



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2009110678/14, 23.03.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.03.2009

(45) Опубликовано: 10.07.2010 Бюл. № 19

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ШАЛАВИН И.А. Маркеры рецидива поверхностного рака мочевого пузыря. Дата публикации 13.06.2006, [он-лайн], найдено 19.10.2009, найдено из Интернет, http://www.vrach-aspirant.m/lib_show/17.html. RU 2284039 C2, 20.09.2006. RU 2275636 C1, 27.04.2006. МАТВЕЕВ В.Б. Рак мочевого пузыря. Дата публикации 18.08.2008, [он-лайн], найдено 19.10.2009, найдено (см. прод.)

Адрес для переписки:
450000, г.Уфа-Центр, Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, Патентный
отдел

(72) Автор(ы):

Павлов Валентин Николаевич (RU),
Измайлов Адель Альбертович (RU),
Измайлова Светлана Михайловна (RU),
Викторова Татьяна Викторовна (RU),
Галимзянов Виталий Захитович (RU),
Кутляров Линат Миниханович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования "БАШКИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ФЕДЕРАЛЬНОГО
АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ
И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ" (ГОУ
ВПО БГМУ РОСЗДРАВА) (RU)

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ РЕЦИДИВНОГО ИНВАЗИВНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к онкоурологии. Из лимфоцитов периферической венозной крови выделяют ДНК, проводят ПЦР-анализ с последующей рестрикцией амплифицированных фрагментов полиморфного локуса Ile105Val гена GSTP1. При обнаружении у больных с поверхностными формами РМП гомозиготного генотипа Val/Val прогнозируют

высокий риск развития рецидивного инвазивного рака мочевого пузыря (РМП). При обнаружении гомозиготного генотипа Ile/Ile прогнозируют минимальный риск развития рецидивного инвазивного РМП. Использование изобретения прогнозирует риск развития инвазивного РМП у пациентов с поверхностными формами РМП. Способ обеспечивает высокую точность прогноза.

(56) (продолжение):

из Интернет, <http://www.ronc.ru/3837>. VAN RHIJN B.W. et al. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review., Eur. Urol., 2005; 47: 736-48.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61B 10/00 (2006.01)*C12Q 1/68* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2009110678/14, 23.03.2009**(24) Effective date for property rights:
23.03.2009(45) Date of publication: **10.07.2010 Bull. 19**

Mail address:

**450000, g.Ufa-Tsentr, Lenina, 3,
BASHGOSMEDUNIVERSITET, Patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Pavlov Valentin Nikolaevich (RU),
Izmajlov Adel' Al'bertovich (RU),
Izmajlova Svetlana Mikhajlovna (RU),
Viktorova Tat'jana Viktorovna (RU),
Galimzjanov Vitalij Zakhitovich (RU),
Kutlijarov Linat Minikhanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
vysshego professional'nogo obrazovaniya
"BASHKIRSKIJ GOSUDARSTVENNYJ
MEDITSINSKIJ UNIVERSITET
FEDERAL'NOGO AGENTSTVA PO
ZDRAVOOKHRANENIJu I SOTSIAL'NOMU
RAZVITIJu" (GOU VPO BGMU ROSZDRAVA)
(RU)****(54) METHOD OF PREDICTING DEVELOPMENT OF RECURRENT INVASIVE URINARY BLADDER
CANCER**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to oncology. DNA is isolated from peripheral venous blood erythrocytes, PCR-analysis is carried out with further restriction of amplified fragments from polymorphic locus Ile105Val of gene GSTPI. If in patients with superficial forms of UBC homozygotic genotype Val/Val is detected, high risk

of development of recurrent invasive urinary bladder cancer (UBC) is predicted. If homozygotic genotype Ile/Ile is detected, minimal risk of development of recurrent UBC is predicted. Application of invention predicts risk of invasive UBC development in patients with superficial forms of UBC.

EFFECT: method ensures high accuracy of prediction.

