

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

Генетические маркеры прогноза рецидива поверхностного рака мочевого пузыря

Кафедра урологии с курсом ИПО ГБОУ ВПО "Башкирский государственный медицинский университет" Минздрава России, г. Уфа, Республика Башкортостан

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

Genetic prognostic markers of urinary bladder cancer recurrence

Резюме

Проанализированы результаты лечения пациентов с поверхностным (N=104) раком мочевого пузыря за период с 2005 по 2009 гг. 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 рецидивами поверхностного рака мочевого пузыря, возникшими в течении одно года, и у пациентов с поверхностным раком мочевого пузыря без рецидива в течении одного года. Выявлены генотипы ассоциированные с появлением рецидива поверхностного рака мочевого пузыря в течении одного года.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, прогноз, генетические маркеры

Summary

Treatment results (2005-2009) for patients with surface (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 surface urine bladder carcinoma recurrence, which took place within a year, and for patients with surface urine bladder carcinoma without recurrence within a year. Genotypes associated with surface urine bladder carcinoma one-year recurrence were identified.

Keywords: urine bladder cancer, prognosis, genetic markers

Введение

В последние десятилетия отмечается рост числа всех онкологических заболеваний, в том числе РМП. На момент постановки диагноза у 70-85% больных выявляется поверхностный РМП (ПРМП) (pTa, pT1) [1]. Стандартная лечебная тактика при ПРМП заключается в трансуретральной резекции (ТУР) опухоли и внутрипузырной химио- или иммунотерапии. Тем не менее, до 85% ПРМП рецидивирует после лечения, причем 10-30% прогрессируют в инвазивные и диссеминированные формы рака [2]. 3-летняя выживаемость при первичном инвазивном раке во всем мире не превышает 67%, а при прогрессирующем из поверхностного — в половину меньше (37%) [3].

Одной из ключевых проблем, с которой сталкивается врач при лечении больных ПРМП, является оценка риска развития рецидива заболевания [4]. С целью определения тактики лечения РМП Европейским обществом по изучению и лечению рака (EORTC) была разработана система балльной оценки рисков рецидивирования и прогрессирования РМП [4]. Основой данной системы служат клиничко-морфологические параметры опухоли. Од-

нако разделение опухолей по морфологическим характеристикам не полностью отражает биологический потенциал ПРМП, поэтому в последние годы большое внимание уделяется поиску дополнительных факторов прогноза [5,6]. Одним из наиболее перспективных направлений является определение молекулярно-генетических изменений в наследственном аппарате клетки, лежащих в основе ее злокачественной трансформации, и использование их в качестве клинических маркеров, определяющих характер и прогноз заболевания [5,6].

Генетический полиморфизм в генах системы биотрансформации ксенобиотиков, ассоциированный с изменением соответствующих ферментов, может влиять на характер роста опухоли и частоту рецидива ПРМП. Особого внимания заслуживают гены семейства цитохрома P450 [7,8,9].

Цитохромы P450 1A1 осуществляют биоактивацию проканцерогенов, в частности, бензапирена и некоторых других ПАУ. Транзиция аденина на гуанин в положении 2454 в 7 экзоне гена CYP1A1 приводит к замене изолейцина на валин в аминокислотной последовательности каталитического центра фермента, в результате чего проду-

цируется энзим с активностью в 2 раза выше исходной. По литературным данным, полиморфизм A2454G гена CYP1A1 ассоциирован с повышенным риском развития РМП [9].

Наиболее функционально значимыми полиморфизмами гена CYP1A2 являются CYP1A2*1D (T-2467delT) и CYP1A2*1F (C-163A) [9]. Установлено, что полиморфизм 1 интрона гена CYP1A2*1F приводит к изменению каталитической активности фермента и увеличению его индуцибельности.

Сохранение целостности генома жизненно важно для организма. Повреждения в ДНК могут приводить к изменению кодирующей последовательности генов и формированию мутантного генотипа. 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 сбоев в системе, контролирующей и запускающей апоптоз, может происходить формирование жизнеспособного мутагенного генотипа. Ген XRCC1 расположен на 19-ой хромосоме 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 [10,11,12,13,14].

