
Streszczenie

Rak pęcherza moczowego zaraz po raku prostaty zaliczany jest do najczęściej spotykanych nowotworów układu moczowego. Średnio u 50-70% pacjentów z nienaciekającą mięśniówki postacią raka (*NMIBC*) wykrywa się nawroty w przeciągu 5 lat od resekcji guza, a u 5 - 20% obserwuje się progresję do stadium inwazyjnego. U tej części pacjentów, u których nowotwór w chwili rozpoznania był guzem inwazyjnym (15-30% pacjentów), jeżeli nie zostanie wprowadzone leczenie radykalne, u ponad połowy z nich w ciągu 2 lat mogą pojawić się przerzuty odległe. Decyzja co do podjęcia właściwej terapii wymaga dokładnego określenia charakteru guza i jego potencjału metastatycznego. Określenie potencjału biologicznego guzów nowotworowych ma ułatwić diagnostykę i poprawić odpowiednie kierowanie pacjentów do prawidłowej strategii leczenia, lub jej modyfikacji w trakcie prowadzonej terapii. Ma to szczególne znaczenie w powiązaniu z typowym dla środowiska komórek nowotworowych fenomenem oporności wielolekowej – MDR (ang. *Multidrug Resistance*). Oporność wielolekowa komórek nowotworowych wynika często z nadmiernej ekspresji genów, a wśród nich tych, które kodują białka transportujące leki do środowiska wewnątrzkomórkowego i/lub je z niego również usuwają. Do genów tej grupy należy gen *MDR1* (*ABCB1*).

W dysertacji podjęto się weryfikacji poziomu ekspresji genu *ABCB1* (*MDR1*) w tkankach guzów pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym pierwotnym rakiem pęcherza moczowego. Poziom ekspresji *MDR1* odniesiono do oznaczeń molekularnych weryfikowanych w rozprawie, tj.: typu polimorfizmu *C3435T* egzonu 26 genu *MDR1* oraz obecności lub braku metylacji promotora genu. Równocześnie zweryfikowano potencjalną możliwość zależności ekspresji *MDR1* od parametrów klinicznych, takich jak: stopień złośliwości histologicznej guzów (G), ich stopień zaawansowania miejscowego (T), liczba guzów, ich wielkość, grupa ryzyka pojawienia się wznowy i progresji choroby, do jakiej typowano pacjentów, pojawienie się nawrotu choroby.

Materiał do badań stanowiły wycinki pobrane w trakcie przezcewkowej elektroresekcji guzów od 115 chorych leczonych z powodu raka pęcherza moczowego. Do przeprowadzenia badań uzyskano zgodę lokalnej Komisji Bioetycznej. Po zidentyfikowaniu zmian guzowatych

w pęcherzu moczowym oznaczano ich lokalizację, liczbę, wielkość poszczególnych zmian, a także ich wygląd morfologiczny.

Analiza molekularna pobranych wycinków obejmowała: izolację DNA i RNA, ocenę aktywności transkrypcyjnej genu *MDR1* (techniką *Real-Time RTTM-PCR*), analizę polimorfizmu *C3435T* egzonu 26 genu *MDR1* (metodą analizy restrykcyjnej produktów amplifikacji oraz sekwencjonowania dideoksy otrzymanych amplimerów weryfikowanego fragmentu genu) oraz ocenę metylacji promotora genu *MDR1* (techniką *MS-PCR*).

Przeprowadzona analiza wyników wykazała, że wycinki tkankowe ze zmienionej nowotworowo ściany pęcherza moczowego badanej grupy pacjentów charakteryzowały się zmiennym poziomem ekspresji genu *MDR1* zależnym od stopnia złośliwości histologicznej i zaawansowania miejscowego nowotworu. Najwyższe wartości ekspresji znaleziono u pacjentów ze stopniem złośliwości G2 i stadium zaawansowania miejscowego T1 guzów. Liczba guzów nowotworowych w pęcherzu moczowym badanych pacjentów nie była czynnikiem powiązaniem znamienne statystycznie z poziomem ekspresji genu *MDR1*. Grupowanie pacjentów z uwagi na stopień złośliwości histologicznej (G) i stadium zaawansowania miejscowego (T) guzów wykazało istnienie znamienych statystycznie różnic w relatywnym poziomie ekspresji *MDR1* wśród pacjentów z pojedynczym i mnogimi guzami o najwyższym stadium zaawansowania choroby, odpowiednio G3 i T2. Wielkość guzów nie wpływała istotnie statystycznie na wyznaczany relatywny poziom ekspresji *MDR1*. Dwukrotne zwiększenie relatywnego poziomu ekspresji *MDR1* zwiększało iloraz szans (*odds ratio*) pojawienia się wznowy choroby u pacjentów o 1,3 razy. Polimorfizm *C3435T* egzonu 26 genu *MDR1* miał wpływ na poziom ekspresji genu i był najwyższy w grupie chorych z wzorem polimorficznym: C/C a najniższy dla typu polimorficznego T/T. Uwzględnienie typowania pacjentów na podstawie zróżnicowania polimorficznego *C3435T* egzonu 26 *MDR1* pozwoliło wykazać zmienność poziomu ekspresji zależnie od parametrów klinicznych (stopnia złośliwości histologicznej guzów G, stopnia zaawansowania miejscowego T, liczby guzów, ich wielkości, grupy ryzyka pojawienia się wznowy i progresji choroby).

