

Оценка диагностической значимости выявления мутаций в генах *TERT*, *GPR126*, *FGFR3* и *PIK3CA* в моче у пациентов с раком мочевого пузыря

Кокарев В.И.^{1*}, Рахматуллин Т.И.², Тивтикян А.С.², Джайн М.²
¹ ФФМ МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова; ² УК МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова

Актуальность

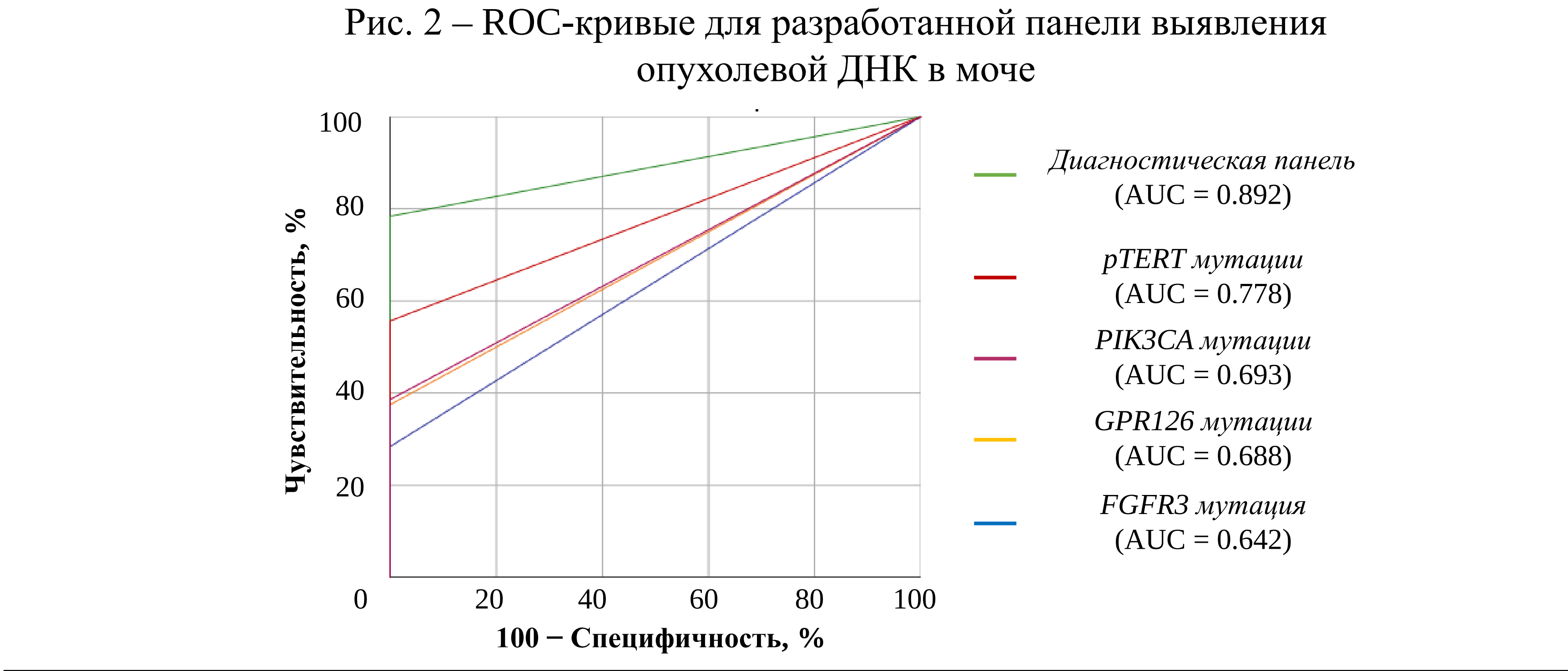
Рак мочевого пузыря (РМП) занимает 9-е место в мире по распространённости среди злокачественных новообразований и 13-е — по смертности [1]. Одной из ключевых проблем в лечении РМП является высокая частота рецидивов, требующая длительного и дорогостоящего мониторинга [2]. На данный момент рутинными методами диагностики РМП являются цистоскопия и цитологическое исследование мочи, обладающие рядом недостатков: инвазивность и низкая точность на ранних стадиях заболевания, соответственно. Анализ внеклеточной опухолевой ДНК в моче может стать перспективной неинвазивной альтернативой вышеназванным методам, однако для РМП подобные решения до сих пор не внедрены в клиническую практику.

