

**МАЛОИНВАЗИВНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА РЕЦИДИВА  
НЕМЫШЕЧНО-ИНВАЗИВНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ,  
АССОЦИИРОВАННОГО С ВПЧ-ИНФЕКЦИЕЙ**

**Димитриади С.Н., Кутилин Д.С., Пулатова А.А., Зыкова Т.А., Розенко А.Д., Хван В.К.,  
Гончаров С.И., Ишонина О.Г., Шалашная Е.В.**

*ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: dr.pulatova05@gmail.com*

Инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) является частой причиной инвазивного рака шейки матки, влагалища, а также, по многим данным, служит фактором инициации и рецидива рака мочевого пузыря (РМП). РМП является важной проблемой в структуре общей онкологической заболеваемости в мире в связи с частым рецидивированием и прогрессированием данного заболевания, что ведет к снижению качества жизни больных. ВПЧ-инфекция приводит к aberrантной экспрессии микроРНК при раке шейки матки, однако подобный метод оценки при РМП у больных с ВПЧ ранее не использовался. Цель исследования – определение уровня молекулярных маркеров в моче для диагностики рецидива немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (НМИРМП). У этих больных из утренней мочи выделяли тотальную РНК и методом ПЦР определяли экспрессию микроРНК hsa-miR-143-3p и hsa-miR-7-5p. Было установлено, что при значении  $K_{miR-143} \leq 5,07 \cdot 10^{-3}$  у 35 пациентов развивался рецидив заболевания. Также установлена связь между ВПЧ-положительным результатом у пациентов с клиническим диагнозом НМИРМП и рецидивом, что говорит о непосредственном влиянии ВПЧ-инфекции на течение заболевания. Соответственно, интеграция ВПЧ в геном, очевидно, приводит к изменению экспрессии hsa-miR-143-3p, которое обнаруживается у соответствующей когорты больных в моче и может служить маркером развития рецидива рака мочевого пузыря в первые 18 месяцев после хирургического лечения. Определение микроРНК в образцах мочи является неинвазивным и высокоспецифичным методом, что дает преимущества в ранней диагностике рецидива НМИРМП с ВПЧ-положительным статусом.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, вирус папилломы человека, немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря, рецидив, микроРНК.

**MINIMALLY INVASIVE MOLECULAR DIAGNOSTICS OF RECURRENT NON-  
MUSCLE-INVASIVE BLADDER CANCER ASSOCIATED WITH HPV INFECTION**

**Dimitriadi S.N., Kutilin D.S., Pulatova A.A., Zykova T.A., Rozenko A.D., Khvan V.K.,  
Goncharov S.I., Ishonina O.G., Shalashnaya E.V.**

*National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: dr.pulatova05@gmail.com*

Infection with the human papillomavirus (HPV) is an integral cause of invasive cancer of the cervix, vagina, and also, according to many sources, is a factor in the initiation and recurrence of bladder cancer (BC). RMP is an important problem in the structure of general oncological morbidity in the world due to the frequent recurrence and progression of this disease, which leads to a decrease in the quality of life of patients. HPV infection leads to aberrant microRNA expression in cervical cancer, but this method of assessment for bladder cancer in patients with HPV has not been previously used. The aim of the study was to determine the urine molecular markers level for the relapse of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) diagnosis. We examined 159 patients with NMIBC, 59 of whom were diagnosed with HPV. In these patients, total RNA was isolated from morning urine, and the expression of microRNAs hsa-miR-143-3p and hsa-miR-7-5p was determined by PCR. It was found that with a value of  $K_{miR-143} \leq 5.07 \cdot 10^{-3}$ , 35 patients developed a relapse of the disease. An association was also established between HPV-positive results in patients with a clinical diagnosis of NMIBC and relapse, which indicates a direct impact of HPV infection on the course of the disease. Accordingly, the integration of HPV into the genome obviously leads to a change in the expression of hsa-miR-143-3p, which is found in the corresponding cohort of patients in the urine and can serve as a marker for the development of bladder cancer recurrence in the first 18 months after surgical treatment. Determination of microRNA in urine samples is a non-invasive and highly specific method, which provides advantages in the early diagnosis of recurrent NMIBC with HPV-positive status.