2 ex

Предлагаемое изобретение относится к медицине, а именно к онкоурологии, и может быть использовано для выявления групп риска к развитию инвазивного рака мочевого пузыря у больных с поверхностными формами рака мочевого пузыря.

Рак мочевого пузыря (РМП) - одна из актуальных проблем в урологии и онкологии.

5 РМП - распространенное многофакторное онкологическое заболевание с широким разнообразием факторов риска. Известно, что пусковым механизмом развития любого многофакторного заболевания является индивидуальная генетическая предрасположенность, провоцируемая разнообразными внешнесредовыми
10 факторами, прежде всего химической природы - ксенобиотиками [Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков // Соросовский образовательный журнал. - 1999. - №1. - С.8-12].

Выбор метода лечения РМП зависит от степени инвазии опухоли. Различают
15 поверхностные (неинвазивные) (T_{is} - T_aT_1) и инвазивные (T_2 - T_3 - T_4) формы РМП. Тактика лечения и прогноз поверхностных и инвазивных форм РМП значительно отличаются. Прогрессия поверхностного рака в инвазивный наблюдается в 25-65% случаев. Несоответствие между уровнем прогрессии поверхностного рака мочевого пузыря в инвазивный у различных пациентов позволило предположить генетическую
20 детерминированность в развитии инвазии.

В метаболизме ксенобиотиков ключевая роль принадлежит ферментам глутатион-S-трансферазам (GSTP1, GSTM1, GSTT1) и эпоксидгидроксилазам. Полиморфизм этих генов, ассоциированный с изменением соответствующих ферментов, может
25 участвовать в формировании риска целого ряда новообразований [Millikan R., Pitman G. et al. Glutathione S-transferase M1, T3, and P1 // Breast cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. - 2000; 12. P.567-573].

Особого внимания заслуживают глутатион-S-трансферазы П (GSTP1), поскольку в некоторых исследованиях была показана их роль в патогенезе ряда злокачественных
30 новообразований, в частности рака мочевого пузыря [Brockmoller J., Cascorbi I., Kerb R. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferase M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P 450 enzymes as modulators of bladder cancer risk // Cancer Research. - 1996; 56. - P.3915-3925] и рака легкого [Miller D.P., Liu G. et al. Combinations of the variant genotypes of GSTP1, GSTM1 and p53 are associated with the lung cancer risk // Cancer. Research. - 2002; 62. P.2819-2823].

35 К глутатионам класса П относится фермент GSTP1, который участвует в детоксикации эпоксидпроизводных ПАУ, пестицидов и ряда канцерогенов [Райе Р.Х., Гуляева Л.Ф., 2003]. Высокий уровень экспрессии гена GSTP1 был обнаружен в
40 тканях, на которых внешняя среда оказывает наибольшее влияние (эпителий легкого, мочевого пузыря и желудочно-кишечного тракта), поэтому в случае низкой ферментативной активности GSTP1 эти ткани являются зоной риска развития токсического процесса [Ma Q., Lin G., Qin Y. et al. GSTP1 Ile105Val polymorphism in benzidine-exposed workers: an association with cytological grading of exfoliated urothelial
45 cells // Pharmacogenetics. - 2003. - Vol.13. - №7. - P.409-15]. Транзиция аденина на гуанин в 313 положении 5 экзона гена (A313G) приводит к аминокислотной замене в 105 положении полипептида (Ile105Val), которая затрагивает последовательность ДНК, кодирующую сайт связывания фермента с определенными субстратами, и таким
50 образом ведет к изменению активности фермента. По мнению ряда авторов, фермент, содержащий валин в 105 положении, в 7 раз активнее по отношению к диолам эпоксидов ПАУ, однако обладает в 3 раза более низкой способностью превращать 1-хлоро-2,4-динитробензен, чем фермент без замены.

Авторами в научно-медицинской и патентной литературе не обнаружено сведений об известности способа прогнозирования развития инвазивного рака мочевого пузыря у пациентов с поверхностными формами рака мочевого пузыря.

