

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ЗНАЧЕНИЯ ТЕОРИИ ПОЛЕЙ КАНЦЕРИЗАЦИИ В ГЕНЕЗЕ ПОВЕРХНОСТНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

А.Ю. Бабаян¹, Д.В. Залетаев^{1,2}, доктор биологических наук, профессор,
М.В. Немцова^{1,2}, доктор биологических наук, профессор

¹НИИ молекулярной медицины Первого Московского государственного
медицинского университета им. И.М. Сеченова,

²Медико-генетический научный центр РАМН

E-mail: nemtsova_m_v@mail.ru

В работе представлены собственные результаты исследования аномального метилирования генов-супрессоров опухолевого роста RASSF1A, P16, CDH1, LAMC3, DAPK в опухолях и неопухолевой ткани мочевого пузыря, полученной от 64 пациентов с диагнозом поверхностного рака мочевого пузыря (ПРМП). Цель исследования – определить участие пограничной неопухолевой ткани в составе полей канцеризации в генезе уротелиальных карцином. В работе приведены экспериментальные доказательства и анализ литературных данных, подтверждающие возможность возникновения карцином уротелия через поля канцеризации, которые представляют собой единый комплекс опухолевой и пограничной неопухолевой тканей.

Ключевые слова: поверхностный рак мочевого пузыря, уротелиальные карциномы, моноклональные опухоли, олигоклональные опухоли, метилирование регуляторных районов генов-супрессоров, поля канцеризации

CONFIRMATION OF FIELD CANCERIZATION IN THE GENESIS OF SUPERFICIAL BLADDER CANCER

A. Yu. Babayan¹, D. V. Zaletaev^{1,2}, M. V. Nemtsova^{1,2}

¹State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «I.M. Sechenov First Moscow State Medical University» of the Ministry of Health care and Social Development, Moscow, Russian Federation,

²Federal State Budgetary Institution «Research Centre of Medical Genetics» of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

The paper presents the results of our own investigation of abnormal methylation of tumor suppressor genes RASSF1A, P16, CDH1, LAMC3, DAPK in tumors and non-tumor tissues obtained from 64 patients with superficial bladder cancer. The purpose of the research is to determine the participation of adjacent non-tumor tissue in the «field cancerization» in the genesis of urothelial carcinomas. We present experimental evidence and analysis of the literature, confirming the possibility of urothelial carcinoma arising to the formation of the «field cancerization», which is the consistent complex of the tumor and non-tumor tissue.

Key words: superficial bladder cancer, urothelial carcinomas, field cancerization, methylation of tumor suppressor genes

Молекулярно-генетические исследования, проведенные в последние годы, убедительно доказывают роль генетических факторов в инициации злокачественного процесса и развития опухоли.

Возникновение опухолевой клетки происходит в результате накопления в наследственном аппарате неизменной клетки определенного количества молекулярных событий, приводящих к активации или инактивации генов, участвующих в регуляции клеточного роста, дифференцировки, выживаемости и апоптоза. Каждое такое событие само по себе не является летальным, но их накопление может нарушать регуляцию клеточного цикла и, как следствие, приводить к образованию устойчивого патологического клеточного клона с такими свойствами, как неконтролируемый рост, независимость от регулирующих воздействий клеточного окружения, способность к инвазивному росту.

Молекулярные повреждения, возникающие в геноме опухолевой клетки, можно разделить на генетические и эпигенетические. К эпигенетическим повреждениям относят аномальное метилирование регуляторных районов генов-супрессоров, в результате чего возникает функциональная инактивация этих генов, подобно происходящей при делеции хромосомного фрагмента. ДНК гена не изменяется, но он полностью инактивируется, что приводит к отсутствию его белкового продукта [1]. Инактивация генов, регулирующих клеточный цикл посредством аномального метилирования, широко представлена при раке мочевого пузыря (РМП).

Теория полей канцеризации была предложена Слоттером в 1953 г. [12]. Он впервые предположил, что «рак не возникает как изолированный клеточный феномен, а представляет собой анапластическую

тенденцию с участием множества клеток сразу...». В предложенной теории распространение опухоли происходило за счет преобразования клеток нормального эпителия, прилегающего к опухоли, а не их разрушения опухолевым клоном.