Keywords: bladder cancer, human papillomavirus, non-muscle-invasive bladder cancer, relapse, miRNA.

Рак мочевого пузыря (РМП) является 10-м по распространенности онкологическим заболеванием в мире. Стандартной опцией в лечении пациентов с поверхностным немышечно-

инвазивным раком мочевого пузыря (НМИРМП) является трансуретральная резекция с последующей адьювантной внутривезикулярной лекарственной терапией. Тем временем у 60% пациентов НМИРМП возникает рецидив заболевания, из них до 40% случаев заболевания прогрессируют до инвазивного или метастатического заболевания с потенциальной летальностью и терапевтической рефрактерностью к проводимому лечению [1]. В России распространенность РМП неуклонно растет в течение последнего десятилетия и в 2021 г. составила 80,0 больных на 100 тыс. населения, при этом только 17,8% случаев РМП выявляются активно, несмотря на совершенствование методов диагностики. [2]

РМП – полиэтиологическое заболевание, одним из возможных факторов риска его развития является инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ). ВПЧ является мукозотропным канцерогеном и нередкой причиной рака в аногенитальной области. В настоящее время неоспоримым является тот факт, что персистенция ВПЧ высокого онкогенного типа приводит к развитию цервикального рака, которому предшествует предраковое заболевание рака шейки матки – интраэпителиальная цервикальная неоплазия [3]. Мочевыводящие пути анатомически близки к половым путям, в результате имеется высокая вероятность инфицирования ВПЧ эпителия мочевого пузыря. Многие исследования определили хроническое воспаление, вызванное инфекцией ВПЧ, как значительный фактор риска онкогенеза. Также известно, что геном ВПЧ может интегрироваться в геном хозяина и повышать экспрессию онкобелков Е6 и Е7, что стимулирует рост клеток, способствует ингибированию клеточной дифференцировки и индуцированию хромосомной нестабильности, приводя к онкогенезу. ВПЧ представляет собой семейство вирусов на основе ДНК, передающихся половым путем, которые поражают многослойный плоский эпителий. Идентифицировано более 150 подтипов ВПЧ, из которых более 35 подтипов имеют специфический тропизм к мочеполовым путям у обоих полов [4].

Частые внутривезикулярные рецидивы приводят к снижению качества жизни у пациентов с РМП. Разработка новых методов диагностики и лечения опухолей мочевого пузыря требует не только определения нозологической принадлежности новообразования, но и точного установления степени дифференцировки и степени инвазии опухоли. От этого зависит прогноз заболевания, а соответственно, и выбор тактики лечения пациента. Интеграция ВПЧ в эпителиальные клетки мочевого пузыря может значительно изменять паттерн экспрессии микроРНК и оказывать существенное влияние на рецидив заболевания. В свою очередь, около 30% генов в клетках человека, кодирующих белок, контролируются микроРНК, которые участвуют во многих важных биологических процессах, таких как апоптоз, пролиферация, диверсификация клеток и онкогенез [5]. Все больше исследований подтверждают, что пациенты с опухолями мочеполовой системы с подтвержденным ВПЧ-инфицированием

имеют более частые рецидивы после проведенного лечения [6]. Отмечается гетерогенность опухолей у ВПЧ-инфицированных пациентов за счет репликации вируса, в результате чего кератиноциты поддерживаются в пролиферативном состоянии, также идет подавление иммунной системы, что способствует частым рецидивам [7]. Формирующиеся иммуносупрессивные условия отражаются как на проявлении биологических свойств опухолевых клеток, так и на изменении клеточного состава тканей мочевого пузыря, вовлеченных в процесс развития и прогрессирования онкологического заболевания [8].