Цель

Оценить диагностический потенциал панели для выявления опухолевой ДНК в моче методом цифровой капельной ПЦР (цкПЦР), включающей мутации в генах *TERT*, *GPR126*, *FGFR3* и *PIK3CA* при РМП.

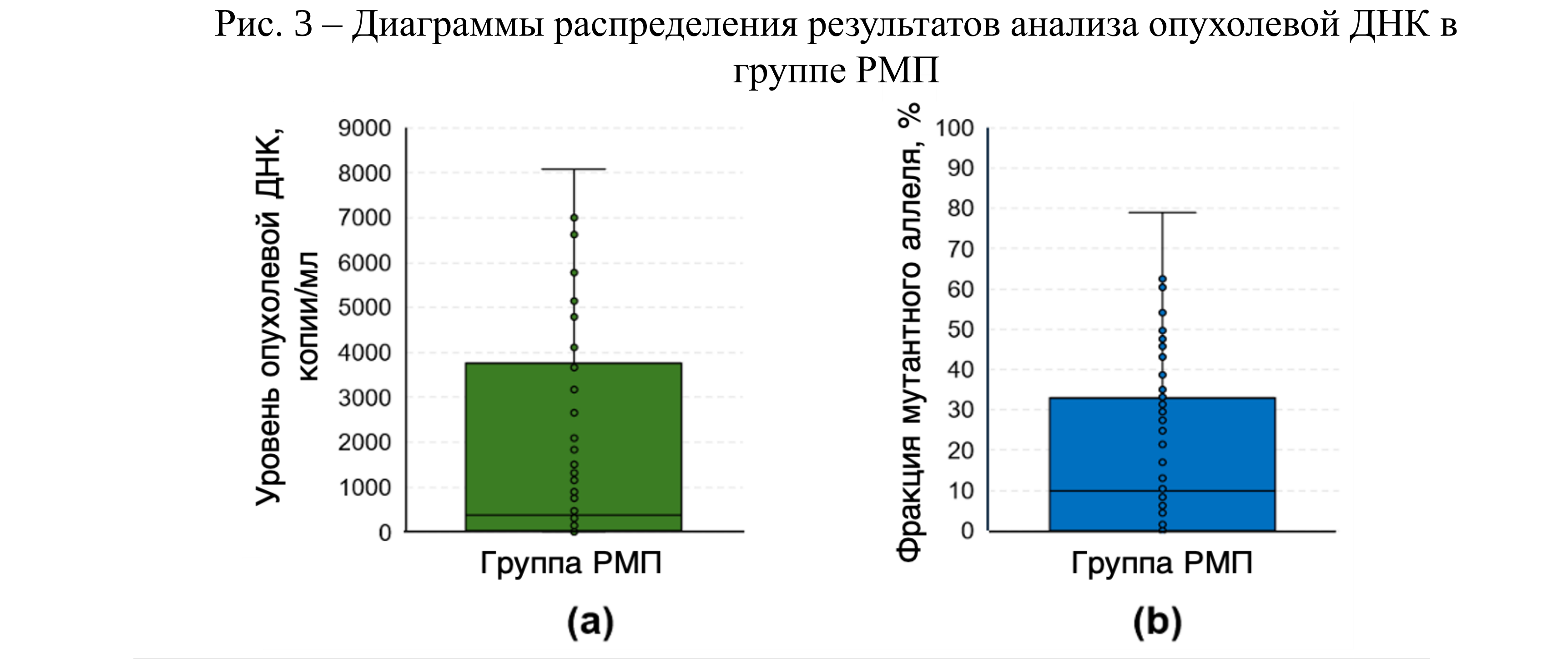
Результаты

- Специфичность разработанной панели составила 100%, чувствительность — 78,4% (опухолевая ДНК была выявлена у 69 из 88 пациентов с раком мочевого пузыря), а значение AUC для панели составило 0,892.