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

Материал и методы

Мы проанализировали результаты лечения 104 пациентов (N=104) с диагнозом РМП находившихся на стационарном лечении в клинике БГМУ, РКОД и РКБ г. Уфы (РБ) в период с 2005 по 2009 гг. Средний возраст больных составил 59,71±6,21 лет. Срок наблюдения за пациентами с РМП составил от 1 до 4 лет после ТУР первичной опухоли мочевого пузыря. За время наблюдения у 57 (54,81%) больных возникли рецидивные опухоли в течение первого года наблюдения. Пациенты с рецидивом заболевания в течение первого года наблюдения вошли в основную группу РМП (N=57), без рецидива - в контрольную группу РМП (N=47).

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 www.imm.ki.se/CYPalleles/ Human Cytochrome P-450 (CYP) genes: a web page for the nomenclature of alleles); глутатион S-трансферазы: GSTM1 (del) и GSTP1 (A313G); репарации ДНК: XRCC1 (G28152A) проводили методом полимеразной цепной ре-

акции синтеза ДНК (ПЦР) на термоциклере в автоматическом режиме с использованием локуспецифических олигонуклеотидных праймеров. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в полиакриламидном неденатурированном геле (ПААГ). Разницу в распределении частот генотипов между группами рассчитывали с использованием критерия χ^2 с поправкой Йэйтса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$, вычисление показателя отношения рисков, соответствующих 95% доверительных интервалов (95% CI) и проведение анализа соответствий при помощи программы Statistica v. 6.0.

Результаты и обсуждение

Проведен анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов CYP1A1, CYP1A2, GSTM1, GSTP1, XRCC1 у больных ПРМП (табл. 1).

Сравнение основной группы и контрольной группы больных по распределению частот генотипов ($\chi^2=7,44$, $p=0,02$) и аллелей ($\chi^2=5,54$, $p=0,02$) полиморфного локуса A2455G гена CYP1A1 показало статистически значимые различия между группами. Так, у больных ПРМП основной группы по сравнению с большими контрольной группы выявлено статистически значимое повышение частоты гетерозигот *1A*2C (42,11% и 19,15%, соответственно, $p=0,02$). Частота аллеля *2C полиморфного локуса A2455G гена CYP1A1 у больных ПРМП основной группы оказалась повышенной до 22,81% против 9,57% у больных контрольной группы ($p=0,02$). В группах преобладал генотип *1A*1A и аллель *1A. Частота генотипа *1A*1A составила в группе контроля 80,85%, тогда как в основной группе – 56,14% ($p=0,01$).

Нами был проанализирован полиморфный локус T-2467delT гена CYP1A2 с учетом рецидива РМП в течение года после операции (табл. 1). Анализ распределения частот генотипов ($\chi^2=6,54$, $p=0,04$) и аллелей ($\chi^2=12,76$, $p=0,01$) данного полиморфного локуса выявил статистически достоверные различия между группами. Частота генотипа *1A*1D у больных основной группы увеличена до 54,38%, в то время как у больных контрольной группы она составила 23,40% ($p=0,01$). Частота аллеля *1D у больных ПРМП основной группы увеличена почти в 2 раза (39,47%) по сравнению с большими контрольной группы (15,96%) ($p=0,01$). С другой стороны, частота генотипа *1A*1A выше у больных контрольной группы (72,34% против 33,33% у больных группы контроля, $p=0,01$).

Сравнение распределения частот генотипов гена GSTM1 у больных ПРМП с учетом рецидива заболевания не выявило статистически достоверных различий между группами ($\chi^2=1,09$, $p=0,30$).