Малые некодирующие молекулы РНК (микроРНК) длиной 18–25 нуклеотидов были предложены в качестве новых прогностических маркеров опухолей, в том числе для прогнозирования прогрессирования рака мочевого пузыря. Обычно микроРНК подавляют экспрессию генов путем взаимодействия с нетранслируемым участком таргетной матричной РНК, вызывая ее деградацию или блокируя трансляцию продукта гена. Важным свойством микроРНК является плеiotропность их действия, т.е. одна молекула может модулировать множество матричных РНК, вовлеченных в различные биологические процессы [9]. Определение функции микроРНК является объектом многих исследований. МикроРНК являются эпигенетическими регуляторами и специфичны для определенной ткани, они модулируют экспрессию генов путем взаимодействия с комплементарными нуклеотидными последовательностями. МикроРНК не только вовлечены в процесс пролиферации клеток, но также являются ключевыми регуляторами процесса воспаления и иммунного ответа. Е6 и Е7 ВПЧ-белки модулируют экспрессию ДНК-метилтрансфераз, ферментов, регулирующих экспрессию генов, путем метилирования их промоторных областей. Избыточная экспрессия вирусных белков Е6 и Е7 приводит к нарушению в сигнальных путях, регулирующих клеточный цикл, вследствие чего возможны накопление генетических ошибок и прогрессирование заболевания. Весь процесс является многоэтапным и включает ряд генетических и эпигенетических изменений. МикроРНК представляют собой некодирующие РНК, играющие ключевую роль в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Интеграция ВПЧ в эпителиальные клетки мочевого пузыря может значительно изменять паттерн экспрессии микроРНК и оказывать существенное влияние на рецидив заболевания. Одним из непосредственных маркеров рецидива может являться *hsa-miR-143-3p*, изменения в экспрессии которой часто связаны с раком [10].

Таким образом, целью исследования стало определение уровня молекулярных маркеров в моче для диагностики рецидива немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (НМИРМП).

#### **Материалы и методы исследования**

В исследовании приняли участие 159 человек с клиническим диагнозом НМИРМП, из них 136 мужчин и 23 женщины, средний возраст обследуемых составил 65 лет  $\pm$  12,1 года. Всем пациентам провели хирургическое лечение в объеме трансуретральной резекции (ТУР) мочевого пузыря. Для оценки статуса ВПЧ-инфицирования исследовали образцы, фиксированные в формалине и залитые в парафин (FFPE). Для выявления, количественного определения и дифференциации ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 генотипов в образцах использовали набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL». За сутки до проведения хирургического лечения у всех больных выполнен забор утренней мочи для молекулярно-генетического исследования.

Для выявления потенциальных молекулярных маркеров проводился анализ базы данных TCGA. С помощью высокоспецифичных праймеров (табл. 1) методом ПЦР в режиме реального времени проводили анализ экспрессии *hsa-miR-143-3p* и *hsa-miR-7-5p* в препаратах тотальной РНК, выделенной из мочи больных. Расчет относительной экспрессии микроРНК осуществляли с помощью формулы  $\Delta C_t = C_{t(hsa-miR-143-3p)} - C_{t(hsa-miR-7-5p)}$ , где  $C_t$  – среднее геометрическое, рассчитанное по трем повторам для целевой и референсной микроРНК. Коэффициент относительной экспрессии (К) рассчитывали по формуле  $1.9^{-\Delta C_t}$  [11].

