

Received: 2016.06.16
Accepted: 2017.03.01
Published: 2017.08.13

Znaczenie białka macierzy jądrowej BLCA-4 w raku pęcherza moczowego

The role of the BLCA-4 nuclear matrix protein in bladder cancer

Beata Szymańska, Anna Długosz

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Katedra i Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

Rak pęcherza moczowego (RPM) występuje dosyć często i dotyka głównie osoby w starszym wieku. Zgodnie z informacją podaną przez Krajowy Rejestr Nowotworów w 2012 roku był to czwarty, pod względem zachorowania, nowotwór u mężczyzn i jedenasty u kobiet. Wczesne zdiagnozowanie tego nowotworu jest bardzo ważne. Im później zostanie wykryty tym bardziej jest zaawansowany, a z tym wiąże się trudniejsze leczenie i gorsze rokowanie.

Diagnostyka raka pęcherza moczowego nie jest prosta i wciąż dość inwazyjna. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu cystoskopię, czyli wziernikowanie pęcherza, biopsję tkanek zmienionych nowotworowo z oceną histopatologiczną, a także cytologiczną ocenę osadu moczu. To skłoniło badaczy do poszukiwań alternatywnych metod diagnostyki raka pęcherza moczowego.

Niedawno opisano grupę sześciu białek BLCA swoistych dla raka pęcherza. Szczególne zainteresowanie wzbudziło białko BLCA-4. Jednak dane dotyczące zastosowania w praktyce są nieliczne, dlatego konieczna jest kontynuacja badań w szerszym zakresie nad tym potencjalnym markerem RPM. BLCA-4 należy do białek macierzy jądrowej i charakteryzuje się dużą swoistością dla tego typu nowotworu.

Uszkodzenia oksydacyjne DNA odgrywają znaczącą rolę w patogenezie niektórych chorób człowieka, m.in. także chorób nowotworowych. 8-Hydroksy-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG) jest nukleozydem, powstającym wskutek utlenienia guaniny w DNA. Oznaczanie 8-OHdG jest przydatnym markerem w ocenie uszkodzeń genotoksycznych.

Celem pracy był przegląd informacji dotyczących wartości diagnostycznej BLCA-4, jego funkcji w procesie karcynogenezy RPM i analiza przydatności w narażeniu na związki genotoksyczne mierzona poziomem 8-OHdG.

Słowa kluczowe:

rak pęcherza moczowego • białko BLCA-4 • marker diagnostyczny • 8-OHdG

Summary

Bladder cancer (BC) affects usually older people. According to information provided by the National Cancer Registry in 2012. BC was the 4th, in terms of illness, cancer in men and 11th in women. Early diagnosis of bladder cancer is important because detected later has worse prognosis.

Diagnosis of bladder cancer is not simple and it is still very invasive. Usually the cystoscopy or endoscopic bladder biopsy with histopathological evaluation and cytology of urine sediment is used. This prompted researchers to look for alternative noninvasive methods of diagnosis of bladder cancer.

Recently, it was described the group of six proteins (BLCA) specific for BC, with special attention to BLCA-4. BLCA-4 belongs to the nuclear matrix protein and has a high specificity for

Key words:	this type of cancer however the value of this marker in BC diagnosis is not yet established. Oxidative DNA damage play an important role in the pathogenesis of some human diseases, including cancer. Determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) is currently used in the evaluation of genotoxic damage. The aim of the work was to review information on BLCA-4, its function in the process of BC carcinogenesis and diagnostic value also in exposure to genotoxic compounds measured by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) level. bladder cancer • BLCA-4 protein • diagnostic marker • 8-OHdG
Full-text PDF: DOI: Word count: Tables: Figures: References:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1245157 10.5604/01.3001.0010.3847 2723 2 2 51

Adres autorki: mgr Beata Szymańska, Katedra i Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław; e-mail: beata.szymanska@umed.wroc.pl

Wykaz skrótów: **Ag-NOR** – region organizujący jąderko, segment chromosomowy, w którym znajdują się geny głównych rybosomowych RNA u ssaków, wybarwione srebrem NOR określa się jako AgNOR; **AP-1** – czynnik transkrypcyjny 1 (activator protein 1); **AP-2** – czynnik transkrypcyjny 2 (activator protein 2); **AUC** – pole pod krzywą ROC (area under the curve); **BER** – naprawa uszkodzeń DNA przez wycięcie zasad azotowych (base excision repair); **BLCA** – białka macierzy jądrowej; **BLCA-4** – białko macierzy jądrowej 4; **BLNL(1-3)** – białka wykryte w zdrowych tkankach pęcherza moczowego; **CI** – przedział ufności dla danej miary statystycznej; **c-MYC** – protoonkogen, kodowane przez ten gen białko jest czynnikiem transkrypcyjnym i reguluje proces komórkowy; **CTCF** – represor transkrypcji; **ELISA** – test immunoenzymatyczny (enzyme-linked immunosorbent assay); **ELK-3** – gen będący członkiem rodziny czynników transkrypcyjnych; **ERK** – grupa kinaz, dzięki którym działają czynniki wzrostu i estry forbolu, odpowiadają za regulację proliferacji i różnicowania komórek (extra cellular signal regulated kinases); **ETS** – czynnik transkrypcyjny (E26 transformation-specific); **HLH** – region helisa-pętla-helisa (helix-loop-helix); **HPLC** – wysokosprawna chromatografia cieczowa (high-performance liquid chromatography); **HR** – rekombinacja homologiczna (homologous recombination); **IL-1, -2** – interleukiny 1, 2; **MMP-9** – metaloproteinaza macierzy 9; **MNU** – N – metyloN-nitromocznik; **NER** – naprawa uszkodzeń DNA przez wycinanie nukleotydów (nucleotide excision repair); **NFATC** – czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów T (nuclear factor of activated T-cells); **NF-E1** – czynnik transkrypcyjny swoisty wobec erytroidy Eryf1 (erythroid-specific transcription factor); **NF-E2** – czynnik jądrowy erytroida 2 (nuclear factor, erythroid 2); **NIH** – bazy danych National Institute of Health, USA; **NIR** – naprawa uszkodzeń DNA przez nacięcie nukleotydu (nucleotide incision repair); **NM** – macierz jądrowa (nuclear matrix); **NMPs** – białka macierzy jądrowej (nuclear matrix proteins); **8-OHdG** – 8-okso-2'-deoksyguanozyna; **PARP-1** – jądrowa polimeraza Poli ADP-rybozy; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **RPM** – rak pęcherza moczowego; **TCF** – podrodzina czynników transkrypcyjnych; **T24** – linia komórkowa raka pęcherza moczowego; **TM** – trombomodulina; **UMUC-2** – linia komórkowa raka pęcherza moczowego; **UUT-UCCs** – nowotwory urotelialnych komórek górnych dróg moczowych; **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (vascular endothelial growth factor); **WWA** – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.