В группе больных ПРМП проведен анализ полиморфного локуса A313G гена GSTP1 с учетом рецидива заболевания (табл. 1). Выявлены статистически значимые различия в распределении частот генотипов ($\chi^2=6,45$, $p=0,04$) и аллелей ($\chi^2=5,98$, $p=0,02$) между группами. Аллель G маркера A313G гена GSTP1 в группе больных основной группы встречался достоверно чаще (28,07%),

Таблица 1. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов CYP1A1, CYP1A2, GSTM1, GSTP1, XRCC1 у больных ПРМП

| Генотипы | Основная группа | | Контрольная группа | | χ^2 | P | OR (95% CI) |
|--|-----------------|-------------|--------------------|-------------|----------|------|-------------------|
| | Абс. | Частота (%) | Абс. | Частота (%) | | | |
| Полиморфный локус A2455G гена CYP1A1 | | | | | | | |
| *1A*1A | 32 | 56,14 | 38 | 80,85 | 6,06 | 0,01 | 0,30 (0,11-0,80) |
| *1A*2C | 24 | 42,11 | 9 | 19,15 | 5,25 | 0,02 | 3,07 (1,15-8,33) |
| *2C*2C | 1 | 1,75 | 0 | 0 | 0,01 | 1,00 | - |
| *1A | 88 | 77,19 | 85 | 90,43 | 5,54 | 0,02 | 0,36 (0,15-0,86) |
| *2C | 26 | 22,81 | 9 | 9,57 | | | 2,79 (1,16-6,85) |
| Полиморфный локус T-2467delT гена CYP1A2 | | | | | | | |
| *1A*1A | 19 | 33,33 | 34 | 72,34 | 14,16 | 0,01 | 0,19 (0,08-0,48) |
| *1A*1D | 31 | 54,38 | 11 | 23,40 | 9,02 | 0,01 | 3,90 (1,54-10,06) |
| *1D*1D | 7 | 12,28 | 2 | 4,26 | 1,21 | 0,27 | - |
| *1A | 69 | 60,53 | 79 | 84,04 | 12,76 | 0,01 | 0,29 (0,14-0,59) |
| *1D | 45 | 39,47 | 15 | 15,96 | | | 3,44 (1,68-7,09) |
| Делеционный полиморфизм гена GSTM1 | | | | | | | |
| +/+ | 32 | 56,14 | 32 | 68,08 | 1,09 | 0,30 | - |
| del | 25 | 43,86 | 15 | 31,92 | | | |
| Полиморфный локус A313G гена GSTP1 | | | | | | | |
| AA | 30 | 52,63 | 35 | 76,09 | 5,05 | 0,03 | 0,35 (0,14-0,89) |
| AG | 22 | 38,60 | 10 | 21,74 | 2,63 | 0,10 | - |
| GG | 5 | 8,77 | 1 | 2,17 | 0,99 | 0,32 | - |
| A | 82 | 71,93 | 80 | 86,96 | 5,98 | 0,02 | 0,38 (0,17-0,84) |
| G | 32 | 28,07 | 12 | 13,04 | | | 2,60 (1,18-5,78) |
| Полиморфный локус G28152A гена XRCC1 | | | | | | | |
| GG | 16 | 28,07 | 20 | 42,55 | 1,79 | 0,18 | - |
| GA | 30 | 52,63 | 21 | 44,68 | 0,37 | 0,54 | - |
| AA | 11 | 19,30 | 6 | 12,77 | 0,39 | 0,53 | - |
| G | 62 | 54,39 | 61 | 64,89 | 1,94 | 0,16 | - |
| A | 52 | 45,61 | 33 | 35,11 | | | - |

тогда в группе больных контрольной группы частота его составила 13,04% (p=0,02). В тоже время, частота гомозиготного генотипа AA выше в контрольной группе 76,09% по сравнению с таковой в основной группе – 52,63% (p=0,03).

Сравнение распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта G28152A гена XRCC1 у больных ПРМП с учетом рецидива заболевания не выявило статистически достоверных различий между группами ($\chi^2=2,57$, p=0,28).

В доступной литературе мы не встретили работ, посвященных изучению ассоциации данных генотипов с рецидивом ПРМП. В результате проведенного нами исследования установлено, что маркерами предрасположенности к развитию рецидивов в группе первичного ПРМП является целый ряд генетических маркеров, отражающих высокий риск такового: генотипы *1A*2C (OR=3,07, 95% CI 1,15-8,33) и аллели *2C (OR=2,79, 95% CI 1,16-6,85) полиморфного локуса A2455G гена CYP1A1; генотипы *1A*1D (OR=3,90, 95% CI 1,54-10,06) и аллели *1D (OR=3,44, 95% CI 1,68-7,09) полиморфного локуса T-2467delT гена CYP1A2; аллели G (OR=2,60, 95% CI 1,18-5,78) полиморфного локуса A313G гена GSTP1. Пациентам, имеющим данные предрасполагающие факторы, мы назначаем интраоперационную химиопрофилактику, а в послеоперационном периоде обязательно про-

ведем химио- или иммунопрофилактики. Контроль состояния оперированных больных выполнялся ежемесячно с помощью ультразвуковым сканированием мочевого пузыря и цистоскопией не менее 1 раза в 3 месяца.

