

MIKROSATELITOVÁ ANALÝZA NA CHROMOZOMU 3 VE TKÁNI KONVENČNÍHO (SVĚTLOBUNĚČNÉHO) RENÁLNÍHO KARCINOMU – MOŽNÝ PROGNOSTICKÝ VÝZNAM

M. Szakácsová¹, M. Babjuk¹, T. Viktorová², V. Soukup¹, M. Pešl¹, J. Dušková³, J. Dvořáček¹, J. Mareš²

¹Urologická klinika VFN a 1. LF UK, Praha

²Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol, Praha

³Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha

Souhrn:

Cíl: Zhodnotit prognostický význam mikrosatelitové analýzy na 3. chromozomu u pacientů s konvenčním renálním karcinomem. Metodika: Do prospektivní studie bylo zařazeno celkem 63 pacientů s lokalizovaným histologicky ověřeným renálním karcinomem. Pacienti podstoupili nefrektomii nebo parciální resekci v době od roku 2002 do roku 2005. Sledovali jsme četnost výskytu ztráty heterozygosity na chromozomu 3 ve studovaném souboru, vztah přítomnosti LOH k velikosti a gradu nádoru, respektive k průběhu onemocnění.

Výsledky: Marker D3S1289 byl informativní u 82,5 % a D3S1560 u 84,1 % pacientů. Ztráta heterozygosity na lokusu D3S1289 byla prokázána v 57,1 %, na lokusu D3S1560 v 55,6 % a na obou lokusech současně v 42,9 % případů. Během průměrné doby sledování 29,5 měsíců došlo k recidivě onemocnění u 7 nemocných. U každého z nich byla prokázána LOH alespoň v jednom z lokusů, u čtyř z nich pak v obou lokusech.

Závěr: Ztráta heterozygosity (LOH) v lokusech D3S1560 a D3S1289 je častým nálezem ve tkáni lokalizovaného konvenčního renálního karcinomu.

Klíčová slova: mikrosatelitová analýza, ztráta heterozygosity, konvenční (světlobunečný) renální adenokarcinom, chromozom 3.

MICROSATELLITE ANALYSIS ON CHROMOSOME 3 IN CONVENTIONAL (CLEAR CELL) RENAL CELL CARCINOMA TISSUE

Abstract

Objective: To evaluate the prognostic value of microsatellite analysis on chromosome 3 in patients with conventional renal cell carcinoma.

Methods: A total of 63 patients with localized histologically confirmed renal cell carcinoma were included in a prospective study. The patients underwent nephrectomy or partial resection between 2002 and 2005. We observed the study group for the frequency of loss of heterozygosity (LOH) on chromosome 3 as well as for the relation of loss of heterozygosity to tumour size and grade and/or the course of the disease.

Results: Marker D3S1289 was informative in 82.5 % and D3S1560 in 84.1 % of patients. Loss of heterozygosity at locus D3S1289 was shown in 57.1 %, at locus D3S1560 in 55.6 %, and at both loci simultaneously in 42.9 % of cases. During a mean follow-up of 29.5 months, the disease recurred in 7 patients. In each of them, LOH was confirmed in at least one of the loci, in four of them in both loci.

Conclusion: Loss of heterozygosity (LOH) at loci D3S1560 and D3S1289 is a common finding in localized conventional renal cell carcinoma tissue.

Key words: microsatellite analysis, loss of heterozygosity, conventional (clear cell) renal adenocarcinoma, chromosome 3.

Česká urologie 2007; 11(3):

Úvod

Zhoubné nádory ledvin tvoří u dospělých 1–2 % maligních onemocnění. Nejčastějším histologickým typem je konvenční, světlobuněčný renální karcinom, který je diagnostikován asi v 65–75 % případů. Dle národního onkologického registru bylo v roce 2000 hlášeno v ČR 1 346 nových onemocnění u mužů a 943 u žen. Incidence byla 17,9/100 000 žen a 26,9/100 000 mužů a dosáhla tak jed-

né z nejvyšších na světě (1). Mortalita v roce 2000 byla 14,6/100 000 mužů a 8,7/100 000 žen, což představovalo 4,1 % všech zemřelých na maligní onemocnění (2).

