

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК [575.224+575.23]:616.62-006

**СМАЛЬ**  
**Маргарита Петровна**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ У НАСЕЛЕНИЯ БЕЛАРУСИ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.07 – молекулярная генетика

Минск, 2016

Работа выполнена в ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

**Научный руководитель:**

**Гончарова Роза Иосифовна**

доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник лаборатории  
криоконсервации генетических ресурсов ГНУ  
«Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

**Официальные оппоненты:**

**Давыденко Олег Георгиевич**

доктор биологических наук, профессор, член-  
корреспондент НАН Беларуси, заведующий  
лабораторией нехромосомной наследственности  
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН  
Беларуси»

**Державец Лилия Александровна**

кандидат биологических наук, заведующая  
клинико-диагностической лабораторией ГУ  
«РНПЦ онкологии и медицинской радиологии  
им. Н.Н. Александрова»

**Оппонирующая организация:** Белорусский государственный университет

Защита состоится 7 апреля 2016 г. в 10.00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.31.01 при ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» по адресу 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.

Тел.: (+375 17) 294 91 79, факс: (+375 17) 284 19 17, e-mail: T.Kuzhir@igc.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Автореферат разослан 5 марта 2016 г.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций,  
доктор биологических наук

Т.Д. Кужир

## ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) занимает 9-ое место по частоте встречаемости в мире [J.A. Witjes et al., 2013]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ежегодно регистрируется приблизительно 430 000 новых случаев и 165 000 смертей от злокачественных новообразований мочевого пузыря [B.W. Stewart, C.P. Wild, 2014]. В 2012 г. в Республике Беларусь число вновь выявленных случаев РМП насчитывало 1216, что составило 2,8% в структуре всех онкологических заболеваний [А.Е. Океанов и др., 2013].

РМП представляет собой гетерогенную группу злокачественных новообразований, 90% из которых являются переходноклеточными, или уротелиальными, карциномами. Более половины всех выявляемых опухолей мочевого пузыря локализируются в пределах слизистого (T<sub>a</sub>, T<sub>is</sub>) или подслизистого слоя (T<sub>1</sub>) и относятся к РМП без мышечной инвазии (РМП БМИ). У остальных пациентов регистрируется мышечно-инвазивный РМП (МИ РМП) (T<sub>≥2</sub>), характеризующийся более агрессивным течением и высоким уровнем смертности. Несмотря на относительно благоприятный прогноз для пациентов с РМП БМИ, 50–80% опухолей рецидивируют и 10–25% прогрессируют в мышечно-инвазивный рак [F. De Braud et al., 2002]. Применяемые в настоящее время клинико-патологические показатели для оценки прогноза клинического течения РМП не позволяют с точностью определять биологическое поведение опухолей и предсказывать отдаленные результаты лечения. В связи с этим возникает необходимость поиска дополнительных прогностических маркеров. Наиболее перспективными могут быть молекулярно-генетические маркеры, в частности, мутации в протоонкогенах и генах-супрессорах опухолей, а также паттерны метилирования промоторных областей специфичных для РМП генов, лежащие в основе процесса злокачественной трансформации клетки.

Значение мутаций генов *FGFR3*, *TP53* и генов семейства *RAS*, а также аномального метилирования гена *RUNX3* для предсказания прогноза РМП все еще остается неясным. В геномах опухолей мочевого пузыря часто встречаются молекулярные изменения этих генов, приводящие к нарушениям основных клеточных процессов, ответственных за поддержание гомеостаза уротелиальных клеток, включая контроль клеточного цикла, апоптоз, клеточный рост, сигнальную трансдукцию и регуляцию экспрессии генов [A.P. Mitra, R.J. Cote, 2009]. Комплексное изучение молекулярных нарушений данных генов в проспективном исследовании белорусских пациентов с РМП, а также понимание их роли в развитии и прогрессии уротелиальной карциномы позволят улучшить точность прогноза клинического течения данного онкологического заболевания, оптимизировать тактику лечения, и, как следствие, повысить эффективность терапии и сохранить качество жизни пациентов.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Связь работы с крупными научными программами и темами

Диссертационная работа выполнялась в рамках задания 02.06 «Разработать новый метод оценки прогноза клинического течения рака мочевого пузыря посредством комплексного анализа клинико-морфологических параметров опухоли и молекулярно-генетического статуса гена *FGFR3*» ГНТП «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики», подпрограммы «Онкология» (2010-2014 гг., № госрегистрации 20101060) и проекта БРФФИ «Мутации генов семейства *RAS* и статус метилирования генов *HOXA9* и *SOX1* при раке мочевого пузыря» (2015–2017гг., № госрегистрации 20150917).

Диссертационная работа соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 гг., отраженным в постановлении Совета министров РБ № 585 от 19 апреля 2010 г., в пунктах 3.6: «Идентификация и картирование генов; паспортизация, маркирование, идентификация, селекция и создание сельскохозяйственных растений, животных и микроорганизмов с помощью ДНК-технологий; ДНК-технологии и генно-инженерные методы в диагностике и лечении заболеваний человека и сельскохозяйственных животных» и 4.2: «Новые технологии профилактики, диагностики, лечения и реабилитации сердечно-сосудистых, онкологических и других социально значимых заболеваний».

### Цели и задачи исследования

**Цель работы:** определить профиль молекулярно-генетических изменений, ассоциированных со злокачественными новообразованиями мочевого пузыря у белорусских пациентов, и оценить возможность их использования в качестве молекулярных маркеров для прогноза клинического течения болезни.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Определить частоту и спектр мутационной изменчивости протоонкогенов *FGFR3* и семейства *RAS*, а также гена-супрессора опухолевого роста *TP53* в геномах опухолей мочевого пузыря;
2. Изучить статус метилирования промоторной области гена *RUNX3* в опухолевой ткани пациентов с РМП, а также в клетках нормального уротелия лиц без онкопатологии;
3. Провести анализ связи молекулярных нарушений изученных генов с демографическими характеристиками пациентов и клинико-морфологическими параметрами уротелиальных карцином;
4. Оценить прогностическое значение мутаций генов *FGFR3*, семейства *RAS*, *TP53* и гиперметилирования гена *RUNX3* в отношении отдаленных результатов лечения;
5. Провести комплексный анализ мутационной и эпигенетической изменчивости всех включенных в исследование генов и оценить совместное влияние их молекулярных нарушений на развитие уротелиальной карциномы.

**Объектом исследования** являлись образцы тотальной ДНК, опухолевого материала от пациентов, страдающих РМП, и образцы мочи лиц без онкопатологии.

**Предметом исследования** служили структурные и эпигенетические изменения генов, ассоциированные с развитием злокачественных новообразований мочевого пузыря.

### **Научная новизна**

Впервые в проспективном исследовании белорусских пациентов, страдающих РМП, проведен комплексный молекулярно-генетический анализ частоты и спектра мутационной изменчивости генов *FGFR3*, *TP53* и семейства *RAS*, а также статуса метилирования гена *RUNX3* в опухолевой ткани мочевого пузыря. Получены новые данные о противоположной ассоциации мутаций генов *HRAS* и *KRAS* с клиническими характеристиками уротелиальных карцином. Впервые установлены обратные статистически значимые зависимости между мутациями гена *FGFR3* и эпигенетическими изменениями гена *RUNX3*, а также определена ключевая роль последних в патогенезе МИ РМП. Полученные в работе данные легли в основу уточненной модели молекулярных путей патогенеза уротелиальной карциномы. Кроме того, впервые на белорусской популяции пациентов с РМП выявлены наиболее прогностически ценные молекулярные маркеры для предсказания прогрессирования опухоли и онкоспецифической выживаемости пациентов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Для геномов исследованных опухолей характерны мутационная изменчивость генов *FGFR3* (49,7%), семейства *RAS* (11,2%), *TP53* (19%), а также аномальное метилирование промоторной области гена *RUNX3* (63%), что отражает молекулярно-генетические особенности уротелиальных карцином у белорусских пациентов.

2. Молекулярные изменения генов *HRAS* и *KRAS* характеризуют альтернативные генетические пути патогенеза уротелиальной карциномы: мутации гена *HRAS* связаны с благоприятным, а *KRAS* – с агрессивным клиническим течением заболевания.

3. Развитие двух основных типов РМП обусловлено определенным спектром генетических и эпигенетических изменений: немышечно-инвазивные опухоли ассоциированы с мутациями в протоонкогенах *FGFR3* и *HRAS*, тогда как мышечно-инвазивные уротелиальные карциномы ассоциированы с молекулярными нарушениями генов *KRAS*, *TP53* и *RUNX3*.