Таблица 1

Последовательности праймеров

Наименование микро-РНК	Последовательность микро-РНК	Последовательность
hsa-miR-7-5p	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGTGTT	F:CGTCAGTGGAAGACTAGTGA R:GTCCAGT(15)ACAACA RT:CAGGTCCAGT(15)AA
hsa-miR-143-3p	TGAGATGAAGCACTGTAGCTC	F:CTAGTGAGATGAAGCACTGTAG R:GGTCCAGT(15)GAGA RT:CAGGTCCAGT(15)GGA

Для проведения статистического анализа полученных авторами данных авторы использовали точный критерий Фишера, критерий  $\chi^2$  с поправкой Йейтса, критерий V Крамера, а также рассчитывали отношение шансов (OR) с 95% ДИ (CI). Также применяли LASSO-пенализованную логистическую регрессию, оптимизированную при помощи множественных переборочных наборов данных, для выявления потенциальных маркеров.

### Результаты исследования и их обсуждение

Был проведен анализ 159 FFPE-блоков на наличие ДНК ВПЧ высокого риска, положительный результат был обнаружен в ткани опухоли у 59 пациентов (37,1%), из них ВПЧ 16-го типа – у 52 больных (89,4%), у четверых пациентов выявлен ВПЧ 18-го типа (6,7%) и 35-го типа – у троих (5,08%). В структуре первичного НМИРМП доля ВПЧ-позитивных пациентов составила 30,9% против 69,1% ВПЧ-негативных пациентов, в то время как при

оценке рецидивирующего НМИРМП доля ВПЧ-положительных пациентов составила 46,8% против 53,2% ВПЧ-отрицательных пациентов (табл. 2).

Таблица 2

ВПЧ-статус больных первичным и рецидивирующим РМП

	ВПЧ-положительные больные РМП (n=59)	ВПЧ-отрицательные больные РМП (n=100)
Первичный РМП (n=97)	30 (30,9%*)	67 (69,1%*)
Рецидивирующий РМП (n=62)	29 (46,8%**)	33 (53,2%**)

\* от всех больных первичным РМП

\*\* от всех больных рецидивирующим РМП

Полученное значение (4,07) значимости различий исходов превышает критическое, соответственно, при применении критерия  $\chi^2$  нулевая гипотеза об отсутствии статистической взаимосвязи между анализируемым фактором риска и результатом может быть отвергнута при критическом уровне значимости 5% ( $p=0,044$ ). Однако величина критерия  $\chi^2$  с поправкой Йейтса составляет 3,419 – это меньше предельного значения (3,841), т.е. авторы не могут отклонить нулевую гипотезу об отсутствии статистической связи между фактором риска и исходом ( $p=0,065$ ). Необходимо отметить наличие слабой взаимосвязи между развитием рецидива НМИРМП и ВПЧ-инфицированием (критерий V Крамера =0,160).

При расчете отношения шансов с 95%-ным доверительным интервалом и с учетом влияния ВПЧ-инфицирования на рецидив заболевания определено, что наличие ВПЧ-положительного результата повышает шанс развития рецидива в 2 раза (отношение шансов (OR)=1,963, стандартная ошибка отношения шансов (S)=0,336, нижняя граница 95% ДИ =1,015, верхняя граница 95% ДИ=3,793).

Проведенный анализ данных Атласа генома рака (TCGA) позволил выделить 150 микроРНК потенциальных маркеров рецидива рака мочевого пузыря, а последующая математическая обработка этих данных (использовали LASSO-пенализованную логистическую регрессию, оптимизированную при помощи множественных переборочных наборов данных) показала большой потенциал микроРНК *hsa-miR-143-3p* в разделении больных на группы с рецидивом и без рецидива (чувствительность 95% и специфичность 90%, AUC 0,98).

У 59 человек с НМИРМП и ВПЧ-положительным результатом в образцах мочи проводили определение уровня экспрессии микроРНК *hsa-miR-143-3p* и *hsa-miR-7-5p*. Результаты представлены в таблице 3.