Etiologie nádoru není známá. Bylo vysloveno podezření o vlivu civilizačních faktorů, jako jsou kouření, obezita nebo hypertenze. Znám je zvýšený výskyt konvenčního renálního karcinomu u autosomálně recesivně dědičného onemocnění nazývaného von Hippel-Lindauův

Tabulka 1. Vstupní charakteristika pacientů a nádorů

Muži	41
Ženy	22
Věk	33–85 let, průměrný 69,1
Velikost nádoru	2–12 cm
Grade dle Fuhrmanové	G1 36, G2 25, G3 2
TNM klasifikace (UICC, 2002)	T1a 19, T1b 23, T2 21
Průměrná doba sledování	29,5 měsíců

Tabulka 2. Informativnost zkoumaných markerů

D3S1289	informativní v 82,5 % (52/63)
D3S1560	informativní v 84,1 % (53/63)
LOH na D3S1289	57,1 % (36/63)
LOH na D3S1560	55,6 % (35/63)
LOH na obou lokusech	42,9 % (27/63)

Tabulka 3. Vztah informativnosti, LOH a gradu dle Fuhrmanové

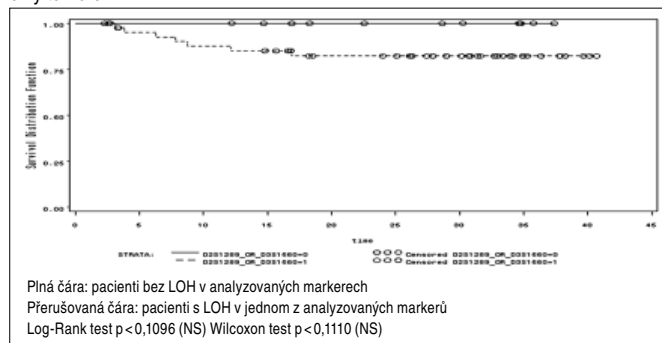
	G1		G2		G3	
LOH na D3S1289	5	7,93 %	5	7,94 %	0	0 %
LOH na D3S1560	7	11,11 %	2	3,17 %	0	0 %
LOH na obou lokusech	12	19,05 %	12	19,05 %	2	3,17 %
LOH na žádném z lokusů	8	12,7 %	2	3,17 %	0	0 %
neinformativní	4	6,35 %	4	6,35 %	0	0 %
Celkem	36	57,14 %	25	39,68 %	2	3,17 %

syndrom. Jeho incidence je 1/36 000 až 1/85 000 obyvatel (2). Nemoc je způsobena mutací genu VHL (von Hippel-Lindau), který je známým tumor-supresorovým genem (TSG) a nachází se na krátkém raménku chromozomu 3. Skupina tumor-supresorových genů je zodpovědná za regulaci proliferace buněk a podporuje jejich diferenciaci a apoptózu. Jejich inaktivace vede k nekontrolovanému růstu a vzniku nádoru. Každý TSG má dvě alely – jednu paternální a jednu maternální. V případě, že jsou obě alely genu stejné, je daný jedinec pro gen homozygotní. Když jsou alely odlišné – jedinec je heterozygot. Poškození obou alel vede k inaktivaci daného genu. Poškození jedné alely může být vrozené, mutace/eliminace alely druhé pak vede ke ztrátě heterozygosity. Mechanismy ztráty heterozygosity jsou různé. Nejčastěji se jedná o delecii, mitotickou nondisjunkci, mitotickou rekombinaci. Vznik hereditárních malignit monogenního typu osvětluje teorie formulovaná Knudsonem v roce 1971 (2, 3).

V naší studii jsme se snažili prokázat význam ztráty heterozygosity na chromozomu 3p (mikrosatelitové sekvence D3S1560 a D3S1289) u světlobuněčného renálního karcinomu.

Metodika

Do studie jsme zařadili celkem 63 pacientů s histologicky prokázaným lokalizovaným konvenčním renálním karcinomem a operovaných na naší klinice od 4. 11. 2002

Obrázek 1. Kaplan-Meierova křivka procentuálního zastoupení pacientů bez recidivy tumoru

do 24. 3. 2005. Vstupní charakteristiky pacientů a jejich tumorů jsou shrnuty v tabulce 1.

Jedenáct pacientů podstoupilo parciální resekci ledviny a 52 nefrektomii. Nefrektomie byla provedena z transperitoneálního přístupu s primární ligaturou renálního hilu a následným odstraněním ledviny včetně tukového pouzdra. Adrenalektomie tvořila rutinní součást operace pouze u nádorů lokalizovaných v kraniální polovině ledviny.

K pólové nebo klínové resekci byli indikováni pacienti s vhodně lokalizovaným nádorem do velikosti 4 cm. Volel byl lumbotomický přístup obvykle z posledního mezižebří a výkon byl proveden v teplé ischémii. Radikalita výkonu byla histologicky potvrzena negativními okraji resekční plochy a negativní biopsií ze spodiny.

