

Artykuły przeglądowe • Review articles

Rak pęcherza moczowego w świetle badań cytogenetycznych

Anna Pastwińska¹, Tomasz Demkow², Barbara Pieńkowska-Grela¹

Rozwój nowoczesnych technik cytogenetyki molekularnej zaowocował istotnym postępem w poznaniu genetycznych podstaw nowotworów ludzkich. Kompleksowe badania cytogenetyczne pozwoliły na określenie aberracji kariotypowych, występujących w komórkach raka pęcherza moczowego. Stwierdzono obecność zarówno zmian ploidii, jak i licznych aberracji strukturalnych. Guzy o niższym stopniu zaawansowania posiadają zwykle kariotypy okołodiploidalne, natomiast nowotwory o wysokim stopniu zaawansowania – kariotypy poliploidalne z licznymi translokacjami i zmianami niezrównoważonymi. Trwają intensywne badania, mające na celu identyfikację genów odpowiedzialnych za powstanie i rozwój tego nowotworu. Wysoka częstość nawrotów była powodem stworzenia wielu testów, mających na celu wyznaczenie markerów, przepowiadających możliwość nawrotu i progresji. Metodami cytogenetyki molekularnej (FISH) można określić obecność charakterystycznych dla nowotworu zmian, takich jak aneuploidia chromosomów 3, 7 i 17 oraz utrata obszaru 9p21 w komórkach z osadu moczu. Test ten jest rekomendowaną przez EAU metodą, zastępującą/uzupełniającą klasyczne badanie cytologiczne, szczególnie w przypadku guzów nawrotowych.

Cytogenetic and molecular genetic aspects of bladder cancer: an overview

The application of molecular cytogenetic methodologies has, recently, resulted in the remarkable advances in cancer genetics which have, in turn, led to establishing chromosome aberration patterns as a diagnostic and prognostic index of numerous malignancies. This article reviews the present-day data concerning the initiation and development of bladder cancer. Complex cytogenetic investigations reveal ploidy alterations and structural chromosomal aberrations. Lower stage tumours have a near-diploid karyotype, while higher stage tumours show numerous translocations and complex chromosomal aberrations. The high incidence of urinary carcinoma recurrences has led to the development of a variety of urine-based tests for recurrent disease. One of them is the fluorescent *in situ* hybridization technology (FISH) – a sensitive method of testing voided urine specimens for such bladder cancer markers as aneuploidy of chromosomes 3, 7 and 17, as well as loss of the 9p21 locus. The EAU recommends this particular test for recurrent disease monitoring.

Słowa kluczowe: rak pęcherza moczowego, cytogenetyka, markery urologiczne

Key words: bladder cancer, cytogenetics, urinary markers

Wstęp

Poszukiwania zaburzeń genetycznych, związanych bezpośrednio z powstaniem i rozwojem nowotworów, prowadzone są na całym świecie w wielu laboratoriach badawczych różnych specjalności. Podstawowych informacji na temat związku zmiany genetycznej z chorobą nowotworową dostarczyły badania cytogenetyczne. Klasyczne badania cytogenetyczne, wykonywane techniką prążkową (GTG, *G-banding*) pozwalają na wykrycie zaburzeń morfologii chromosomów. Ujawniane w ten sposób aberracje kariotypowe są widoczną manifestacją zaburzeń DNA. W chwili obecnej badania nad identyfikacją zmian gene-

tycznych prowadzone są przy użyciu zarówno technik cytogenetycznych, takich jak: analiza prążkowa, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridization*), porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH, *comparative genomic hybridization*), jak i zaawansowanych technik molekularnych: reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*), reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR, *real-time polymerase chain reaction*), analizy zmiany szybkości migracji jednoniciowych fragmentów DNA (SSCP, *single strand conformation polymorphism*) lub mikromacierzy (*microarrays*).

Istotne dla poznania mechanizmów onkogenezy jest określenie kolejności pojawiania się aberracji w danym typie nowotworu. Zmiana pierwotna, istotna dla ustalenia mechanizmu transformacji nowotworowej, jest najczęściej pojedynczą aberracją, specyficzną dla określonego typu nowotworu. Nieprzypadkowe zmiany wtórne, zach-

¹ Samodzielna Pracownia Cytogenetyki

² Klinika Nowotworów Układu Moczowego, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

dzące w komórkach niosących już zmianę pierwotną, związane są zwykle z progresją i mogą mieć raczej znaczenie rokownicze. Poznanie mechanizmów patogenezы nowotworów jest najlepszą drogą dla stworzenia podstaw optymalnej terapii.

W niektórych chorobach rozrostowych, wywodzących się z układu krwiotwórczego, precyzyjnie określono mechanizmy onkogenezy, a zaangażowane w nie geny zidentyfikowano na podstawie badania punktów pęknięć w chromosomach metafazowych (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes>). Badania cytogenetyczne i molekularne pozwoliły m.in. na szczegółowe określenie zmiany pierwotnej w przewlekłej białaczce szpikowej, gdzie w wyniku translokacji t(9;22)(q34;q11) powstaje fuzyjny gen BCR/ABL o zmienionej aktywności kinazy tyrozynowej. Zrozumienie mechanizmu tego zaburzenia pozwoliło na zaprojektowanie i skonstruowanie pierwszego, niecytostatycznego leku o swoistym działaniu przeciwnowotworowym (imatinib, glivec, STI571). Imatinib selektywnie hamuje nieprawidłową kinazę BCR/ABL w komórkach niosących tę specyficzną aberrację [1-5]. Ten sam lek jest wysoce skuteczny w terapii nowotworów zrębu przewodu pokarmowego (GIST, *gastrointestinal stromal tumours*), gdzie dochodzi do nieprawidłowej ekspresji białka KIT (produkt protoonkogenu c-KIT) [6]. Mimo intensywnych badań, prowadzonych na materiale guzów litych, zidentyfikowano jedynie niewielką liczbę genów odpowiedzialnych za ich patogenezę [7].