Существование полей канцеризации, вероятно, является свойством только эпителиальных опухолей и связано с защитной барьерной функцией эпителиальных клеток. Осуществление последней предполагает воздействие на пласт эпителиальных клеток экологически вредных веществ, в том числе канцерогенных. В результате образуются протяженные районы, содержащие клетки с генетически измененным наследственным аппаратом. Способность эпителиальных клеток к самообновлению приводит к аномальной пролиферации, гиперпластическим, а затем и диспластическим процессам. Эти процессы в сочетании с генетическими повреждениями обуславливают трансформацию клеток и появление злокачественного клона.

Существование полей канцеризации подтверждено для разных типов рака — пищевода, желудка, кожи, легких, молочной железы и др. [7]. Но несмотря на значительную историю изучения этого вопроса, получаемые исследовательскими группами данные крайне противоречивы.

Исследование полей канцеризации при поверхностном раке мочевого пузыря (ПРМП) напрямую связано с клиническими характеристиками этого типа опухолей. Одной из основных проблем при лечении пациентов с ПРМП является высокая частота первично-множественных и рецидивных опухолей мочевого пузыря [3].

Современные модели канцерогенеза мочевого пузыря предполагают, что развитие мультифокальных опухолей, синхронных или метакронных у одного пациента, является общей характеристикой злокачественных опухолей уротелия [9]. Для объяснения повышенной частоты появления множественных уротелиальных опухолей предложены 2 теории. Моноклональная теория предполагает, что множественные опухоли возникают из одной трансформированной клетки, которая размножается и распространяется по всему уротелию в результате имплантации или интраэпителиальной миграции. Вторая теория объясняет развитие множественных опухолей через развитие поля канцеризации. Химические канцерогены, которые выводятся с мочой, являются причиной появления независимых генетических изменений в различных районах слизистой оболочки мочевого пузыря, что приводит к возникновению нескольких клеточных полей с разнородными генетическими повреждениями, из которых впоследствии возникают множественные неродственные опухоли.

Для доказательства теорий происхождения множественных и рецидивных опухолей используется

тактика сравнения спектра молекулярных событий во множественных или рецидивных опухолях, полученных от одного пациента. В этом случае молекулярно-генетические дефекты (такие, как аллельные потери, мутации, аномальное метилирование промоторных районов генов-супрессоров или профиль геновой экспрессии) выступают в качестве опухолевых маркеров, которые используют для проведения сравнительного анализа.

Единого мнения о том, имеет мультифокальный уротелиальный рак моноклональное или олигоклональное происхождение, пока нет. Предполагается возможность развития син- и метакронных опухолей РМП как по моноклональному пути посредством интрауретерального расселения опухолевых клеток, так и посредством полей канцеризации, обуславливающих появление олигоклональных опухолей. Более того, в последнее время обсуждается возможность реализации обоих путей развития множественных опухолей МП у одного пациента.

В поддержку теории поля выступает обнаружение генетической нестабильности в морфологически неизменной слизистой оболочке мочевого пузыря, расположенной на границе с опухолевой тканью у пациентов, а также определение предраковых изменений типа дисплазии и карциномы *in situ* на значительном расстоянии от очага опухоли [5, 10].