5 Прогнозирование риска развития инвазивного рака мочевого пузыря у пациентов с поверхностными формами рака мочевого пузыря имеет значение для определения частоты и характера наблюдения, проведения адьювантного лечения, а также влияет на выбор методики оперативного вмешательства.

10 Задачей изобретения является разработка объективного, высокоинформативного способа прогнозирования развития инвазивного рака мочевого пузыря у пациентов с поверхностными формами рака мочевого пузыря на основе выявления молекулярно-генетических маркеров. Метод доступен по реактивам и оборудованию.

Технический результат - получение критериев прогноза развития инвазивного рака мочевого пузыря у пациентов с поверхностными формами рака мочевого пузыря.

15 Предлагаемый способ осуществляется следующим образом.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служат образцы ДНК, выделенные из лимфоцитов периферической венозной крови. Кровь набирают в пробирки со стандартным консервантом (1 мл глюцира) в соотношении 4:1. До 20 выделения образцы крови хранят при температуре +4°C не более месяца. Для выделения ДНК используют стандартный метод фенольно-хлороформной экстракции [Mathew C., 1984 (The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods in Molecular Biology / Ed. J.M.Walker. - New York., London. - 1984. - Vol.2. - P.31-34)]. К 4-8 мл крови добавляют 40 мл холодного лизирующего буфера, 25 содержащего 320 мМ сахарозы, 1% тритона X 100, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-HCl pH 7,6.

30 Ядра осаждают двойным центрифугированием при 4°C и 4000 g (сначала в течение 20 минут, а затем в течение 10 минут после слива супернатанта и повторного добавления 10 мл лизирующего буфера). Полученный осадок ресуспендируют в 400 мкл буфера Soline EDTA (25 мМ EDTA, NaCl 5M pH 8,0), добавляют 40 мкл 10% SDS и 30-40 мкл протеиназы К («Promega») до конечной концентрации 10 мг/мл. После перемешивания на шейкере инкубируют при 37°C в течение 10-12 часов.

35 Очистку ДНК от белков производят с помощью экстракции лизата забуференным фенолом (200 мкл меркаптоэтанола на 50 мл фенола-Трис-HCl, pH 7,8), смесью фенол-хлороформа (1:1) и хлороформом (2 мл изоамилового спирта на 48 мл хлороформа). При этом фенол активно денатурирует белки, смесь фенол-хлороформа полностью ингибирует РНК активность, в результате последней экстракции хлороформом из 40 препарата ДНК удаляют остатки фенола. Экстракцию производят, смешивая лизат и растворитель до образования эмульсии. Разделение фаз проводят центрифугированием при 10000-12000 g в течение 8-10 мин. Осаждение ДНК производят добавлением двух объемов охлажденного 96% этанола. Осажденную ДНК 45 дважды промывают 70% этанолом для очистки от солей, затем удаляют этанол из пробирки и подсушенный при комнатной температуре осадок ДНК растворяют в деионизированной воде. Раствор ДНК хранят при -20°C.

Анализ полиморфных локусов гена GSTP1 (Ile105Val) проводят методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК (ПЦР) на термоциклере в автоматическом режиме с использованием локуспецифических олигонуклеотидных праймеров. 50 Реакционная ПЦР-смесь содержит следующие обязательные компоненты: 1,25 мкл 1×ПЦР-буфера (60 мМ Tris-HCl pH 8.5), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.1% тритон X-100), 200 мМ каждого dNTP, по 1 мкл соответствующих праймеров, примерно 100 нг геномной ДНК, 1 ед Taq-полимеразы

(«Сибэнзим», Россия) и необходимое количество деионизированной воды до объема 12.5 мкл.

Режим амплификации включает: предварительную денатурацию (94°C, 5-7 мин), 28-32 цикла амплификации: денатурация - 94°C, 40 сек; отжиг - 54 t°C, 40 сек; синтез - 72°C, 1 мин; завершающий синтез (72°C, 7-10 мин).

Полиморфизм локусов гена GSTP1 исследуют методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

После амплификации ПЦР-продукт подвергают гидролизу соответствующей эндонуклеазой рестрикции. Для этого 5 мкл амплификата смешивают с 5 ед. фермента в соответствующем буфере, смесь инкубируют при определенной температуре, согласно инструкциям производителей («Сибэнзим») на протяжении 12 часов.

Результаты амплификации и рестрикции оценивают при помощи вертикального электрофореза в 6-8%-ном полиакриламидном геле (исходное соотношение акриламида и метиленбисакриламида 29:1) при напряжении 200-300 В (10 В/см). По окончании электрофореза гель окрашивают раствором бромистого этидия (0,1 мкг/мл) в течение 15 минут и фотографируют в проходящем ультрафиолетовом свете. Для идентификации аллелей использовали маркер молекулярного веса 100 bp DNA ladder («Сибэнзим»). При обнаружении у больных с поверхностными формами РМП гомозиготного генотипа Val/Val прогнозируют высокий риск развития рецидивного инвазивного РМП. При обнаружении гомозиготного генотипа Ile/Ile прогнозируют минимальный риск развития рецидивного инвазивного РМП.

Проведен анализ на выборке из 145 больных с диагнозом РМП, из них 68 пациентов с инвазивным и 77 с поверхностным РМП, находившихся на стационарном лечении в Республиканском онкологическом диспансере и Республиканской клинической больнице г.Уфы (РБ) в период с 2005 по 2008 г. Клиническое обследование больных проводилось врачами стационаров и включало обязательные и дополнительные методы исследования. Средний возраст больных с инвазивным РМП составил 62.07±11.12 лет, а с поверхностным РМП - 60.48±11.50 лет.

Ассоциацию генотипов, аллелей с развитием заболевания выявляли, сравнивая выборки больных и здоровых индивидов по частоте одного признака с использованием критерия χ^2 . Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Относительный риск заболевания по конкретному признаку вычисляли как соотношение шансов (OR - odds ratio): $OR = (a \times d) / (b \times c)$,

где a - частота аллеля (генотипа) в выборке больных инвазивными формами РМП, b - частота аллеля (генотипа) в выборке больных поверхностными формами РМП, c - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных инвазивными формами РМП, d - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных поверхностными формами РМП. Доверительный интервал для относительного риска рассчитывали по следующей формуле:

$$OR' = \exp\left(\ln OR - 1.96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}\right)$$

$$OR'' = \exp\left(\ln OR + 1.96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}\right)$$

Значение $OR > 1.5$ рассматривали как положительную ассоциацию заболевания с признаком («фактор риска»), $OR < 0.5$ - как отрицательную ассоциацию («фактор устойчивости»).

Анализ распределения генотипов локуса Ile105Val гена GSTP1 у больных РМП в зависимости от степени инвазии показал, что генотип Val/Val выявлялся достоверно

чаще у индивидов с инвазивным течением заболевания, чем у индивидов с неинвазивной формой РМП (17% и 3% соответственно, $\chi^2=5.9$; $p=0.01$). В группе больных с неинвазивным характером роста частота генотипа Ile/Ile гена GSTP1 увеличена до 67% против 39% в группе больных с инвазивными формами РМП ($\chi^2=10.1$; $p=0.002$). Показатель отношения шансов для данного генотипа составил 0.3 (95% CI 0.1-0.6), указывая на его протективную значимость в отношении развития инвазивных форм РМП.

Предлагаемый способ иллюстрируется следующими клиническими примерами.

Пример 1. Пациент, 42 года, поступил в урологическое отделение РКБ с жалобами на примесь крови в моче в течение 2 недель.