STRUKTURA I FUNKCJA MACIERZY JĄDROWEJ

Macierz jądrowa, nukleoskielet, szkielet jądrowy (NM – nuclear matrix) jest trójwymiarową siecią włókien białkowych tworzących wewnętrzny szkielet jądra komórkowego, odpowiedzialny za utrzymanie struktury przestrzennej chromatyny. Termin NM został po raz pierwszy wprowadzony przez Berezneya i Coffeya

w 1974 r. jako określenie uporządkowanej pozostałości z jąderka wątroby szczura [3].

Nukleoskielet tworzą pozachromatynowe struktury pozostałe po trawieniu jądra komórkowego buforami o dużej sile jonowej oraz niejonowymi detergentami i nukleazami. Do elementów struktury szkieletu jądrowego należą: blaszka jądrowa z jądrowymi komplek-

sami porowymi, będąca pozostałością otoczki jądrowej; resztkowa struktura jąderka; pozajądrowa włóknisto-ziarnista sieć znajdująca się w przestrzeni wewnętrznochromatynowej, tworząca tzw. macierz wewnętrzną (internal matrix) [2].

Skład macierzy jądrowej nie jest znany, udało się ustalić, że dominującą komponentą macierzy są białka niehistonowe (98%), resztę tworzą fosfolipidy i niewielkie ilości kwasów nukleinowych. Bez względu na sposób izolowania białek, zawsze są zasacowane z niewielką ilością DNA jądrowego odpornego na trawienie przez nukleazy. Skład macierzy danej komórki może ulegać zmianom, przez to nie zawsze jest identyczny. Dzieje się tak m.in. wówczas, gdy komórka ulega procesowi różnicowania lub transformuje się w komórkę nowotworową [36,37].

Do funkcji hipotetycznych macierzy jądrowej można zaliczyć: rolę w replikacji DNA, udział w regulacji ekspresji genów, uczestnictwo w transkrypcji i dojrzewaniu RNA oraz w transporcie prekursorów rybosomów do cytoplazmy. Także uczestnictwo w procesie wirowania i fosforylacji białek wirusowych, wiązania karcynogenów czy też wiązania hormonów steroidowych. Macierz jądrowa jest zaangażowana w procesy występujące w zmienionych nowotworowo komórkach (zaburzenia organizacji i replikacji DNA, zmian w transkrypcji czy struktury i kształtu jądra) [4,18].

Białka macierzy jądrowej (NMPs) stanowią mniej niż 10% całkowitych białek jądrowych. Należą do nich m.in.: białka matryny, laminy, białka Ag-NOR, aktyna, białka rybonukleoprotein jądrowych, polimeraza, topoizomeraza oraz kinaza jądrowa zależna od kalmoduliny i jonów wapnia. Głównymi białkami macierzy jądrowej ssaków są matryny, prawdopodobnie uczestniczą w procesach fosforylacji białek, koordynowaniu transkrypcji i splataniu RNA. Błazka jądrowa jest siecią średniej wielkości włókien składających się z białek zwanych laminami. Lamininy są bezpośrednio związane z DNA, ale odgrywają również ważną rolę w utrzymaniu wewnętrznej architektury jądra komórkowego. Uważa się, że uczestniczą w częściowym przekazie sygnałów między jądrem a cytoplazmą komórkową. Jest wiele białek macierzy jądrowej, w tym autoantygeny, fibronektyna, białka keratynopodobne, produkty onkogenów, czynniki transkrypcyjne, startery rozpoznawania białek, fosfolipazy i kinazy białkowe, których rola wciąż nie jest poznana [35].

NMPs wiążą się ze swoistymi sekwencjami DNA S/MAR, które uczestniczą w chromosomalnej replikacji i transkrypcji. Oddziałują z topoizomerazą II, polimerazami PARP 1 i 2 oraz CTCF, czynnikiem wiążącym z regulatorem genu *C-MYK* [3,36].

BIĄŁKO MACIERZY JĄDROWEJ – 4 (BLCA – 4)

Analiza elektroforetyczna białek macierzy jądrowej przeprowadzona z użyciem dwuwymiarowej (2D) elektroforezy wysokiej rozdzielczości wykazała obecność

ponad 200 protein. Porównanie składu nukleoskieletu komórek zdrowych i zmienionych chorobowo umożliwiło znalezienie i identyfikację swoistych białek macierzy dla danego rodzaju nowotworu, np. w raku pęcherza moczowego, stercza, sutka czy jelita grubego [28].