Kompleksowe cytogenetyczne badania raków pęcherza moczowego pozwoliły stwierdzić, że ich komórki charakteryzują się zarówno zmianą ploidi, jak i obecnością znacznej liczby aberracji strukturalnych. Guzy o niższym stopniu zaawansowania wykazują zwykle kariotypy około-diploidalne, podczas gdy nowotwory poliploidalne o wysokim stopniu zaawansowania – ujawniają obecność licznych translokacji i zmian niezrównoważonych [8-12]. Nie zidentyfikowano do chwili obecnej aberracji całkowicie specyficznych dla zmian pierwotnych lub wtórnych w rakach pęcherza moczowego. Ustalenie kolejności pojawiania się zmian w czasie progresji choroby jest szczególnie trudne w przypadku nowotworów niosących liczne, współwystępujące aberracje. Istnieje jednak związek pomiędzy pojawieniem się określonych aberracji kariotypowych, a określonym stopniem i stadium zaawansowania guza.

Epidemiologia i stadia kliniczne

Rak pęcherza moczowego stanowi 3% wszystkich nowotworów złośliwych. U mężczyzn wykrywany jest 2,5 razy częściej niż u kobiet. Jest czwartym co do częstości występowania rakiem u mężczyzn (po raku płuca, żołądka i prostaty) i ósmym u kobiet [13]. Rak pęcherza moczowego jest rozpoznawany głównie u osób starszych, pomiędzy 60 i 70 rokiem życia. Czynniki sprzyjające wystąpieniu raka pęcherza moczowego to palenie tytoniu (występuje 4 razy częściej u palaczy), praca w przemyśle gumowym i barwiarskim, napromienianie okolic pęcherza moczowego (np. z powodu raka szyjki macicy) [14].

W Europie około 90-95% wszystkich nowotworów złośliwych pęcherza moczowego stanowi rak z komórek przejściowych (*ca transitional, transitional cell ca – TCC*). Rak płaskonabłonkowy (*ca planoepitheliale, squamous cell ca – SCC*) jest rozpoznawany w około 5% przypadków raka pęcherza, natomiast w 2% stwierdza się gruczolakoraki (*adenocarcinoma*) [14, <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Tumors/blad5001.html>]. Wyjątkowo rzadko występują inne nowotwory złośliwe, takie jak mięsaki lub chłoniaki.

Stopień zróżnicowania jest jednym z dwóch podstawowych czynników rokowniczych; w raku pęcherza moczowego określany jest wg klasyfikacji WHO [15]. Wyróżnia się następujące stopnie zróżnicowania nowotworu:

- G1 – komórki dobrze zróżnicowane – występuje w ok. 40% raków pęcherza
- G2 – komórki słabo zróżnicowane – występuje w ok. 30%
- G3 – komórki źle zróżnicowane – występuje w 23%
- G4 – komórki niezróżnicowane – występuje w 7%

Drugim czynnikiem rokowniczym jest określenie stopnia zaawansowania guza pierwotnego wg klasyfikacji TNM [16] lub zmodyfikowanego systemu Jewett'a i Marshall'a. Ze względu na większą dokładność preferowana jest klasyfikacja TNM, określająca stan guza pierwotnego, węzłów chłonnych i obecność przerzutów.

Nowotwory pęcherza moczowego charakteryzują się skłonnością do wznów i progresji. O wznowie mówimy, gdy po leczeniu nowotwór nawraca w nie wyższym stadium zaawansowania T i nie wyższym stopniu zróżnicowania G. Natomiast mianem progresji określa się pojawienie guza w wyższym stadium zaawansowania T i wyższym stopniu G. Nawroty i progresja występują częściej, gdy guzy są liczniejsze (co najmniej 3), mają większą średnicę (większą niż 3 cm) i wyższe cechy T i G.

Nowotwory powierzchniowe podzielono na trzy grupy ryzyka nawrotów i progresji, które leczy się w odmienny sposób:

- grupa niskiego ryzyka: guz pojedynczy, TaG1, średnica guza <3 cm,
- grupa wysokiego ryzyka: liczne guzy, często nawracające, T1G3, CIS,
- grupa pośrednia: wszystkie inne.

Ponad 60% raków pęcherza moczowego w momencie rozpoznania to zmiany powierzchniowe, ograniczone do śluzówki. Jednak nawet po całkowitej resekcji przezcewkowej wszystkich widocznych zmian występują nawroty, a u 10-25% pacjentów następuje progresja do raków inwazyjnych, naciekających błonę mięśniową pęcherza moczowego.

W oparciu o czynniki prognostyczne (cechy T i G, wieloogniskowość, wielkość guza, lokalizacja) trudno jednoznacznie wypowiedzieć się, jaki będzie przebieg kliniczny raka pęcherza moczowego. Wydaje się natomiast, że aberracje cytogenetyczne wykrywane w komórkach guza, mogą stać się istotnym, dodatkowym czynnikiem prognostycznym.

Etjopatogeneza – teorie

Transformacja nowotworowa jest procesem wielostopniowym. Uważa się, że w procesie powstawania raka pęcherza moczowego występują co najmniej trzy istotne etapy. W pierwszym – w komórce prekursorowej pojawiają się zmiany genetyczne, które zwiększają jej zdolności proliferacji; powstaje zmiana w nabłonku pęcherza moczowego. To prowadzi do zjawiska „defektu pola”. Drugi etap to rozwój nowotworu ze zwiększeniem ruchliwości i zmniejszeniem adhezji komórkowej. Te cechy komórek są odpowiedzialne za powstanie nawrotów. Trzeci etap to nabywanie przez guzy nawrotowe dalszych zmian genetycznych, co prowadzi do progresji nowotworu. Powyższe założenia stały się podstawą hipotezy Dalbagniego i wsp. zakładającej, że guzy nawrotowe są pochodzenia monoklonalnego, a defekt pola jest wynikiem rozsiewania i bocznej migracji komórek guza pierwotnego [17].

Wysoka częstość synchronicznych i niesynchronicznych wieloogniskowych nawrotów doprowadziła do wysunięcia teorii nowotworowego „efektu pola” (*field effect*) w karcinogenezie raka pęcherza moczowego [18, 19]. Teoria ta mówi, że część raków przejściowokomórkowych naciekających mięśniówkę może powstać z niezależnie stransformowanej komórki prekursorowej nabłonka przejściowego pęcherza moczowego (*progenitor cell*). Niektóre raki wykazują obecność odrębnych klonów, pochodzących z różnych komórek pierwotnych. Dane molekularne i kliniczne sugerują, że inwazyjne raki pęcherza moczowego mogą rozwijać się *de novo* lub z raka nie przekraczającego błony podśluzowej. W komórkach morfologicznie prawidłowego nabłonka u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego są obecne delecje chromosomowe i zmetylowane regiony promotorowe przypuszczalnych genów supresorowych, co potwierdza teorię „efektu pola”.

