific survival in the group of patients with non-muscle invasive bladder cancer.

*Keywords:* bladder cancer, *RUNX3* gene, hypermethylation, prognostic significance.

**Введение.** Рак мочевого пузыря (РМП) представляет собой гетерогенную группу злокачественных новообразований, подавляющее большинство из которых составляют переходноклеточные карциномы. Более половины всех выявляемых опухолей мочевого пузыря локализируются в пределах слизистого (Ta, CIS) или подслизистого (T1) слоя и относятся к РМП без мышечной инвазии (РМП БМИ). Несмотря на относительно благоприятный прогноз для пациентов с РМП БМИ, 50–80 % опухолей рецидивируют и 10–25 % прогрессируют в мышечно-инвазивный рак (МИ РМП) ( $\geq T2$ ), характеризующийся высоким уровнем смертности [1].

Применяемые в настоящее время клинико-патологические параметры для оценки прогноза клинического течения РМП не позволяют с точностью определять биологическое поведение опухолей и предсказывать рецидивирование, прогрессирование и метастазирование РМП. В связи с этим возникает необходимость поиска дополнительных прогностических маркеров. Наиболее перспективными из них могут являться мутации в протоонкогенах и генах-супрессорах опухолей, а также паттерны метилирования промоторных областей специфичных для РМП генов. Ра-

нее нами выявлена высокая частота соматических мутаций генов *FGFR3* и *TP53*, ассоциированная с РМП БМИ и МИ РМП соответственно [2; 3].

В последнее время большое внимание уделяется не только структурным нарушениям генов, но и эпигенетическим изменениям, к которым относят метилирование ДНК, посттрансляционную модификацию гистонов и замалчивание генов микро-РНК. Было показано, что аномальное метилирование вносит вклад в развитие различных типов злокачественных новообразований, в том числе и РМП [4]. Подобно другим типам рака, опухолевые клетки мочевого пузыря характеризуются глобальным гипометилированием и сайт-специфическим гиперметилированием CpG-островков в промоторных областях генов [5]. Последнее событие является одним из установленных механизмов сайленсинга генов-супрессоров опухолевого роста посредством инактивации транскрипции и часто ассоциировано с агрессивным опухолевым фенотипом и неблагоприятным исходом заболевания [6].

Для РМП показано аномальное метилирование и сниженная экспрессия ряда генов, включая *RUNX3*, *RASSF1A*, *p16*, *RAR $\beta$*  и *E-cadherin* [7]. *RUNX3* – один из трех Runt-домен-содержащих транскрипционных факторов (*RUNX1*, *RUNX2* и *RUNX3*), являющихся ключевыми регуляторами экспрессии ряда генов и задействованных в таких важных процессах, как гематопоз, остеогенез и нейрогенез [8]. Полагают, что *RUNX3* действует как онкосупрессор, поскольку активирует экспрессию антионкогенного пути ARF-p21 и участвует в индукции апоптоза [9].

Рядом авторов выявлена высокая частота гиперметилирования гена *RUNX3* при РМП, статистически значимо ассоциированная с высокой степенью распространения, низкой степенью дифференцировки, наличием рецидивов и прогрессии [5; 10–12]. Однако несмотря на то что полученные данные свидетельствуют о возможности использования *RUNX3* в качестве потенциального маркера неблагоприятного течения заболевания, результаты ретроспективных исследований требуют валидации в проспективных выборках пациентов. Таким образом, целью настоящей работы явилось изучение статуса метилирования гена *RUNX3* в проспективной группе белорусских пациентов, страдающих РМП, и оценка его прогностического значения.

**Материалы и методы исследования.** В исследование включены 24 донора без онкопатологии (16 мужчин и 8 женщин) в возрасте от 27 до 79 лет (медиана – 63,5 лет) и 262 пациента с гистологически подтвержденным диагнозом РМП. Образцы опухолевого материала отобраны проспективно в период с 2010 по 2014 г. в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова. Возраст пациентов (208 мужчин и 54 женщины) находился в диапазоне от 31 до 93 лет (медиана – 67 лет). Все случаи РМП классифицированы по системе TNM (2002). Степень дифференцировки опухолевой ткани определялась гистологически в соответствии с классификациями ВОЗ 1973 и 2004 гг. Клинико-анамнестические данные пациентов представлены в табл. 1.