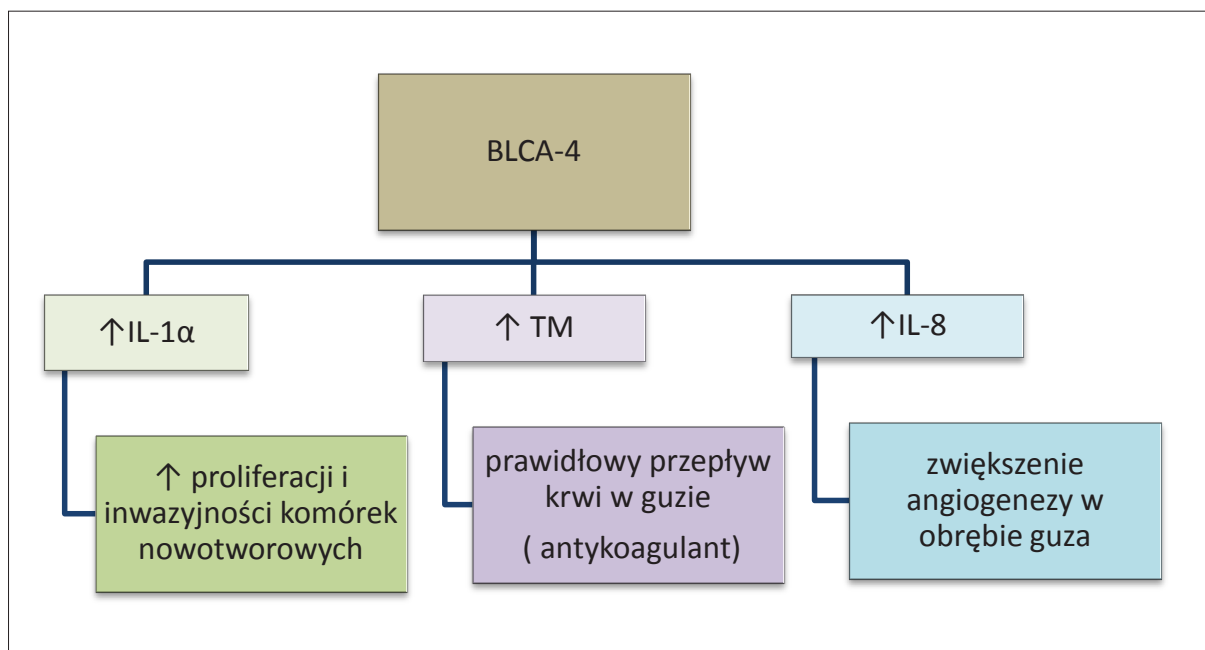
W 1996 r. Getzenberg i wsp. zwrócili uwagę na zmieniony kształt jądra i chromatyny jądrowej w komórkach nowotworowych pęcherza moczowego. To skłoniło ich do wnikliwego przeanalizowania składu zmienionych struktur, czego skutkiem było odkrycie białek raka pęcherza moczowego BLCA. Przeprowadzając jednocześnie analizę próbek tkanek nowotworowych i prawidłowych od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego, stwierdzono różnice w zawartości NMPs. We wszystkich próbkach guzów wykryto 6 swoistych dla raka pęcherza białek macierzy jądrowej (BLCA-1-BLCA-6), nieobecnych w prawidłowych wycinkach urotelium (tab.1). Obecność pięciu z nich, powiązanych z RPM znaleziono również na liniach komórkowych raka pęcherza UMUC-2, T24 (nie zidentyfikowano tylko BLCA-5). Wykryto również 3 białka (BLNL-1 do BLNL-3) występujące jedynie w materiale ze zdrowych tkanek pęcherza moczowego. Białko określone jako BLCA-4, pojawiało się już we wczesnym stadium choroby i było go najwięcej w analizowanej macierzy [19,41,47] dwuwymiarowej

Tabela 1. Białka BLCA występujące w ludzkim raku pęcherza moczowego, zidentyfikowane z użyciem 2-wymiarowej (2D) elektroforezy wysokiej rozdzielczości (wg [19])

BLCA (białka macierzy jądrowej RPM)	Masa cząsteczkowa [kDa]	Punkt izoelektryczny [pI]
BLCA-1	72 000	7,70
BLCA-2	40 000	7,50
BLCA-3	39 000	6,27
BLCA-4	37 000	6,24
BLCA-5	32 000	580
BLCA-6	31 000	8,00

Właściwie niemożliwe jest zmierzenie przebiegu ekspresji BLCA-4 u ludzi, dlatego posłużono się modelem zwierzęcym w celu przeanalizowania progresji raka pęcherza moczowego. Opracowany przez Hicksa i Wakefield, a następnie zmodyfikowany przez Steinberga i wsp. model zwierzęcy obejmował podawanie czynnika rakotwórczego N-metylo-N-nitrozomocznika (MNU) bezpośrednio do pęcherza szczurów, w celu wywołania procesu karcynogenezy. Widoczne guzy w pęcherzu pojawiły się około 30 tygodnia od pierwszej iniekcji dopęcherzowej (większość zmian tworzyły raki urotelialne).

Samcom szczurów F344 Fisher wkraplano MNU dopęcherzowo w 0, 2, 4 i 6 tygodniu. Do badań pobierano pęcherze zwierząt w 8-34 tygodni, natomiast próbki moczu od drugiego tygodnia zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej (złożonej ze zdrowych szczurów



Ryc. 1. Model prawdopodobnego udziału BLCA-4 w patogenezie RPM [34]

F344 Fisher). BLCA-4 stwierdzono w moczu już w 4 tygodniu po iniekcji MNU, natomiast ekspresję w tkance po 8 tygodniach. Wyniki potwierdziły, że pojawienie się BLCA-4 w moczu następuje we wczesnym stadium raka pęcherza, zanim pojawią się makroskopowo widoczne guzy [14,46].

Białko BLCA-4 wykryto u chorych pacjentów z RPM zarówno w guzach nowotworowych, jak i w niezmięnionej tkance pęcherza moczowego. W próbkach pobranych od zdrowych osób nie znaleziono białka BLCA-4. Zastanawiające jest jednak to, dlaczego białko BLCA-4 występuje także w zdrowych tkankach pęcherza u pacjentów z nowotworem. Prawdopodobna jest hipoteza oparta na „efekcie pola” wobec tkanek sąsiadujących, tj. niskiej ekspresji białka BLCA-4 w zdrowych komórkach sąsiadujących z nowotworową tkanką pęcherza [26,45].

W 2004 r. Van Le i wsp. zidentyfikowali i wyizolowali gen kodujący białko BLCA-4. Gen został sklonowany do pcDNA 3.1 wektora ekspresji. Po porównaniu homologii sekwencji w bazie danych NIH (National Institute of Health, USA) uzyskano informację, iż BLCA-4 wykazuje podobieństwo do wcześniej już zidentyfikowanego członka rodziny czynników transkrypcyjnych ETS – genu *Elk-3*. Wspólne obszary obu genów obejmują sekwencje jądrowej lokalizacji i jeden region – HLH (helisa-pętla-helisa). Badacze uważają, że białko BLCA-4 jest prawdopodobnie nie tylko potencjalnym markerem nowotworowym z dużą swoistością. Jest także nowo odkrytym członkiem rodziny czynników transkrypcyjnych ETS. Geny docelowe ETS obejmują onkogeny, geny supresorowe, geny związane z apoptozą, z różnicowaniem, angiogenezą, inwazyjnością i tworzeniem przerzutów. Ponieważ czynniki transkrypcyjne są zaangażowane

w przebiegu wielu funkcji biologicznych, nieprawidłowa ekspresja genów może się przyczynić do transformacji i progresji nowotworu. Złuszczając *Elk-3* odgrywa rolę w promowaniu stymulacji angiogenezy i ekspresji czynnika wzrostu śródbłonnka naczyń (VEGF) [46].