Мутации *pTERT* включали замены в двух областях (C228T и C250T). Мутации *PIK3CA* включали 3 наиболее распространенные замены в кодирующих областях гена (E545K, E542K, H1047R). Мутации *GPR126* включали две замены в его 6-м интроне (хромосома 6: 142 706 206, замена G/A, и хромосома 6: 142 706 209, замена C/T, сборка генома GRCh37). Для *FGFR3* была проанализирована только одна кодирующая мутация (S249C); *pTERT* — промотор гена *TERT*; AUC — площадь под ROC-кривой.

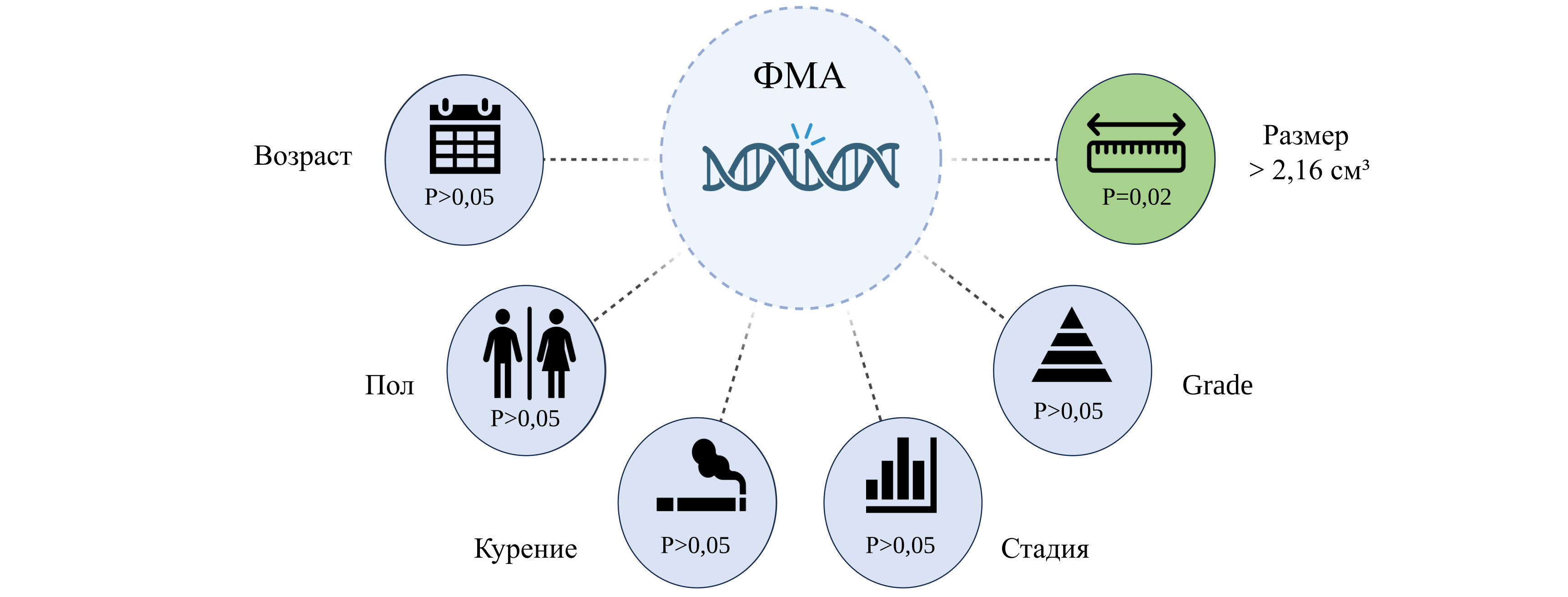
- Мутации *pTERT* были наиболее частыми (54,5%), за ними следовали мутации *PIK3CA*, *GPR126* и *FGFR3* (частота обнаружения 38,6%, 37,5% и 28,4%, соответственно).
- В группе РМП уровни опухолевой ДНК и ФМА в моче значительно варьировали: 385,7 [23,8; 3700,1] копий/мл и 10,0 [0,05; 32,4] %, соответственно.



а – Уровень опухолевой ДНК, выраженный в копиях на 1 мл мочи. б – Доля мутантных аллелей, выраженная в %. Если образец одновременно содержал 2 или более мутаций, уровень опухолевой ДНК и доля мутантных аллелей выбирались для мутации с наибольшим значением соответствующей переменной.