4. Распределение пациентов на группы риска в зависимости от мутационного и/или эпигенетического статуса изученных генов позволяет значительно улучшить точность прогноза в отношении отдаленных результатов лечения. При РМП БМИ мутации гена *TP53* и гиперметилирование гена *RUNX3* являются независимыми факторами риска прогрессирования опухоли, тогда как мутации гена *FGFR3* ассоциированы с лучшей выживаемостью до

прогрессирования в подгруппе низкодифференцированных карцином. Мутации 8-го экзона гена *TP53* и гиперметилование гена *RUNX3* оказывают независимое влияние на снижение онкоспецифической выживаемости в случае РМП БМИ; мутации 5-го экзона гена *TP53* – в случае МИ РМП.

#### **Личный вклад соискателя**

Основные научные результаты диссертационной работы получены автором лично. Выделение ДНК, молекулярно-генетический анализ, статистическая обработка данных и их интерпретация выполнены самим диссертантом. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.б.н., профессору Гончаровой Р.И. как автору идеи; член-корр., профессору Красному С.А. и к.м.н. Ролевичу А.И. за формирование группы исследования, сбор образцов, помощь в статистической обработке данных, обсуждение полученных результатов; д.б.н. Кужир Т.Д. за консультации и помощь в подготовке диссертационной работы; всему коллективу лаборатории генетической безопасности и лаборатории криоконсервации генетических ресурсов за создание дружественной атмосферы и поддержку в ходе работы над диссертацией.

#### **Апробация результатов диссертации**

Результаты диссертационной работы были представлены на 4-ой Международной конференции молодых ученых «Molecular biology: advances and perspectives» (Киев, 2011); Конференции онкоурологов стран СНГ «Актуальные вопросы диагностики и лечения местно-распространенного и метастатического рака почки, мочевого пузыря и предстательной железы» (Киев, 2012); VII Конгрессе Российского общества онкоурологов (Москва, 2012); Международных научных конференциях «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, 2012, 2015); EMBL конференции «Cancer Genomics» (Хайдельберг, 2013); Ежегодных конгрессах Европейской ассоциации урологии (Милан, 2013; Мадрид, 2015); 18-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2014); VIII Съезде онкологов и радиологов СНГ и Евразии (Казань, 2014); 6-ой Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике (Звенигород, 2014).

Результаты диссертационной работы используются в практической деятельности ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», а также в учебном процессе на кафедрах онкологии БГМУ и БелМАПО, что подтверждается актами внедрения.

#### **Опубликованность результатов диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 25 печатных работ, в том числе 6 статей в научных журналах, 18 тезисов в сборниках материалов конференций и 1 методические рекомендации. Объем публикаций в соответствии с пунктом 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь» – 3,5 авторских листа.

## Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 141 странице машинописного текста, состоит из введения, семи глав, заключения, библиографического списка и 4 приложений. Библиографический список включает 267 наименований использованных источников, в том числе 258 на иностранном языке. Диссертация иллюстрирована 27 таблицами и 33 рисунками.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Биологическим материалом для анализа служили образцы свежей и заключенной в парафин опухолевой ткани от пациентов с РМП, проходивших лечение в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова с 2010 по 2014 гг. Изучение мутационной изменчивости гена *FGFR3* проводилось на выборке из 433 пациентов (352 мужчин и 81 женщина) в возрасте от 31 до 93 лет (медиана – 68 лет). 249 и 247 пациентов из этой выборки включены в анализ мутаций генов семейства *RAS* и гена *TP53*, соответственно. Статус метилирования гена *RUNX3* изучен у 262 пациентов. Все случаи РМП классифицированы по системе TNM (2002). Степень дифференцировки опухолевой ткани (G) определялась гистологически по классификациям ВОЗ 1973 и 2004 гг. Рецидивирование и прогрессирование заболевания учитывалось только для группы пациентов с РМП БМИ. За местный рецидив принимали повторное появление в мочевом пузыре морфологически верифицированной уротелиальной карциномы в стадии T<sub>a</sub>, T<sub>1</sub> или T<sub>is</sub>. Прогрессирование опухолевого процесса устанавливалось в случае развития мышечно-инвазивной опухоли и/или регионарных либо отдаленных метастазов у пациентов, ранее получавших лечение по поводу РМП БМИ. Скорректированную (онкоспецифическую) выживаемость определяли по времени от момента постановки диагноза до смерти от РМП.

Для выявления специфичности аномального метилирования гена *RUNX3* при РМП была сформирована контрольная группа из 24 индивидуумов без онкопатологии (16 мужчин и 8 женщин) в возрасте от 27 до 79 лет (медиана – 63,5 лет). Материалом для анализа служили образцы мочи этих доноров (n=21) и тканевые пробы мочевого пузыря от пациентов с неподтвержденным диагнозом РМП (n=3).

Геномную ДНК выделяли из клеточного осадка мочи и тканевых проб посредством ферментативной обработки образцов протеиназой К и последующей фенол-хлороформной экстракции. Для определения мутаций генов *FGFR3* и семейства *RAS* использовали метод SNaPshot. Мутации в 5–8-м экзонах гена *TP53* выявляли с помощью анализа конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP) и прямого секвенирования. Статус метилирования гена *RUNX3* определяли методом метил-специфической ПЦР,

для чего образцы ДНК предварительно подвергали бисульфитной модификации с использованием набора EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов прикладных программ SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc.) и STATISTICA 10.0 (Statsoft). Статистическую значимость различий между исследуемыми группами анализировали с помощью U-теста Манна-Уитни, теста  $\chi^2$  или двустороннего точного критерия Фишера. Выживаемость определяли по методу Каплана-Мейера, значимость различий оценивали при помощи log-rank теста. Влияние потенциальных факторов риска на отдаленные результаты лечения оценивали с помощью моно- и мультивариантного логистического регрессионного анализа, а также регрессионного анализа пропорциональных рисков Кокса. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### Мутационная изменчивость гена *FGFR3* в опухолях мочевого пузыря

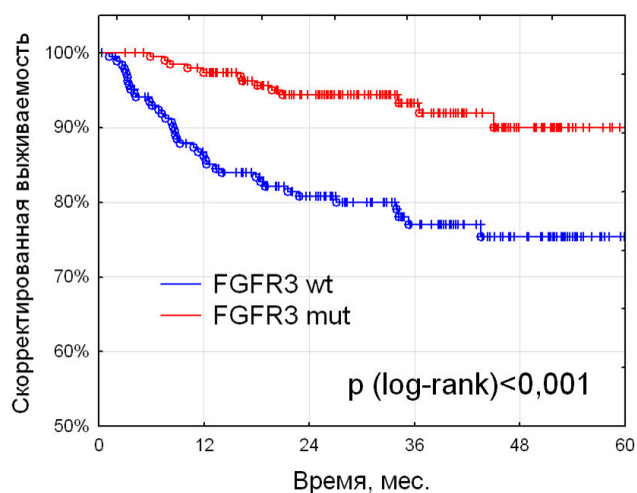
**Мутации гена *FGFR3* и их ассоциация с клинико-морфологическими характеристиками.** Активирующие мутации гена *FGFR3*, кодирующего рецептор фактора роста фибробластов, выявлены у 215 из 433 пациентов с уротелиальными карциномами, что составило 49,7%. У 202 пациентов обнаружены одиночные, у 13 – двойные мутации исследуемого гена. Достаточно большая выборка пациентов в нашем исследовании позволила идентифицировать практически все известные к настоящему времени миссенс-мутации данного гена в злокачественных новообразованиях мочевого пузыря: S249C, R248C, Y375C, G372C, S373C, A393E, K652M, K652E и G382R. Преобладающими являлись мутации S249C и Y375C, их частоты составили 64,5% и 14,5% от всех обнаруженных мутаций гена *FGFR3*, соответственно. Суммарно на долю мутаций в кодонах 248, 249 и 375, принадлежащих к горячим точкам мутирования гена *FGFR3* при РМП, приходилось 92,2%.