Уровень экспрессии микроРНК miR-143-3p у больных с НМИРМП и ВПЧ-положительным результатом

	Количество пациентов	Средний показатель $K_{\text{mir-143}}$
Рецидивирующий РМП+ВПЧ	35	$5,07 \cdot 10^{-3}$
РМП без рецидива + ВПЧ	24	$26,17 \cdot 10^{-3}$

У 35 больных из 59 человек с НМИРМП и ВПЧ-положительным результатом средний показатель  $K_{\text{miR-143}}$  составлял  $5,07 \cdot 10^{-3}$ . После проведения адьювантной внутрипузырной терапии согласно клиническим рекомендациям проводилось динамическое наблюдение этих больных в течение 18 месяцев, после ТУР мочевого пузыря. Каждые 2 месяца пациенты проходили стандартное контрольное обследование согласно клиническим рекомендациям, при этом дополнительно проводились забор мочи и анализ уровня *hsa-miR-143-3p* и *hsa-miR-7-5p*. Развитие рецидива НМИРМП у 80% больных происходило в первые 18 месяцев после проведенного лечения. У 24 больных из 59 человек с НМИРМП и ВПЧ-положительным результатом средний показатель  $K_{\text{miR-143}}$  составлял  $26,17 \cdot 10^{-3}$ . У этих пациентов развитие рецидива не наблюдалось в течение 18 месяцев.

Согласно результатам многих исследований, при сравнении групп ВПЧ-положительных и ВПЧ-отрицательных больных выявлено, что ВПЧ-положительный РМП характеризуется более высокой степенью анаплазии клеток, чем ВПЧ-отрицательный. ВПЧ-инфекция нередко оказывается вовлеченной в процесс инициации РМП, ВПЧ-положительные клетки опухоли до того, как в ходе лечения их удаляют, непосредственно влияют на микроокружение РМП, вследствие чего микроокружение приобретает способность ускорять развитие рецидива из клеток условно нормального уротелия, прилегавшего к удаленной впоследствии опухоли.

МикроРНК играют решающую роль в разнообразных клеточных процессах, таких как пролиферация, дифференцировка и развитие клеток, регулируя экспрессию специфических генов. МикроРНК регулируют экспрессию генов путем ингибирования трансляции или разрушения специфических транскриптов матричной РНК.

Злокачественные опухоли характеризуются неконтролируемым делением клеток, фенотип которых определяется нарушением экспрессии различных генов. Поэтому неудивительно, что образование микроРНК часто нарушено в клетках различных опухолей.

Аберрантная экспрессия микроРНК может являться результатом как мутации, так и метилирования генов, кодирующих микроРНК. Важным преимуществом микроРНК является высокая специфичность для определенных тканей и биологических жидкостей, а также для ряда патологий, в том числе для каждого типа рака. С этой точки зрения miR считаются идеальными неинвазивными биомаркерами [12].

Согласно данным литературы в патогенезе рака мочевого пузыря имеет место непосредственное влияние вируса папилломы человека на степень дифференцировки опухоли и частоту рецидивов. В эксперименте определялась ДНК ВПЧ в 159 парафиновых блоках на наличие вируса папилломы человека высокого онкогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов) методом ПЦР. Определение уровня *hsa-miR-143-3p* в образцах мочи показало, что у пациентов при значении  $K_{miR-143} \leq 5,07 \cdot 10^{-3}$  в течение 18 месяцев с начала комплексного лечения наблюдался рецидив НМИРМП. Данный метод можно использовать для прогноза, уточнения особенностей течения заболевания, а также с его помощью на ранних этапах выявить пациентов с высоким риском рецидива и скорректировать тактику лечения.

### **Заключение**

В настоящем исследовании установлена связь между ВПЧ-положительным результатом у пациентов с клиническим диагнозом НМИРМП и рецидивом, что говорит о непосредственном влиянии ВПЧ инфекции на течение заболевания. Интеграция ВПЧ в геном, очевидно, приводит к изменению экспрессии *hsa-miR-143-3p*, которое обнаруживается у соответствующей когорты больных в моче и может служить маркером развития рецидива рака мочевого пузыря в первые 18 месяцев после хирургического лечения. Определение микроРНК в образцах мочи является неинвазивным и высокоспецифичным методом, что дает преимущества в ранней диагностике рецидива НМИРМП у пациентов с ВПЧ-положительным статусом.