Геномную ДНК выделяли из образцов мочи здоровых доноров ( $n = 21$ ), тканевых проб мочевого пузыря от индивидуумов с неподтвержденным диагнозом РМП ( $n = 3$ ) и свежего опухолевого материала пациентов с уротелиальной карциномой ( $n = 262$ ) посредством ферментативной обработки протеиназой К и последующей фенол-хлороформной экстракции. Для этого образцы тканей мочевого пузыря гомогенизировали, а образцы мочи в объеме 30–50 мл центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин, после чего осадок промывали дважды буфером, содержащим 10мМ Tris-HCl, 1мМ ЭДТА и 100мМ NaCl.

Бисульфитную модификацию ДНК проводили с использованием набора EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research) в соответствии с рекомендациями производителя. Статус метилирования гена *RUNX3* определяли с помощью метил-специфической ПЦР с праймерами, предложенными Kim и соавт. [10]. Реакционная смесь общим объемом 15 мкл содержала 100 нг бисульфит-конвертированной ДНК, 1х ПЦР буфер, 0,2 мкМ каждого праймера, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ dNTPs, 0,3 единицы активности Taq полимераза (Праймтех) и ДМСО в конечной концентрации 5 %. После 15-минутной инкубации при 95 °С проводили 40 циклов амплификации (денатурация при 99 °С – 1 с, отжиг при 70 °С, 69 °С и 61 °С – 10 с для выявления неконвертированной, метилированной и неметилированной ДНК соответственно, элонгация при 72 °С – 10 с) в термоциклере C1000 Thermal cycler (Bio-Rad). Конечную элонгацию осуществляли в течение

Т а б л и ц а 1. Характеристика группы исследования и статус метилирования гена *RUNX3* в зависимости от клинических параметров

Характеристика	Класс	Общее количество, <i>n</i>	Метилирование <i>RUNX3</i> , <i>n</i> (%)	<i>p</i>
Пол	Мужской	208	134 (64,4)	0,34
	Женский	54	31 (57,4)	
Возраст	До 60 лет	59	30 (50,8)	0,028
	60 лет и более	203	135 (66,5)	
Категория Т	Ta	42	19 (45,2)	0,003
	T1	132	80 (60,6)	
	T ≥ 2	88	66 (75,0)	
Наличие метастазов	Да	20	14 (70,0)	0,66
	Нет	226	141 (62,4)	
Размер опухоли	До 3 см	112	61 (54,5)	0,015
	3 см и более	149	103 (69,1)	
Степень дифференцировки (ВОЗ 1973)	G1	88	41 (46,6)	<0,001
	G2	114	80 (70,2)	
	G3	57	43 (75,4)	
Степень дифференцировки (ВОЗ 2004)	ПУОНЗП / Low grade	151	82 (54,3)	<0,001
	High grade	108	81 (75,0)	
Мультифокальность опухоли	Одиночная опухоль	101	59 (58,4)	0,26
	Множественная опухоль	159	104 (65,4)	
Статус курения	Не курит	75	48 (64,0)	0,94
	Курил ранее	74	47 (63,5)	
	Курит	104	64 (61,5)	

П р и м е ч а н и е. ПУОНЗП – папиллярная уротелиальная опухоль с низким злокачественным потенциалом.

2 мин при 72 °С. В качестве положительного контроля метилирования была использована *in vitro* метилированная ДНК, полученная посредством обработки CpG-метилтрансферазой (Thermo Scientific). Анализ продуктов метил-специфической ПЦР проводили в 8 %-ном полиакриламидном геле при напряжении 130 В. Результаты электрофореза визуализировали с помощью бромистого этидия.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ SPSS Statistics 17.0. Статистическую значимость различий между исследуемыми группами анализировали с помощью критерия  $\chi^2$  и *U*-теста Манна–Уитни. Безрецидивную выживаемость, выживаемость до прогрессирования и скорректированную (онкоспецифическую) выживаемость определяли по методу Каплана–Мейера, значимость различий между показателями выживаемости оценивали при помощи log-rank теста. Влияние потенциальных факторов риска на отдаленные результаты лечения оценивали с помощью моно- и мультивариантного регрессионного анализа пропорциональных рисков Кокса. В мультивариантный анализ были включены переменные, статистическая значимость которых была меньше 0,1 в моновариантном анализе. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Метилирование гена *RUNX3* в контрольной группе и у пациентов с РМП. Для определения специфичности гиперметилирования гена *RUNX3* к РМП нами изучена эпигенетическая изменчивость этого гена как в контрольной группе из 24 индивидуумов без онкопатологии, так и в группе из 262 пациентов с РМП. Ни в одном образце контрольной группы не выявлено гиперметилирование промоторной области *RUNX3*. Подобно нашим результатам, в ряде работ сообщалось об отсутствии метилирования *RUNX3* в нормальных тканях мочевого пузыря, предстательной железы, легких и молочной железы [5; 13].