Анализ связи мутаций с основными демографическими характеристиками пациентов и клинико-патологическими параметрами опухоли выявил статистически значимую ассоциацию молекулярных изменений гена *FGFR3* с папиллярным характером роста, мультифокальностью, небольшими размерами опухоли, а также отсутствием метастазов ( $p \leq 0,001$ ) (таблица 1). Наши данные подтверждают ключевую роль мутаций гена *FGFR3* в развитии немышечно-инвазивных уротелиальных карцином, где их частота составила 63,2% по сравнению с таковой при МИ РМП (20,6%). Найдена сильная ассоциация между наличием мутаций гена *FGFR3*, с одной стороны, и низкой степенью распространения, а также высокой степенью дифференцировки опухоли ( $p < 0,001$ ), с другой стороны (таблица 1).

**Прогностическое значение мутаций гена *FGFR3* при РМП.** В зависимости от мутационного статуса гена *FGFR3* не выявлено статистически



значимых различий в безрецидивной выживаемости ( $p=0,56$ ) и выживаемости до прогрессирования ( $p=0,21$ ). В общей группе пациентов мутации гена *FGFR3* статистически значимо ассоциированы с лучшей онкоспецифической выживаемостью ( $p<0,001$ ) (рисунок 1): 3-летние показатели составили 93,2% (95%ДИ 89,3–97,1%) при наличии молекулярных изменений *FGFR3* и 77,0% (95%ДИ 70,3–83,7%) при их отсутствии. В многофакторном анализе прогностическую значимость для онкоспецифической выживаемости в общей группе пациентов проявили только клинические параметры: наличие метастазов



**Рисунок 1. – Онкоспецифическая выживаемость в зависимости от мутационного статуса гена *FGFR3***

прогрессирования при наличии мутации составила 100% по сравнению с 75,2% (95%ДИ 55,0–95,4%) при отсутствии мутации. Таким образом, нами показана связь мутаций гена *FGFR3* с благоприятным прогнозом клинического течения РМП в отношении прогрессирования низкодифференцированных опухолей и онкоспецифической выживаемости в общей группе пациентов.

### **Мутационная изменчивость генов семейства *RAS* при РМП**

**Спектр мутаций генов семейства *RAS* и их связь с клиническими параметрами.** Молекулярные изменения генов семейства *RAS*, продукты которых являются малыми гуанозинтрифосфатазами, выявлены в 28 из 249 уротелиальных карцином (11,2%). Из них на мутации гена *HRAS* приходилось 64,3%, *KRAS* – 28,6% и *NRAS* – 7,1%. Ни в одном образце не обнаружено двойных мутаций. Все молекулярно-генетические изменения представлены 13 трансверсиями (7 – G:C>T:A, 4 – A:T>T:A, 2 – G:C>C:G) и 15 транзициями (8 – G:C>A:T, 7 – A:T>G:C). В гене *HRAS* наиболее часто встречались мутации Q61L и Q61R, а в гене *KRAS* – G12D.

Мутации всех исследованных генов этого семейства достоверно чаще встречались у пациентов более молодого возраста ( $p<0,001$ , тест Манна-Уитни). Эта зависимость сохранялась и в случае анализа мутационной изменчивости генов *HRAS* ( $p=0,009$ ) и *KRAS* по отдельности ( $p=0,02$ ) (таблица 1). Нами не обнаружено

Таблица 1. – Мутации генов *FGFR3*, *HRAS*, *KRAS*, *TP53* и метилирование гена *RUNX3* в зависимости от клинических и демографических характеристик

Характеристика	Признак	Мутация <i>FGFR3</i>	p	Мутация <i>HRAS</i>	p	Мутация <i>KRAS</i>	p	Мутация <i>TP53</i>	p	Метилирование <i>RUNX3</i>	p
Пол	м	170/352	0,24	13/195	0,55	7/195	1,0	36/195	0,66	134/208	0,34
	ж	45/81		5/54		1/54		11/52		31/54	
Возраст (непрерывный показатель)			0,07		<b>0,009</b>		<b>0,02</b>		0,9		<b>0,017</b>
Категория T	Ta	67/93		4/38		0/38		2/38		19/42	
	T1	121/209		13/130		4/130		11/128		80/132	
	T2	16/70	< <b>0,001</b>		<b>0,02</b>		0,43	13/42	< <b>0,001</b>	40/49	<b>0,007</b>
	T3	5/30		1/81		4/81		9/18		12/18	
	T4	6/31						12/21		14/21	
Наличие метастазов	Да	9/39		0/20	0,38	3/20	<b>0,019</b>	12/20	< <b>0,001</b>	14/20	0,48
	Нет	206/386	< <b>0,001</b>	18/229		5/229		35/227		144/235	
Размер опухоли	< 3 см	114/195	<b>0,001</b>	13/108	<b>0,013</b>	1/108	0,14	11/106	<b>0,003</b>	61/112	<b>0,014</b>
	≥ 3 см	101/238		5/141		7/141		36/141		104/150	
Степень дифференцировки (ВОЗ 1973)	G1	110/149		11/88		1/88		6/87		41/88	
	G2	90/184	< <b>0,001</b>	6/110	0,074	5/110	0,37	20/109	< <b>0,001</b>	80/114	< <b>0,001</b>
	G3	14/94		1/48		2/48		20/48		43/57	
Степень дифференцировки (ВОЗ 2004)	PUNLMP / Low grade	170/264	< <b>0,001</b>	17/149	<b>0,002</b>	6/149	0,48	11/147	< <b>0,001</b>	83/152	< <b>0,001</b>
	High grade	44/166		1/99	0,13	2/99	0,49	36/99	<b>0,021</b>	82/109	0,26
	Одиночная	64/167		10/95		4/95		25/95		59/101	
Характер роста опухоли	Множественная	147/260	< <b>0,001</b>	8/154		4/154		22/152		104/159	
	Папиллярная	196/324	< <b>0,001</b>	17/185	<b>0,049</b>	3/185	<b>0,028</b>	18/183	< <b>0,001</b>	116/193	0,12
Статус курения	Солидная/смешанная	18/106		1/64		5/64		29/64		48/68	
	Не курит	63/124		8/75		2/75		12/73		48/75	
	Курил ранее	66/139	0,82	4/70	0,39	1/70	0,40	14/70	0,85	47/74	0,94
	Курит	75/148		5/95		5/95		18/95		64/104	

Примечания:

1. в ячейках с числовыми значениями указано количество выявленных изменений к общему числу информативных случаев в группе;
2. p – уровень значимости, определенный с использованием U-теста Манна-Уитни для показателя «возраст», теста  $\chi^2$  при  $n \geq 10$  или двустороннего точного критерия Фишера в случае  $n < 10$  для остальных параметров

связи между всеми мутациями генов семейства *RAS* и патоморфологическими характеристиками. Однако при дифференцированном анализе отмечено, что мутации гена *HRAS* статистически значимо ассоциированы с такими благоприятными показателями, как низкая степень распространения, высокая степень дифференцировки, папиллярный характер роста и небольшие размеры опухоли ( $p < 0,05$ ) (таблица 1). Их частота в немышечно-инвазивных опухолях составила 10,1%, в мышечно-инвазивных – 1,2% ( $p = 0,009$ ). Мутации в гене *KRAS*, напротив, наблюдались чаще в более агрессивных уротелиальных карциномах, характеризующихся солидным характером роста и наличием метастазов ( $p < 0,05$ ) (таблица 1). Таким образом, нами впервые показана противоположная связь мутаций *HRAS* и *KRAS* с патоморфологическими характеристиками РМП.

#### ***Прогностическое значение мутаций генов HRAS и KRAS при РМП.***

Мутационный статус генов *HRAS* и *KRAS* не имел прогностического значения в отношении рецидивирования и прогрессирования опухоли ( $p > 0,2$ ). Вместе с тем, мутации *KRAS* были статистически значимо ассоциированы со сниженной онкоспецифической выживаемостью в общей группе пациентов ( $p = 0,004$ ), а также в подгруппе с РМП БМИ ( $p = 0,021$ ). Так, 3-летняя скорректированная выживаемость в общей группе пациентов при наличии молекулярных изменений *KRAS* составила 47,6% (95%ДИ 3,5–91,7%), а в группе без мутаций этого гена – 86,5% (95%ДИ 81,8–91,2%). Тем не менее, в многофакторном регрессионном анализе Кокса прогностическую значимость сохранил только клинический параметр – наличие метастазов (ОР 6,0; 95%ДИ 2,5–14,6;  $p < 0,001$ ).

Несмотря на то, что мутационный статус гена *HRAS* не представлял прогностическую ценность в отношении отдаленных результатов лечения ( $p > 0,05$ ), обращает на себя внимание 100%-ная выживаемость до прогрессирования, а также 100%-ная скорректированная выживаемость пациентов с уротелиальными карциномами, несущими мутации этого гена.