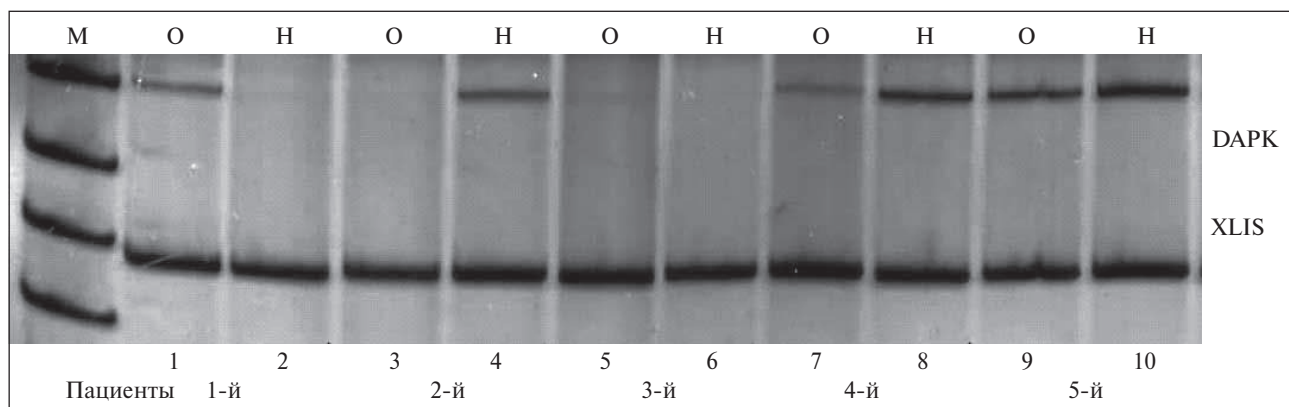
Для подтверждения теории существования полей канцеризации и комплексного изменения слизистой МП при образовании опухоли исследованы эпигенетические повреждения генов-супрессоров опухолевого роста *RASSF1A*, *P16*, *CDH1*, *LAMC3*, *DAPK* в материале опухоли и морфологически неизменной слизистой оболочки МП на определенном расстоянии от опухолевого узла.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали образцы опухолей и неизменной слизистой оболочки МП, доступные в виде операционного материала и парафиновых блоков пациентов с установленным диагнозом ПРМП (стадии pTa, pT1). Всего 64 парных образца (опухоль/условно нормальная ткань) предоставлены Медицинским радиологическим научным центром РАМН г. Обнинска. Расстояние между опухолевым очагом и местом взятия морфологически нормальной ткани не превышало 3–5 см.

Получение геномной ДНК из тканей. Геномную ДНК из ткани выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [6].

Определение аномального метилирования промоторных областей генов-супрессоров опухолевого роста *P16*, *CDH1*, *RASSF1*, *DAPK* и *LAMC3*. Метилирование CpG-островков промоторных областей генов определяли с помощью метилчувствительной (МЧ) полимеразной цепной реакции (ПЦР) (см. рису-



Результат исследования аномального метилирования гена *DAPK*. Каждому пациенту соответствуют 2 дорожки геля: о – опухолевая ткань, н – морфологически нормальная ткань. Метилирование гена *DAPK* определено в дорожках 1о, 4н, 7о, 8н, 9о, 10н

нок). Метод МЧ-ПЦР основан на способности метилчувствительных рестриктаз гидролизовать ДНК, не содержащую модифицированных оснований, и оставлять негидролизованную участки, содержащие метилцитозин. В качестве матрицы для ПЦР использовали гидролизованную метилчувствительными рестриктазами *HpaII* (CCGG) ДНК. Геномную ДНК (1 мкг) обрабатывали 10 ед. акт. рестриктазы в 10 мкл инкубационной смеси в течение ночи. Для ПЦР использовали 150 нг гидролизованной ДНК. При проведении ПЦР учитывали присутствие сайтов узнавания используемых рестриктаз в амплифицируемом фрагменте, который содержал не менее 3–4 *HpaII*-сайтов. В случае модификации цитозинов в метилцитозин ДНК не расщепляется, и продукт ПЦР может быть выявлен в геле. В отсутствие метилирования ДНК полностью гидролизуется, и продукт ПЦР не образуется.

С целью исключения ложноположительных и ложноотрицательных результатов проводили мультилокусные ПЦР с 2 парами праймеров: один фрагмент принадлежал изучаемому гену (*P16*, *CDH1*, *RASSF1*, *DAPK* и *LAMC3*), другой служил внутренним контролем (фрагмент гена *XLIS*, не содер-

жащий сайтов узнавания указанных рестриктаз). ПЦР проводили по следующей схеме: к 0,1 мкг геномной ДНК добавляли 0,05 мкМ каждого олигопраймера, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 1–2 ед. Таq-полимеразы, 50 мкл однократного буфера для ПЦР следующего состава: 50 мМ КСl, 10 мМ Трис-НСl (рН 8,4), 5 мМ MgCl₂, 10% диметилсульфоксида. Затем добавляли 30 мкл вазелинового масла, прогревали смесь при 95°C в течение 10 мин и проводили 33 цикла по следующей программе: денатурация при 95°C – 30 с, отжиг и элонгация при 58–62°C – 2 мин 30 с. Нуклеотидная последовательность праймеров и режимы отжига представлены в таблице. Продукты ПЦР разделяли в 8% полиакриламидном геле и окрашивали нитратом серебра [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучено состояние метилирования CpG-островков генов, играющих значительную роль в генезе РМП. Панель генов для определения эпигенетических повреждений включала гены-супрессоры опухолевого роста *RASSF1A*, *P16*, *CDH1*, *LAMC3*, *DAPK*.