Stav retroperitoneálních lymfatických uzlin byl hodnocen na základě CT vyšetření a peroperačního palpačního nálezu. U žádného z nemocných zařazených do studie nebyly tímto způsobem zachyceny známky uzlinového postižení. Pacienti neměli klinicky prokazatelné vzdálené metastázy a u žádného z nich nebyla indikována adjuvantní terapie. Všichni pacienti byli zařazeni do dispenzarizačního programu, který zahrnoval kontrolní klinické vyšetření, odběry (FW, biochemie séra, KO), RTG snímek plic a ultrasonografické nebo CT vyšetření retroperitonea. Interval mezi jednotlivými kontrolami činil 6 měsíců během prvních 2 let a následně byl prodloužen na 12 měsíců. Recidiva onemocnění byla definována jako ložiskový nález v retroperitoneu nebo jako nový vznik metastatického onemocnění.

Nádor byl klasifikovaný dle TNM klasifikace, verze z roku 2002 (4). Odstraněná tkáň byla odeslána k rutinnímu histopatologickému vyšetření, jehož součástí bylo ověření i stanovení gradu dle Fuhrmanové (5). Reprezentativní část nádoru byla okamžitě zmrazena a uložena při -70°C ; až do izolace DNA pomocí přístroje ABI PRISM 6100 NUCLEIC ACID PREPSTATION a výrobcem doporučených kitů. Mikrosatelitová DNA byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) (30 cyk-

lů, denaturace 95 °C 30s, hybridizace primerů D3S1289 55 °C 60s a D3S1560 56 °C 60s, elongace 72 °C 60s) Použité primery pro D3S1289 byly 5'-Hex-AGCAACTG-TAAGAGAGCATTC-3' a 5'-AATGCTCCATTTTCTCCTTC-3' a pro D3S1560 5'-Hex-CCCCGTTTTTTTACTGATCT-3' a 5'-CCTGATAATG GAACTGTGACA-3' (6, 7). Fragmentová analýza amplifikované DNA byla prováděna na přístroji ABI PRISM 3100 AVANT. Jako kontrolní tkáň byla použita krev pacientů.

Sledovali jsme četnost výskytu ztráty heterozygosity (LOH) ve studovaném souboru, vztah přítomnosti LOH k velikosti a gradu nádoru, respektive k průběhu onemocnění.

Statistická analýza výsledků byla provedena pomocí softwaru S.A.S. 8.2. a byl použitý k analýze Log-Rank, Wilcoxon a Anova testy.

Výsledky

Na základě molekulárního vyšetření byl marker D3S1289 informativní u 82,5 % pacientů (52/63) a D3S1560 u 84,1 % pacientů (53/63). Ztráta heterozygosity (LOH) v D3S1289 byla detekována u 57,1 % (36/63) a v D3S1560 u 55,6 % (35/63) sledovaných pacientů (tabulka č. 2). Současný nálezh LOH v obou lokusech byl detekován u 42,9 % (27/63). U obou pacientů s nádorem G3 byla prokázána LOH v obou lokusech (tabulka 3).

Vztah mezi nálezem v jednotlivých markerech a gradem dle Fuhrmanové je uveden v tabulce 3. Vztah nebyl statisticky významný. Stejně tak jsme nezachytili statisticky významnou korelaci mezi nálezem LOH a velikostí nádoru.

Průměrná délka sledování byla 29,5 měsíců. Za tuto dobu došlo u 7 pacientů (11,1 %) k progresi onemocnění. U všech těchto pacientů byla zjištěná ztráta heterozygosity alespoň v jednom z lokusů a u čtyřech z nich v obou lokusech.

Při hodnocení přežívání bez recidivy jsme zachytili lepší výsledky u pacientů bez nálezu LOH, rozdíl však není statisticky významný (obrázek 1).

Diskuze

Mikrosatelitová analýza je dnes často používanou metodou k vyšetřování genomu.

Mikrosatelity jsou typicky krátké repetice dvou až šesti bází. Jsou obklopeny unikátními sekvencemi. Jejich přesný význam v buňce není zatím znám. Používají se ke genetickému mapování, v onkogenetice, populační genetice a v jiných odvětvích molekulární biologie.

Každý vyšetřovaný marker má dvě alely, jedna alela je paternální a druhá maternální. Jednotlivé alely mohou mít odlišný počet repetice, tedy i různou délku. Taková alela je heterozygotní. Marker je homozygotní a neinformativní v případě, že obě alely mají stejný počet repetice jak v normální, tak v tumorózní tkáni, respektive heterozygotní v situacích, kdy jsou prokázány dvě odlišné alely v tumoru i v normální tkáni, nebo dvě jiné alely v normální a pouze jedna v nádorové tkáni. Stav, kdy jsou v normální tkáni přítomny dvě různé alely a v nádorové pouze jedna, se popisuje jako ztráta heterozygosity.

V naší studii jsme se zaměřili na studium dvou markerů: D3S1289 a D3S1560. Jedná se o lokusy na krátkém raménku chromozomu 3, který je známou lokalitou tumor supresorových genů, proto je častým cílem genetického vyšetřování nejen u nádorů ledvin.

