

# 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 рецидивирует, 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 углеводородов. 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 термоблокере 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  $\chi^2$  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 |      | $\chi^2$ | <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