В то же время в 165 образцах (63,0 %) опухолевого материала наблюдались эпигенетические изменения исследуемого гена. Согласно литературным данным, частота гиперметилирования этого гена при РМП варьирует в пределах от 28,1 до 73 % [5; 12] в зависимости от состава включенных в исследование опухолей.

Нами выявлена статистически значимая ассоциация аномального метилирования гена *RUNX3* с увеличением возраста пациентов ( $p = 0,017$ , тест Манна–Уитни). Wolff и соавт. [14], наблюдавшие такую же зависимость, предложили использовать статус метилирования *RUNX3* как критерий оценки возраста уротелиальной карциномы, поскольку в нормальных тканях данные эпигенетические изменения отсутствуют.

В настоящем исследовании гиперметилирование *RUNX3* статистически значимо чаще наблюдалось в мышечно-инвазивных опухолях (75,0 %) по сравнению с немышечно-инвазивными (56,9 %) ( $p = 0,004$ ). При этом наименьшая частота эпигенетических нарушений *RUNX3*, равная 45 %, отмечалась при категории Та (табл. 1). Кроме того, выявлена строгая корреляция между статусом метилирования исследуемого гена и степенью дифференцировки опухоли: при G1 частота гиперметилирования составила приблизительно 47 %, при G2 – 70 % и при G3 – 75 %. По частоте эпигенетических изменений в промоторной области *RUNX3* обнаружены статистически значимые различия между low-grade (54,3 %) и high-grade (75,0 %) уротелиальными карциномами. Кроме того, гиперметилирование *RUNX3* значительно чаще наблюдалось в опухолях больших размеров (табл. 1). Более высокая частота метилирования гена *RUNX3* отмечалась в метастатических опухолях по сравнению с неметастатическими, однако эта зависимость не достигла уровня статистической значимости. Корреляции между эпигенетическими изменениями исследуемого гена и такими характеристиками, как пол, статус курения и мультифокальность опухоли, обнаружено не было (табл. 1).

Таким образом, полученные результаты указывают на тесную связь гиперметилирования гена *RUNX3* с агрессивными низкодифференцированными мышечно-инвазивными опухолями больших размеров, что согласуется с данными других авторов [5; 10; 11; 14; 15].

**Прогностическое значение статуса метилирования гена *RUNX3* при РМП.** Определение роли статуса метилирования гена *RUNX3* в предсказании прогноза проводилось на выборке из 230 пациентов, 32 пациента выбыли из-под наблюдения. Длительность наблюдения колебалась от 32 до 60 мес., медиана наблюдения составила 46 мес. В течение этого периода у 43 из 150 пациентов с РМП БМИ (28,7 %) выявлены рецидивы, в 6 % (9 из 150) случаев зарегистрировано прогрессирование в мышечно-инвазивную форму, 69 пациентов умерли, в том числе 34 – от РМП.

При наличии гиперметилирования исследуемого гена наблюдалось снижение 3-летней безрецидивной выживаемости до 68,8 % (ДИ 58,8–78,8 %) по сравнению с таковой при отсутствии гиперметилирования (80,2 %, ДИ 70,0–90,4 %), однако это снижение не достигло уровня статистической значимости ( $p = 0,19$ ).

Установлены статистически значимые различия в выживаемости до прогрессирования в зависимости от статуса метилирования гена *RUNX3* ( $p = 0,045$ ) (рис. 1). У пациентов с эпигенетическими изменениями *RUNX3* прогрессирование отмечалось в 9,3 % (8 из 86) случаев, тогда как

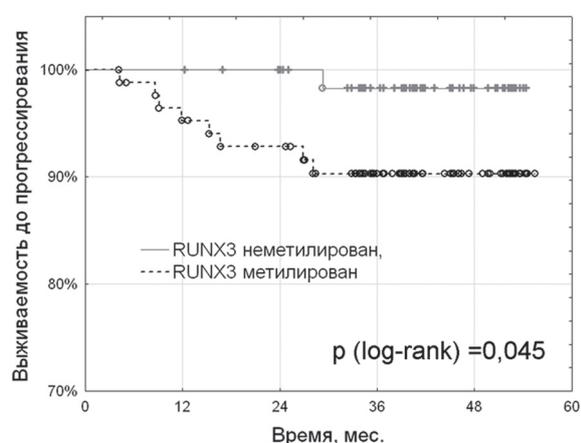


Рис. 1. Выживаемость до прогрессирования в зависимости от статуса метилирования гена *RUNX3*