Marija Velikovic et al. porovnávali výskyt LOH v papilárním, chromofobním a světlobuněčném karcinomu. Použili 13 markerů na chromozomu 3. Nejčastější LOH u chromofobního karcinomu ledviny byla na lokusech D3S4260 (66,65 %, $p < 0,001$), D3S1300 (64 %, $p < 0,001$) a na lokusu D3S1560 (70 %, $p < 0,001$). Na lokusu 3p25–26 byla prokázána vyšší frekvence ztráty heterozygosity než na lokusu 3p14. Výsledky byly v podstatě stejné jako u světlobuněčného karcinomu (8). Girolami F et al. vyhodnotili lokus 3p25–26 jako jednu z nejčastějších míst LOH ve tkáni světlobuněčného renálního karcinomu (9). M. L. Maestro et al. vyšetřoval LOH na lokusech 3p14,1–3p14,3 dále 3p21,2–3p21,3 a 3p25 ve vzorcích tkáně renálního karcinomu. Ve 42,5 % případů prokázal LOH nejméně na jednom z lokusu, z toho u 30 % na jednom lokusu, u 5 % na dvou a u 7,5 % na všech třech lokusech (10). Aliaga M. et al. porovnával výskyt LOH na lokusu 3p13–p25 vzhledem k histologickému typu nádoru. V případě konvenčního světlobuněčného nádoru byla prokázána LOH v 73,2 % na daném úseku (11). Ztráta heterozygosity jako častý nálezh na chromozomu 3 byl popisován v mnoha publikacích (12–13).

V souladu s těmito pracemi byly i v našem souboru lokusy D3S1560 a D3S1289 ve většině případů informativní. Ztrátu heterozygosity na jednotlivých lokusech jsme zachytili u více než poloviny pacientů a v téměř 50 % na obou lokusech. U dvou nádorů hodnocených jako G3 byla LOH prokázána na obou lokusech.

Přes známky příznivějšího průběhu onemocnění u nemocných bez nálezu LOH jsme neprokázali statisticky významný prognostický význam studovaných markerů. Příčinou však může být omezená velikost souboru a re-

lativně krátká doba sledování při nízkém riziku recidivy u pacientů s lokalizovaným renálním karcinomem.

Závěr

LOH v lokusech D3S1560 a D3S1289 je častým nálezem ve tkáni lokalizovaného konvenčního renálního karcinomu. Byť jsme zatím neprokázali statisticky významný rozdíl, ukazují naše výsledky určitou korelaci mezi nálezem LOH a průběhem onemocnění.

Práce byla podpořena VZ MSM 0021620808.

Zasláno redakci

14. 8. 2007

Akceptováno

22. 10. 2007

Monika Szakácsová

Urologická klinika, Ke Karlovu 6, 128 00 Praha 2
e-mail: monika.szakacsova@email.cz

Literatura

1. Babjuk M, Matoušková M, Novák J. Doporučené diagnostické a léčebné postupy u urologických nádorů. Praha: Galén; 2003; 1. vydání.
2. Kawaciuk I. Prognóza karcinomu ledviny. Praha: Galén; 2005; 1. vydání.
3. Morávek P. Epidemiologie a etiologie nádorů ledvin. In: Dvořáček J, Babjuk M et al. Onkourologie. Praha: Galén; 2005; 1. vydání, p 31–32.
4. Sobin L, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours. s. 239, 6th edition. John Wiley & Sons, New York 2002.
5. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 1982 Oct; 6(7): 655–663.
6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts.cgi?uid=12732>.
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts.cgi?uid=31733>.
8. Velikovic M, Delahunt B, Storkel S, Grebe KGS. VHL and FHIT locus loss of heterozygosity is common in all renal cancer morphotypes but differs in pattern and prognostic significance. Cancer Res. 2001 Jun 15; 61(12): 4815–4819.
9. Girolami F, Passerini I, Gargano D et al. Microsatellite analysis of chromosome 3p region in sporadic renal cell carcinomas. Pathol. Oncol. Res. 2002; 8: 241–244.
10. Maestro ML, del Barco V, Sanz-Casla MT, Moreno J et al. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in renal cancer. Oncology 2000; 59: 126–130.
11. Aliaga M, Millan Salvador JM, Jimenez Cruz JF. Microsatellite analysis of the 3p13–p25 region in renal cell carcinoma in humans, Actas Urol. Esp. 2002; 26(3): 150–162.
12. Hoeffling C, Schmidt H, Meinhard M et al. Comparative evaluation of microsatellite marker, AP-PCR and CGH in primary renal cell carcinoma, Int J Mol Med. 2004 Jun; 13(6): 835–4211.
13. Kondo K, Yao M, Yoshida M et al. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinicopathological parameters, Genes Chromosomes Cancer. 2002; 34(1): 58–68.