### **Список литературы**

1. Huang C.S., Tsai C.H., Yu C.P., Wu Y.S., Yee M.F., Ho J.Y., Yu D.S. Long Noncoding RNA LINC02470 Sponges MicroRNA-143-3p and Enhances SMAD3-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition to Promote the Aggressive Properties of Bladder Cancer // *Cancers (Basel)*. 2022. Vol. 14 (4). P. 968. DOI: 10.3390/cancers14040968.
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году | Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 239 с.

3. Димитриади Т.А., Кит О.И., Бурцев Д.В. Скрининг рака шейки матки. Мировой опыт. Ситуация в России // Известия ВУЗОВ. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2017. № 4-2. С. 26-32.
4. Sun J.X., Xu J.Z., Liu C.Q., An Y., Xu M.Y., Zhong X.Y., Zeng N., Ma S.Y., He H.D., Hu J., Liu Z., Wang S.G., Xia Q.D. The association between human papillomavirus and bladder cancer: Evidence from meta-analysis and two-sample mendelian randomization // J. Med. Virol. 2022. DOI: 10.1002/jmv.28208.
5. Borkowska E.M., Konecki T., Pietrusiński M., Borowiec M., Jabłonowski Z. MicroRNAs Which Can Prognosticate Aggressiveness of Bladder Cancer // Cancers (Basel). 2019. Vol. 11 (10). P. 1551.
6. Pang L., Ding Z., Li F., Chai H., Wu M., Shao J. HPV-16 Expression and Loss of Cell Differentiation in Primary Bladder Tumors // Biomed Res Int. 2022. DOI: 10.1155/2022/6565620.
7. Пулатова А.А., Димитриади С.Н., Кутилин Д.С., Зыкова Т.А., Шевченко А.Н., Гончаров С.И., Хван В.К. Генетические и эпигенетические особенности немышечно-инвазивного и мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря у больных, инфицированных вирусом папилломы человека: обзор литературы // Онкоурология. 2022. № 18 (4). 108-119. DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-4-108-119.
8. Сагакянц А.Б., Белякова Л.И., Шевченко А.Н., Бондаренко Е.С., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Филатова Е.В., Хван В.К., Хомутенко И.А., Бурцев Д.В. Особенности локального иммунитета у пациентов с неинвазивно-мышечным раком мочевого пузыря различной степени злокачественности // Южно-Российский онкологический журнал. 2022. № 3 (4). С. 58-66. DOI: 10.37748/2686-9039-2022-3-4-6.
9. Раскуражев А.А., Шабалина А.А., Кузнецова П.И., Танашян М.М. МикроРНК как значимые биомаркеры атеросклеротической цереброваскулярной патологии // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2022. Т. 16. № 1. С. 5-13. DOI: 10.54101/ACEN.2022.1.1.
10. Tomita K., Fukumoto M., Itoh K., Kuwahara Y., Igarashi K., Nagasawa T., Suzuki M., Kurimasa A., Sato T. MiR-7-5p is a key factor that controls radioresistance via intracellular Fe<sup>2+</sup> content in clinically relevant radioresistant cells // Biochem Biophys Res Commun. 2019. Vol. 518 (4). P. 712-718. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.08.117.
11. Кутилин Д.С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком // Молекулярная биология. 2020. Т. 54. № 4. С. 580-595.
12. Шнейдер О.В., Камилова Т.А., Голота А.С., Сарана А.М., Щербак С.Г. Биомаркеры и таргетная терапия при раке легких // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. 2021. Т. 3. № 1. С. 74-94. DOI: 10.36425/rehab63268.