

© А.С.Аль-Шукри, В.Н.Ткачук, М.В.Дубина, 2010
УДК 616.62-006.6-036.8:575

А.С. Аль-Шукри¹, В.Н. Ткачук¹, М.В. Дубина

ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

A.S. Al-Shukri, V.N. Tkachuk, M.V. Dubina

POSSIBILITIES OF MOLECULAR-GENETIC RESEARCH FOR PREDICTION OF BLADDER CANCER

¹Кафедра урологии и ²отдел молекулярно-генетических исследований Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ – изучить мутацию гена FGFR3 и экспрессию гена p53 для определения прогноза у больных раком мочевого пузыря. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследовано 25 больных раком мочевого пузыря. Материалом для молекулярно-генетических исследований послужил операционный материал. Геномную ДНК из опухоли и крови получали с использованием набора GenElute (США), а мутационные повреждения определяли в генах FGFR3 (экзон 7) и p53 (экзоны 5, 6, 7). **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Согласно полученным данным, мутации экзона 7 гена FGFR3 характеризуют благоприятное течение заболевания, а мутации в экзонах 5, 6, 7 гена p53 наблюдается при неблагоприятном течении рака мочевого пузыря. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Для определения прогноза рака мочевого пузыря целесообразно определять мутации генов FGFR3 и p53.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, прогноз заболевания, мутации генов FGFR3 и p53.

ABSTRACT

THE AIM – to examine FGFR3 gene mutation and expression of p53 gene to determine the prognosis of patients with bladder cancer. **PATIENTS AND METHODS.** A total of 25 patients with bladder cancer were investigated. Materials for molecular genetic studies were surgical specimens. Genomic DNA from tumor and blood were obtained using a set GenElute (USA), and mutational damage was determined in the genes FGFR3 (exon 7) and p53 (exons 5, 6, 7). **RESULTS.** According to our data, mutations of exon 7 gene FGFR3 characterizes the favorable course of disease, and mutations in exons 5, 6, 7 p53 gene is observed in the poor course of bladder cancer. **CONCLUSION.** To determine the prognosis of bladder cancer is useful to determine the FGFR3 gene mutations and p53.

Keywords: bladder cancer, prognosis, FGFR3 gene mutations and p53.

ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря является самым частым новообразованием мочевых путей [1, 2]. По данным И.О. Аполихина и соавт. [3], в Российской Федерации с 1995 по 2005 г. заболеваемость раком мочевого пузыря увеличилась на 58,6%.

В последние годы основным методом лечения поверхностного рака мочевого пузыря стала трансуретральная резекция (ТУР), однако прогноз заболевания у многих больных после оперативного лечения является неблагоприятным, а частота возникновения рецидивов после ТУР крайне высока и составляет от 50 до 90% [4]. По данным литературы [5, 6], при первичном диагнозе в настоящее время поверхностные формы рака мочевого пузыря выявляют у 70–75% больных.

Известно, что как среди поверхностных, так и среди мышечно-инвазивных опухолей мочевого пузыря, существует биологическая неоднородность, которая определяется не только морфологической формой и степенью инвазии опухоли, но и молекулярно-генетическими изменениями [6, 7]. Поэтому стали развиваться прикладные аспекты применения молекулярно-генетической диагностики в уроонкологии. Было доказано, что наиболее информативными факторами прогноза у больных с поверхностным раком мочевого пузыря являются мутации гена FGFR3 и экспрессия гена p53 [8, 9]. Однако опубликованы лишь единичные исследования, посвященные молекулярно-генетическим факторам прогноза у больных раком мочевого пузыря. Дальнейшие исследования в этом направлении помогут значительно улучшить определение прогноза заболевания у больных раком мочевого пузыря, что имеет существенное практическое значение.

Аль-Шукри А.С. 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 17, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова, кафедра урологии, тел. (812) 234-91-96.

Целью настоящего исследования явилось изучение мутации гена FGFR3 и экспрессии гена p53 для определения прогноза у больных раком мочевого пузыря.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Настоящая работа основана на обследовании 25 больных, страдающих раком мочевого пузыря. Материалом для молекулярно-генетических исследований у этих больных послужил операционный материал (у 7 – цистэктомия, у 18 – ТУР опухоли). Всем больным оперативное лечение было выполнено на базе кафедры и клиники урологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова. По данным гистологического исследования удаленных опухолей мочевого пузыря, у 23 (92%) больных был выявлен переходно-клеточный рак с различной степенью дифференцировки, а у 2 (8%) – аденокарцинома с умеренной и низкой степенью дифференцировки.