ЧАСТОТА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ В ГРУППАХ И ОБЩАЯ ОЦЕНКА МЕТИЛИРОВАНИЯ ВСЕХ ГЕНОВ В НЕИЗМЕНЕННОЙ ТКАНИ И В ОПУХОЛИ

Гены; метилирование	RASSF1A	P16	CDH1	LAMC3	DAPK
1-я группа (оп. +/ н.тк. -)	24 (37)	16 (25)	19 (29)	17 (26)	21 (32)
2-я группа (оп. +/ н.тк. +)	15 (23)	13 (20)	12 (18)	17 (26)	14 (21)
3-я группа (оп. -/ н.тк. -)	20 (31)	29 (45)	28 (43)	28 (44)	18 (28)
4-я группа (оп. -/ н.тк. +)	5 (7)	6 (9)	5 (7)	1 (1)	11 (17)
Всего образцов	64	64	64	64	64
met опухоль	39 (60)	29 (45)	32 (50)	35 (54)	34 (53)
met норма	20 (31)	19 (29)	16 (25)	19 (29)	25 (39)

Примечание. В скобках – %.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ПАНЕЛИ ГЕНОВ

CDH1: ген-супрессор расположен в хромосомном районе 16q22.1, кодирует белок E-кадгерин, который отвечает за адгезию и межклеточное взаимодействие, а также образует комплекс с катенинами, которые в свободном диссоциированном состоянии функционируют как онкогены. Снижение активности гена приводит к утрате клеточных контактов и приобретению опухолевой клеткой способности к инвазии и метастазированию.

RASSF1A: ген-супрессор локализован в хромосомном районе 3p21.3, кодирует несколько образующихся в результате альтернативного сплайсинга транскриптов, которые участвуют в контроле клеточного цикла; его белок участвует в регуляции клеточной пролиферации и апоптоза. Инактивация гена *RASSF1A* ведет к нарушению микротубулярного аппарата клетки и, как следствие, — нарушению клеточной адгезии и опухолевой прогрессии.

DAPK: ген расположен в хромосомном локусе 9q34, кодирует белковую киназу, ассоциированную с клеточной гибелью. Белок обеспечивает апоптоз и предотвращает опухолевую прогрессию в результате ингибирования поляризации клетки. Инактивация гена DAP-киназы приводит к усилению миграции и инвазии опухолевых клеток, препятствует апоптозу.

p16/INK4a (CDKN2A): ген-супрессор опухолевого роста, картированный на хромосоме 9p21. Белок является ингибитором циклинзависимой киназы cdk4, он блокирует активную транскрипцию генов, задерживая клетки в G1-фазе клеточного цикла, негативно регулирует клеточный цикл, препятствуя фосфорилированию, а следовательно, инактивации белка Rb1. Отсутствие этого белка или снижение его количества приводят к утрате контроля над клеточным циклом.

LAMC3: ген расположен в локусе 9q34.13, кодирует γ 3-цепь ламинина. Значение экспрессии этого гена для нормального функционирования уротелия определяется участием его белка во взаимодействии клеток с базальной мембраной. Нарушение базальных взаимодействий ведет к нарушениям клеточной адгезии, что способствует приобретению клетками способности к инвазии и активной миграции.

В качестве материала для исследования использовали ДНК, полученную из 64 парных образцов опухоли/условно нормальная ткань МП от пациентов с установленным диагнозом ПРМП. При анализе аномального метилирования генов в опухолевой и соответствующей морфологически нормальной ткани исследуемые образцы были распределены по 4 группам (см. таблицу):

1-я группа — метилирование генов определено в опухоли при отсутствии метилирования в условной норме (оп. +/н.тк. -);

2-я группа — метилирование генов определено как в опухоли, так и в условной норме (оп. +/н.тк. +);

3-я группа — метилирование генов не определено ни в опухоли, ни в условной норме (оп. -/н.тк. -);

4-я группа — метилирование генов не определено в опухоли, но представлено в условной норме (оп. -/н.тк. +).