Elk-3 ufosforylowany i aktywowany przez zewnętrzny sygnał szlaku kinazy (Erk) razem z *Elk-1* i *Sap-1* tworzy potrójny kompleks czynników transkrypcyjnych podrodziny TCF, regulujący wczesną odpowiedź komórek spoczynkowych na stymulację czynnikiem wzrostu [5,35]. Van Lee i wsp. wykazali, że BLCA-4 może być potencjalnym regulatorem transkrypcji i może oddziaływać z już poznanymi czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak AP-1, AP-2, NFATC, NF-E1 i NF-E2 [40,45].

Myers-Irvin i wsp. w 2005 r. analizując rolę białka BLCA-4 w patofizjologii raka pęcherza moczowego stwierdzili, że komórki z nadekspresją BLCA-4 wykazywały intensywniejszy poziom wielu genów, m.in. kodujących IL-1α, IL-8 czy trombomodulinę (TM). To odkrycie dostarczyło informacji na temat potencjalnej funkcji BLCA-4 w czasie procesu nowotworowego. Wykazano związek między ekspresją białka BLCA-4 a IL-1α, IL-8 i TM. Analiza sekwencji genów promotorowych *IL-1α*, *IL-8*, *TM* wskazała wiele miejsc ETS, co może sugerować, że BLCA-4 wiążąc się bezpośrednio z każdym z tych genów wywołuje ich nadekspresję. Według Mayers-Irvin i wsp. jest to potencjalny mechanizm patogenezy RPM związany z udziałem BLCA-4 (ryc.1). Wzrost IL-1α nasila ekspresję enzymów degradujących macierz i sprzyja adhezji nowotworowych komórek śródbłonnka, co natomiast powoduje wzrost proliferacji i inwazyjności komórek rakowych. Podwyższona ilość trombomoduliny będącej antykoagulantem, zapewnia odpowiedni przepływ krwi

w naczyńach nowotworu hamując powstawanie zakrzepów blokujących właściwe jego ukrwienie. Zwiększona ilość IL-8 stymuluje angiogenezę w obrębie guza. Prawidłowe unaczynienie nowotworu pozwala na szybki jego rozrost [34].

BLCA-4 W RAKU PĘCHERZA MOCZOWEGO (PRZYKŁADY)

Feng i wsp. przeanalizowali 53 próbki pochodzące od chorych na raka pęcherza moczowego (metodą immunohistochemiczną) pod względem ekspresji wielu czynników. Dodatkowo korelacje zidentyfikowano między ekspresją BLCA-4 i interleukiny-1 α (IL-1 α), ($p=0,038$), IL-8, ($p=0,001$), czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), ($p=0,002$) i metaloproteiny macierzy 9 (MMP-9), ($p=0,013$) [16].

Poziom białka BLCA-4 może być ważnym markerem przeżywalności przydatnym w monitorowaniu przebiegu raka pęcherza moczowego. Badania 325 chorych na RPM wykazały, że nadekspresja BLCA-4 była istotnie związana z inwazyjnością guza ($p < 0,001$) oraz jego stadium ($p < 0,001$). Nie zależała od wieku, płci, rozmiaru guza oraz liczby guzów nowotworowych. Wysoki poziom BLCA-4 był znaczącym czynnikiem informującym o słabej przeżywalności pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Wielowymiarowa analiza regresji Coxa wykazała, że poziom ekspresji białka BLCA-4 może odgrywać ważną rolę w przewidywaniu rokowań jako marker przeżywal-

ności [51].

Raki urotelialnych górnych dróg moczowych (UUT-UCCs – (upper urinary tract urothelial cell carcinoma) są rzadkie, ale zwykle inwazyjne w chwili rozpoznania. W baniach oceniono poziom BLCA-4 w moczu u 30 pacjentów chorych na UUT-UUC i u zdrowych (grupa kontrolna). Wykazano, że poziom BLCA-4 był znacząco wyższy u pacjentów z UUT-UCC ($p < 0,0017$) w stosunku do grupy porównawczej ($p < 0,0001$). Autorzy ocenili BLCA-4 jako bardzo swoisty marker dla tego typu raka i zasugerowali jego oznaczanie jako wskaźnika pomocniczego oprócz biopsji [17].

METAANALIZA BLCA-4

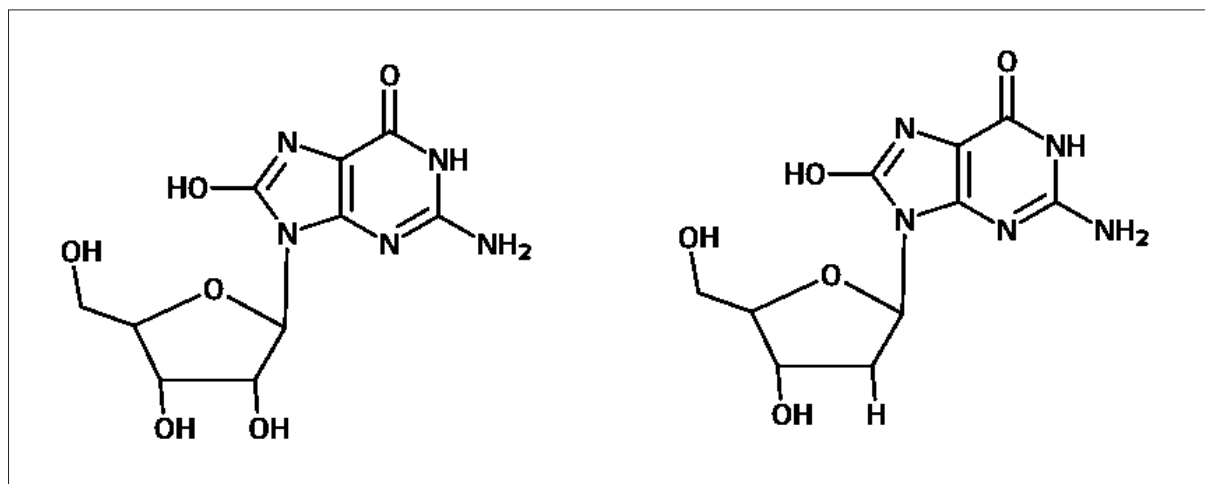
Qiliang Cai, Yudong Wu i wsp. w 2015 r. zanalizowali i porównali 9 raportów, których tematem była ocena wartości diagnostycznej białka BLCA-4 u chorych na raka pęcherza moczowego [6]. Były to prace: Konety [25,26], Van Le [45], Chen [9], Guo [20], Feng [17], Jiang [22], Huang [21], Wang [47] i Yang [48]. Wstępną charakterystykę każdego z raportów zamieszczono w tabeli 2.