Porównanie aberracji chromosomowych guzów i sąsiadującego nabłonka pęcherza moczowego wykazało podobny schemat zmian cytogenetycznych. Obszary chromosomów: 1 (w regionie 1p36), 8 (obszar 8p23), 9 (9p21), 11 (11q13) oraz 17 (17p13) wykazują zaburzenia tak w guzach, jak i w sąsiadującym nabłonku, co potwierdza tezę, że rak pęcherza moczowego rozwija się z nabłonka cytogenetycznie zmienionego [20, 21].

Wydaje się, że zmiany wieloogniskowe w nabłonku pęcherza moczowego mogą powstać zarówno na skutek śródnabłonkowej migracji komórek pochodzących z pojedynczego guza pierwotnego, jak i wszczepiania się komórek złuszczonej z guza pierwotnego w inne miejsce śluzówki. Złuszczenie się komórek jest zjawiskiem normalnym i wykorzystuje się je w ocenie cytologicznej komórek z osadu moczu u pacjentów z rakiem pęcherza [19]. Badanie mutacji genu *TP53* wskazuje na większe prawdopodobieństwo drugiego z tych mechanizmów. Stwierdzono mianowicie, że występowanie komórek z mutacją było ograniczone tylko do obszarów sąsiadujących z guzem, co potwierdzałoby zjawisko bocznej migracji, podczas gdy wszczepianie złuszczonej komórek spowodowałoby powstanie przypadkowo rozprzestrzenionych guzów [19]. Ponadto analiza mutacji genu supresorowego *TP53* (*locus*

17p13) z zastosowaniem barwienia immunohistochemicznego i sekwencjonowania wskazuje na klonalne pochodzenie guzów i potwierdza teorię „efektu pola”.

Kolejnych argumentów, świadczących na korzyść teorii monoklonalnego pochodzenia raków pęcherza moczowego, dostarczyły badania Cheng’a i wsp. [18]. Klonalność oceniano w oparciu o polimorfizm *locus* genu *HUMARA* (gen receptora androgenu związanego z chromosomem X) u kobiet. Komórki żeńskie zawierają dwie kopie chromosomu X: matczyną i ojcowską. W każdej z komórek organizmu aktywna jest tylko jedna, losowo wybrana kopia chromosomu X. Druga jest wyłączona przez mechanizm metylacji. Tak więc, w warunkach fizjologicznych, tkanki żeńskie są mozaiką pod względem aktywności rodzicielskich kopii chromosomu X, a proporcja aktywnych i nieaktywnych kopii rodzicielskich ma rozkład losowy. Na tej podstawie założono, że guz powstały z pojedynczej stransformowanej komórki prekursorowej zawierał będzie tę samą nieaktywną kopię chromosomu X we wszystkich komórkach (ojcowską bądź matczyną). Wynik badania potwierdził wzór nieprzypadkowej inaktywacji chromosomu X w guzie, co wskazuje na jego monoklonalne pochodzenie, choć nie wyklucza możliwości niezależnego powstania z dwóch lub więcej komórek pierwotnych, które miały ten sam nieaktywny allel chromosomu X.

Według Simona i wsp. powstanie rozsianych ognisk nowotworowych w nabłonku pęcherza moczowego jest efektem kumulacji kolejnych zmian genetycznych w komórkach raka [19]. Obecność nielicznych zmian kariotypu wydaje się charakterystyczna dla pojedynczego guza pierwotnego. Wraz z pojawieniem się dalszych aberracji, komórki nowotworu nabywają zdolność inwazji i migrują do błony mięśniowej oraz naczyń krwionośnych – tworząc przerzuty. W nowotworach wieloogniskowych niestabilność genetyczna pojawia się wcześniej, a efektem jest utrata adhezji komórkowej i migracja komórek nowotworowych w obrębie nabłonka pęcherza moczowego.

Aberracje chromosomowe

Badania cytogenetyczne prowadzone technikami klasycznej analizy prążkowej oraz zaawansowanych technik molekularnych, pozwoliły na ustalenie niektórych cech kariotypowych, związanych z powstaniem i progresją guzów pęcherza moczowego. Nielosowe ubytki i pojawienie się dodatkowych kopii całych chromosomów, bądź ich fragmentów, są uznawane za kluczowe w powstawaniu raka pęcherza. Analiza cytogenetyczna raka przejściowokomórkowego wykazała, że najczęściej występujące aberracje liczbowe dotyczą chromosomów 3, 7, 8, 9, 11, 17, Y, rzadziej 13, 15, 20 [9, 12, 20, 22-29]. W zmiany strukturalne zaangażowane są liczne chromosomy (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18). Efektem aberracji są głównie delecje, rzadziej notuje się obecność izochromosomów i translokacje niezrównoważone.

Aberracje strukturalne chromosomu 1 występują w ok. 35% przypadków raka pęcherza moczowego i obejmują delecje, translokacje, duplikacje i izochromosomy.

Delecje krótkiego ramienia chromosomów 3 i 11 oraz monosomia chromosomu 3, występujące w guzach inwazyjnych i w zaawansowanych stadiach choroby, związane są z wysokim ryzykiem progresji guza. Często w guzach pęcherza moczowego obserwuje się utratę chromosomu Y, utratę krótkiego ramienia chromosomu 8 i dodatkowo kopie długiego ramienia chromosomu 8, natomiast stosunkowo rzadko izochromosom krótkiego ramienia chromosomu 5, którego występowanie związane jest z agresywnym, inwazyjnym fenotypem [12, 25, 26, 30].

Zastosowanie techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH) i fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) pozwoliło na dokładniejsze poznanie charakteru aberracji. Wyodrębniono regiony amplifikowane w guzach pęcherza moczowego: 1q12-q25, 2p, 3q24-q26, 5p21, 6p, 7p/q, 8q21-q22, 10q22-q23, 11q11-q14, 13q21-q24, 17q11-q13, 20q11-qter oraz regiony ulegające delecji: 2q, 3p13-p14, 4p, 5q, 6q, 8p11-p21, 9p/q, 10q24-q26, 11p15, 11q12-q23, 13q14, 17p13, 18q21, Y [31-34].