Słowa kluczowe: ekspresja genów, polimorfizm, metylacja wysp CpG, rak pęcherza moczowego, oporność wielolekowa MDR

Abstract

Bladder cancer, right after prostate cancer, is one of the most common urinary tract malignancies. High level of recurrence is encountered within 5 years of tumor resection (50-70% of patients with non-muscle-invasive form of cancer). Moreover, patients diagnosed with an invasive tumor develop distant metastases within 2 years (15-30% of patients). The assessment of the biological potential of cancer tumors is to facilitate diagnostics and improve the proper management of patients for the correct treatment strategy or its modification during therapy. This is particularly important in connection with the phenomenon of MDR (multi-drug resistance) - typical for the cancer cell environment. Multidrug resistance of cancer cells often results from overexpression of genes coding for proteins involved in drugs transport into or outside the intracellular environment. One of the genes in this group include the *MDR1* (*ABCB1*) gene. The dissertation attempts to verify the level of *ABCB1* (*MDR1*) gene expression in tumor tissue samples collected from patients diagnosed with primary bladder cancer. The level of *MDR1* expression was analyzed based on molecular features, i.e. the type of *C3435T* polymorphism of the *MDR1* gene and the presence or absence of gene promoter methylation. Simultaneously, the potential possibility of *MDR1* expression dependence on clinical parameters, such as: the degree of histological malignancy of tumors (G), their local stage (T), number of tumors, their size, risk group of recurrence and disease progression for which patients were selected, appearance of a relapse was verified. The study material consisted of specimens collected during transurethral resection of tumors from 115 patients treated for bladder cancer. Ethics board approval was obtained for patient recruitment, sample collection and research studies. After identifying tumors in the bladder, their location, number, size, as well as their morphological appearance were determined. Molecular analysis of the collected sections included: isolation of DNA and RNA, assessment of transcriptional activity of the *MDR1* gene (*Real-Time RTTM-PCR* technique), analysis of the *C3435T* polymorphism of the exon 26 of the *MDR1* gene (using restriction analysis of amplimers and their dideoxy sequencing) and methylation assessment of *MDR1* gene promoter (MS-PCR technique). The analysis of the results showed variable levels of *MDR1* gene expression depending on the degree of histological malignancy and the stage of the local tumor. The highest *MDR1* expression was

found in patients with G2 malignancy and local stage T1 tumors. The number of tumors in the bladder of the patients studied was not a statistically significant factor related to the level of *MDR1* expression. Patient grouping by histological (G) and local (T) stage of tumors showed statistically significant differences in the relative level of *MDR1* expression among patients with single and multiple tumors with the highest stage of disease, G3 and T2, respectively. Tumor size did not significantly affect the relative *MDR1* expression level. A two-fold increase in the relative level of *MDR1* expression increased the *odds ratio* of recurrence in patients by 1.3 times. The *C3435T* exon 26 polymorphism of the *MDR1* gene had an effect on the level of gene expression and was the highest in the group of patients with the polymorphic pattern: *C/C* and the lowest for the polymorphic type *T/T*. Considering patient typing based on the *C3435T* polymorphic diversity of the *MDR1* exon 26 showed the variability of the expression level depending on clinical parameters (histological grade of G tumors, grade of local T, number of tumors, their size, risk group of recurrence and disease progression).

Key words: gene expression, polymorphism, *CpG* island methylation, bladder cancer, multidrug resistance MDR