Badania przeprowadzono w latach 2000-2015, większość w Chinach, dwa w USA. Liczba prób w poszczególnych badaniach mieściła się w zakresie 76-180, wszystkie wykonano w moczu pacjentów. Białko BLCA-4 oznaczono testem ELISA (7 raportów), w jednym z pozostałych

Tabela 2. Charakterystyka dziewięciu raportów poddanych metaanalizie przez Qiliang Cai, Yudong Wu i wsp. [6]

Badacze	Kraj	Rok	Liczba prób (n)	Metoda oznaczenia	Punkt odcięcia	PD	FD	FU	PU
Konety	USA	2000	106	test ELISA	13 A/ μ g	53	0	2	51
Van Le	USA	2005	140	test kanapkowy	OD=0.04	67	3	8	62
Chen	Chiny	2005	76	test ELISA	13 A/ μ g	33	0	2	41
Guo	Chiny	2011	155	qPCR	13 A/ μ g	65	14	7	69
Feng	Chiny	2011	136	test ELISA	1,7x10-4A	74	0	2	60
Jiang	Chiny	2013	88	test ELISA	13 A/ μ g	28	0	2	58
Huang	Chiny	2014	82	test ELISA	13 A/ μ g	49	1	7	25
Wang	Chiny	2014	156	test ELISA	13 A/ μ g	42	0	4	110
Yang	Chiny	2015	180	test ELISA	13 A/ μ g	75	0	5	100

Punkt odcięcia – wartość graniczna (wartość odcięcia) – kryterium rozdzielające wyniki prawidłowe od wyników uznanych za nieprawidłowe; PD – prawdziwie dodatnie, FD – fałszywie dodatnie, FU – fałszywie ujemne, PU – prawdziwie ujemne; OD = wartość odczytu; A/ μ g – indeks przeliczenia absorbancji na μ g białka; qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy DNA



Ryc. 2. Wzory strukturalne najczęściej oznaczanych zmodyfikowanych nukleotydów: 8-hidroksyguanozyny (8-OHG) oraz 8-okso-2'-deoksyguanozyny (8-OHdG) [10]

raportów testem immunoenzymatycznym z podwójnym wiązaniem przeciwciał (tzw. test kanapkowy) [45], a w drugim ilościową reakcją łańcuchową polimerazy DNA (qPCR) [20].

Uzyskano następujące szacunkowe wartości: czułość 0,93 (95% przedział ufności [CI] 0,90-0,95), swoistość 0,97 (95% CI, 0,95-0,98), pozytywny stosunek prawdopodobieństwa 48,16 (95% CI, 11,77-197,01), negatywny stosunek prawdopodobieństwa 0,08 (95% CI, 0,06-0,11), diagnostyczny iloraz szans 534,03 (95% CI, 150,15-1899,31) i wartość pola pod krzywą (AUC) wynosząca 0,9607 (określa wysoki poziom ogólnej dokładności). Podsumowując, BLCA-4 uznano za obiecujący marker do diagnozowania raka pęcherza moczowego.

MARKER USZKODZEŃ GENETYCZNYCH 8-HIDROKSY-2'DEOKSYGUANOZYNA (8-OHdG)

Rak pęcherza moczowego (RPM) jest zaliczany do nowotworów zależnych środowiskowo. Związek między ekspozycją środowiskową a zapadalnością jest wyraźniejszy niż w innych nowotworach. Chociaż etiologia raka pęcherza jest nieznana, zidentyfikowano wiele czynników, które mogą go wywołać. Należą do nich: m.in. palenie papierosów, aminy aromatyczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), pestycydy, nitrozaminy, związki arsenu oraz pewne leki. Udowodniono, że niektóre związki chemiczne wchłonięte do organizmu a następnie usuwane w postaci połączeń z substancjami endogennymi, podczas wydalania z moczem ulegają w pęcherzu moczowym częściowej hydrolizie z wytworzeniem kancerogennych karbokationów [12,24,29].

Na RPM zapadają głównie ludzie starsi (50% przypadków to osoby powyżej 75 roku życia), dlatego uważa się, że długotrwały wpływ środowiska i stylu życia, nie powinien być lekceważony. W raku pęcherza interakcje czynników środowiskowych w połączeniu z genetyczną wrażliwością, mechanizmami detoksykacyjnymi czy sys-

temami naprawczymi (np. DNA) to bardzo prawdopodobnie droga rozwoju RPM [43].

Najwięcej dowodów na chemiczną karcynogenezę w raku pęcherza moczowego dostarcza narażenie zawodowe. Związek między ekspozycją na niektóre aminy aromatyczne a zapadalnością na RPM odkryto już w XIX w. u pracowników zatrudnionych przy produkcji barwników azowych. Aktualna lista czynników sprawczych obejmuje wiele związków chemicznych np. z grupy metali. Wykazano m.in. związek arsenu w wodzie pitnej a zachorowaniem na RPM. Główny mechanizm chemicznej karcynogenezy w narażeniu (na arsen) polega na wzmożonej generacji wolnych rodników (RFT), które uszkadzają DNA. RFT powodują strukturalne modyfikacje kwasów nukleinowych, do których można zaliczyć: utlenienie zasady azotowej, co powoduje rozerwanie nici DNA (np. utlenienie guaniny do 8-oksoguaniny, powstawanie glikolu tyminy); alkilowanie zasady azotowej, najczęściej za pomocą grupy metylowej (powstają cząsteczki 7-metyloguaniny, 1-metyloadeniny i 6-O-metyloguaniny); hydroliza zasad azotowych, w tym deaminacja, a także depirymidynacja i depurynacja (odłączenie zasady azotowej od ufosforylowanej cząsteczki deoksyrybozy); tworzenie adduktów (np. benzo[a]pirenodioloepoksydu guanozyny) [13,38,39,49].

Uszkodzenia DNA następują w wyniku bezpośredniego oddziaływania RFT lub przez włączenie zmodyfikowanego nukleotydu w czasie powielania materiału genetycznego. RFT indukują uszkodzenia zarówno jądrowego, jak i mitochondrialnego DNA. Częściej niż uszkodzenia w obrębie jądrowego DNA (nuclear DNA, nDNA) są obserwowane mutacje w DNA mitochondrialnym (mitochondrial DNA, mtDNA). Sąsiedztwo łańcucha oddechowego, generującego RFT sprzyja uszkodzeniom mtDNA i błędowi replikacyjnemu białek, odpowiedzialnych za przeprowadzenie procesu fosforylacji oksydacyjnej. Według jednej z hipotez, to właśnie mutacje mitochondrialnego

DNA i malejąca z wiekiem aktywność mitochondriów są główną przyczyną starczyń zaburzeń organizmu i zmian patologicznych [23,27].