Объективно: состояние удовлетворительное; кожа и видимые слизистые обычной окраски. Дыхание везикулярное, тоны сердца ясные ритмичные. Живот мягкий безболезненный. Мочеиспускание самостоятельное, безболезненное. В моче примесь крови. Анализ крови: эр - $3,4 \times 10^{12}/л$, л - $10,5 \times 10^9/л$, СОЭ - 19 мм/час. УЗИ органов брюшной полости без патологии. УЗИ мочевого пузыря выявило по задней стенке мочевого пузыря гиперэхогенное объемное образование 35×46 мм. ТРУЗИ подтвердило наличие объемного гиперэхогенного образования по задней стенке на 7 часах без инвазии в мышечную стенку размерами 35×45 мм, с кровотоком в режиме доплеровского картирования. Цистосткопия с биопсией подтвердила диагноз: умеренно-дифференцированный плоскоклеточный рак мочевого пузыря. Проведено исследование по предложенной методике. Установлено: пациент обладает генотипом Ile/Ile полиморфного локуса Ile105Val гена GSTP1. Риск развития рецидивного инвазивного рака мочевого пузыря у данного пациента минимален.

Произведена трансуретральная резекция опухоли мочевого пузыря с интраоперационной химиопрофилактикой митомицином. Пациенту рекомендовано контрольное УЗИ исследование 1 раз в 3 месяца в первый год наблюдения. При контрольном обследовании через 2 года у пациента не выявлен рецидив опухоли мочевого пузыря.

Пример 2. Пациент, 45 лет, поступил в урологическое отделение РКБ с жалобами на примесь крови в моче в течение месяца.

Объективно: состояние удовлетворительное; кожа и видимые слизистые обычной окраски. Дыхание везикулярное, тоны сердца ясные ритмичные. Живот мягкий безболезненный. Мочеиспускание самостоятельное, безболезненное. В моче примесь крови. Анализ крови: эр - $3,7 \times 10^{12}/л$, л - $8,5 \times 10^9/л$, СОЭ - 15 мм/час. УЗИ органов брюшной полости без патологии. УЗИ мочевого пузыря выявило по передней стенке мочевого пузыря гиперэхогенное объемное образование 40×35 мм. ТРУЗИ подтвердило наличие объемного гиперэхогенного образования по задней стенке на 8 часах без инвазии в мышечную стенку размерами 42×37 мм, с кровотоком в режиме доплеровского картирования. Цистосткопия с биопсией подтвердила диагноз: умеренно-дифференцированный плоскоклеточный рак мочевого пузыря. Проведено исследование по предложенной методике. Установлено: пациент обладает гомозиготным генотипом Val/Val полиморфного локуса Ile105Val гена GSTP1. У данного пациента высокий риск развития рецидива инвазивного рака мочевого пузыря.

Произведена трансуретральная резекция опухоли мочевого пузыря с интраоперационной химиопрофилактикой митомицином. В послеоперационном периоде пациенту проведена внутривезикулярная иммунотерапия. Пациенту рекомендовано контрольное УЗИ и цистоскопическое исследование через 1 месяц и в

дальнейшем 1 раз в 3 месяца. При 3-м контрольном УЗИ исследовании выявлен рецидив опухоли с инвазией в стенку мочевого пузыря. Пациенту произведена радикальная цистэктомия с илеоцистопластикой по Штудеру.

5 Таким образом, выявление высокого риска развития инвазии опухоли у данного пациента позволило выбрать более активную тактику послеоперационного наблюдения и лечения, что привело к своевременной диагностике развития инвазивного РМП и своевременному выполнению радикальной цистэктомии с илеоцистопластикой.

10

Формула изобретения

Способ прогнозирования риска развития рецидивного инвазивного рака мочевого пузыря (РМП) у пациентов с поверхностными формами РМП, характеризующийся тем, что из лимфоцитов периферической венозной крови выделяют ДНК, проводят
15 анализ полиморфного локуса Ile105Val гена GSTP1 методом ПЦР с последующей рестрикцией амплифицированных фрагментов и при обнаружении генотипа Val/Val прогнозируют высокий риск развития инвазивного РМП, при обнаружении генотипа Ile/Ile прогнозируют минимальный риск.

20

25

30

35

40

45

50