Таким образом, полученные данные дают основания полагать, что продукты генов семейства *RAS*, по-видимому, выполняют различные функции, а молекулярные изменения этих онкогенов характеризуют альтернативные пути патогенеза РМП: мутации *HRAS* ассоциированы с благоприятным, а *KRAS* – с агрессивным течением заболевания.

#### **Мутационная изменчивость гена TP53 в опухолях мочевого пузыря**

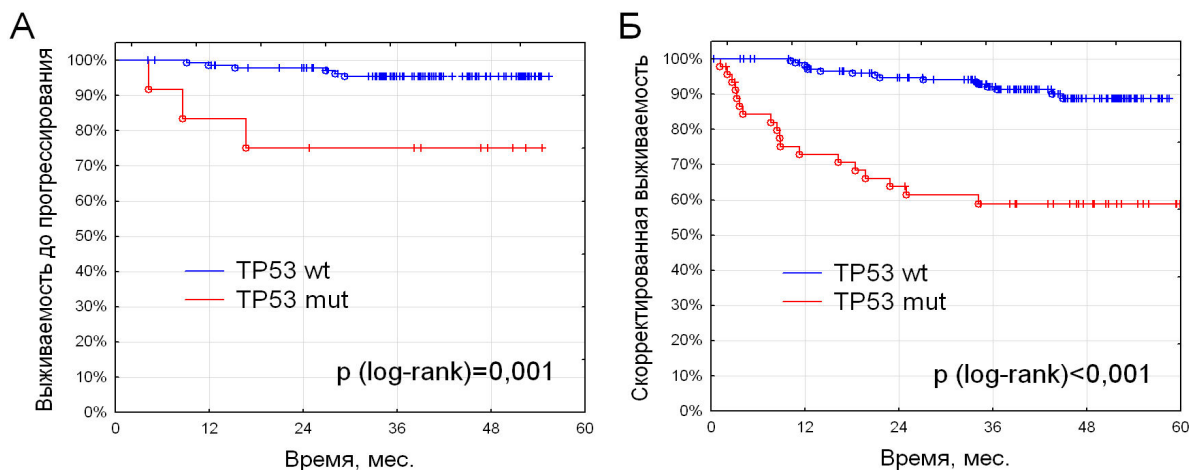
##### ***Мутации гена TP53 и их ассоциация с клиническими параметрами.***

Мутации гена *TP53*, продукт которого (p53) участвует в поддержании стабильности генома, выявлены в 47 из 247 уротелиальных карцином (19,0%), при этом в 5-м экзоне зарегистрировано 25%, в 6-м экзоне – 7,7%, в 7-м экзоне – 30,8% и в 8-м экзоне – 36,5% всех мутаций этого гена. У 42 пациентов обнаружены одиночные, у 5 – двойные мутации *TP53*. Значительная доля (44,2%) мутаций приходилась на кодоны 175, 220, 245, 248, 271, 273, 280 и 285,

являющиеся горячими точками мутирования гена *TP53* при РМП. Среди всех мутаций обнаружена 1 делеция (1,9%), 28 транзиций (53,8%) и 23 трансверсии (44,2%). В единичных случаях наблюдались нонсенс- и сайленс-мутации. Наиболее часто (42,3%) встречались G:C>A:T транзиции, около половины (45,4%) из которых составили мутации в CpG-динуклеотидах.

При изучении связи с клиническими параметрами обнаружена статистически значимая ассоциация мутаций гена *TP53* с большим размером опухоли, единичным и непиллярным характером роста опухоли, а также наличием регионарных и/или отдаленных метастазов (таблица 1). У пациентов с МИ РМП частота молекулярных изменений гена была существенно выше (42,0%) по сравнению с РМП БМИ (7,8%). Выявлена сильная ассоциация мутаций гена *TP53* с более высокой степенью распространения опухоли ( $p < 0,001$ ) и низкодифференцированными G3 опухолями ( $p < 0,001$ ) (таблица 1).

**Прогностическое значение мутаций гена *TP53* при РМП.** Нами не выявлено влияние мутационного статуса гена *TP53* на развитие рецидивов ( $p = 0,80$ ). В то же время, молекулярные изменения *TP53* статистически значимо ассоциированы с более низкими уровнями выживаемости до прогрессирования ( $p = 0,001$ ) (рисунок 2А). У пациентов с мутантным *TP53* прогрессирование отмечалось в 25,0% случаев, тогда как у пациентов с *TP53* дикого типа – в 4,3% наблюдений. В многофакторном анализе Кокса независимыми факторами риска прогрессирования РМП БМИ являлись мутации в гене *TP53* (ОР 16,7; 95%ДИ 3,24–85,69;  $p = 0,001$ ), наличие рецидивной опухоли (ОР 7,33; 95%ДИ 1,49–36,07;  $p = 0,014$ ), а также возраст пациентов (ОР 1,11; 95%ДИ 1,02–1,2;  $p = 0,017$ ).



**Рисунок 2. – Выживаемость до прогрессирования (А) и скорректированная выживаемость (Б) в зависимости от мутационного статуса гена *TP53***

Кроме того, в общей группе пациентов мутации гена *TP53* предсказывали более низкие уровни онкоспецифической выживаемости ( $p < 0,001$ ) (рисунок 2Б). 3-летняя скорректированная выживаемость у пациентов с молекулярными изменениями *TP53* составила 58,9% (95%ДИ 44,2–73,6%), у пациентов без мутаций – 92% (95%ДИ 87,9–96,1%). При отдельном анализе пациентов с

РМП БМИ и МИ РМП выявлено, что мутации в 8-м экзоне являются единственным независимым фактором риска смерти от РМП БМИ (ОР 20,29; 95%ДИ 3,2–126,9;  $p=0,001$ ), тогда как мутации в 5-м экзоне гена *TP53* оказывают независимое влияние на снижение онкоспецифической выживаемости в группе пациентов с МИ РМП (ОР 8,27; 95%ДИ 1,95–35,17;  $p=0,004$ ).

Использование мутационного статуса гена *TP53* в качестве дополнительного маркера прогноза позволит выделить группу пациентов с высоким риском неблагоприятного исхода заболевания, нуждающихся в более интенсивном лечении и тщательном наблюдении.

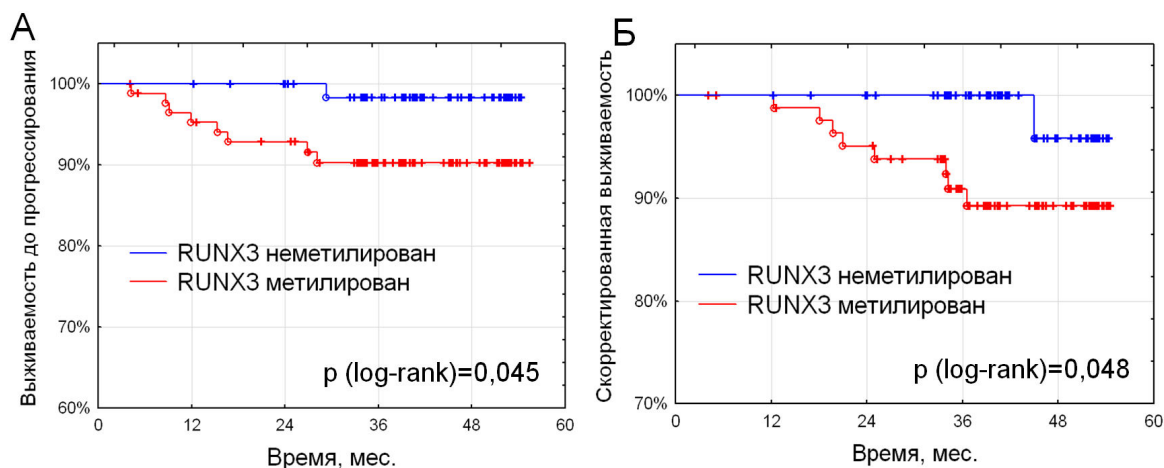
### **Метилирование гена *RUNX3* в опухолях мочевого пузыря**

**Метилирование гена транскрипционного фактора *RUNX3* в контрольной группе и у пациентов с РМП.** Для определения специфичности эпигенетических изменений гена *RUNX3* при РМП изучен статус метилирования промоторной области этого гена как в контрольной группе, так и в группе пациентов с РМП. Ни в одном образце контрольной группы не выявлено гиперметилирование гена *RUNX3*, тогда как в 165 образцах (63,0%) опухолевого материала наблюдались данные эпигенетические изменения. При статистическом анализе обнаружена значимая ассоциация аномального метилирования гена *RUNX3* с увеличением возраста пациентов ( $p=0,017$ , тест Манна-Уитни). Гиперметилирование *RUNX3* статистически значимо чаще наблюдалось в мышечно-инвазивных опухолях (75,0%) по сравнению с немышечно-инвазивными (56,9%) ( $p=0,004$ ). При этом наименьшая частота эпигенетических нарушений *RUNX3*, равная 45,2%, отмечалась при категории Та (таблица 1). Кроме того, выявлена ассоциация гиперметилирования исследуемого гена с опухолями низкой степени дифференцировки ( $p<0,001$ ) и больших размеров ( $p=0,014$ ) (таблица 1).