у пациентов с неметилированным геном – в 1,6 % (1 из 64) наблюдений. В мультивариантном регрессионном анализе пропорциональных рисков Кокса единственными независимыми факторами риска прогрессирования РМП БМИ являлись наличие рецидивной опухоли (ОР 6,4; 95 % ДИ 1,53–27,04;  $p = 0,011$ ) и статус метилирования гена *RUNX3* (ОР 9,1; 95 % ДИ 1,06–78,35;  $p = 0,044$ ) (табл. 2).

В отношении онкоспецифической выживаемости не выявлено прогностическое значение эпигенетической изменчивости гена *RUNX3* в общей группе пациентов, однако наблюдалось некоторое повышение уровня смертности в случае эпигенетических нарушений. Так, 3-летняя скорректированная выживаемость пациентов с мети-

Т а б л и ц а 2. Результаты моно- и многофакторного анализа выживаемости до прогрессирования

Показатель	Монофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОР	<i>p</i>	ОР	<i>p</i>
Пол	2,87 (ДИ 0,36–22,98)	0,32		
Возраст, непрерывный показатель	1,07 (ДИ 0,99–1,14)	0,079	1,07 (ДИ 0,99–1,17)	0,11
Рецидивная опухоль против первичной	6,42 (ДИ 1,6–25,67)	0,009	6,42 (ДИ 1,53–27,04)	0,011
Единичная опухоль против мультифокальной	0,51 (ДИ 0,11–2,47)	0,4		
Размер, непрерывный показатель	0,5 (ДИ 0,24–1,05)	0,066	0,52 (ДИ 0,25–1,1)	0,086
T1 против Та	1,2 (ДИ 0,25–5,77)	0,82		
G	1,0	0,38		
G2 против G1	2,39 (ДИ 0,57–10,02)	0,23		
G3 против G1	3,68 (ДИ 0,38–35,43)	0,26		
Статус метилирования гена <i>RUNX3</i>	6,36 (ДИ 0,8–50,83)	0,08	9,13 (ДИ 1,06–78,35)	0,044

лированным *RUNX3* составила 82,2 % (ДИ 75,5–88,9 %), а при отсутствии гиперметилирования – 90,2 % (ДИ 83,7–96,7 %) ( $p = 0,15$ ). При раздельном анализе пациентов с РМП БМИ и МИ РМП обнаружено, что эпигенетические изменения исследуемого гена статистически значимо ассоциированы с более низкой скорректированной выживаемостью в группе с мышечно-инвазивными опухолями ( $p = 0,048$ ) (рис. 2), в то время как при МИ РМП статистически значимых различий в онкоспецифической выживаемости не выявлено ( $p = 0,62$ ). Как и в случае выживаемости до прогрессирования, многофакторный регрессионный анализ Кокса показал, что гиперметилирование гена *RUNX3* оказывает независимое влияние на онкоспецифическую выживаемость пациентов с РМП БМИ (ОР 9,4; 95 % ДИ 1,14–77,95;  $p = 0,037$ ) совместно с наличием рецидивной опухоли (ОР 3,97; 95 % ДИ 1,04–15,16;  $p = 0,044$ ).

В литературе имеются противоречивые данные относительно роли эпигенетической изменчивости гена *RUNX3* в предсказании отдаленных результатов лечения. Согласно данным ряда исследований, аномальное метилирование гена *RUNX3* статистически значимо ассоциировано с рецидивированием [5; 11; 12] и прогрессированием РМП БМИ [5; 10; 11], а также сниженной онкоспецифической выживаемостью [10]. Однако в работах других авторов прогностическое значение гиперметилирования *RUNX3* не выявлено [15]. В нашем исследовании обнаружено, что аномальное метилирование гена *RUNX3* оказывает независимое влияние на снижение выживаемости до прогрессирования и скорректированной выживаемости в проспективной группе пациентов с РМП БМИ.