Наличие метилирования генов в морфологически нормальной ткани, расположенной на границе с опухолевым узлом (группы 2-я и 4-я), предполагает существование в этих образцах поля канцеризации, которое характеризуется ранним аномальным метилированием исследуемых генов. Во 2-й группе (опухоли с метилированием генов как в опухоли, так и в условной норме) возникновение опухолевого клона произошло на фоне поля канцеризации, в котором уже имелось аномальное метилирование генов в качестве раннего события. Самой малочисленной является 4-я группа, в которой метилирование генов не определено в опухоли, но имеется в условной норме. Для этой группы опухолей, вероятно, аномальное метилирование исследуемых генов являлось ранним событием, поэтому оно существует в условной норме, но затем клonalная экспансия привела к преимущественному росту клона с другими генетическими повреждениями.

Для 1-й и 3-й групп в нашем исследовании невозможно подтвердить наличие поля канцеризации. В 1-й группе наличие метилирования генов в опухоли при отсутствии его в условной норме указывает на то, что для этих опухолей аномальное метилирование не является ранним событием канцерогенеза. Возможно, оно присоединилось позже, что привело к появлению клона с преимущественными ростовыми характеристиками.

Опухоли, принадлежащие к 3-й группе, для которой метилирование генов не определено ни в опухоли, ни в условной норме, можно определить как неинформативные.

В результате показано, что исследуемые гены *RASSF1A*, *P16*, *CDH1*, *LAMC3*, *DAPK* с высокой частотой метилируются как в опухоли, так и в морфологически неизменной ткани, расположенной на границе с опухолевым узлом. Наибольшая частота метилирования в опухоли определена для гена *RASSF1A* (60%), а в условно нормальной ткани — для гена *DAPK* (39%).

При анализе паттернов метилирования разных генов в неизменной и опухолевой ткани МП показано, что в 18–26% случаев паттерн метилирования генов в опухоли и нормальной ткани совпадает, а в 1–11% случаев метилирование исследованных генов может быть детектировано лишь в нормальном эпителии и отсутствует в опухоли. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу теории полей канцеризации примерно в 30% опухолей РМП. Это подтверждает данные других исследований, в которых также обнаружены молекулярно-генетические изменения в гистологически неизменном уротелии [4, 5, 11].

Важным вопросом, решение которого напрямую связано с наличием полей канцеризации, являются размеры этого поля, что имеет практическое значение: размеры поля могут помочь в определении минимального объема хирургического лечения.

К настоящему времени единого мнения о размерах поля канцеризации нет; предполагается, что его протяженность может зависеть от типа опухоли. Так, для плоскоклеточной карциномы головы и шеи эффект поля определен в пределах 7 см [13]. D. Wong и соавт. в 2001 г., исследуя статус гена *P16* в метапластическом эпителии при пищеводе Барретта, показали, что клон с повреждением гена распространяется на 8 см от опухолевого очага [14]. В любом случае речь идет об области (размером от нескольких до 2 десятков сантиметров), окружающей опухолевый узел.

Для РМП этот вопрос важен, потому что в процессе трансуретральной резекции (ТУР) происходит удаление только опухолевого узла, без прилежащих тканей. Проведенное нами исследование предполагает наличие полей канцеризации примерно у 1/3 пациентов. Проведение у них ТУР позволит убрать опухолевый узел, но оставшиеся клетки поля канцеризации могут дать начало новому опухолевому узлу, привести к рецидиву, что является большой проблемой при лечении пациентов, страдающих ПРМП.