Среди обследованных пациентов были 4 (16%) женщины и 21 (84%) мужчина в возрасте от 46 до 85 лет (средний возраст $64,9 \pm 9,3$ года). Стадия заболевания T1 установлена у 4 (16%) больных, T2a – у 8 (32%), T2b – у 6 (24%), T3a – у 4 (16%), T3b – у 2 (8%) и T4a – у 1 (4%) больного.

Материал из первичных опухолей, а также цельную кровь объемом 5 мл в растворе ЭДТА получали после операции для дальнейших молекулярно-генетических исследований. Образцы опухолевой ткани помещали в специальные кассеты, замораживали при температуре -20°C и транспортировали в лабораторию для последующего хранения и исследований. Весь материал хранили в термоконтейнерах при температуре -80°C . Последующие генетические исследования с образцами опухолей проводили при температуре от -20°C до -4°C (на льду). Для верификации ранее установленного гистологического диагноза, предварительной оценки наличия опухолевых клеток в исследуемых препаратах, изучения стромы и окружающей опухоли делали 2–3 криосреза толщиной 6–7 мкм. Один из криотомных срезов опухолевой ткани обязательно окрашивали гематоксилином – эозином.

Геномную ДНК из образцов крови и опухолей мочевого пузыря получали с использованием коммерческого набора GenElute™ Mammalian Genomic DNA Kit (Sigma, США). Кровь объемом 1 мл размораживали до температуры -20°C и использовали в дальнейшем без дополнительной подготовки. Для полной гомогенизации ткани и лизиса клеточных мембран в каждую пробирку объемом 2,0 мл с исследуемыми индивидуальными образцами тка-

ни или крови добавляли по 180 мкл солевого «литического раствора» (№6678, каталог Sigma, США) и по 20 мкл протеиназы К, которую предварительно разводили из расчёта 20 мг/мл. Пробирки инкубировали на водяной бане при постоянной температуре 55°C в течение 2–4 ч (до полного лизиса тканевых элементов), после чего добавляли в раствор по 200 мкл литического раствора и инкубировали образцы при температуре 70°C в течение 10 мин.

Для оптимизации последующей экстракции ДНК от лизированных клеточных элементов и ингибирования протеиназы в полученную смесь добавляли 200 мкл 95–100% этанола. Затем пробирки центрифугировали при 6500 об/мин в течение 1 мин. Для фильтрации полученного раствора и очистки ДНК через колонку с силиконовой мембраной, специфически связывающей нуклеиновые кислоты, в пробирки дважды добавляли по 500 мкл «моющего раствора» (№6553, каталог Sigma, США) и проводили центрифугирование (6500 об/мин в течение 1 мин и 12.000 об/мин в течение 3 мин). Очищенную геномную ДНК, прикрепленную к силиконовой мембране, получали после добавления 200 мкл вымывающего раствора Elution Solution (Трис-HCl в концентрации 10 ммоль, ЭДТА в концентрации 0,5 ммоль, pH 9,0) и центрифугирования при 6500 об/мин в течение 1 мин. В окончательном растворе методом спектрофотометрии измеряли концентрацию очищенной ДНК. Соотношение длин волн 260 нм/280 нм в пределах 1,7–1,9 свидетельствовало о наличии и примерной концентрации двуцепочечной ДНК 50 мкг/мл окончательного раствора. При условии соблюдения исходных условий экстракции и очистки ДНК в последующем при амплификации генов методом ПЦР использовали по 0,5 мкл окончательного раствора ДНК на отдельную реакцию.

Генетический анализ ДНК опухолей проводили на наличие мутационных повреждений в генах FGFR3 и p53. Для поиска возможных мутаций генов в опухолях мочевого пузыря использовали метод секвенирования нуклеотидных последовательностей по Сэнгеру с использованием фермента ДНК-полимеразы Taq, описанного Р.М. Green и соавт. в 1994 г. [10]. Метод основан на технологии полимеразной цепной реакции, с помощью которого А.А. Bakkar и соавт. [8] в 2003 г. были обнаружены мутации в генах FGFR3 и p53 при раке мочевого пузыря. Данный метод состоит из следующих основных этапов: амплификация избранных участков ДНК методом ПЦР, денатурация, медленная ренатурация и последующее электрофоретическое разделение амплифицированных генов в

Ген	Фрагмент гена	Праймеры
PCPK3	Экзон 7 размер: 116 п.н.	Прямой: 5'-АСТССССССТСТСТСАСС6АС-3' Обратный: 5'-САССАССССССТСТСТТСС-3'
p53	Экзон 5 размер: 310 п.н. Экзон 6 размер: 331 п.н. Экзон 7 размер: 214 п.н.	Прямой: 5'-Т6ТТТСТТТСТТТСТСТСССТСТ-3' Обратный: 5'-САССАСССССТСТСТСТСТ-3' Прямой: 5'-ТСССССССАТСССАСТСАС-3' Обратный: 5'-ААССАСССТТААССССТСТ-3' Прямой: 5'-ААССАСССТТААССССТСТ-3' Обратный: 5'-ССССАСТССССТСАТСТТС-3'

полиакриламидном геле. Идентификацию продуктов ПЦР проводили в каждом из 2 одонитевых фрагментов ДНК. Затем с помощью генетического банка нуклеотидных последовательностей (GeneBank), приведенного в сети интернет на странице Национального центра биотехнологической информации и Национальных институтов здоровья США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), определяли нуклеотидные последовательности кодирующих регионов экзона 7 гена FGFR3 и экзонов 5, 6 и 7 гена p53.

