

МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ И РИСКА МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПРИ МЫШЕЧНО-ИНВАЗИВНОМ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

АВТОРЫ: к.б.н. Смаль М.П., д.м.н. Ролевич А.И., Большакова Д.В., к.м.н. Суслов Л.Н., к.м.н. Набебина Т.И., д.м.н., профессор, чл.-корр. НАН Беларуси Красный С.А., д.б.н., профессор Гончарова Р.И.

Технология использования метода предполагает на первом этапе определение потери гетерозиготности генов PTEN, TP53 и TNKS, на втором этапе – непосредственно оценка вероятности метастазирования и прогнозирование выживаемости пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (МИРМП).

1. Определение потери гетерозиготности генов PTEN, TP53 и TNKS

1.1. Амплификация

Для определения аллельного дисбаланса используются высокополиморфные маркеры D10S1765, D10S541, D17S1353 и проводится анализ пента-, тетра- и динуклеотидных повторов в ходе двух ПЦР в парных образцах опухолевой ткани и периферической крови пациентов. Для приготовления реакционной смеси общим объемом 15 мкл используют 1–250 нг геномной ДНК, 1,5 мкл 10х ПЦР-буфера, 0,9 мкл 25 мМ MgCl₂, 1,5 мкл 2 мМ дНТФ, 0,2 мкл каждого праймера (таблица 2) в концентрации 15 мкМ и 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл).

Таблица 1. – Последовательности праймеров для анализа потери гетерозиготности

Реакция	Маркер	Локус (Ген)	Последовательность (5'→3')	Размер продукта п.н.
I	D10S1765	10q23.31	F: TAMRA-ACACTTACATAGTGCTTTCTGCG R: CAGCCTCCCAAAGTTGCTG	168-186
II	D10S541	<i>PTEN</i>	F: FAM-AAGCAAGTGAAGTCTTAGAACACC R: CCACAAGTAACAGAAAGCCTGTCTC	247-273
I	(AAAAT) ₈ повтор	17p13.1	F: R6G-CTGAGGCAGGAGAATCATTTGA R: ACAAACATCCCCTACCAAACA	190-196
II	D17S1353	<i>TP53</i>	F: CTGAGGCACGAGAATTGCAC R: FAM- GAGGGATACTATTCAGCCCGAG	190-228
I	(TTGG) ₁₂ повтор	8p23.1	F: R6G-AGGTAGTCTTTGTGGGACTGA R: GGCAACAAAATAGGCCAAACA	275-296
II	(TA) ₂₂ повтор	<i>TNKS</i>	F: ROX-ATCAGAGCAGACTGGAATTACGGA R: TCCTAAAAGCTCTCAGCAAGGACT	145-165

Условия амплификации:

- денатурация при 94°C в течение 5 мин;
- 36 циклов амплификации:
 - 30 сек. денатурации при 94°C;
 - 30 сек. отжига при 61°C (для маркера D10S1765 – 64°C);
 - 30 сек. элонгации при 72°C;
- конечная элонгация 30 мин. при 72°C.

1.2. Фрагментный анализ продуктов амплификации

Анализ продуктов ПЦР проводят с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе. ПЦР-продукты для анализа генов *PTEN*, *TP53* и *TNKS* смешивают в отношении 1:1:1. К 1 мкл смеси добавляют 8 мкл высокоочищенного формамида и 1 мкл размерного стандарта. Потерю гетерозиготности определяют с помощью программы GeneMapper v.4.1 путем сравнения величин пиков, соответствующих аллелям микросателлитных маркеров, между нормальной и опухолевой тканью. При анализе учитывают только пики выше 400 RFU (относительных флуоресцентных единиц). Схема

расчетов для определения потери гетерозиготности микросателлитного локуса включает следующие этапы:

1. Подсчет аллельного отношения:

$$\text{Аллельное отношение} = \frac{\text{Высота пика аллеля 1}}{\text{Высота пика аллеля 2}}$$

2. Подсчет аллельного дисбаланса между аллельными отношениями для образцов нормальной и опухолевой ткани:

$$\text{Аллельный дисбаланс} = \frac{\text{Аллельное отношение в нормальной ткани}}{\text{Аллельное отношение в опухолевой ткани}}$$

3. Оценка аллельного дисбаланса:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Аллельный дисбаланс} > 1,35 \\ \text{Аллельный дисбаланс} < 0,67 \end{array} \right\} \text{ Потеря гетерозиготности}$$

2. Оценка вероятности метастазирования

Вероятность метастазирования МИРМП в регионарные лимфоузлы и/или отдаленные органы определяется путем решения сводного регрессионного уравнения:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}), \text{ где}$$

$$z = -1,947 - 1,031 \times X1 + 1,466 \times X2 + 1,009 \times X3,$$

X1 – возраст (до 70 лет – 0, старше 70 лет – 1);

X2 – характер роста опухоли (папиллярный – 0, непиллярный – 1);

X3 – наличие потери гетерозиготности в локусе гена *PTEN* (нет – 0, да – 1).

С использованием ROC-кривой определено пороговое значение, равное 0,23, позволяющее предсказать вероятность метастазирования с наибольшей чувствительностью (88,6%) и специфичностью (55,1%), AUC=0,727, p<0,001. Негативное и позитивное прогностическое значение логистической модели составляет 91,5% и 47% соответственно. Если при решении сводного регрессионного уравнения получают значение больше 0,23, пациента относят к группе высокого риска развития метастазов.

В этом случае пациенту назначается неоадьювантная или адьювантная системная цисплатин-содержащая полихимиотерапия согласно национальным стандартам, а также оргаоуносящее хирургическое лечение с расширенной лимфодиссекцией.

Клинический пример. Пациент 1: возраст – 73 года, солидная уротелиальная карцинома, выявлена потеря гетерозиготности гена *PTEN*.

$$z = -1,947 - 1,031 \times 1 + 1,466 \times 1 + 1,009 \times 1 = -0,503;$$

$$P = 1 / (1 + e^{0,503}) = 0,38.$$

Заключение: высокая вероятность метастазирования.

3. Прогнозирование выживаемости

Оценка скорректированной выживаемости пациентов с МИРМП осуществляется с использованием следующего регрессионного уравнения:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}), \text{ где}$$

$$z = -1,576 + 1,813 \times X1 + 0,95 \times X2,$$

X1 – наличие метастазов (нет – 0, да – 1);

X2 – наличие потери гетерозиготности как минимум в 2-х из генов *PTEN*, *TP53*, *TNKS* (нет – 0, да – 1).

Если значение P оказывается больше порогового, равного 0,94, вероятность смерти от МИРМП увеличивается в 5,3 раз (ОР 5,3; 95% ДИ 2,8–10,0; $p < 0,001$).