**Прогностическое значение статуса метилирования гена *RUNX3* при РМП.** При наличии гиперметилирования исследуемого гена наблюдалась тенденция к повышению числа рецидивов у пациентов с РМП БМИ ( $p=0,19$ ) и уровня смертности в общей группе пациентов ( $p=0,15$ ), однако различия не достигли статистической значимости. В то же время, установлены существенные различия в уровнях выживаемости до прогрессирования в зависимости от статуса метилирования гена *RUNX3* ( $p=0,045$ ) (рисунок 3А). У пациентов с эпигенетическими изменениями исследуемого гена прогрессирование отмечалось в 9,3% случаев, тогда как у пациентов с неметилированным геном – в 1,6% наблюдений. В мультивариантном анализе пропорциональных рисков Кокса независимыми факторами прогноза в отношении прогрессирования РМП БМИ являлись наличие рецидивной опухоли (ОР 6,4; 95%ДИ 1,53–27,04;  $p=0,011$ ) и статус метилирования гена *RUNX3* (ОР 9,1; 95%ДИ 1,06–78,35;  $p=0,044$ ).

Кроме того, обнаружено, что эпигенетические изменения исследуемого гена статистически значимо ассоциированы с низкой скорректированной

выживаемостью у пациентов с немышечно-инвазивными опухолями ( $p=0,048$ ) (рисунок 3Б). Как и в случае прогрессирования, многофакторный регрессионный анализ Кокса показал, что гиперметилирование гена *RUNX3* оказывает независимое влияние на снижение онкоспецифической выживаемости пациентов с РМП БМИ (ОР 9,44; 95%ДИ 1,14–77,95;  $p=0,037$ ). Можно заключить, что метилирование гена *RUNX3* характеризует группу пациентов, страдающих РМП БМИ, с высоким риском неблагоприятного исхода заболевания.



**Рисунок 3. – Выживаемость до прогрессирования (А) и скорректированная выживаемость (Б) в группе пациентов с РМП БМИ в зависимости от статуса метилирования гена *RUNX3***

### **Комплексный анализ мутационной изменчивости генов *FGFR3*, *TP53*, семейства *RAS* и эпигенетической изменчивости гена *RUNX3* в опухолях мочевого пузыря**

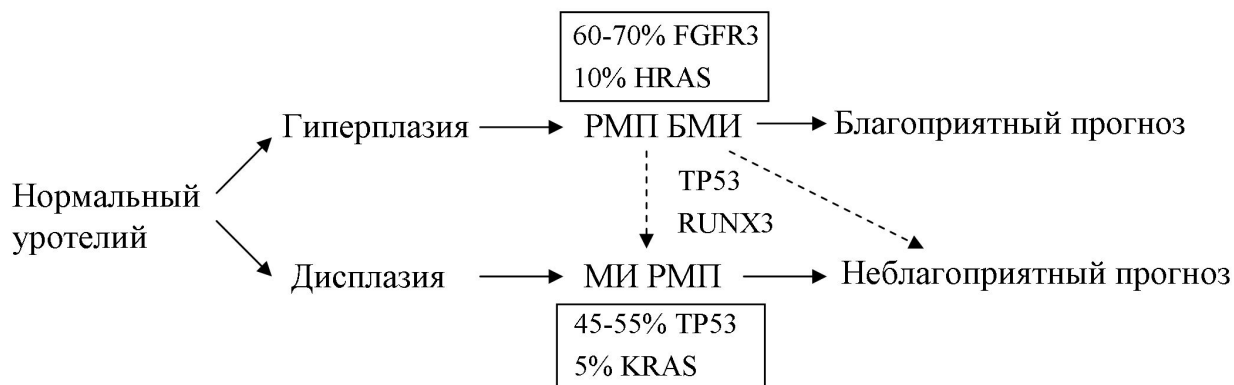
*Совместный анализ частоты мутаций генов *FGFR3*, *RAS*, *TP53* и метилирования гена *RUNX3* при РМП.* По меньшей мере, одно структурное изменение любого из генов *FGFR3*, *RAS* и *TP53* выявлено в 71,4% случаев. Ни в одном образце опухолевого материала не обнаружено одновременное наличие мутаций этих генов. Гиперметилирование гена *RUNX3* часто наблюдалось совместно с молекулярными изменениями других генов, но также обнаруживалось и при отсутствии мутаций (зарегистрировано в 74,3% опухолей с генотипом *FGFR3wt/RASwt/TP53wt*). Геномы опухолей, в которых отсутствуют мутации генов *FGFR3*, *RAS*, *TP53* и эпигенетические изменения *RUNX3*, составили всего 7,3%.

В нашем исследовании обнаружена статистически значимая обратная зависимость между частотами молекулярных изменений генов *FGFR3* и *TP53* ( $p=0,003$ ), *FGFR3* и *RUNX3* ( $p=0,002$ ). Мутации генов *FGFR3* и *HRAS*, а также *TP53* и *HRAS* были взаимоисключающими. Следует отметить отсутствие связи между молекулярными нарушениями генов *TP53* и *RUNX3*, несмотря на их значимую ассоциацию с одним и тем же агрессивным опухолевым фенотипом, что свидетельствует о разных механизмах влияния изменчивости данных генов на развитие МИ РМП.

В настоящее время принята модель альтернативных путей патогенеза РМП БМИ и МИ РМП, обусловленных мутациями в ключевых генах *FGFR3* и *TP53*, соответственно. Тем не менее, в нашей работе 38,8% опухолей не несли молекулярные изменения этих двух генов. 73,7% уротелиальных карцином с генотипом *FGFR3wt/TP53wt* имели метилированный ген *RUNX3*. Гиперметилирование *RUNX3* в уротелиальных карциномах с генотипом *FGFR3wt/TP53wt*, ассоциация эпигенетических нарушений с патоморфологическими показателями, характеризующими неблагоприятное клиническое течение заболевания, а также отсутствие их связи с мутациями гена *TP53* при обратной зависимости от частоты мутаций гена *FGFR3*, указывают на ключевую роль эпигенетических изменений гена *RUNX3* в патогенезе МИ РМП.

Взаимоисключающий характер мутационной изменчивости генов *FGFR3* и *HRAS*, а также ассоциация их молекулярных изменений с относительно благоприятным течением РМП, по-видимому, свидетельствуют об их одинаковом влиянии на регуляцию одного и того же сигнального пути, нарушение функционирования которого обуславливает развитие РМП БМИ.

Обобщая вышесказанное, следует отметить, что высокодифференцированные немышечно-инвазивные уротелиальные карциномы характеризуются повышенной частотой мутаций генов *FGFR3* и *HRAS*, тогда как в мышечно-инвазивных опухолях с высоким злокачественным потенциалом чаще встречаются мутации в генах *TP53*, *KRAS* и гиперметилирование гена *RUNX3*. Представленные данные позволяют расширить известную модель генетических путей развития РМП БМИ и МИ РМП (рисунок 4).



**В процентах указаны частоты молекулярных изменений соответствующих генов при РМП БМИ и МИ РМП**

**Рисунок 4. – Модель двух путей патогенеза РМП на основании представленных в настоящей работе данных**

В схеме патогенеза нами впервые показаны ассоциации мутаций генов *HRAS* и *KRAS* с РМП БМИ и МИ РМП, соответственно, а также вклад эпигенетических изменений гена *RUNX3* в развитие МИ РМП. Данная модель отражает комплексную молекулярно-генетическую природу уротелиальных карцином, а также наличие нескольких молекулярных подтипов в рамках двух

альтернативных путей патогенеза РМП.

