

Опыт исследования образцов уротелиальной карциномы с помощью панели секвенирования нового поколения на 523 гена

Я.В. Гриднева^{1,2}, Д.Н. Хмелькова^{3,4}, М.И. Волкова^{✉1,5}, К.А. Благодатских³, А.А. Желудкевич³, А.Б. Семенова¹, А.А. Вещевайлов¹, А.В. Бабкина¹, С.А. Бондарев¹, В.Н. Галкин^{1,2}

¹ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.С. Юдина» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

³ПАО «Центр генетики и репродуктивной медицины «ГЕНЕТИКО», Москва, Россия;

⁴ООО «АйТиДжен Лабс», Москва, Россия;

⁵ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия

Аннотация

Обоснование. Геномные дефекты в клетках уротелиальной карциномы (УК) варьируют от точечных мутаций ДНК до комплексных хромосомных перестроек и изменения числа хромосом в опухолевой клетке. Генетический профиль УК крайне разнороден, что приводит к существенным различиям в естественном течении заболевания, прогнозе в популяции заболевших, а также ответах на лечение. Высока актуальность изучения генетических альтераций российских пациентов с раком мочевого пузыря (МП).

Цель. Оценить профиль мутаций опухолевых образцов УК с помощью панели секвенирования нового поколения (NGS) на 523 гена.

Материалы и методы. Изучены фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы УК 36 пациентов. Carcinoma in situ без папиллярной опухоли верифицирована у 1 (2,9%), Ta – у 14 (38,8%), T1 – у 19 (52,7%), T>T1 – у 2 (5,6%) больных; УК high-grade имела место у 14 (38,9%) пациентов. Из парафиновых блоков выделяли ДНК и РНК, готовили библиотеки с помощью панели Illumina TruSight Oncology 500, после чего проводили NGS с последующей биоинформатической обработкой данных.

Результаты. Медиана мутационной нагрузки (tumor mutation burden – TMB) составила 14,1 (1,6–102,9) мутации/Мб: TMB≥20 мутаций/Мб – 6 (16,7%). Во всех случаях уровень микросателлитной нестабильности являлся низким. В 36 образцах выявлена 181 терапевтически значимая и онкогенная мутация в 62 генах: медиана – 5 (1–16) мутаций в образце. В структуре мутаций доминировали SNV: 123 (68%); наибольшая частота – G>A 36 (29,3%). Выявлено 47 (26,0%) indel-мутаций, 10 (5,5%) амплификаций и 1 (0,6%) транслокация. Клинически значимые мутации обнаружены во всех образцах. Наибольшая частота клинически значимых мутаций отмечена в генах *FGFR3* – 22 (61,1%) образца с мутациями в данном гене, *KDM6A* – 22 (61,1%), *STAG2* – 13 (36,1%), *PIK3CA* – 9 (25,0%) и *ARID1A* – 9 (25,0%). Патогенные мутации 1–2-го уровня, обеспечивающие потенциальные терапевтические мишени, обнаружены в 29 (80,6%) из 36 образцов и включали альтерации 13 генов (*AKT1*, *ATM*, *BRAF*, *CHEK2*, *ERBB2*, *FGFR3*, *IDH1*, *MLH1*, *NF1*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN* и *TSC1*). Частыми мутациями 3–4-го уровня терапевтической значимости являлись *KDM6A* (61,6%), *ARID1A* (25,0%) и *CDKN2A* (11,4%).

Заключение. Исследование с помощью панели NGS на 523 гена подтвердило высокую TMB и низкую частоту микросателлитной нестабильности в опухолевых клетках УК. Наиболее частыми патогенными мутациями, ассоциированными с потенциальными терапевтическими мишенями при УК, являются альтерации *FGFR3*, *PIK3CA* и *ERBB2*.

Ключевые слова: уротелиальная карцинома, секвенирование нового поколения, профиль мутаций

Для цитирования: Гриднева Я.В., Хмелькова Д.Н., Волкова М.И., Благодатских К.А., Желудкевич А.А., Семенова А.Б., Вещевайлов А.А., Бабкина А.В., Бондарев С.А., Галкин В.Н. Опыт исследования образцов уротелиальной карциномы с помощью панели секвенирования нового поколения на 523 гена. Современная Онкология. 2024;26(4):489–494. DOI: 10.26442/18151434.2024.4.203018

© ООО «КОНСИЛИУМ МЕДИКУМ», 2024 г.

Информация об авторах / Information about the authors

✉ **Волкова Мария Игоревна** – д-р мед. наук, врач-онколог онкологического отделения №8 Онкологического центра №1 ГБУЗ «ГКБ им. С.С. Юдина», проф. каф. онкологии и паллиативной медицины им. акад. А.С. Савицкого ФГБОУ ДПО РМАНПО. E-mail: mivolkova@rambler.ru; SPIN: 8942-0678

Гриднева Яна Владимировна – канд. мед. наук, врач-онколог, зав. онкологическим отделением №8 Онкологического центра №1 ГБУЗ «ГКБ им. С.С. Юдина», доц. каф. онкологии, радиотерапии и реконструктивной хирургии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет). SPIN-код: 4189-6387

Хмелькова Дарья Николаевна – зам. ген. дир. по направлению Онкогенетика, рук. отд. биоинформатического анализа ПАО «ЦГРМ «ГЕНЕТИКО», ген. дир. ООО «АйТиДжен Лабс»

Благодатских Константин Александрович – канд. биол. наук, зам. ген. дир. ПАО «ЦГРМ «ГЕНЕТИКО»

Желудкевич Анна Алексеевна – вед. биолог лаб. высокопроизводительного секвенирования ПАО «ЦГРМ «ГЕНЕТИКО»

Семенова Анна Борисовна – д-р мед. наук, зав. центром патологоанатомической диагностики и молекулярной генетики ГБУЗ «ГКБ им. С.С. Юдина»

Вещевайлов Александр Александрович – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения №2 ГБУЗ «ГКБ им. С.С. Юдина»

✉ **Maria I. Volkova** – D. Sci. (Med.), Moscow State Budgetary Healthcare Institution "Oncological Center No. 1 of Moscow City Hospital named after S.S. Yudin, Moscow Healthcare Department", Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. E-mail: mivolkova@rambler.ru; ORCID: 0000-0001-7754-6624

Yana V. Gridneva – Cand. Sci. (Med.), Moscow State Budgetary Healthcare Institution "Oncological Center No. 1 of Moscow City Hospital named after S.S. Yudin, Moscow Healthcare Department", Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). ORCID: 0000-0002-9015-2002

Darya N. Khmelkova – Deputy Director, Center of Genetics and Reproductive Medicine Genetico PJSC, Director, ITGen Labs LLC. ORCID: 0000-0002-4673-1031

Konstantin A. Blagodatskikh – Cand. Sci. (Biol.), Center of Genetics and Reproductive Medicine Genetico PJSC. ORCID: 0000-0002-8732-0300

Anna A. Zheludkevich – Leading Specialist, