



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 74923

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61B 10/00

C12Q 1/68

C12N 15/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ПЕРЕДРАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЦИСТИТ

1

2

(21) 2004021432

(22) 27.02.2004

(24) 15.02.2006

(46) 15.02.2006, Бюл. № 2, 2006 р.

(72) Возіанов Олександр Федорович, Романенко
Аліна Михайлівна, Базалицька Світлана Василів-
на, Виниченко Володимир Іванович, Запарін Ва-
дим Корнійович, Забарко Лариса Борисівна(73) ІНСТИТУТ УРОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ
НАУК УКРАЇНИ

(56) UA, B, 51226, 15.11.2002

US, A, 5 021 551, 04.06.1991

Xu X. et al.: "A hot spot for p53 mutation in
transitional cell carcinoma of the bladder: clues to the
etiology of bladder cancer", Cancer Epidemiol.
Miomark. Rev., 1997, vol. 4, pages 546-551Kressner Ulf et al.: "Prognostic value of p53 genetic
changes in colorectal cancer", Journal of Clinical
Oncology, 1999, vol. 17Havrilesky L. et al.: "Prognostic Significance of p53
mutation and p53 overexpression in advanced
epithelial ovarian cancer: a gynecologic oncology
group study", Journal of Clinical Oncology, 2003, vol.
21, pages 3814-3825(57) Спосіб діагностики передраку сечового міхура
у хворих на хронічний цистит, які проживають на
забруднених радіонуклідами територіях, який
включає імуногістохімічне визначення експресії
протеїну p53, який відрізняється тим, що додат-
ково проводять молекулярно-генетичний PCR-
SSCP аналіз гена p53, його екзотів 4-8 у тканині
уротелію хворих на цистит та при наявності точко-
вих мутацій діагностують передрак сечового міху-
ра.

Спосіб діагностики передраку сечового міхура
у хворих на хронічний цистит, які проживають на
забруднених радіонуклідами територіях
відноситься до медицини, а саме до урології і мо-
же бути використаний для ранньої діагностики
передраку сечового міхура та його профілактики.

Серед хворих, які мешкають на забруднених
радіонуклідами регіонах різні форми хронічного
проліферативного циститу з ділянками клітинної
атипії складають відповідно 94 % та 95 % з роз-
витком ознак променевого патоморфозу.

Відома залежність між виразністю
морфологічних, імуногістохімічних (AgNOR-
протеїни, апоптоз, p53, PCNA, bax, bcl-2) змін
епітелію сечового міхура, та місцем проживання
хворих і величиною показників забруднення сечі
радіонуклідами Cs¹³⁷. Хворі, які проживають у за-
бруднених радіонуклідами регіонах, складають
групу ризику щодо розвитку раку сечового міхура
та передміхурової залози, що вказує на
необхідність організації довготривалого диспан-
серного нагляду.

Відомий спосіб діагностики раку сечового
міхура [1], який полягає у імуногістохімічному
визначенні експресії протеїну p53 в пухлинній
тканині при перехідноклітинному раку сечового
міхура, раку простати та раку нирки.

Недоліком цього способу є те, що підвищена
експресія протеїну p53 визначалася лише в
пухлинній тканині.

Відомий також спосіб діагностики раку сечово-
го міхура [2], прийнятий нами за прототип, який
полягає у імуногістохімічному визначенні експресії
протеїну p53, що є показником розвитку
перехідноклітинного раку сечового міхура.

Недоліком даного способу є те, що
імуногістохімічні особливості уротелію визначали-
ся лише в пухлинній тканині.

В основу винаходу поставлено завдання удо-
сконалити спосіб діагностики передраку сечового
міхура у хворих на хронічний цистит, які прожива-
ють на забруднених радіонуклідами територіях
шляхом визначення імуногістохімічних особливо-
стей уротелію при передракових станах сечового
міхура (різні форми хронічного проліферативного

(13) C2

(11) 74923

(19) UA

циститу з ділянками клітинної атипії та плоскоклітинної метаплазії уротелію, з уротеліальною екзо- та ендофітною папіломою сечового міхура) та при проведенні молекулярно-генетичного (PCR-SSCP) аналізу гену p53, а саме його екзонів 4 - 8 і при наявності крапкових мутацій діагностують передрак сечового міхура, ідо сприяє зниженню захворюваності на рак сечового міхура серед хворих, які мешкають на забруднених радіонуклідами територіях.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб діагностики передраку сечового міхура у хворих на хронічний цистит, які проживають на забруднених радіонуклідами територіях, який включає імуногістохімічне визначення експресії протеїну p53, згідно з винаходом, додатково проводять молекулярно-генетичний (PCR-SSCP) аналіз гену p53, його екзонів 4 - 8, у тканині уротелію хворих на цистит та при наявності крапкових мутацій діагностують передрак сечового міхура.

Запропонований спосіб виконують таким чином: хворим з довготривалими хронічними циститами, що не піддаються лікуванню загальноприйнятими методами, у яких при цистоскопії виявлені зміни слизової оболонки сечового міхура, характерні для лейкоплакії або папілярної пухлини, поряд із клініко-лабораторним обстеженням виконують численну трансуретральну біопсію стінки сечового міхура для проведення імуногістохімічного дослідження експресії протеїну p53.

Для визначення експресії протеїну p53 використовують моноклональні антитіла миші проти людини DO-7 фірми "DAKO" (Glostrup, Данія) у робочому розведенні 1:200 та вторинні біотинізовані антитіла коня проти миші у розведенні 1:50 з універсального Kit-набору фірми "Vector" (Vector Laboratories, США).

Після депарафінізації у ксилолі та дегідратації у спиртах матеріал у цитратному буфері інкубують в мікрохвильовій печі три рази по 5 хвилин. Блокування активності ендогенної пероксидази здійснюють за допомогою розчину перекису водню у метанолі у розведенні 1:9 на протязі 20 хвилин. Після обробки зрізів 2% розчином сироватки коня на протязі 30 хвилин на них наносять первинні

антитіла миші проти людини у робочому розведенні 1:200 та матеріал залишають на 12 годин при температурі 4°C. Вторинні біотинізовані антитіла коня проти миші у розведенні 1:50 наносять на зрізи, після чого проводять інкубацію їх з першою порцією розчину ABC та обробляють зрізи біотинізованим тираміном у розведенні 1:125 на протязі 10 хвилин. Останнім кроком є нанесення другої частини розчину ABC на зрізи. Зрізи фарбують гематоксиліном-еозинном. Використовують позитивний та негативний контроль. Всі зрізи досліджують під мікроскопом фірми „Olympus” при збільшенні у 400 разів. На ділянках, які у сумі складають не менше, ніж 2 000 клітин, підраховують кількість клітин із забарвленим ядром. Результати імуногістохімічних реакцій дослідження експресії p53 протеїнів оцінюють із використанням індексів імунореактивності, що визначають як відсоток позитивно забарвлених клітин серед 2000 клітин за формулою:

$$\text{Кількість імунопозитивних клітин} \times 100\%$$

$$2000$$

Молекулярно-генетичний PCR-SSCP аналіз гену p53, його екзонів 4-8, складається з п'яти етапів: 1 - ізоляції ДНК; 2 - очищення ДНК; 3 - проведення полімеразної ланцюгової реакції (PCR) для збільшення копій екзонів 8-9, 5-6 та 4; 4 - проведення аналізу одноланцюгового конформаційного поліморфізму (SSCP) із забарвленням сріблом; 5 - визначення послідовності нуклеотидів в ДНК (3, 4).

Спосіб діагностики передраку сечового міхура у хворих на хронічний цистит, які проживають на забруднених радіонуклідами територіях був застосований у відділі патоморфології Інституту урології АМН України при дослідженні 28 хворих на хронічний цистит, які проживають на забруднених радіонуклідами територіях України, у 17 хворих-мешканців Києва та у 10 хворих із "чистих" регіонів віком від 49 до 92 років з використанням загальногістологічних методів дослідження і фарбуванням зрізів гематоксилін-еозинном.

Розподіл хворих по групах залежно від радіоактивного забруднення місця проживання представлений в таблиці 1.

Таблиця 1

Розподіл хворих на хронічний цистит по групах залежно від радіоактивного забруднення місця проживання

№	Групи хворих з	Кількість хворих	Щільність забруднення ґрунту Cs (Ки/км ²)	Індивідуальна річна сумарна ефективна еквівалентна доза (мбер)
1	"чистих" регіонів України (контрольна)	10		
2	м. Києва	17	0,5-8	0,5
3	радіоактивне забруднених регіонів України	28	5-20	32,21

Для екстракції ДНК відібрано епітелій сечового міхура у 17 хворих з 2 та 3 груп, які мешкають на забруднених радіонуклідами Cs регіонах України та М.Києва з інтенсивною ядерною p53 імунореактивністю (більше 10 % зафарбованих

клітин), або без імуногістохімічної експресії p53, але із гістологічними змінами (дисплазія високого ступеню, CIS або TCC) та у 9 хворих контрольної групи без передракових змін уротелію. ДНК для PCR аналізу отримують з парафінових зрізів за

допомогою мікродисекції. Для цього серійні зрізи, аналогічні тим, що використовують для гістологічного дослідження, завтовшки 3-7 мкм, депарафінують та висушують на повітрі. Ділянки досліджуваного епітелію, довжиною 3-8 мм, відокремлюють тонкою голкою та вирізають під мікроскопом.

Після мікродисекції слизового шару сечового міхура уротеліальні клітини кладуть у тюби для депарафінізації ксилолом на протязі 10 хвилин при кімнатній температурі у центрифугі при швидкості 13030 обертів у хвилину, після чого промивають вміст туб абсолютним етанолом та висушують. Перетравлювання протеїнів здійснюють протягом 12 годин при струшуванні з додатком 0,01 молярного розчину фосфатного буферу (PBS) та протеїнінази K у концентрації 2 мг/мл. Інактивацію ензиму проводять при занурюванні тубів у воду з температурою 94° С, на протязі 5 хвилин з наступним розташуванням на льоду протягом 5 хвилин.

При проведенні полімеразної ланцюгової реакції (PCR) використовують стандартні праймери фірми Bethesda Research Laboratories до екзонів 4, 5-6 та 8-9, довжиною 259, 328 та 342 нуклеотидних пари відповідно. Для екзона 5, 5'-TTCAACTCTGTCTCCTTCCT-3', і 5'-CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG-3'; для екзона 6, 5'-GCGTCTGATTCCTCACTGAT-3' і 5'-TTAACCCCTCCTCCCAGAGA-3'; для екзона 7, 5'-AGGCGCACTGGCCTCATCTT-3' і 5'-TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC-3'; для екзона 8, 5'-TTCCTTACTGCCTCTTGCTT-3' і 5'-AGGCATAACTGCACCCTTGG-3'.

Для приготування складного гелю (5 % поліакріламід 0,25 % агароза) розмірами 210 x 400 x 0,4 мм використовують 5 мл 50 % акріаміду в суміші з 5 мл 50 % гліцерола та 15 мл дистильованої води. Суміш інкубують протягом 2 хвилин у мікрохвильовій печі при температурі 100° С. Адекватний об'єм 0,5 % агарози фірми BioRad (Hercules, CA, USA) у розчині фосфатного буферу підігрівують до 100° С та охолоджують до 30°С. Суміш розчинів поліакріламіду та агарози, які готують разом з 330 мк 10 % розчину амонію персульфату та 30 мк тетраметиленаміду заливають в апарат "Sequi - Gen" фірми BioRad (Hercules, CA, USA). Гель залишають протягом 12 годин при кімнатній температурі.

При проведенні аналізу одноланцюгового конформаційного поліморфізму (SSCP) 5 мк продуктів, які отримують для кожного із екзонів 4, 5-6 та 8-9 при PCR реакції, змішують з трьома об'ємами "стоп" буферного розчину, до складу якого входять 98 % розчин формаміду, 10 мілімолярний розчин їдкого натру, 20 мілімолярний розчин фосфатного буферу, 0,15 % бромфенол блакитний та 0,05 % розчин ксилену FF. Після денатурації отриманої речовини протягом 10 хвилин при температурі 90° С, її закачують в гель. Гель розташовують у буферному розчині та проводять електрофорез при напрузі 40 W протягом трьох годин при температурі 4°С.

Після електрофорезу, на гель протягом 30 хвилин наносять розчин, який фіксує гель, та складається із 1,5 г бензенсульфонові кислоти,

50 мл етанолу та 200 мл дистильованої води. Після перетравлювання гелю у розчині, що складався із 0,05 г содіум тріосульфату та дистильованої води протягом 1 хвилини, його промивають тричі у дистильованій воді. Забарвлення гелю здійснюють на протязі 30 хвилин у суміші 0,175 г бензенсульфонові кислоти та 0,5 г срібла у 250 мл води, після чого гель промивають двічі. Проявляють продукти полімеразної ланцюгової реакції протягом 6 хвилин у розчині, який складався із 6,25 г содіум карбонату, 250 цл формальдегіду, 25 мл тіосульфату та 225 мл води. Для зупинки реакції використовують суміш з 12,5 г содіум ацетату, 28,7 г оцтової кислоти, 28,7 г гліцерола та 250 мл дистильованої води. Гель розміщують у целофан. У всіх спостереженнях, в яких виявляють мутації, хоча б раз повторюється PCR-SSCP аналіз з використанням незалежних продуктів, наявність мутацій підтверджується прямим визначенням послідовності нуклеотидів. Особливу увагу при проведенні експерименту приділено уникненню забруднення матриці ДНК. PCR-реагенти утримують окремо від того місця, де знаходяться PCR-продукти. А реагенти з'єднують у COY Template Tamer hood (COY Co., Grass Lake, MI), оснащеною ультрафіолетовим світлом.

Визначення послідовності нуклеотидів здійснюють з використанням комп'ютерного програмного забезпечення. Для визначення статистичної достовірності використовують χ^2 -тест.

Дані морфологічного дослідження пояснюють ілюстративними матеріалами.

На фіг. 1 представлена випадково виявлена папілярно-інвазивна уротеліальна карцинома у хворого із забрудненого радіонуклідами регіону. Гематоксилін-еозин. X 180.

На фіг. 2 - висока імуногістохімічна експресія протеїназ р53 в уротелії сечового міхура при хронічному непроліферативному циститі у хворого з забрудненого радіонуклідами регіону. X 200.

При гістологічному дослідженні біоптатів сечового міхура у всіх спостережених груп хворих із забруднених радіонуклідами територій України та м. Києва визначають різні форми хронічного проліферативного циститу: гнізда Бруна, кистозний цистит, поля плоскоклітинної або залозистої, часто кишкової, метapлазії, що нерідко поєднувалися між собою. Для цих випадків характерними є численні крововиливи у підслизовому шарі, дилатація судин та ангіоматозні судинні зміни, а також зони склерозу і фіброзу, що в цілому можна охарактеризувати як променевий патоморфоз хронічного циститу.

У всіх спостереженнях досліджуваних 3 та 2 груп, за виключенням 3 хворих із 45, визначають численні зони дисплазії, що становить 95 % та 94 % відповідно. Крім того, у 22 хворих - 16 хворих 3 групи та 6 хворих 2 групи, визначають ділянки раку *in situ* (CIS), що становить 57 % та 35 % відповідно. Крім того, випадково верифіковані 2 маленькі уротеліальні карциноми (одна папілярно-інвазивна, а друга- інвазивна) (Фіг. 1).

При цьому, в уротелії пацієнтів контрольної групи кількість випадків хронічного проліферативного циститу становить 6 спостере-

жень, у двох із яких визначали ділянки дисплазії уротелію сечового міхура низького ступеню. В інших випадках передракових та ракових змін в уротелії виявлено не було, хоча ознаки запалення спостерігали, як в уротелії, так і в підслизовому шарі.

Молекулярно-генетичний аналіз проведено у 17 хворих-мешканців забруднених радіонуклідами територій України. Порівняльний аналіз показників

імуногістохімічної експресії протеїну p53 наглядно демонструє високу експресію протеїну p53 у уротелії сечового міхура хворих з забруднених радіонуклідами територій України та м. Києва і відсутність її у хворих із трьох контрольних груп (Фіг.2).

Результати мутаційного аналізу гену наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Мутаційний аналіз гену p53 в уражених ділянках уротелію пацієнтів, що мешкають на забруднених радіонуклідами територіях України

№	Вік/ група	Дата дослідження	Зразок	Гістологічний діагноз	Екзон	Кодон	Мутації гену p53		
							Зміни основ	Зміни послідовності АМК'	Переміщення нуклеотидів
1	57/1	02.1997	Біопсія	Дисплазія ^a	Немає				
2	69/1	05.1996	Біопсія	Дисплазія	Немає				
3	60/П	05.1995	Біопсія	Дисплазія	Немає				
4	74/1	11.1996	Біопсія	CIS ^b	Немає				
5	67/1	03.1996	Біопсія	CIS	Немає				
6	78/II	05.1996	Біопсія	Дисплазія	N.E. ^c				
7	69/1	07.1997	Сеча		Немає				
8	68/1	12.1994	Біопсія	Дисплазія	Немає				
9	66/1	07.1996	Біопсія	Дисплазія	Немає				
10	63/1	11.1994	Біопсія	Дисплазія	7	251	ATC→CTC	Ile→Leu	A→C
11	63/1	01.1995	Біопсія	CIS	7	245	GGC→AGC	Gly→Ser	G→A/CpG
12	73/1	02.1997	Біопсія	Інвазивна TCC	5	158	CGC→CAC	Arg→His	G→A/CpG
13	68/1	05.1995	Біопсія	' CIS	N.E.				
14	66/1	07.1997	Сеча(58CP)		5	175	CGC→TGC	Arg→Cys	C→T/CpG
15	66/1	03.1995	Біопсія	Дисплазія	7	245	GGC→AGC	Gly→Ser	G→A/CpG
16	63/1	01.1997	Біопсія	CIS	7	245	GGC→AGC	Gly→Ser	G→A/CpG
17	68/1	07.1997	сеча(3CP)	Дисплазія	7	245	GGC→AGC	Gly→Ser	G→A/CpG
18	68/1	07.1996	Біопсія	Дисплазія	7	245	GGC→AGC	Gly→Ser	G→A/CpG
19	68/1	08.1997	се4а(SSCP)		7	245	GGC→AGC	Gly→Ser	G→A/CpG
20	69/П	02.1997		Дисплазія	5	154	GGC→GGT	Gly→Gly	G→T/nonCpG
21					7	245 ^d	GGC→AGC	Gly→Ser	G→A/CpG
22					7	254 ^e	ATC→ACC	Ile→Thr	T→C
23	70/1	05.1995	Біопсія	Дисплазія	7	248	CGG→TGG	Arg→Trp	C→T/CpG
24			Біопсія	CIS	5	158	CGC→CAC	Arg→His	G→A/CpG
25					7	248	CGG→TGG	Arg→Trp	C→T/CpG
26		08.1997	Сеча		4	125 ^f	ACG→ATG	Arg→Met	C→G/CpG
27					6	211 ^g	ACT→ATT	Thr→He	C→T/non-CpG

^aвиразність дисплазії середня-сильна. ^bКарцинома *in situ*. ^cНеоцінювалася через недостатність кількості PCR зразків.

^dтандемні мутації на ідентичних алелях. ^eАМК - амінокислота.

У зонах CIS та клітинної атипії уротелію більшості спостережень (9 із 17 пацієнтів -53 %), що підлягали молекулярно-генетичному аналізу, визначені одна і більше крапкових мутацій гену p53, як в поодиноких так й в декількох зразках у одного і того ж пацієнта, що забирали в різні часи.

У трьох пацієнтів при дослідженні в різні часи різних біоптатів, або біоптатів і сечі, визначені ідентичні мутації, що підтверджує їх клональну спорідненість, тобто наявність мutowаних клонів в уротелії з десквамацією у сечу значної кількості ушкоджених клітин. Всі виявлені мутації гену, окрім одної, де було визначено

ураження різних екзонів (кодони 154, GGC (Gly) на GGT (Gly), є поодинокими заміщеннями основних пар, при цьому відсутні делеції та інсерції.

Специфічні мутації визначені у 11 із 15 хворих (73 %) і є поодинокими трансцизіями основних пар G:C на A: T у CpG динуклеотидів (кодони 158, 245, 248) в екзонах 4, 5, 6, 7. З метою виявлення змін в послідовності нуклеотидів між колонами 245 - 254

екзона 7, де знайдені мутації у 9 із 15 випадків, утворені специфічні праймери для цієї ділянки (5'-ACTACATGTGTAACAGTTCC-3' і 5'-TCCTGACCTGGAGTCTTCCA-3'), які продукували PCR-фрагмент довжиною 86 bp (основних пар).

На екстрагованих ДНК уротелію 9 пацієнтів, які проживають у "чистих" регіонах (група 1 - контрольна), проведений PCR-SSCP аналіз показав, що жодного аномального бенду не було виявлено.

За результатами проведення молекулярно-генетичних досліджень визначено, що висока імуногістохімічна експресія протеїну p53 в уротелії сечового міхура відповідає мутаціям гену p53 ДНК.

Наводимо приклади практичного застосування запропонованого способу.

Приклад 1. Хв. Л.А., і.х. № 164, 68 р., мешканець м.Києва. Поступив в клініку 20.01.2003 р. з діагнозом: гіперплазія простати, хр.цистит. Проведена численна біопсія стінки сечового міхура. Встановлений гістологічний діагноз: хр.проліферативний кистозно-фолікулярний цистит.

Дослідження біоптату сечового міхура протгодеіе за запропонованим способом та виявлено високу імуногістохімічну експресію протеїну p53 уротелію сечового міхура. Молекулярно-генетичний аналіз гену p53 виявив численні крапкові мутації в екзонах 4-8. Хворому призначене профілактичне лікування цитостатичними препаратами. Через місяць проведене контрольне дослідження з цитологічним аналізом аспірату сечі. Проліферативних та диспластичних змін в уротелії сечового міхура не виявлено.

Таким чином, застосування запропонованого способу у хворих з довготривалими хронічними циститами, що не піддаються лікуванню загальноприйнятими методами, у яких при цистоскопії виявлені зміни слизової оболонки сечового міхура, характерні для лейкоплакії або папілярної пухлини, поряд із клініко-лабораторним обстеженням необхідно виконувати численну трансуретральну біопсію стінки сечового міхура на виявлення крап-

кових мутацій гену p53, що сприятиме попередженню та зниженню захворюваності на рак сечового міхура населення, яке проживає на забруднених радіонуклідами територіях.

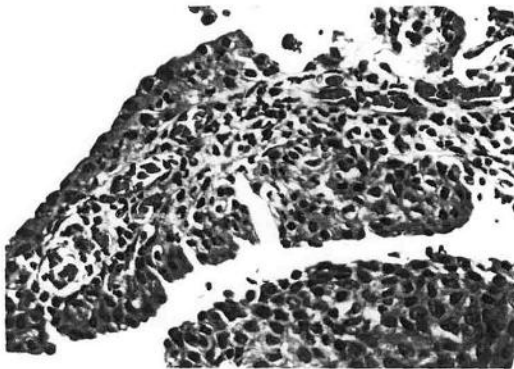
Джерела інформації, прийняті до уваги при експертизі

1. Sinik Z., Alkibay T., Bozkirli I. Nuclear p53 overexpression in bladder, prostate and renal carcinomas. // *Int. J. Urol.* - 1997. - V. 4. - P. 546-551.

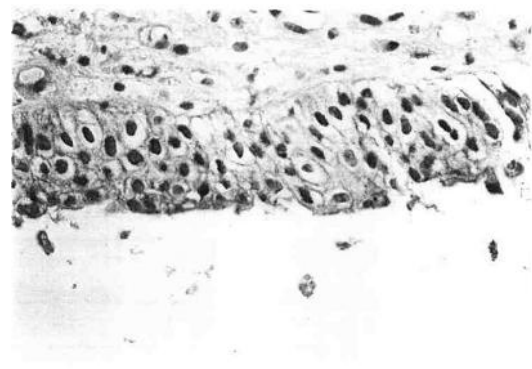
2. A hot spot for p53 mutation in transitional cell carcinoma of the bladder: clues to the etiology of bladder cancer /Xu X., Slower M.J., Reid I.N. et al. // *Cancer Epide-miol. Miomark. Rev.* - 1997. - V. 6. - P. 611-616 (прототип).

3. Nomiyama K., Nomiyama M. Critical concentrations of "unbound" cadmium in the rabbit renal cortex // *Experientia.* - 1986. - V. 42. - P. 149.

4. EPA. U.S. Environmental Protect Agency: Part II. Federal Register. - 1990. -V. 55.-P. 31227-31229.



Фіг. 1



Фіг. 2