**Заключение.** В настоящем исследовании выявлена высокая частота специфичных для РМП эпигенетических изменений гена *RUNX3*, равная 63 %. Гиперметилирование промоторной области исследуемого гена статистически значимо чаще наблюдалось у пациентов старшей возрастной группы и было ассоциировано с низкодифференцированными мышечно-инвазивными опухолями больших размеров. При РМП БМИ частота гиперметилирования *RUNX3* составила 57 %, тогда как при МИ РМП этот показатель был равен 75 %. Анализ прогностического значения статуса метилирования гена *RUNX3* показал, что эпигенетические изменения исследуемого гена являются независимыми факторами риска в отношении прогрессирования и онкоспецифической выживаемости пациентов с РМП БМИ. Определение эпигенетической изменчивости *RUNX3* позволит выявить группу пациентов с неблагоприятным прогнозом заболевания. Кроме того, использование статуса метилирования гена *RUNX3* может быть перспективным в терапии РМП ввиду обратимости эпигенетических нарушений под действием ингибиторов метилирования и возможности восстановления функции гена.

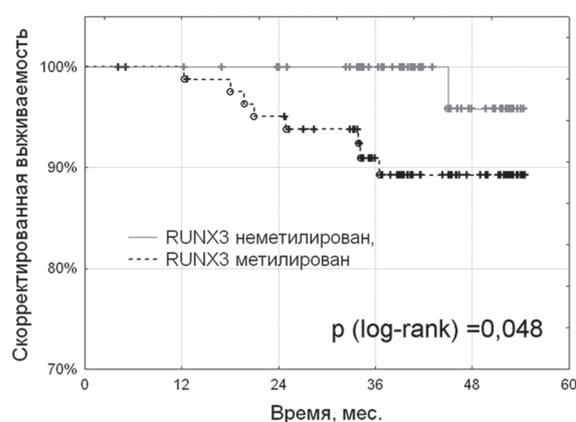


Рис. 2. Скорректированная выживаемость в группе пациентов с РМП БМИ в зависимости от статуса метилирования гена *RUNX3*

## Список использованной литературы

1. Bladder cancer / F. de Braud [et al.] // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2002. – Vol. 41, N 1. – P. 89–106.
2. Мутационный статус гена FGFR3 в проспективной когорте пациентов, страдающих раком мочевого пузыря / М. П. Смаль [и др.] // *Докл. НАН Беларуси.* – 2013. – Т. 57, № 1. – С. 96–101.
3. FGFR3 and TP53 mutations in a prospective cohort of Belarusian bladder cancer patients / M. P. Smal [et al.] // *Exp. Oncol.* – 2014. – Vol. 36, N 4. – P. 246–251.
4. *Kandimalla, R.* DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer / R. Kandimalla, A. A. van Tilborg, E. C. Zwarthoff // *Nat. Rev. Urol.* – 2013. – Vol. 10, N 6. – P. 327–335.
5. RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors / W. J. Kim [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, N 20. – P. 9347–9354.
6. Comprehensive genome methylation analysis in bladder cancer: identification and validation of novel methylated genes and application of these as urinary tumor markers / T. Reinert [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17, N 17. – P. 5582–5592.
7. *Kim, Y. K.* Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer / Y. K. Kim, W. J. Kim // *Int. J. Urol.* – 2009. – Vol. 16, N 1. – P. 17–22.
8. *Levanon, D.* Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes / D. Levanon, Y. Groner // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23, N 24. – P. 4211–4219.
9. Runx3 inactivation is a crucial early event in the development of lung adenocarcinoma / Y. S. Lee [et al.] // *Cancer Cell.* – 2013. – Vol. 24, N 5. – P. 603–616.
10. Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor / E. J. Kim [et al.] // *J. Urol.* – 2008. – Vol. 180, N 3. – P. 1141–1145.
11. RUNX3 methylation as a predictor for disease progression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer / C. Yan [et al.] // *J. Surg. Oncol.* – 2012. – Vol. 105, N 4. – P. 425–430.
12. Prognostic significance of methylation profiles in urothelial carcinomas of the bladder / H. J. Park [et al.] // *Korean J. Pathol.* – 2010. – Vol. 44. – P. 623–630.
13. DNA methylation-associated inactivation of TGFbeta-related genes DRM/Gremlin, RUNX3, and HPP1 in human cancers / M. Suzuki [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 93, N 9. – P. 1029–1037.
14. RUNX3 methylation reveals that bladder tumors are older in patients with a history of smoking / E. M. Wolff [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, N 15. – P. 6208–6214.
15. Methylation of tumor suppressor genes in a novel panel predicts clinical outcome in paraffin-embedded bladder tumors / R. Garcia-Baquero [et al.] // *Tumour Biol.* – 2014. – Vol. 35, N 6. – P. 5777–5786.

Поступило в редакцию 10.06.2015