Do obrony przed mutacjami genowymi organizmy żywe wykształciły systemy naprawcze kwasów nukleinowych. Należą do nich: BER (base excision repair) – naprawa przez wycięcie zasad azotowych, NIR (nucleotid incision repair) – nacięcie nukleotydu, NER (nucleotide excision repair) – wycinanie nukleotydów, HR (homologous recombination) – rekombinacja homologiczna. W przypadku niesparowanych nukleotydów, zgodnie z zasadami komplementarności, jest aktywowany mechanizm korygujący (mis-match repair) [32,50].

Jednymi z markerów uszkodzeń DNA zachodzących pod wpływem stresu oksydacyjnego są: 8-hydroksyguanozyna (8-OHG) oraz jej pochodna, 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG) [10].

Wykazano podwyższony poziom 8-OHdG u pracowników narażonych na chloroanilinę [8], arsen [30,31], rtęć [7,43] czy pestycydy [33]. Dane te wskazują na wartość 8-OHdG w monitorowaniu narażenia na związki genotoksyczne.

8-OHdG po wycięciu przez systemy naprawcze organizmu zostaje całkowicie wydalony do moczu w postaci niezmienionej. Kiedyś był oznaczany z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC z następową chromatografią gazową z detektorem spektrometrii masowej (GC/MS), obecnie metodą immunoenzymatyczną (ELISA) znacznie tańszą i szybszą [1,10].

8-HYDROKSY-2'DEOKSYGUANOZyna (8-OHdG) w RPM (PRZYKŁADY)

Rak pęcherza moczowego jest często charakteryzowany jako zależny od środowiska i występuje najczęściej u osób starszych, narażenie na działanie toksyn środowiskowych (często genotoksycznych) jest istotne, tym bardziej że procesy naprawcze ulegają osłabieniu z wiekiem. W dostępnej literaturze niewiele jest przykładów dotyczących oznaczeń poziomu 8-OHdG w RPM; wyniki są rozbieżne. Niektóre wskazują na zwiększone stężenie uwalnianego do moczu 8-OHdG i jego analogów u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego ($70,5 \pm 38,2$ ng/mg kreatyniny) ($58,8 \pm 43,4$ ng/mg kreatyniny) w porównaniu do grupy kontrolnej ($36,1 \pm 24,5$ ng/mg kreatyniny) [10].

Istotne są wyniki opisujące korelacje między 8-OHdG a stężeniem arsenu w moczu chorych z RPM. Wykazano, że średnie całkowite stężenie związków arsenu w moczu było znacznie podwyższone u pacjentów z rakiem i wynosiło $37,67 \pm 2,98$ µg/g kreatyniny w porównaniu z grupą kontrolną $21,10 \pm 0,79$ µg/g kreatyniny ($p < 0,01$). Jednak nie stwierdzono istotnie wyższego stężenia 8-OHdG ($7,48 \pm 0,97$ ng/mg kreatyniny) u pacjentów z rakiem, w porównaniu do osób zdrowych ($5,95 \pm 0,21$ ng/mg kreatyniny) [11].

Aby oszacować poziom uszkodzeń oksydacyjnych w raku pęcherza moczowego, określono zawartość 8-OHdG w DNA izolowanym z leukocytów krwi obwodowej zdrowych osób dorosłych i pacjentów. Poziom 8-OHdG w DNA u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego były istotnie wyższe ($p < 0,0001$) niż u osób w grupie kontrolnej. Choć średnie wartości 8-OHdG u pacjentów były wyższe u osób palących w porównaniu z niepalącymi, różnica nie była istotna statystycznie. 8-OHdG nie wykazało korelacji z typem zróżnicowania raka G (grade). U palaczy z rakiem pęcherza stwierdzono istotnie wyższy poziom 8-OHdG ($p < 0,001$) niż u osób zdrowych palących, podobnie u chorych na raka pęcherza moczowego niepalących poziom 8-OHdG ($p < 0,001$) był istotnie wyższy niż u zdrowych niepalących. Redukcja oksydacyjnego stresu jest uważana za bardzo ważny środek do pierwotnej profilaktyki RPM [1].

W innych badaniach oceniono poziom 8-OHdG w moczu i surowicy u 36 chorych na RPM. Średnią wartość 8-OHdG w surowicy wynosiła $0,24$ ng/ml ($0,13$ – $0,58$ ng/ml), a w moczu $12,20$ ng/ml ($1,66$ – $62,96$ ng/ml). Stężenie kreatyniny w surowicy korelowało z poziomem 8-OHdG ($r = 0,739$, $p < 0,001$), ale nie stwierdzono takiej zależności w moczu ($R = 0,075$; $p = 0,52$). Brak było również wzajemnej korelacji między zawartością 8-OHdG w surowicy i moczu ($R = 0,257$, $p = 0,13$). Wyższe poziomy w surowicy 8-OHdG powiązano z obecnością guzów wysokiej klasy ($p = 0,028$) [42].

Wprawdzie 8-OHdG można uznać za marker uszkodzeń DNA w raku pęcherza moczowego, to wciąż niewiele wiadomo o jego swoistości.

PODSUMOWANIE

Badania BLCA-4 wskazują na wartość tego białka jako wczesnego markera do nieinwazyjnej diagnostyki RPM ze względu na jego nasiloną ekspresję i szybkie pojawienie się w moczu jeszcze przed utworzeniem widocznych guzów (badania przesiewowe, prewencja raka pęcherza moczowego w grupie ryzyka). Wśród markerów raka pęcherza moczowego, BLCA-4 ma wysoką czułość i swoistość, a jego wartość dodatkowo wzrasta przez brak ekspresji u pacjentów z różnymi łagodnymi zaburzeniami urologicznymi, np. zakażenia dróg moczowych, zapalenie pęcherza moczowego, kamica, polipowatość czy jednoczesne przeprowadzenie cystoskopii.