Выводы

Таким образом, ценность полученной информации, как нам представляется, состоит в том, что выявление данных генетических маркеров позволяет строить индивидуальный план послеоперационного ведения пациентов ПРМП.■

Павлов В.Н. – д.м.н., профессор, зав. кафедрой урологии с курсом ИПО ГБОУ ВПО БГМУ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Измайлов А.А. – к.м.н., доцент кафедры урологии с курсом ИПО ГБОУ ВПО БГМУ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Измайлова С.М. – к.м.н., ассистент кафедры биологии ГБОУ ВПО БГМУ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Казихинов А.А. – д.м.н., профессор кафедры урологии с курсом ИПО ГБОУ ВПО БГМУ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Урманцев М.Ф. – аспирант кафедры урологии с курсом ИПО ГБОУ, г. Уфа, Республика Башкортостан. Автор, ответственный за переписку – Урманцев Марат Фаатович – 450000, г. Уфа, ул. Шафиева 2. e-mail: urmantsev@rambler.ru Тел. 89373535306

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. 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. - Vol. 54(2). - P. 303-14.
3. Somali Sanyal, Petra J. de Verdier, Gunnar Steineck, Per Larsson, Erik Onelov, Kari Hemminki, Rajiv Kumar. Polymorphisms in XPD, XPC and the risk of death in patients with urinary bladder neoplasms // Acta Oncologica. - 2007. - Vol. 46. - P. 31-41.
4. 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. - Vol. 165(3) - P. 808-10.
5. Глыбочко П.В., Понукалин А.Н., Шахлазян Н.К., Захарова Н.Б. Значение маркеров опухолевого роста и ангиогенеза в диагностике рака мочевого // Онкология. - 2009. - №2. - С. 56-60.
6. Kim Y.K., Kim W.J. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer // J. Int. Urology. - 2009 Jan. - Vol. 16(1). - P. 17-22.
7. Androutopoulos V.P., Tsatsakis A.M., Spandidos D.A. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention // BMC Cancer. - 2009. - Vol. 9. - P. 187.
8. Golka K., Hermes M., Selinski S., Blaszkewicz M., Bolt H.M., Roth G., Dietrich H., Prager H.M., Ickstadt K., Hengstler J.G. Susceptibility to urinary bladder cancer: relevance of rs9642880[T], GSTM1 0/0 and occupational exposure // Pharmacogenet. Genomics. - 2009 Nov. - Vol. 19(11). - P. 903-6.
9. 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. - Vol. 9(1). - P. 21-8.
10. Gao W., Romkes M., Zhong S., Nukui T., Persad R.A., Smith P.J., Branch R., Keohavong P. Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XPD and XRCC1, p53 gene mutations and bladder cancer risk // Oncol. Rep. - 2010 Jul. - Vol. 24(1). - P. 257-62.
11. Leissner J., Hohenfellner R., Thuroff J.W., Wolf H.K. Lymphadenectomy in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder: significance for staging and prognosis. // BJU Int - 2000. - Vol. 85. - P. 817 - 821.
12. Mittal R.D., Singh R., Manchanda P.K., Ahirwar D., Gangwar R., Kesarwani P., Mandhani A. XRCC1 codon 399 mutant allele: a risk factor for recurrence of urothelial bladder carcinoma in patients on BCG immunotherapy // Cancer Biol. Ther. - 2008 May. - Vol. 7(5). - P. 645-50.
13. 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. - Vol. 178. - P. 1218 - 1223.
14. Wang C., Sun Y., Han R. XRCC1 genetic polymorphisms and bladder cancer susceptibility: a meta-analysis // J. Urology. - 2008 Oct. - Vol. 72.