



**Petr Hušek(1), Jaroslav Pacovský(1), Marcela Chmelařová(2), Miroslav Podhola(3),
Miloš Broďák (1)**

1. Urologická klinika FN a LFUK Hradec Králové

2. Ústav klinické biochemie a diagnostik

3. Finglandův ústav patologie FNHK

Výzkum je podpořen: INTERNÍ SOUTĚŽ FN HK 2015

Cíle

Retrospektivní zhodnocení efektu léčby u 82 pacientů s povrchovým high grade karcinomem močového měchýře či CIS, kteří prodělali BCG instilační terapii. Následně jsou archivované vzorky tumoru těchto pacientů podrobeny analýze vybraných hypermetylací promotorových oblastí pomocí MS-MLPA (Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

Soubor a metoda

MS-MLPA představuje semikvantitativní metodu pro sledování metylačních změn DNA. MS-MLPA je velmi podobná klasické MLPA, kdy ligace probe je kombinována se štěpením komplexu DNA-proba metylačně specifickou endonukleázou. Nejčastěji využívaným restričním enzymem je Hha1, tento enzym rozpoznává a specificky štěpí pouze nemetylovanou DNA sekvenci GCGC. MS-MLPA je metoda, která je velmi citlivá a může být využita již při malých koncentracích izolované DNA. Nespornou výhodou je i její použití u analýzy DNA izolované z parafínových bločků, která často bývá málo kvalitní. Další výhodou je analýza několika sekvencí v jedné reakci. Celkově bylo metylační analýza podrobena 66 vzorků tumorů a 13 kontrolní pacientů (zdravého urotelu).

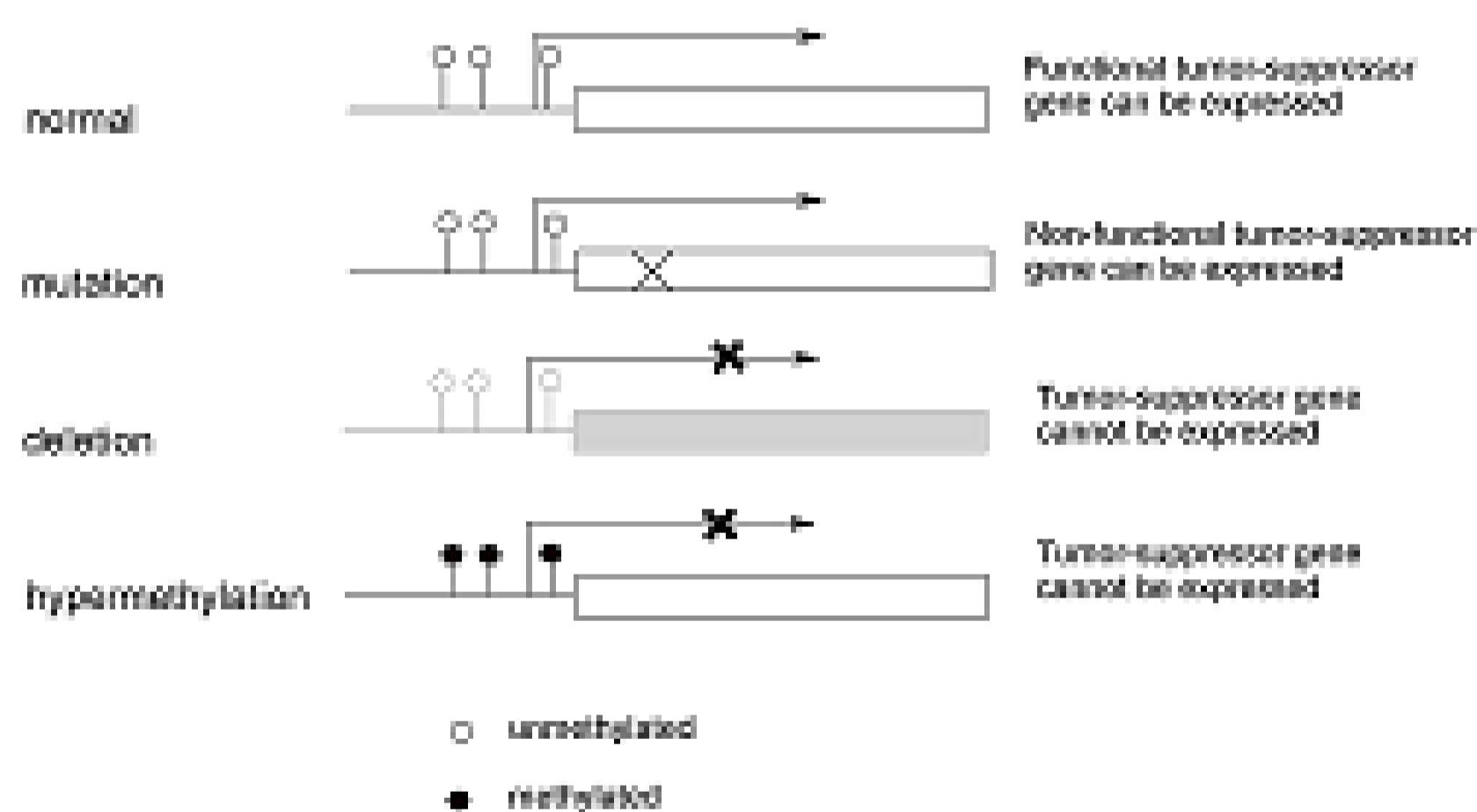
Výsledky

Celkově bylo zhodnoceno 66 pacientů. Léčebná odpověď byla pozorována u 45 (68%) pacientů, selhání BCG léčby u 21 (32%) pacientů. Ve skupině selhání se jednalo o rekurenci onemocnění u 15 (23%) pacientů o progresi onemocnění u 6 (9%) pacientů. 3 (5%) pacienti zemřeli na karcinom močové měchýře.

Kompletní nebo částečná metylační analýza byla provedena u 57 pacientů s tumorem měchýře a 13 kontrolních pacientů. Izolace DNA byla neúspěšná u 9 pacientů, kde tedy metylační analýzu nebylo možno provést.

Zcela nově byly námi identifikovány změny metylací genů MUS81a ($p=0.00002$), NTRK1 ($p=0.00396$) a PCCA ($p=0.01297$).

Změny metylací genů CDKN2B ($p=0.00312$) a MUS81a ($p=0.01907$) byly spojeny s klinickou odpovědí na BCG léčbu. Nepřítomnost těchto dvou metylací byla spojena s selháním BCG léčby.



Mechanisms of inactivation of tumor-suppressor genes.

Závěr

Genetické a epigenetické změny hrají důležitou roli v karcinogenezi karcinomu močového měchýře. Na základě výstupu naší práce a dosud publikovaných dat, mají změny metylací vybraných tumor supresorových genů potenciál v předpovědi léčebné odpovědi BCG instalační terapie, u pacient s povrchovým high grade karcinomem močového měchýře. Nicméně zatím je stále málo dat pro bezpečné využití v běžné klinické praxi. CDKN2B a MUS81 jsou velmi nadějně pro další výzkum.