Dobrze poznanym wskaźnikiem uszkodzeń genotoksycznych jest 8-OHdG. O ile u zdrowych osób uszkodzony nukleotyd jest naprawiany przez endonukleazy i inne enzymy, to w stanach patologicznych uszkodzenia przewyższają zdolności naprawcze DNA. Obecność zmodyfikowanego nukleotydu w nici kwasu nukleinowego zwiększa ryzyko zaburzeń w procesach transkrypcji i replikacji DNA, doprowadzając do wystąpienia mutacji. Jeżeli zmiany obejmą grupę onkogenów lub genów supresorowych, w komórce może zostać zainicjowany proces kancerogenezy.

Wiele danych wskazuje na 8-OHdG jako marker narażenia na związki genotoksyczne, co sugeruje jego podatność, tym bardziej że w tym typie raka narażenie na pewne czynniki chemiczne odgrywa istotną rolę w procesie nowotworzenia. Poziom oznaczanego 8-OHdG jest sumą działania czynników środowiskowych, istniejącej choroby oraz wydolności systemów naprawczych DNA.

Nie znaleziono w dostępnej literaturze próby zbadania korelacji BLCA-4/8-OHdG między markerem wykrywania

RPM (BLCA-4) a genotoksycznych uszkodzeń (8-OHdG) w raku pęcherza moczowego. Wykazanie wzajemnych zależności między obydwooma markerami w RPM, na którego rozwój zasadniczy wpływ ma styl życia (palenie papierosów, miejsce zamieszkania, rodzaj pracy, dieta) potwierdziłoby swoistość BLCA-4 także w narażeniu środowiskowym. Wydaje się, że łączne stosowanie obu tych markerów ułatwi diagnostykę i ocenę rokowań w RPM.

PIŚMIENICTWO

- [1] Akçay T., Saygılı I., Andican G., Yalçın V.: Increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in peripheral blood leukocytes in bladder cancer. *Urol. Int.*, 2003; 71: 271-274
- [2] Berezney R.: Regulating the mammalian genome: the role of nuclear architecture. *Adv. Enzyme Regul.*, 2002; 42: 39-52
- [3] Berezney R., Coffey D.S.: Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974; 60: 1410-1417
- [4] Bosman F.T.: The nuclear matrix in pathology. *Virchows Arch.*, 1999; 435: 391-399
- [5] Buchwalter G., Gross C., Wasyluk B.: Ets ternary complex transcription factors. *Gene*, 2004; 324: 1-14
- [6] Cai Q., Wu Y., Guo Z., Gong R., Tang Y., Yang K., Li X., Guo X., Niu Y., Zhao Y.: Urine BLCA-4 exerts potential role in detecting patients with bladder cancers: a pooled analysis of individual studies. *Oncotarget*, 2015; 6: 37500-37510
- [7] Chen C., Qu L., Li B., Xing L., Jia G., Wang T., Gao Y., Zhang P., Li M., Chen W., Chai Z.: Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clin. Chem.*, 2005; 51: 759-767
- [8] Chen H.L., Liou S.H., Ho S.F., Wu K.Y., Sun C.W., Chen M.F., Cheng L.C., Shih T.S., Loh C.H.: Oxidative DNA damage estimated by plasma 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG): influence of 4, 4'-methylenebis (2-chloroaniline) exposure and smoking. *J. Occup. Health*, 2007; 49: 389-398
- [9] Chen T.E., Guo G.Z., Wang G.X., Xia L.P.: The value of BLCA 4 in the diagnosis of bladder cancer. *J. Mod. Lab. Med.*, 2005; 20: 59-60
- [10] Chiou C.C., Chang P.Y., Chan E.C., Wu T.L., Tsao K.C., Wu J.T.: Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin. Chim. Acta*, 2003; 334: 87-94
- [11] Chung C.J., Huang C.J., Pu Y.S., Su C.T., Huang Y.K., Chen Y.T., Hsueh Y.M.: Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and urothelial carcinoma risk in low arsenic exposure area. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008; 226: 14-21
- [12] Chung K.T.: The etiology of bladder cancer and its prevention. *J. Cancer. Sci. Ther.*, 2013; 5: 346-361
- [13] Czajka A.: Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu. *Now. Lek.*, 2006; 75: 582-586
- [14] Ding J., Xu D., Pan C., Ye M., Kang J., Bai Q., Qi J.: Current animal models of bladder cancer: awareness of translatability. *Exp. Ther. Med.*, 2014; 8: 691-699
- [15] Feng C.C., Wang P.H., Guan M., Jiang H.W., Wen H., Ding Q., Wu Z.: Urinary BLCA-4 is highly specific for detection of bladder cancer in Chinese Han population and is related to tumour invasiveness. *Folia Biol.*, 2011; 57: 242-247
- [16] Feng C., Wu Z., Guo T., Jiang H., Guan M., Zhang Y., Wen H., Ding Q.: BLCA-4 expression is related to MMP-9, VEGF, IL-1 α and IL-8 in bladder cancer but not to PEDF, TNF- α or angiogenesis. *Pathol. Biol.*, 2012; 60: e36-e40
- [17] Feng C.C., Wu Z., Jiang H.W., Wen H., Guan M., Ding Q.: Urinary BLCA-4 level is useful to detect upper urinary tract urothelial cell carcinoma. *Actas Urol. Esp.* 2012; 36: 597-602
- [18] Fey E.G., Bangs P., Sparks C., Odgren P.: The nuclear matrix: defining structural and functional roles. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Expr.* 1991; 1: 127-143
- [19] Getzenberg R.H., Konety B.R., Oeler T.A., Quigley M.M., Hakam A., Becich M.J., Bahnson R.R.: Bladder cancer-associated nuclear matrix proteins. *Cancer Res.*, 1996; 56: 1690-1694
- [20] Guo B., Che T., Shi B., Guo L., Yin Y., Li L., Wang J., Yan D., Chen Y.: Screening and identification of specific markers for bladder transitional cell carcinoma from urine urothelial cells with suppressive subtractive hybridization and cDNA microarray. *Can. Urol. Assoc. J.*, 2011; 5: E129-E137
- [21] Huang Y.H., Zhou N., Xu X., Zhang Z.: The significance of combined detection of specific nuclear matrix protein-4 and bladder cancer antigen in bladder cancer at an early stage. *J. Prac. Med.*, 2014; 30: 3608-3610
- [22] Jiang M.J., Wu G., Hou J.Q.: Expression and clinical significance of bladder cancer specific nuclear matrix protein 4 in urine of patients with bladder cancer. *Chin. J. Exper. Surgery*, 2013; 30: 1754-1755
- [23] Karolkiewicz J.: Wpływ stresu oksydacyjnego na strukturę i funkcję komórek oraz konsekwencje wynikające z uszkodzeń wolnorodnikowych – związek z procesami starzenia. *Gerontol. Pol.*, 2011; 19: 59-67
- [24] Kiriluk K.J., Prasad S.M., Patel A.R., Steinberg G.D., Smith N.D.: Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urol. Oncol.*, 2012; 30: 199-211
- [25] Konety B.R., Nguyen T.S., Brenes G., Sholder A., Lewis N., Bastacky S., Potter D.M., Getzenberg R.H.: Clinical usefulness of the novel marker BLCA-4 for the detection of bladder cancer. *J. Urol.*, 2000; 164: 634-639
- [26] Konety B.R., Nguyen T.T., Dhir R., Day R.S., Becich M.J., Stadler W.M., Getzenberg R.H.: Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 2618-2625
- [27] Kujoth G.C., Hiona A., Pugh T.D., Someya S., Panzer K., Wohlgemuth S.E., Hofer T., Seo A.Y., Sullivan R., Jobling W.A., Morrow J.D., Van Remmen H., Sedivy J.M., Yamasoba T., Tanokura M. i wsp.: Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*, 2005; 309: 481-484