Другим практическим вопросом, который имеет непосредственное отношение к наличию полей канцеризации, является высокая частота первично-множественных опухолей ПРМП. Многие генетические исследования уротелиальной атипии в образцах цистэктомии поддерживают концепцию олигоклональности и полей канцеризации при развитии мультифокальных уротелиальных опухолей, особенно на ранних стадиях заболевания. Однако моноклональная и олигоклональная теории уротелиальной мультифокальности не противоречат друг другу. Были предложены различные теории, чтобы объединить 2 механизма. Существует предположение, что оли-

гоклональность более распространена на ранних стадиях опухолевого развития, а с прогрессированием опухоли, на более поздних стадиях, происходит преимущественный рост одного клона с более агрессивными ростовыми характеристиками, и возникает явление псевдомоноклональности [8]. Так, ранние поражения могут возникнуть независимо друг от друга, а затем специфический злокачественный клон будет распространяться в уротелии через внутрипросветный или интраэпителиальный механизм. Хотя в последнее время считается, что множественные опухоли в большинстве случаев являются олигоклональными, существуют неоспоримые доказательства моноклональной гипотезы [4].

Решение вопроса о клональности происхождения син- и метакронных опухолей имеет не только фундаментальное, но и огромное прикладное значение. Так, при моноклональном характере развития рецидивов и множественных опухолей добиться улучшения результатов лечения и снижения частоты рецидивов можно путем совершенствования хирургических/диагностических внутрипузырных технологий. Их использование приведет к снижению возможности диссеминации и имплантации отдельных опухолевых клеток, а также повышению эффективности обнаружения малых опухолевых узлов. В случае олигоклонального развития рецидивных опухолей послеоперационные профилактические и терапевтические мероприятия должны подстраиваться под определенный молекулярный патогенез каждой опухоли или оказывать комплексное терапевтическое и иммуномодулирующее воздействие на всю слизистую оболочку при РМП. При множественных опухолях с отличиями в профиле генетических повреждений лечение должно учитывать их генетический профиль. Сходство и различия молекулярного профиля множественных опухолей также может иметь большое значение при использовании современных молекулярных методов диагностики в выявлении периодической и остаточной болезни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Залетаев Д., Немцова М., Стрельников В. и др. Диагностика эпигенетической патологии при наследственных и онкологических заболеваниях // Мол. биология. – 2004; 38: 213–23.
2. Немцова М.В., Михайленко Д.С., Кекеева Т.В. и др. Молекулярно-генетические маркеры в онкоурологии // Мол. Мед. – 2007; 3: 43–54.
3. Bender C., Jones P. Carcinoma of the Bladder: Innovations in Management (Ed. Petrovich Z., Baert L., Brady L.W.). Springer: Heidelberg/New York. – 1998; 37–51.
4. Cheng L., Zhang S., MacLennan G. et al. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice // Hum. Pathol. – 2011; 42 (4): 455–81.
5. Cianciulli A., Leonardo C., Guadagni F. et al. Genetic instability in superficial bladder cancer and adjacent mucosa: an inter-phase cytogenetic study // Hum. Pathol. – 2003; 34: 214–21.
6. Costello J., Plass C. Methylation matters // J. Med. Genet. – 2001; 38 (5): 285–303.
7. Dakubo G., Jakupciak J. Clinical implications and utility of field cancerization // Cancer Cell International. – 2007; 7 (2): 1–12.
8. Hafner C., Knuedel R., Stoehr R. et al. Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies // Int. J. Cancer. – 2002; 101: 1–6.
9. Jones T., Wang M., Eble J. et al. Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis // Clin. Cancer Res. – 2005; 11: 6512–9.
10. Junker K., Boerner D., Schulze W. et al. Analysis of genetic alterations in normal bladder urothelium // Urology. – 2003; 62 (6): 1134–8.
11. Paterson R., Ulbright T., MacLennan G. et al. Molecular genetic alterations in the laser-capture-microdissected stroma adjacent to bladder carcinoma // Cancer. – 2003; 98 (9): 1830–6.
12. Slaughter D., Southwick H., Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin // Cancer. – 1953; 6: 963–8.
13. Tabor M., Brakenhoff R., Ruijter-Schippers H. et al. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion // Am. J. Pathol. – 2002; 161: 1051–60.
14. Wong D., Paulson T., Prevo L. et al. p16(INK4a) lesions are common, early abnormalities that undergo clonal expansion in Barrett's metaplastic epithelium // Cancer Res. – 2001; 61: 8284–9.