Раствор для ПЦР готовили ex tempore из расчета 15 мкл раствора на 1 образец исследуемой ДНК. В работе использовали следующие компоненты и объемы, исходя из расчетного объема раствора для ПЦР:

- | | |
|-----------|--|
| Таблица 1 | <p>лей мочевого пузыря в присутствии всех четырех типов dNTP и того же набора праймеров. Итоговые реакционные смеси ПЦР (5 мкл), содержащие продукты амплификации, подвергали электрофорезу в 0,9% агарозном геле, содержащем 1X TBE (44,5 ммоль трис-гидроксиметиламинометан, 44,5 mM борной кислоты, 1 ммоль ЭДТА, pH 8,3) для контроля реакции. Затем гели окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете, что позволяло выявить конечный продукт реакции.</p> |
|-----------|--|

На заключительном этапе проводили повторную полимеразную цепную реакцию с исходными очищенными продуктами и в режиме секвенирования. В реакционную смесь для секвенирования объемом 20 мкл входили следующие компоненты: 9 мкг очищенного продукта ПЦР, 3,2 пмоль соответствующего праймера и готовая реакционная смесь из набора Big Dye Terminator Kit v. 3.0 (Perkin Elmer), включающая в себя фермент Taq ДНК полимеразу и смесь четырех 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP). Данная комбинация реактивов позволяет в одной реакции «прочитать» до 500 нуклеотидов в цепочке ДНК. Маркированные индивидуальным цветом 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфаты (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP) обеспечивали специфический обрыв синтеза за счет способности включаться в растущую цепь ДНК и блокировать дальнейший синтез новой цепочки ДНК из-за отсутствия 3'-ОН группы, необходимой для присоединения следующего дезоксинуклеозидтрифосфата.

После этого полученные продукты вносили в автоматический секвенатор ABI Prism 3700. Затем с помощью специальных компьютерных программ по расположению цветовых полос, создаваемых группами отдельных нуклеотидов в месте обрыва синтеза, определяли их последовательность в структуре исследуемых генов. Полученные дан-

Таблица 2

Распределение больных в зависимости от патогистологической характеристики опухоли

Гистологический диагноз (степень дифференцировки)	Количество образцов опухолей	
	Абс. число	%
Переходно-клеточный рак высокой степени дифференцировки	13	52,0
Переходно-клеточный рак умеренной степени дифференцировки	5	20,0
Переходно-клеточный рак низкой степени дифференцировки	5	20,0
Аденокарцинома разной степени дифференцировки и недифференцированные опухоли	2	8,0
Всего	25	100,0

ные сравнивали с нуклеотидными последовательностями изучаемых экзонов генов, доступных в генетической базе данных «Genbank». Для этого использовали семейство программ поиска похожих участков сравниваемых нуклеотидных последовательностей «BLAST 2». Принцип работы данных программ основан на том, что пользователь вводит в программу найденную опытным путем нуклеотидную последовательность и исследуемую последовательность из базы данных. Затем программа производит поиск и выводит на экран компьютера список похожих последовательностей с указанием степени их гомологичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам предварительного гистологического исследования все образцы злокачественных опухолей мочевого пузыря, полученные от пациентов при хирургических операциях, были разделены на 4 группы в зависимости от степени дифференцировки опухолевых клеток в исследуемых тканях (табл. 2).

Как видно из таблицы, наибольший процент исследуемых образцов представляли опухоли с высокой степенью дифференцировки (52% от общего числа исследуемых случаев).

При исследовании нуклеотидной последовательности методом прямого секвенирования в образцах опухолей мочевого пузыря были установлены следующие характеристики генетических нарушений в последовательности нуклеотидных оснований.