- [28] Leman E.S., Getzenberg R.H.: Nuclear structure as a source of cancer specific biomarkers. *J. Cell. Biochem.*, 2008; 104: 1988-1993
- [29] Lerner S.P., Grossman H.B., Messing E.M., Kibel A.S., Stephenson A., Gee J.R., O'Donnell M.A., Reid R.D., Kamat A.M., Parnes H.L., House M.G.: BCAN Think Tank session 3: Prevention of bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 2010; 28: 338-342
- [30] Li X., Pi J., Li B., Xu Y., Jin Y., Sun G.: Urinary arsenic speciation and its correlation with 8-OHdG in Chinese residents exposed to arsenic through coal burning. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2008; 81: 406-411
- [31] Lin T.S., Wu C.C., Wu J.D., Wei C.H.: Oxidative DNA damage estimated by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and arsenic in glass production workers. *Toxicol. Ind. Health*, 2012; 28: 513-521
- [32] Michalak A., Krzeszowiak J., Markiewicz-Górka I.: Starzenie się organizmu a stres oksydacyjny oraz zmniejszona sprawność systemów naprawczych. *Postępy. Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 1483-1491
- [33] Mishra B.P., Badade Z.G., Anand B.K., Lingidi J.L., Jaiswal S.: 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels in urinary samples of pesticide sprayers on exposure to organophosphorus pesticides. *Int. J. Clin. Trials.*, 2015; 2: 59-63
- [34] Myers-Irvin J.M., Van Le T.S., Getzenberg R.H.: Mechanistic analysis of the role of BLCA-4 in bladder cancer pathobiology. *Cancer Res.*, 2005; 65: 7145-7150
- [35] Oikawa T.: ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci.*, 2004; 95: 626-633
- [36] Olszewska M., Krajewska W.: Budowa jądra komórkowego. W: *Podstawy cytofizjologii*, red.: J. Kawiak, J. Mirecka, M. Olszewska, J. Warchol; wyd. III zmienione, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995, 106-107
- [37] Orkisz S., Bartel H.: Organizacja i funkcjonowanie jądra komórkowego. W: *Seminaria z cytofizjologii dla studentów medycyny, weterynarii i biologii*, red.: J. Kawiak i M. Zabel. Wydawnictwo Medyczne Urban i Partner, Wrocław 2002, 7-8
- [38] Pira E., Piolatto G., Negri E., Romano C., Boffetta P., Lipworth L., McLaughlin J.K., La Vecchia C.: Bladder cancer mortality of workers exposed to aromatic amines: a 58-years follow up. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2010; 102: 1096-1099
- [39] Puzanowska-Tarasiewicz H., Starczewska B., Kuźmicka L.: Reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008; 4: 1007-1015
- [40] Santoni M., Catanzariti F., Minardi D., Burattini L., Nabissi M., Muzzonigro G., Cascinu S., Santoni G.: Pathogenic and diagnostic potential of BLCA-1 and BLCA-4 nuclear proteins in urothelial cell carcinoma of human bladder. *Adv. Urol.*, 2012; 2012: 397412
- [41] Shirodkar S.P., Lokeshwar V.B.: Potential new urinary markers in the early detection of bladder cancer. *Curr. Opin. Urol.*, 2009; 19: 488-493
- [42] Soini Y., Haapasaari K.M., Vaarala M.H., Turpeenniemi-Hujanen T., Kärjä V., Karihtala P.: 8-hydroxydeoxyguanosine and nitrotyrosine are prognostic factors in urinary bladder carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2011; 4: 267-275
- [43] Szymańska-Chabowska A., Beck A., Poręba R., Andrzejak R., Antonowicz-Juchniewicz J.: Evaluation of DNA damage in people occupationally exposed to arsenic and some heavy metals. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2009; 18: 1131-1139
- [44] Ścibior-Bentkowska D., Czeżot H.: Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 58-72
- [45] Van Le T.S., Miller R., Barder T., Babjuk M., Potter D.M., Getzenberg R.H.: Highly specific urine-based marker of bladder cancer. *Urology*, 2005; 66: 1256-1260
- [46] Van Le T.S., Myers J., Konety B.R., Barder T., Getzenberg R.H.: Functional characterization of the bladder cancer marker BLCA-4. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 1384-1391
- [47] Wang X.P., Wang H., Wang Z.Y., Guo L., Zhang Z.W.: The value of bladder cancer specific nuclear matrix proteins in diagnosis of bladder cancer. *J. Chengde Med. College*, 2014; 31: 115-117
- [48] Yang J.R., Liu W., Liu B., Pan T.J.: Clinical significance of expression of BLCA-4 in urine of bladder cancer patients. *Practical J. Cancer*, 2015; 30: 168-170
- [49] Zabłocka A., Janusz M.: Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Postępy. Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 118-124
- [50] Zaremba T., Oliński R.: Oksydacyjne uszkodzenia DNA – ich analiza oraz znaczenie kliniczne. *Postępy Biochem.*, 2010; 56: 124-138
- [51] Zhao Q., Shen W.H., Chen Z.W., Zhou Z.S., Ji H.X.: High expression level of BLCA-4 correlates with poor prognosis in human bladder cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2012; 5: 422-427

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.