**Значение комплекса мутационной и эпигенетической изменчивости исследуемых генов в предсказании отдаленных результатов лечения.**

Обнаружена значимая ассоциация гиперметилирования *RUNX3* с более низкими показателями безрецидивной выживаемости в подгруппах немышечно-инвазивных опухолей без мутаций гена *FGFR3* ( $p=0,03$ ), а также опухолей, характеризующихся наличием мутаций генов семейства *RAS* ( $p=0,035$ ).

Для повышения точности прогноза в отношении прогрессирования РМП БМИ в мышечно-инвазивную форму выделены три прогностические группы на основе комбинации молекулярной изменчивости генов *TP53* и *RUNX3*. Молекулярные нарушения этих генов, как указывалось выше, предсказывали прогрессирование заболевания и не были связаны между собой. Уротелиальные карциномы, принадлежащие к группе высокого риска (присутствие молекулярных нарушений обоих генов), прогрессировали с частотой 42,9%, тогда как в группах умеренного (наличие в опухолевой ткани мутации *TP53* или метилирования *RUNX3*) и низкого риска (опухоль без молекулярных изменений обоих генов) этот показатель составил соответственно 6,0% и 1,7% ( $p<0,001$ ). Согласно многофакторному анализу Кокса, наличие молекулярных изменений обоих генов является независимым фактором риска прогрессирования (ОР 341,9; 95%ДИ 14,62–7994,5;  $p<0,001$ ), причем прогностическая значимость сочетания молекулярных маркеров многократно превосходит значимость единственного клинического показателя – наличие рецидивной опухоли (ОР 9,51; 95%ДИ 1,66–54,6;  $p=0,012$ ).

Более низкие уровни скорректированной выживаемости пациентов с РМП БМИ, как уже упоминалось, статистически значимо ассоциированы с мутациями в генах *TP53*, *KRAS* и гиперметилированием *RUNX3*, между которыми не обнаруживалось каких-либо значимых зависимостей. Для более точного предсказания прогноза в отношении выживаемости при комбинации мутационного и эпигенетического статуса этих генов были также сформированы три прогностические группы: первая характеризовалась отсутствием молекулярных изменений всех трех генов, вторая – наличием одного молекулярного изменения и третья – присутствием двух или трех молекулярных нарушений. Трехлетняя онкоспецифическая выживаемость пациентов первой группы составила 100%, второй группы – 94,7% (95%ДИ 89,6–99,8%) и третьей группы – 59,3% (95%ДИ 23,0–95,6%) ( $p<0,001$ ). В мультивариантном анализе Кокса наличие двух или трех молекулярных изменений генов *TP53*, *KRAS* и/или *RUNX3* являлось единственным фактором, независимо влияющим на снижение онкоспецифической выживаемости пациентов с РМП БМИ (ОР 26,85; 95%ДИ 2,62–274,84;  $p=0,006$ ).

Для выявления предикторов метастатического РМП проведены логистические регрессионные анализы. В мультивариантной модели с учетом всех клинических и генетических показателей, проявивших статистическую значимость в моновариантном анализе, единственным фактором риска развития



метастазов являлось наличие мутации 5-го экзона гена *TP53* (отношение шансов 8,39; 95%ДИ 1,19–59,31;  $p=0,033$ ).

Таким образом, учет молекулярных изменений всех изученных генов наряду с классическими клинико-морфологическими параметрами прогноза позволяет значительно улучшить предсказание отдаленных результатов лечения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Одними из наиболее частых генетических нарушений в злокачественных новообразованиях мочевого пузыря у пациентов Беларуси являются активирующие мутации гена *FGFR3*, зарегистрированные в 49,7% случаев. Молекулярные изменения этого гена статистически значимо ассоциированы с папиллярным характером роста, небольшими размерами опухолей, низкими степенями распространения и злокачественности, а также отсутствием метастазов, что указывает на связь мутаций *FGFR3* с благоприятным течением болезни. В подтверждение этого выявлена ассоциация молекулярных изменений гена *FGFR3* со статистически значимо лучшим прогнозом в отношении прогрессирования низкодифференцированных немышечно-инвазивных уротелиальных карцином [1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 24].

2. У пациентов с РМП мутации генов семейства *RAS* наблюдались с частотой 11,2%, причем на мутации гена *HRAS* приходилось 64,3%, *KRAS* – 28,6% и *NRAS* – 7,1%. Нами впервые показаны противоположные зависимости между мутациями генов *HRAS* и *KRAS* и клиническими характеристиками РМП: мутации *HRAS* статистически значимо ассоциированы с папиллярными опухолями небольших размеров, низкими степенями распространения и злокачественности; мутации *KRAS*, напротив, наблюдались чаще в солидных уротелиальных карциномах и при наличии метастазов. Также показана связь мутаций гена *KRAS* с низкими уровнями онкоспецифической выживаемости в общей группе пациентов и в подгруппе с РМП БМИ [5, 23].

3. Мутации в гене-онкосупрессоре *TP53* выявлены в 19% уротелиальных карцином. Обнаружена их статистически значимая ассоциация с опухолями высоких степеней распространения и злокачественности, больших размеров, солидным характером роста и метастатическим поражением, что указывает на важную роль мутаций гена *TP53* в патогенезе МИ РМП. Молекулярные изменения *TP53* независимо от клинических параметров предсказывали прогрессирование уротелиальной карциномы в мышечно-инвазивную форму. Установлено, что мутации в 8-м экзоне являлись единственным независимым фактором снижения скорректированной выживаемости пациентов с РМП БМИ, тогда как мутации в 5-м экзоне гена *TP53* независимо влияли на снижение этого показателя у пациентов с МИ РМП [2, 6, 17, 18, 19, 20, 24].

4. Опухоли мочевого пузыря характеризуются высокой частотой

метиляции промоторной области гена *RUNX3*, равной 63%. Выявлена статистически значимая ассоциация эпигенетических нарушений гена *RUNX3* с пожилым возрастом пациентов и с агрессивным опухолевым фенотипом: высокой степенью распространения, низкой степенью дифференцировки и большими размерами опухоли. Установлено, что гиперметилование гена *RUNX3* являлось независимым фактором риска в отношении прогрессирования опухоли и онкоспецифической выживаемости в группе пациентов с РМП БМИ [4, 19, 22, 24].

5. Молекулярные нарушения изученных генов определяют альтернативные генетические пути патогенеза уротелиальной карциномы: активирующие мутации протоонкогенов *FGFR3* и *HRAS* ассоциированы с РМП БМИ с относительно благоприятным течением, в то время как мутации генов *TP53* и *KRAS*, а также аномальное метилирование гена *RUNX3* наблюдаются с повышенной частотой в агрессивных мышечно-инвазивных опухолях мочевого пузыря [2, 3, 4, 5, 6].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Определение мутационного статуса гена *FGFR3* позволит распределить пациентов, имеющих уротелиальные немышечно-инвазивные низкодифференцированные карциномы, по группам риска и подобрать в зависимости от этого определенную тактику лечения. Разработанная на основе этих данных и утвержденная Минздравом Республики Беларусь инструкция по применению «Оценка прогноза клинического течения рака мочевого пузыря посредством комплексного анализа клинико-морфологических и генетических параметров опухоли» (№121-1114 от 27.11.2014) [25] внедрена в практическую деятельность отделения онкоурологической патологии ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (акт внедрения от 09.11.2015) и рекомендуется для использования в других медицинских учреждениях онкологического профиля.

2. Созданный информационный ресурс «База данных мутационной изменчивости гена *FGFR3* в проспективной группе пациентов, страдающих немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря» (регистрационное свидетельство №1341403757 от 10.02.2014) рекомендуется использовать для идентификации наиболее значимых мутаций этого гена у пациентов с различными типами раковых заболеваний.

3. Данные о мутационной изменчивости гена *TP53* и эпигенетической изменчивости гена *RUNX3* целесообразно использовать в качестве дополнительных факторов прогноза для более точного предсказания прогрессирования опухоли и онкоспецифической выживаемости пациентов, страдающих РМП.