- В группе РМП значения ФМА не были ассоциированы с полом, возрастом, курением и стадией заболеваниям ($p > 0,05$), однако у пациентов с опухолями размером более 2,16 см³ значения ФМА были выше, чем у остальных (23,4 [1,8; 46,3] против 1,6 [0; 24,6] % соответственно, $p = 0,02$).

Рис. 4 – Связь с клинико-демографическими характеристиками



Статистический анализ проводился при помощи логистической регрессии. Grade - степень дифференцировки; ФМА - фракция мутантного аллеля.

Выводы и практические рекомендации

- Разработанная панель для выявления опухолевой ДНК в моче методом цкПЦР продемонстрировала высокие диагностические характеристики: чувствительность составила 78,4 %, а специфичность — 100 %.
- Повышенная ФМА была ассоциирована только с большим объемом опухоли, тогда как связи с другими клинико-демографическими характеристиками выявлено не было.
- После достаточной валидации диагностическая панель может быть внедрена в клиническую практику как высокоэффективный неинвазивный метод диагностики РМП, способный снизить дискомфорт у пациентов и уменьшить время и стоимость диагностики.
- Может быть облегчен подбор индивидуализированной таргетной химиотерапии, поскольку данный метод анализа внеклеточной опухолевой ДНК будет пригоден для генотипирования опухоли (например, эрдафитиниба или ингибиторов PI3K).

Материалы и методы

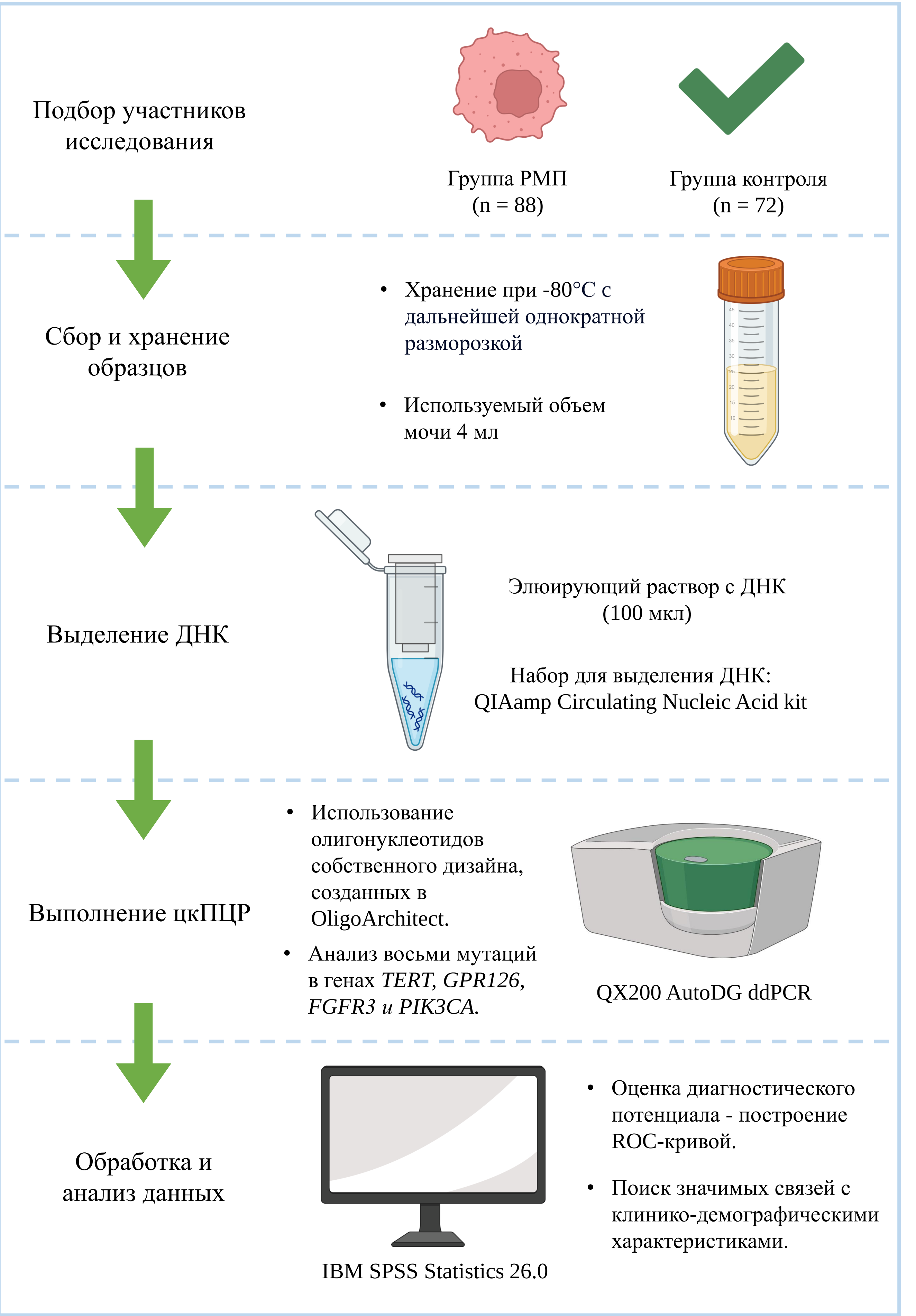
- Исследование включало **160 человек** в возрастном диапазоне 18 -87 лет, из которых:
- 88 являлись пациентами с гистологически подтвержденным мышечно-неинвазивным РМП (группа РМП);
 - 72 пациента с различными видами циститов и другими незлокачественными процессами (группа контроля).

Таблица 1 — Клинико-демографическая характеристика участников исследования		
Параметры	Группа РМП (n = 88)	Группа контроля (n = 72)
Возраст, лет ¹	63.8 (26.0–87.0)	51.0 (18.0–79.0)
Пол, n (%):		
- Мужчины	74 (84.1%)	46 (63.9%)
- Женщины	14 (15.9%)	26 (36.1%)
Анамнез курения, n (%)	31 (35.2%)	6 (8.3%)
Задержка мочеиспускания, n (%)	18 (22.9%)	0 (0.0%)
Макрогематурия, n (%)	12 (13.6%)	0 (0.0%)
Стадия опухоли, n (%):		
- I	75 (85.2%)	Н/Д
- II	5 (5.8%)	Н/Д
- IIIA	6 (6.8%)	Н/Д
- IIIB	1 (1.1%)	Н/Д
- IVA	1 (1.1%)	Н/Д
Степень дифференцировки, n (%):		
- Low	42 (47.7%)	Н/Д
- High	21 (23.9%)	Н/Д
- н/д	25 (28.4%)	Н/Д
Размер опухоли, см ³ ²	2.16 [1.04–11.05]	Н/Д
Наличие метастазов, n (%)	1 (1.1%)	Н/Д

РМП, рак мочевого пузыря; Н/Д, нет данных; ¹ данные представлены как среднее (диапазон); ² данные представлены как медиана (межквартильный диапазон).

- Доклиническая валидация флуоресцентно меченных зондов HEX и FAM происходила на образцах ДНК с заведомо известным генотипом, а для мутаций *TERT* и *GPR126* – дополнительно на синтетических ДНК-конструкциях, несущих данные мутации.
- Результаты количественного анализа ДНК представлены как фракция мутантного аллеля (ФМА): $ФМА = \frac{C_{\text{мутированной ДНК}}}{(C_{\text{ДНК дикого типа}} + C_{\text{мутированной ДНК}})}$, где «С» – это концентрация, выраженная в копиях на 1 мл мочи.

Рис. 1 - Схематическое изображение этапов исследовательской работы



РМП, рак мочевого пузыря;

[1] Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends / Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. – DOI 10.1016/j.eururo.2016.06.010 // European Urology. – 2017. – Vol. 71, N. 1 – p. 96-108.
[2] Recurrence of high-risk bladder cancer: a population-based analysis / Chamie K, Litwin MS, Bassett JC, Daskivich TJ, Lai J, Hanley JM, Konety BR, Saigal CS; Urologic Diseases in America Project. – DOI 10.1002/cnrc.28147 // Cancer. – 2013. – Vol. 119, N. 17. – p. 3219-3227.