Analiza następstw (*temporal analysis*) przeprowadzona przez Hóglunda i wsp. [35] wykazała, że kolejność pojawiania się najczęstszych aberracji w raku przejściowo-komórkowym pęcherza moczowego jest związana ze stadiem zaawansowania. Monosomia chromosomu 9 i trisomia chromosomu 7 są pierwszymi zmianami pojawiającymi się w guzach pęcherza, muszą być więc ważne w pierwszych etapach karcinogenezy. Zmiany takie jak -5q, +5p, -15, -18, -22p pojawiają się później i prawdopodobnie są istotne w progresji guza. Utrata jednej kopii chromosomu 10, 15 i 16 i krótkiego ramienia chromosomu 11 wydają się być związane ze stadiem T2, a 3p-, -4p, -5q, +5p, -6q i -22p – ze stadiem T3.

W rozrostach płaskonabłonkowych potwierdzono częste występowanie zmian genetycznych typowych dla raka pęcherza moczowego (utrata kopii chromosomu 4 i 9, utrata długiego ramienia chromosomu 2 i krótkich ramion chromosomów 8 i 11, dodatkowe kopie chromosomu 17) [36]. Wydaje się, że w nowotworach pęcherza moczowego, podobnie jak w innych guzach litych, translokacje wzajemne są zwykle zmianami wtórnymi.

Obecnie przypuszcza się, że znaczącą rolę w patogenezie raka pęcherza moczowego odgrywa inaktywacja trzech genów supresorowych, do których zalicza się gen *RB* (13q14), gen *CDKN2/p16* (9p21) i *TP53* (17p13) oraz aktywacja onkogenów: *CCND1* (11q13), *ERB-B2* (17q11-q12) i *EGFR* (7p11.2) [34, 37].

Poszukiwanie zmiany pierwotnej

Aberracje występujące powszechnie w guzach pęcherza moczowego to nieprzypadkowe utraty fragmentu chromosomu (często submikroskopowe) lub całych kopii chromosomów, pojawienie się dodatkowych kopii chromosomów, poliploidyzacja i powstawanie izochromosomów [9, 24, 25, 38]. Utrata kopii chromosomów występuje wcześniej, a dodatkowe kopie są akumulowane później, w trakcie rozwoju guza [10, 25, 34]. Utrata materiału genetycznego dotyczy najczęściej chromosomu 9, a także krótkiego ramienia chromosomów 1, 8, 17 oraz chromosomu Y.

Powielony materiał genetyczny to zwykle dodatkowe kopie długiego ramienia chromosomów 1 i 8, krótkiego ramienia chromosomu 5, całych kopii chromosomów 7 i 20. Przypuszcza się, że obszary te zawierają geny odpowiedzialne za rozwój nowotworu.

Brak jednej z kopii chromosomu 9 występuje w ponad 40% przypadków raka pęcherza moczowego i prowadzi do utraty heterozygotyczności. Monosomia tego chromosomu jest związana z wczesnymi etapami dysplazji nabłonka pęcherza i może poprzedzać wystąpienie zmian zauważalnych makroskopowo, a także może zostać wykryta w komórkach z osadu moczu u pacjentów z rakiem przejściowokomórkowym w okresie remisji, u których nie stwierdzono jeszcze klinicznych objawów nawrotu. W inwazyjnych rakach pęcherza alleliczne utraty chromosomu 9 występują o wiele rzadziej niż w zmianach powierzchniowych. Żaden region chromosomu 9 nie jest powiązany ze specyficznym stopniem histologicznym czy fenotypem inwazyjnym TCC. W badanych liniach komórkowych, wywodzących się z raka pęcherza moczowego, nie wykazano wspólnych punktów pęknięć na chromosomie 9. Interesującą obserwacją jest fakt istnienia przypadków, gdzie mimo braku monosomii chromosomu 9 występuje homozygotyczność w obrębie wszystkich lub większości markerów mikrosatelitarnych. Takie zjawisko sugeruje utratę jednego homologu rodzicielskiego i reduplikację pozostałego [39].

Regiony chromosomu 9 zaangażowane we wczesnych etapach rozwoju raka pęcherza moczowego zlokalizowano na obu ramionach tego chromosomu. Na krótkim ramieniu są to regiony prążków p11-13 i p22-23, na długim zaś zmiany koncentrują się w obszarach: q12-13, q21-22 i q31-34 [40]. Bardzo często występują delecje małego fragmentu krótkiego ramienia w prążku 9p21. W regionie tym znajduje się kilka genów, których rearanżacja lub utrata przypuszczalnie powoduje rozwój raka pęcherza moczowego.

Szczegółowe badania chromosomu 9 obejmowały analizę delecji genu *CDKN2A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2*, zwanego też *p16* lub *MTS1*), zlokalizowanego na 9p21 [39, 41]. W tym samym regionie zlokalizowane są kolejne geny podejrzane o zaangażowanie w patogenezę raka pęcherza moczowego: drugi cyklinozależny inhibitor kinaz *CDKN2B* (p15) oraz *p19*, będący genem regulatorowym cyklu komórkowego. Spadek ekspresji genu *p15* jest wczesnym zjawiskiem w transformacji nowotworowej nabłonka pęcherza, co sugeruje, że gen ten może być zaangażowany w procesie powstawania raka pęcherza moczowego [42]. W ok. 30% przypadków raków powierzchniowych stwierdzono nielosową delecję innego genu tej rodziny: genu *CDKN2A*, *p16* [41]. Na podstawie analizy delecji genu p16 z równoczesną utratą sąsiadującego regionu zawierającego gen *p19* założono, że zdarzenia te zachodzą na wczesnym etapie karcinogenezy [43], jednak inni autorzy [40, 44] wskazują, że zmiany te są stosunkowo rzadkie.

Analiza delecji w obrębie długiego ramienia chromosomu 9 w przypadkach raka z komórek przejściowych (guzy pierwotne) pozwoliła na zidentyfikowanie czterech

innych regionów zawierających przypuszczalne geny supresorowe [45]. W obszarze 9q22.3 znajdują się geny: *NBCCS*, *ESS1*, *FACC*, *XPAC*, *HSN1* i *CKS2*, region 9q31-32 zawiera kilka genów, z których dwa mogłyby odpowiadać poszukiwanym supresorom: *DYS* i *FCMD*. Kolejny gen-kandydat *GSN* (*gelsolin gene*) zlokalizowany jest w regionie 9q33, następnym zaś regionem jest 9q33-34.1 z genami: *NPS1*, *DYTI*, *COL5A1* i *HHT*. Ten ostatni (*HHT* – *hereditary hemorrhagic teleangiectasia gene*; koduje transbłonowe białko, wchodzące w skład kompleksu receptora *TGFB1*) wydaje się być przypuszczalnym genem supresorowym w raku pęcherza moczowego. Ostatnio prowadzone badania sugerują związek aberracji w regionie 9p21 z podatnością na zachorowanie na raka pęcherza [46].

W oparciu o analizy statystyczne wyodrębniono dwa szlaki cytogenetyczne w raku przejściowokomórkowym. Dwie najwcześniejsze zmiany w TCC: monosomia 9 i trisomia 7, rozpoczynają dwie odrębne drogi w progresji guza.

Monosomia chromosomu 9 jest najczęstsza w guzach T_a (49%) i T₁ (52%), ale rzadka w guzach T₃ [35]. Wtórnymi zmianami zachodzącymi po utracie chromosomu 9 są delecje krótkiego ramienia chromosomu 11, dodatkowe kopie długiego ramienia chromosomu 1 i monosomia chromosomu 17, po których później występuje utrata chromosomów 10, 15, 16. W guzach niskiego stopnia zaawansowania rzadko pojawia się utrata materiału 9q, w późniejszych etapach występuje utrata 9p. Uważa się, że inaktywacja przypuszczalnego genu/genów supresorowych zlokalizowanych na tym właśnie chromosomie inicjuje powstanie raka pęcherza moczowego.

Szczegółowe badanie chromosomu 9 nie pozwoliło, jak dotąd, na sformułowanie jednoznacznych wniosków, umożliwiających poznanie genetycznej zmiany leżącej u podstaw powstania guza pęcherza moczowego.

Sytuację komplikuje fakt, iż sugerowane jest istnienie drugiego szlaku cytogenetycznego z trisomią chromosomu 7 jako pierwszą zmianą. Dodatkowa kopia chromosomu 7 występuje rzadko w guzach T_a i T₁, częściej zaś w T₂ i T₃ [35]. Droga ta dotyczyłaby więc prawdopodobnie guzów o bardziej agresywnym przebiegu. Wtórnymi zmianami w tym szlaku są 8p-, +8q, 3p- i -17. W przypadkach progresji pojawiają się -6q, -5q i +5p.

Na podstawie powyższego przeglądu należy stwierdzić, że w chwili obecnej problem określenia zmiany/zmian inicjujących powstanie raka pęcherza moczowego pozostaje nadal otwarty. Badania te przyniosły jednak korzyść praktyczną. Obecność zmian w obrębie genów p16 i p15 na chromosomie 9, wykorzystano dla stworzenia nieinwazyjnych testów, pozwalających na wykrycie obecności komórek nowotworowych w osadzie moczu pacjentów. Zmiany takie stały się istotnym markerem nawrotu w badaniu osadu moczu [47-54].

Zmiany wtórne

W oparciu o dane z piśmiennictwa przeprowadzono analizę miejsc łamliwych na chromosomach często zaangażowanych w raku pęcherza moczowego. Uważa się, że miej-

scą łamliwe są normalnym zjawiskiem w populacji (z wyjątkiem zespołu łamliwego chromosomu X). Wydaje się jednak, że szczególna podatność na złamania, występujące w określonych punktach chromosomów, może odgrywać pewną rolę w onkogenezie. Pęknięcia chromosomów mogą inaktywować geny lub – z powodu niestabilności genomowej – mogą ułatwiać amplifikacje lub delecje. Wykazano, że miejsca łamliwe związane ze zmianami chromosomowymi w raku pęcherza moczowego, nie angażują genów powiązanych z procesem nowotworzenia. Prawie 45% aberracji chromosomowych w raku pęcherza moczowego nie jest związane z typowymi miejscami łamliwymi [55].

Poszukiwanie regionów amplifikowanych lub ulegających delecji z zastosowaniem techniki mikromacierzy, pozwala na bardzo precyzyjne zlokalizowanie zaangażowanych obszarów genomowych. W grupie pierwotnych guzów pęcherza moczowego zidentyfikowano onkogeny, które uległy amplifikacji: *E2F3* (region 6p22.3), *EGFR* (7p11.2), *FGFR1* (8p12), *CMYC* (8q24), *CCND1/EMS/INT2* (11q13), *MDM2* (12q14.3-q15), *ERBB2* (17q12), *JUNB* (19p13.2), *CCNB* (11q13.11) i *CYP24* (20q13.2) oraz homozygotyczne delecje w regionach: 9p21.3 (*CDKN2A/p16*), 8p23.1 i 11p13 (*TRAF6*). Jak do tej pory nie zaobserwowano jednak znaczących związków między stopniem i stadium zaawansowania guza a zmianami w liczbie kopii poszczególnych genów [56].

Genem przypuszczalnie zaangażowanym w rozwój raka pęcherza moczowego jest, zlokalizowany w regionie 1p36.33 gen *p73*, będący homologiem *p53*. Porównanie ekspresji genu *p73* w komórkach guza i sąsiadującego prawidłowego nabłonka wykazało ogromną nadekspresję *p73* w 95% analizowanych przypadków raka pęcherza moczowego. Nie wykryto mutacji *p73* w pierwotnych guzach pęcherza i liniach komórkowych wywodzących się z raka pęcherza moczowego, więc gen ten nie może być genem supresorowym zaangażowanym w karcinogenezę. Jednak bardzo wysoki poziom ekspresji w komórkach guza wskazuje, że odgrywa on ważną rolę w dalszych etapach rozwoju raku pęcherza [57].

W regionie 3p25 znajduje się onkogen *RAF-1*, którego duplikacja może odgrywać rolę w patogenezie. Podobnie delecja fragmentu krótkiego ramienia chromosomu 11 z punktem pęknięcia w prążku 11p15 może zmieniać ekspresję genów zlokalizowanych w tym regionie [8]. Również na chromosomie 4 w regionie p11-15, na krótkim ramieniu chromosomu 5, na długim ramieniu chromosomu 5 w regionie q15-23, na chromosomie 10 w q24-26 i na chromosomie 18 w regionie q12-23 mogą znajdować się geny zaangażowane w progresję raka pęcherza moczowego. Jednak do tej pory nie zidentyfikowano genów odpowiedzialnych za rozwój i progresję raka pęcherza moczowego, których obecność zakłada się w opisanych regionach [28].

W komórkach raka pęcherza moczowego i liniach komórkowych wywodzących się z raka pęcherza stwierdzono nadekspresję białka *E2F3*, spowodowaną amplifikacją genu *E2F3*, zlokalizowanego w regionie 6p22 [58]. W ponad 30% badanych TCC wykazano nadekspresję

białka E2F3, związaną z utratą funkcji pRB. Amplifikacja *E2F3* jest związana z inwazyjnym fenotypem i wysokim stopniem zaawansowania. Nie stwierdza się jej w guzach niskiego stopnia. Wydaje się, że ekspresja tego genu aktywuje proliferację komórek w guzach pęcherza moczowego. Dlatego stwierdzenie amplifikacji *E2F3* może być przydatnym narzędziem w rozróżnianiu guzów inwazyjnych i nieinwazyjnych [59, 60].

Genem supresorowym, inaktywowanym również w nowotworach piersi, prostaty, zespole Cowden'a jest leżący w regionie 10q23 gen *PTEN/MMAC1* (*phosphate and tensin homolog deleted on chromosome ten/mutated in multiple advanced cancers 1*). Mutacje tego genu stwierdzono jedynie w 5% badanych pierwotnych guzów pęcherza moczowego, a jego inaktywacja jest spowodowana prawdopodobnie innym mechanizmem niż delecją [61].

W regionie 20q11 położony jest onkogen *CDC91L1* (*PIG-U*), którego nadekspresję stwierdzono zarówno w badaniach na materiale linii komórkowych wywodzących się z raka pęcherza, jak i pierwotnych guzów pęcherza. Nadekspresja *CDC91L1* występuje w ponad 30% analizowanych linii komórkowych i guzów pęcherza moczowego, co sugeruje, że amplifikacja locus 20q11 może być związana z procesem karcinogenezy guzów pęcherza moczowego [62].

Określanie markerów nawrotu

Rak pęcherza moczowego charakteryzuje się bardzo wysoką częstością nawrotów. Pochodzenie guzów nawrotowych nie jest jasne. Aby stwierdzić czy są one mono- czy poliklonalne, Dalbagni i wsp. [17] analizowali mutacje genu *TP53*. W prawidłowym pod względem morfologicznym nabłonku pęcherza moczowego nie ujawniono ekspresji *TP53*, ale była ona obecna we wczesnych stadiach nowotworowych. W połowie badanych przypadków wykryto identyczne mutacje genu *p53*, co wskazuje na to, że komórki guza pierwotnego przetrwały i dały nawroty. Identyczna mutacja guza pierwotnego i guzów nawrotowych potwierdza monoklonalną naturę guzów.

Ze względu na wysoką częstość nawrotów raka pęcherza moczowego stworzono wiele testów, mających na celu wykrycie markerów przepowiadających możliwość nawrotu i progresji. Jednym z takich testów jest komercyjnie dostępny test UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kit (Vysis), który określa aneuploidię chromosomów 3, 7 i 17 oraz utratę regionu 9p21 w komórkach uzyskanych z osadu moczu. Badanie to przeprowadzane jest w laboratoriach cytogenetycznych przy użyciu techniki FISH. Przedstawiono kilka prac, w których wskazuje się na wysoką wrażliwość i swoistość tego testu w wykrywaniu nawrotów raka przejściowokomórkowego [47-52, 54, 63, 64]. Zgodnie z wytycznymi EAU (European Association of Urology, 2005) test ten jest obecnie rekomendowany do stosowania zarówno w zakresie diagnozy jak i monitorowania nawrotów raka pęcherza moczowego [64]. Wykazano wysoką wrażliwość testu UroVysion w porównaniu z testem BTASat i cytologią oraz swoistość, która była porównywalna ze swoistością klasycznej cytologii. Poza tym

badanie FISH ujawniło prawie połowę nawrotowych guzów pęcherza, zanim zostały wykryte badaniem cystoskopowym [49, 50, 63].

Wysoką wrażliwość i swoistość wykazano również w zestawieniu testu UroVysion z innymi np.: ImmunoCyt, LewisX, NMP22, UBC Rapid, Accu-DX, CYFRA-21, HA-HAase, BLCA-4, Quanticyt czy analiza mikrosatelitów. Na etapie prób najbardziej obiecujące wydają się być testy: CYFRA-21, analiza mikrosatelitów, LewisX, NPM22, gdyż charakteryzują się bardzo wysoką wrażliwością i swoistością. Jednak żaden z dostępnych testów nie jest w stanie zastąpić cystoskopii i badania cytologicznego, ale powinny być one stosowane jako uzupełnienie badań osadu moczu w okresie remisji [51, 54, 64, 65]. Niezbędne są dalsze badania, które pozwolą określić przydatność testów w praktyce klinicznej i tym samym zmniejszyć ilość kontrolnych cystoskopii.

Poszukiwanie markerów inwazyjności

Istnieje duże podobieństwo między zmianami genetycznymi w komórkach guza pierwotnego i w guzach przerzutowych u tego samego pacjenta. Te dane potwierdzają klonalne pochodzenie guzów przerzutowych w raku pęcherza moczowego [34]. Z analiz cytogenetycznych wynika, że kariotyp okołodiploidalny w guzach pęcherza jest związany z niższą inwazyjnością niż kariotypy tri- lub tetraploidalne. Tak więc poliploidia jest czynnikiem prognostycznym, wskazującym na bardzo wysokie ryzyko nawrotu i progresji guza [8, 9]. Poza tym z ryzykiem nawrotów związane są specyficzne aberracje chromosomowe, np. duplikacja krótkiego ramienia chromosomu 3, delecja krótkiego ramienia chromosomu 11 i trisomia 7 [8].

Dodatkowe kopie chromosomu 17 są stwierdzane głównie w zaawansowanych stadiach raka pęcherza moczowego i zjawisko to świadczy o poliploidyzacji komórek guza. Wydaje się również, że często wykrywane mutacje i delecje *p53* związane są raczej z wysokim stopniem zaawansowania i inwazyjnością guza [12, 66-68]. Utrata zarówno *p53* jak i *RB* jest wysoce istotnym czynnikiem progresji, a zmiany ekspresji *p16* i *p53* znacząco podwyższają ryzyko progresji [27, 34, 37, 66].

Delecje długiego ramienia chromosomów 6, 10 i 18 i krótkiego ramienia chromosomów 4, 8 i 14 występują często w guzach inwazyjnych, naciekających mięśniówkę.

Podsumowanie

W ostatniej dekadzie prowadzono szeroko zakrojone badania nad genetycznymi mechanizmami powstawania i rozwoju raka pęcherza moczowego. Jak dotąd wykryto i opisano aberracje dotyczące liczby kopii poszczególnych chromosomów i ich regionów, a także podjęto próby w typowania genów, zaangażowanych w procesie powstawania i rozwoju tego nowotworu.

Wyniki dotychczasowych badań pozwoliły na osiągnięcie istotnego postępu w skuteczności wykrywania nowotworu pęcherza moczowego i jego nawrotów. Zaowocowały one powstaniem nieinwazyjnych testów, pozwa-

lających na szybkie i skuteczne wykrycie nawrotów choroby. Dzięki zastosowaniu techniki FISH możliwe jest szybkie wykrycie obecności komórek niosących aberracje typowe dla guza pęcherza moczowego, tak w materiale biopsji, jak i w komórkach uzyskanych z osadu moczu pacjenta. Możliwość łatwego wykonania takich wstępnych badań, pozwala na szybkie podjęcie dalszych decyzji terapeutycznych, co może być kluczowe dla ostatecznego powodzenia leczenia.

Obecnie prowadzone prace nad identyfikacją zaburzeń genetycznych związanych z progresją i inwazyjnością guzów pęcherza moczowego, zmierzają do wyselekcjonowania genetycznych markerów prognostycznych. Osiągnięcie sukcesu w tym zakresie jest ważne nie tylko dla celów poznawczych, ale też może mieć istotne konsekwencje praktyczne.

Z punktu widzenia lekarza i jego pacjenta najważniejsze są: wczesna diagnostyka, łatwiejsze i bardziej precyzyjne testy laboratoryjne, a w dalszej perspektywie wprowadzenie nowej generacji leków o swoistym działaniu przeciwnowotworowym. Tak więc praktycznym celem prowadzonych badań teoretycznych jest dostarczenie wydajnych narzędzi, umożliwiających efektywne diagnozowanie, a następnie zastosowanie właściwego, skuteczniejszego leczenia choroby, szczególnie w przypadkach nawrotowych.

Mgr Anna Pastwińska
Samodzielna Pracownia Cytogenetyki
Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie
w Warszawie

Piśmiennictwo

- Rowley JD. A new consistent abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-3.
- de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G i wsp. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1982; 300: 765-7.
- Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM i wsp. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 1986; 233: 212-4.
- Drucker BJ, Tamura S, Buchdunger E i wsp. Effects of a selective inhibitor of the ABL tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells. *Nature Med* 1996; 2: 561-6.
- Savage SG, Antman KH. Imatinib mesylate – a new oral targeted therapy. *N Engl J Med* 2002; 346: 683-93.
- Ruka W, Rutkowski P, Nowecki Z i wsp. Imatinib mesylate – inhibitor kinazy tyrozynowej w leczeniu nowotworów zrębu przewodu pokarmowego – gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Współcz Onkol* 2002; 6: 562-9.
- Mitelman F, Mertens F, Johansson B. Prevalence estimates of recurrent balanced cytogenetic aberrations and gene fusions in unselected patients with neoplastic disorders. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 43: 350-66.
- Babu VR, Lutz MD, Miles BJ i wsp. Tumor behavior in transitional cell carcinoma of the bladder in relation to chromosomal markers and histopathology. *Cancer Res* 1987; 47: 6800-5.
- Smeets W, Pauwels R, Laarakkers L i wsp. Chromosomal analysis of bladder cancer. III. Nonrandom alterations. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 29: 29-41.
- Fadl-Elmula I, Gorunova L, Mandahl N i wsp. Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29: 256-65.
- Fadl-Elmula I, Kytola S, Pan Y i wsp. Characterization of chromosomal abnormalities in uroepithelial carcinomas by G-banding, spectral karyotyping and FISH analysis. *Int J Cancer* 2001; 92: 824-31.
- Fadl-Elmula I. Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. *Cell & Chromosome* 2005; 4: 1.
- Didkowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W i wsp. *Nowotwory złośliwe w Polsce*. Warszawa: Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie; 2002.
- Pawlicki M, Siedlecki P. Nowotwory układu moczowo-płciowego. W: *Onkologia kliniczna*, red. Krzakowski M. Warszawa: Borgis Wydawnictwo Medyczne; 2001; t. 2, s. 254-64.
- Eble JN, Sauter G, Epstein IJ i wsp. *WHO classification of tumors: tumors of the urinary system and male genital organs*. Berlin: Springer; 2004.
- Sobin LH, Wittekind CH. *TNM classification of malignant tumors*. 6th edition. New York: Willey-Liss, Weinheim; 2002.
- Dalbaghni G, Ren ZP, Herr H i wsp. Genetic alterations in TP53 in recurrent urothelial cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2797-801.
- Cheng L, Gu J, Ulbright TM i wsp. Precise microdissection of human bladder carcinomas reveals divergent tumor subclones in the same tumor. *Cancer* 2002; 94: 104-10.
- Simon R, Eltze E, Schäfer KL i wsp. Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Res* 2001; 61: 355-62.
- Steidl C, Simon R, Bürger H i wsp. Pattern of chromosomal aberrations in urinary bladder tumours and adjacent urothelium. *J Pathol* 2002; 198: 115-120.
- Stoehr R, Zietz S, Burger M i wsp. Deletions of chromosomes 9 and 8p in histologically normal urothelium of patients with bladder cancer. *Eur Urol* 2005; 47: 58-63.
- Atkin NB, Baker MC. Cytogenetic study of ten carcinomas of the bladder: involvement of chromosomes 1 and 11. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15: 253-68.
- Berger CS, Sandberg AA, Todd IAD i wsp. Chromosomes in kidney, ureter and bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23: 1-24.
- Vanni R, Scarpa RM, Nieddu M i wsp. Cytogenetic investigation on 30 bladder carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 30:35-42.
- Gibas Z, Gibas L. Cytogenetics of bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 95: 108-15.
- Halachmi S, Madjar S, Moskowit B i wsp. Genetic alterations in bladder cancer. *Cancer J* 1998; 11: 86-8.
- Pycha A, Mian C, Posch B i wsp. Numerical chromosomal aberrations in muscle invasive squamous cell and transitional cell cancer of the urinary bladder: an alternative to classic prognostic indicators? *Urology* 1999; 53: 1005-10.
- Richter J, Wagner U, Schraml P i wsp. Chromosomal imbalances are associated with a high risk of progression in early invasive (pT1) urinary bladder cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 5687-91.
- Stamouli MI, Panani AD, Ferti AD i wsp. Detection of genetic alterations in primary bladder carcinoma with dual-color and multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics Cytogenetics* 2004; 149: 107-13.
- Bartlett JMS, Watters AD, Ballantyne SA i wsp. Is chromosome 9 loss a marker of disease recurrence in transitional cell carcinoma of the urinary bladder? *Br J Cancer* 1998; 77: 2193-8.
- Richter J, Beffa L, Wagner U i wsp. Pattern of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1998; 153: 1615-21.
- Koo SH, Kwon KC, Ihm CH i wsp. Detection of genetic alterations in bladder tumors by comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 110: 87-93.
- Zhao J, Richter J, Wagner U i wsp. Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasm (pTa). *Cancer Res* 1999; 59: 4658-61.
- Reznikoff CA, Sarkar S, Jülicher KP i wsp. Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol Oncol* 2000; 5: 191-203.
- Höglund M, Säll T, Heim S i wsp. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways in transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 8241-46.
- Obermann EC, Junker K, Stoehr R i wsp. Frequent genetic alterations in flat urothelial hyperplasias and concomitant papillary bladder cancer as detected by CGH, LOH and FISH analyses. *J Pathol* 2003; 199: 50-7.
- Hitchings AW, Kumar M, Jordan S i wsp. Prediction of progression in pTa and pT1 bladder carcinomas with p53, p16 and pRB. *Br J Cancer* 2004; 91: 552-7.

38. Gibas Z, Prout GR, Connolly JG i wsp. Nonrandom chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1984; 44: 1257-64.
39. Williams SV, Sibley KD, Davies AM i wsp. Molecular genetic analysis of chromosomes 9 candidate tumor-suppressor loci in bladder cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34: 86-96.
40. Czerniak B, Chaturvedi V, Li L i wsp. Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 9 in progression of human urinary bladder neoplasia: implications for a genetic model of multistep urothelial carcinogenesis and early detection of urinary bladder cancer. *Oncogene* 1999; 18: 1185-96.
41. Balázs M, Carroll P, Kerschmann R i wsp. Frequent homozygous deletion of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (MTS1, p16) in superficial bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19: 84-9.
42. le Frere-Belda MA, Cappellen D, Daher A i wsp. p15^{INK4b} in bladder carcinomas: decreased expression in superficial tumours. *Br J Cancer* 2001; 85: 1515-21.
43. Tsutsumi M, Tsai YC, Gonzalgo ML i wsp. Early acquisition of homozygous deletions of p16/p19 during squamous cell carcinogenesis and genetic mosaicism in bladder cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3021-7.
44. van Tilborg AAG, Groenfeld LE, van der Kwast TH i wsp. Evidence for two candidate tumour suppressor loci on chromosome 9q in transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder but no homozygous deletions in bladder tumour cell lines. *Br J Cancer* 1999; 80: 489-94.
45. Simoneau M, Aboukassim TO, LaRue H i wsp. Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31. *Oncogene* 1999; 18: 157-63.
46. Shao L, Lerner SL, Bondaruk J i wsp. Specific chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes are associated with risk of bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 41: 379-89.
47. Inoue T, Nasu Y, Tsushima T i wsp. Chromosomal numerical aberrations of exfoliated cells in the urine detected by fluorescence in situ hybridization: clinical implication for the detection of bladder cancer. *Urol Res* 2000; 28: 57-61.
48. Bubendorf L, Grilli B, Sauter G i wsp. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 79-86.
49. Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G i wsp. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol* 2002; 168: 1950-4.
50. Placer J, Espinet B, Salido M i wsp. Clinical utility of a multiprobe FISH assay in voided urine specimens for the detection of bladder cancer and its recurrences, compared with urinary cytology. *Eur Urol* 2002; 42: 547-52.
51. Tinzi M, Marberger M. Urinary markers for detecting bladder cancer. *EAU Update Series* 2003; 1: 64-70.
52. Skacel M, Fahmy M, Brainard JA i wsp. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detected transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J Urol* 2003; 169: 2101-5.
53. Little B, Hughes A, Young MRA i wsp. Use of polymerase chain reaction analysis of urinary DNA to detect bladder carcinoma. *Urol Oncol* 2005; 23: 102-7.
54. van Rhijn BWG, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 2005; 47: 736-48.
55. Moriarty HT, Webster LR. Fragile sites and bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 140: 89-98.
56. Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S i wsp. Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 2872-80.
57. Yokomizo A, Mai M, Tindall DJ i wsp. Overexpression of the wild type p73 gene in human bladder cancer. *Oncogene* 1999; 18: 1629-33.
58. Feber A, Clark J, Goodwin G i wsp. Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene* 2004; 23: 1627-30.
59. Bruch J, Schultz WA, Häussler J i wsp. Delineation of the 6p22 amplification unit in urinary bladder carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2000; 60: 4526-30.
60. Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P i wsp. E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene* 2004; 23: 5616-23.
61. Cairns P, Evron E, Okami K i wsp. Point mutation and homozygous deletion of PTEN/MMAC1 in primary bladder cancer. *Oncogene* 1998; 16: 3215-8.
62. Guo Z, Linn JF, Wu Gi. CDC91L1 (PIG-U) is a newly discovered oncogene in human bladder cancer. *Nature Medicine* 2004; 10: 374-81.
63. Varella-Garcia M, Akduman B, Sunpaweravong P i wsp. The UroVysion fluorescence in situ hybridization assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer. *Urol Oncol* 2004; 22: 16-9.
64. van der Meijden APM, Sylvester R, Oosterlinck W i wsp. EAU guidelines on the diagnosis and treatment of urothelial carcinoma in situ. *Eur Urol* 2005; 48: 363-71.
65. Pycha A, Lodde M, Comploj E i wsp. Intermediate-risk urothelial carcinoma: an unresolved problem? *Urology* 2004; 63: 472-5.
66. Gallucci M, Guadagni F, Marzano R i wsp. Status of the p53, RB1, and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9, and 17 in advanced bladder cancer: correlation with adjacent mucosa and pathological parameters. *J Clin Pathol* 2005; 58: 367-71.
67. Hartmann A, Schlake G, Zaak D i wsp. Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder. *Cancer Res* 2002; 62: 809-18.
68. Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC i wsp. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991; 252: 706-9.

Otrzymano: 12 grudnia 2005 r.

Przyjęto do druku: 20 lutego 2006 r.