4. Результаты исследований рекомендуется включить в лекционные курсы высших учебных заведений соответствующего профиля для ознакомления обучающихся с современными представлениями о молекулярных путях патогенеза уротелиальной карциномы. Получены акты внедрения в учебный процесс на кафедрах онкологии БГМУ от 27.11.2015 и БелМАПО от 14.12.2015.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

### Публикации, соответствующие пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь»

1. Мутационный статус гена FGFR3 в проспективной когорте пациентов, страдающих раком мочевого пузыря / **М.П. Смаль**, Т.Д. Кужир, А.И. Ролевич, С.Л. Поляков, Т.И. Набебина, С.А. Красный, Р.И. Гончарова // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2013. – Т. 57, № 1. – С. 96–101.
2. FGFR3 and TP53 mutations in a prospective cohort of Belarusian bladder cancer patients / **M.P. Smal**, A.I. Rolevich, S.L. Polyakov, S.A. Krasny, R.I. Goncharova // *Exp. Oncol.* – 2014. – Vol. 36, № 4. – P. 246–251.
3. Роль мутационного статуса гена FGFR3 в предсказании прогрессирования рака мочевого пузыря без мышечной инвазии / А.И. Ролевич, **М.П. Смаль**, С.А. Красный, Р.И. Гончарова // *Онкоурология.* – 2015. – Т. 11, № 3. – С. 62–70.
4. Метилирование гена RUNX3 как фактор прогноза при раке мочевого пузыря без мышечной инвазии / **М.П. Смаль**, А.И. Ролевич, Т.И. Набебина, С.А. Красный, Р.И. Гончарова // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2015. – Т. 59, № 5. – С. 85–90.
5. Противоположные ассоциации мутаций генов HRAS и KRAS с клиническими параметрами рака мочевого пузыря / **М.П. Смаль**, А.И. Ролевич, Т.И. Набебина, С.А. Красный, Р.И. Гончарова // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2015. – Т. 19, № 5. – С. 638–646.
6. Мутации гена TP53 и их прогностическая значимость при раке мочевого пузыря / **М.П. Смаль**, А.И. Ролевич, Т.И. Набебина, С.А. Красный, Р.И. Гончарова // *Молекулярная медицина.* – 2015. – № 6. – С. 26–32.

### Тезисы докладов

7. **Smal, M.** FGFR3 mutations in bladder cancer / **M. Smal** // Abstract book. The 4<sup>th</sup> International IMBG conference for young scientists «Molecular biology: advances and perspectives», Institute of molecular biology and genetics, Kyiv, Ukraine, September 14-17, 2011. – P. 189.
8. Мутационный статус гена FGFR3 у больных с раком мочевого пузыря в Республике Беларусь / **М.П. Смаль**, А.И. Ролевич, С.А. Красный, Р.И. Гончарова // Программа и тезисы. VIII международная конференция «Молекулярная генетика соматических клеток», Звенигород, Москва, Россия, 6–9 декабря 2011 г. – С. 26–27.
9. Частота мутаций гена FGFR3 у больных раком мочевого пузыря в Республике Беларусь / А.И. Ролевич, **М.П. Смаль**, С.А. Красный, Р.И. Гончарова, С.Л. Поляков, Т.И. Набебина // Конференция онкоурологов стран СНГ «Актуальные вопросы диагностики и лечения местно-распространенного и метастатического рака почки, мочевого пузыря и предстательной железы»,

- Киев, Украина, 6–7 апреля 2012 г. / Клиническая онкология. – 2012. – Специальный выпуск I. – С. 42–43.
10. Анализ частоты мутаций гена FGFR3 в опухоли у больных раком мочевого пузыря / А.И. Ролевич, **М.П. Смаль**, С.А. Красный, Р.И. Гончарова, С.Л. Поляков, Т.И. Набебина // Материалы VII Конгресса Российского общества онкоурологов, Москва, Россия, 3–5 октября 2012 г. – С. 112.
  11. Группы риска немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря и частота мутаций гена FGFR3 / А.И. Ролевич, **М.П. Смаль**, С.А. Красный, Р.И. Гончарова, С.Л. Поляков, Т.И. Набебина // Материалы VII Конгресса Российского общества онкоурологов, Москва, Россия, 3–5 октября 2012 г. – С. 112–113.
  12. Мутационный статус рака мочевого пузыря: может ли помочь при стадировании? / А.И. Ролевич, **М.П. Смаль**, С.А. Красный, Р.И. Гончарова, С.Л. Поляков, Т.И. Набебина // Материалы VII Конгресса Российского общества онкоурологов, Москва, Россия, 3–5 октября 2012 г. – С. 113.
  13. Роль гена FGFR3 в развитии рака мочевого пузыря / Р.И. Гончарова, **М.П. Смаль**, А.И. Ролевич, С.А. Красный // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы (к 100-летию со дня рождения академика Н.В. Турбина). Международная научная конференция, Минск, Беларусь, 8–11 октября 2012 г.: материалы конференции / Ред. кол.: А.В. Кильчевский и др.; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2012 г. – С. 189.
  14. Could a mutational status of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene in bladder cancer tissue improve accuracy of clinical staging? / A.I. Rolevich, **M.P. Smal**, S.A. Krasny, R.I. Goncharova, S.L. Polyakov, T.I. Nabebina // 28th Annual Congress of the European Association of Urology, Milan, Italy, March 15–19, 2013 г. / Eur. Urol. – 2013. – Vol. 12, Suppl. 1 – P. e278.
  15. Incidence of FGFR3 mutations in Belarusian bladder cancer patients / **M. Smal**, A. Rolevich, S. Polyakov, T. Nabebina, S. Krasny, R. Goncharova // EMBL Conference: Cancer Genomics, Heidelberg, Germany, November 3–5, 2013. – P. 131.
  16. Мутации гена FGFR3 у пациентов с немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря / **М.П. Смаль**, А.И. Ролевич, С.А. Красный, С.Л. Поляков, Т.И. Набебина, Р.И. Гончарова // Сборник тезисов 18-ой Международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, Россия, 21–25 апреля 2014 г. – С. 281–282.
  17. Мутации в гене-онкосупрессоре TP53 при раке мочевого пузыря / **М.П. Смаль**, А.И. Ролевич, С.А. Красный, С.Л. Поляков, Т.И. Набебина, Р.И. Гончарова // Всероссийская конференция молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», Томск, Россия, 25 апреля 2014

- г. / Сибирский онкологический журнал. – 2014. – Приложение № 1. – С. 109.
18. FGFR3 and TP53 gene mutations in bladder cancer in the Belarusian population / **М.Р. Smal**, A.I. Rolevich, S.L. Polyakov, T.I. Nabebina, S.A. Krasny, R.I. Goncharova // The European human genetics conference, Milan, Italy, May 31 – June 3, 2014. / Eur. J. Hum. Genet. – 2014. – Vol. 22, Suppl. 1. – P. 465.
  19. Молекулярно-генетические аспекты рака мочевого пузыря / Р.И. Гончарова, **М.П. Смаль**, А.И. Ролевич, Т.Д. Кужир, С.Л. Поляков, С.А. Красный // Тезисы VIII Съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии, Казань, Россия, 16-18 сентября 2014 г. / Евразийский онкологический журнал. – 2014. – № 3. – С. 94–95.
  20. Прогностическая значимость мутаций генов FGFR3 и TP53 при раке мочевого пузыря / **М.П. Смаль**, А.И. Ролевич, С.А. Красный, С.Л. Поляков, Т.И. Набебина, Р.И. Гончарова // Тезисы докладов 6-ой Международной школы молодых ученых по молекулярной генетике «Геномная и системная биология», Москва-Звенигород, Россия, 16-21 ноября 2014 г. – С. 42.
  21. Fibroblast growth factor receptor 3 mutational status could predict progression in T1 high grade bladder cancer / A.I. Rolevich, **М.Р. Smal**, S.A. Krasny, R.I. Goncharova, S.L. Polyakov // 30th Annual Congress of the European Association of Urology, Madrid, Spain, March 20-24, 2015 г. / Eur. Urol. – 2015. – Vol. 14, Suppl. 2 – P. e748.
  22. Мутационная и эпигенетическая изменчивость при раке мочевого пузыря / Р.И. Гончарова, **М.П. Смаль**, А.И. Ролевич, С.Л. Поляков, С.А. Красный // Тезисы VII Съезда Российского общества медицинских генетиков, Санкт-Петербург, Россия, 19-23 мая 2015 г. / Медицинская генетика. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 47.
  23. **Смаль, М.П.** Мутации генов семейства RAS при раке мочевого пузыря / **М.П. Смаль** // Всероссийская конференция молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», Томск, Россия, 22 мая 2015 г. / Сибирский онкологический журнал. – 2015. – Приложение № 1. – С. 73–74.
  24. Мутационная и эпигенетическая изменчивость генома опухолей мочевого пузыря / Р.И. Гончарова, **М.П. Смаль**, А.И. Ролевич, С.Л. Поляков, С.А. Красный // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы. II Международная научная конференция, Минск, Беларусь, 13–16 октября 2015 г.: материалы конференции / Ред. кол.: А.В. Кильчевский и др.; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2015 г. – С. 221.