В результате прямого секвенирования экзона 7 гена FGFR3 у 9 из 25 больных, что составило 36%, была обнаружена нуклеотидная замена цитозина (C) на гуанин (G) в кодоне 746 с соответствующей заменой аминокислоты серина (Ser) на цистин (Cys) в 249-й позиции белка. Исходя из гистологической классификации, обнаруженные мутационные изменения гена FGFR3 соответствовали определённой форме и стадии злокачественного процесса, а именно: все образцы опухолей мочевого пузыря, в которых была обнаружена данная мутация, характеризовались высокой степенью дифференцировки и

составляли 69,2% от всех опухолей этой группы. Кроме того, данные опухоли были локализованы в поверхностном слое мочевого пузыря и были обнаружены у пациентов на стадии T1 (2 случая) и T2a (3 случая) рака мочевого пузыря.

В результате прямого секвенирования экзонов 5, 6 и 7 гена p53 при исследовании опухолей мочевого пузыря были обнаружены три вида мутаций. В частности, при секвенировании экзона 5 в одном случае была выявлена делеция (выпадение) цитозина в кодоне 13085 нуклеотидной последовательности, которая приводила к остановке считывания белка в соответствующей позиции. Данная мутация была ассоциирована с переходно-клеточным раком мочевого пузыря в стадии T2, который характеризовался низкой степенью дифференцировки и инвазией в слизистую оболочку. В экзоне 6 была выявлена замена аденина (A) на гуанин (G) в кодоне 13419 с соответствующей заменой аминокислоты тирозина (Tyr) на цистин (Cys) в 220-й позиции белка. Данная мутация была ассоциирована с переходно-клеточным раком в стадии T2, характеризующимся низкой степенью дифференцировки и прорастанием всех слоев стенки мочевого пузыря. В экзоне 7 была выявлена замена гуанина (G) на аденин (A) в кодоне 14070 с соответствующей заменой аминокислоты аргинина (Arg) на глутамин (Gln) в 248-й позиции белка. Данная мутация была ассоциирована с образцами переходно-клеточного рака в стадии T3 (2 случая) низкой степени дифференцировки, прорастанием опухоли в мышечный слой и T3b (1 случай) – недифференцированная опухоль с прорастанием в предстательную железу, мышечную оболочку, стенку, инвазией по сосудам. Взятые вместе мутации гена p53 наблюдались в 62,5% злокачественных опухолей в двух группах, характеризующих рак низкой степени дифференцировки, недифференцированные опухоли и аденокарциномы (5/8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного нами молекулярно-генетического исследования генов FGFR3 и p53 у пациентов с гистологически

верифицированным диагнозом «рак мочевого пузыря» был установлен факт преобладания мутаций различных генов, характеризующих разные стадии прогрессии, что может служить важным фактором прогноза заболевания. Согласно нашим данным, мутации, выявленные в наиболее часто мутируемом экзоне 7 гена FGFR3, характеризовали относительно благоприятное течение заболевания у больных с опухолью мочевого пузыря на стадии T1 – T2, с высокой степенью клеточной дифференцировки, а мутации в экзонах 5,6 и 7 гена p53 наблюдались при неблагоприятном течении заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали возможности молекулярно-генетических исследований для прогнозирования рака мочевого пузыря. При этом основной задачей молекулярно-генетических исследований опухолей мочевого пузыря является проведение правильно спланированных работ, позволяющих выявить значимые молекулярные маркеры для прогноза заболевания и эффективности избранного метода лечения у каждого больного, страдающего раком мочевого пузыря.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аль-Шукри СХ, Ткачук ВН. *Опухоли мочеполовых органов: Руководство для врачей*. «Питер», СПб., 2000; 320
2. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2007. *Cancer Clin* 2007; 57:43-66
3. Аполихин ОИ, Какорина ЕП, Сивков АВ и др. Состояние урологической заболеваемости в Российской Федерации по данным официальной статистики. *Урология* 2008; (3): 3-9
4. Павлов ВН, Казихинуров АА, Крупин ВН и др. Изменение ультраструктуры и микроциркуляции стенки мочевого пузыря у пациентов с неинвазивными формами рака. *Онкоурология* 2008; (4): 57-60
5. Kaufman D. Challenges in the treatment of bladder cancer. *Ann Oncol* 2006; 17: 106-112
6. Knowels M. Molecular subtypes of bladder cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27(3): 361-373
7. Аль-Шукри АС, Ткачук ВН, Дубина МВ. Прогностические молекулярно-генетические маркеры рака мочевого пузыря. *Онкоурология* 2009; 2: 78-82
8. Bakkar A, Wallerand H, Radvanyi F et al. FGFR3 and p53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63(8): 8108-8112
9. Hernandez S, Lopez-Knowels E, Lloreta J et al. FGFR3 and Tp53 mutation in T1G3 transitional bladder carcinomas: independent distribution and lack of association with prognosis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5444-5450
10. Green PM, Giannelli F. direct sequencing of PCR-amplified DNA. *Molecular Biotechnology* 1994; 2: 117-124

Поступила в редакцию 11.02.2010 г.
Принята в печать 02.06.2010 г.