### **Методические рекомендации**

25. Оценка прогноза клинического течения рака мочевого пузыря посредством комплексного анализа клинико-морфологических и генетических параметров опухоли: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 27.11.2014. – Минск: РНПЦ ОМР, 2015. – 11 с.

## РЭЗІЮМЭ

Смаль Маргарыта Пятроўна

### Малекулярна-генетычная характарыстыка раку мачавога пузыра ў насельніцтва Беларусі

**Ключавыя словы:** рак мачавога пузыра (РМП), мутацыя, метылаванне, гены *FGFR3*, сямейства *RAS*, *TP53*, *RUNX3*, прагнастычнае значэнне.

**Мэта працы:** вызначыць профіль малекулярна-генетычных змяненняў, асацыяваных са злаякаснымі новаўтварэннямі мачавога пузыра ў беларускіх пацыентаў, і ацаніць магчымасць іх выкарыстання ў якасці малекулярных маркёраў для прагнозу клінічнага цяжэння хваробы.

**Метады даследавання:** вылучэнне геномнай ДНК, SNaPshot-аналіз, SSCP-аналіз, секвеніраванне, метыл-спецыфічная ПЛР, статыстычныя метады аналізу.

**Вынікі даследавання:** упершыню на беларускай папуляцыі пацыентаў з РМП вызначаны частоты мутацый генаў *FGFR3* (49,7%), сямейства *RAS* (11,2%), *TP53* (19%) і гіперметылавання прамотарнай вобласці гена *RUNX3* (63%). Удакладнены малекулярныя шляхі патагенезу двух асноўных тыпаў РМП: нямышачна-інвазіўныя пухліны асацыяваны з мутацыямі ў генах *FGFR3* і *HRAS*, тады як больш агрэсіўныя мышачна-інвазіўныя ўратэліяльныя карцыномы асацыяваны з малекулярнымі парушэннямі генаў *KRAS*, *TP53* і *RUNX3*. Аналіз прагнастычнага значэння мутацыйнай ці эпигенетычнай зменлівасці адпаведных генаў паказаў, што мутацыі гена *TP53* і гіперметылаванне гена *RUNX3* з'яўляюцца незалежнымі фактарамі рызыкі прагрэсавання РМП без мышачнай інвазіі (РМП БМІ). Мутацыі гена *FGFR3* статыстычна значна асацыяваны з лепшым прагнозам у дачыненні прагрэсавання ў падгрупе нізкадыферэнцыяваных нямышачна-інвазіўных пухлін. Для прадказання анкаспецыфічнай выжывальнасці пацыентаў у якасці прагнастычна каштоўных маркёраў могуць выкарыстоўвацца малекулярныя парушэнні генаў *FGFR3*, *KRAS*, *TP53* і *RUNX3*. Выяўлена, што мутацыі 8-га экзона гена *TP53*, роўна як і метылаванне гена *RUNX3*, незалежна ўплывалі на зніжэнне скарэктаванай выжывальнасці ў выпадку нямышачна-інвазіўных пухлін, тым часам як мутацыі 5-га экзона гена *TP53* з'яўляліся незалежнымі фактарамі рызыкі неспрыяльнага выніку захворвання для пацыентаў з МІ РМП.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** атрыманыя вынікі рэкамендуецца выкарыстоўваць для павышэння дакладнасці прагнозу клінічнага цяжэння раку мачавога пузыра, што будзе спрыяць выбару адэкватнай тактыкі лячэння.

## РЕЗЮМЕ

Смаль Маргарита Петровна

### Молекулярно-генетическая характеристика рака мочевого пузыря у населения Беларуси

**Ключевые слова:** рак мочевого пузыря (РМП), мутация, метилирование, гены *FGFR3*, семейства *RAS*, *TP53*, *RUNX3*, прогностическое значение.

**Цель работы:** определить профиль молекулярно-генетических изменений, ассоциированных со злокачественными новообразованиями мочевого пузыря у белорусских пациентов, и оценить возможность их использования в качестве молекулярных маркеров для прогноза клинического течения болезни.

**Методы исследования:** выделение геномной ДНК, SNaPshot-анализ, SSCP-анализ, секвенирование, метил-специфическая ПЦР, статистические методы анализа.

**Результаты исследования:** впервые на белорусской популяции пациентов с РМП определены частоты мутаций генов *FGFR3* (49,7%), семейства *RAS* (11,2%), *TP53* (19%) и гиперметиличивания промоторной области гена *RUNX3* (63%). Уточнены молекулярные пути патогенеза двух основных типов РМП: немышечно-инвазивные опухоли ассоциированы с мутациями в генах *FGFR3* и *HRAS*, тогда как более агрессивные мышечно-инвазивные уротелиальные карциномы ассоциированы с молекулярными нарушениями генов *KRAS*, *TP53* и *RUNX3*. Анализ прогностического значения мутационной или эпигенетической изменчивости соответствующих генов показал, что мутации гена *TP53* и гиперметиличивание гена *RUNX3* являются независимыми факторами риска прогрессирования РМП БМИ. Мутации гена *FGFR3* статистически значимо ассоциированы с лучшим прогнозом в отношении прогрессирования в подгруппе низкодифференцированных немышечно-инвазивных опухолей. Для предсказания онкоспецифической выживаемости пациентов в качестве прогностически ценных маркеров могут использоваться молекулярные нарушения генов *FGFR3*, *KRAS*, *TP53* и *RUNX3*. Выявлено, что мутации 8-го экзона гена *TP53*, равно как и метилирование гена *RUNX3*, независимо влияли на снижение скорректированной выживаемости в случае немышечно-инвазивных опухолей, в то время как мутации 5-го экзона гена *TP53* являлись независимым фактором риска неблагоприятного исхода заболевания для пациентов с МИ РМП.

**Рекомендации по использованию:** полученные результаты рекомендуется использовать для повышения точности прогноза клинического течения рака мочевого пузыря, что будет способствовать выбору адекватной тактики лечения.

## SUMMARY

Smal Marharyta P.

### **Molecular genetic characteristics of bladder cancer in the population of Belarus**

**Key words:** bladder cancer (BC), mutation, methylation, *FGFR3*, *RAS* gene family, *TP53*, *RUNX3*, prognostic value.

**Aim of the study:** to determine the profile of molecular changes associated with bladder neoplasms in the group of Belarusian BC patients and to assess the possibility of their application as prognostic molecular markers for prediction of the disease clinical course.

**Methods:** DNA isolation, SNaPshot assay, SSCP analysis, sequencing, methyl-specific PCR, statistical methods for data analysis.

**Results:** for the first time on the Belarusian cohort of bladder cancer patients the mutation frequencies of *FGFR3* gene (49.7%), *RAS* family genes (11.2%), *TP53* gene (19%), as well as the frequency of *RUNX3* promoter hypermethylation (63%) were determined. Molecular pathogenetic pathways of two main types of BC were specified: non-muscle invasive tumors are associated with *FGFR3* and *HRAS* mutations, whereas more aggressive muscle invasive urothelial carcinomas are associated with molecular alterations of *KRAS*, *TP53*, and *RUNX3* genes. Analysis of the prognostic value of structural and epigenetic changes of corresponding genes showed that *TP53* mutations and *RUNX3* hypermethylation were the independent risk factors for progression of non-muscle invasive BC. On the contrary, *FGFR3* mutations were significantly associated with better progression-free survival in the subgroup of high grade non-muscle invasive tumors. Molecular alterations of *FGFR3*, *KRAS*, *TP53*, and *RUNX3* genes could be used as prognostic markers for prediction of cancer-specific survival. 8 exon mutations of *TP53* gene, as well as *RUNX3* gene hypermethylation, independently predicted decreased cancer-specific survival in case of non-muscle invasive tumors, whereas alterations in the 5<sup>th</sup> exon of *TP53* gene were independent risk factors of unfavourable outcome for patients with muscle invasive disease.

**Recommendation for the use of the results:** the results obtained are recommended to be used for increasing the accuracy of prognosis of the bladder cancer clinical course what will assist the selection of adequate treatment strategy.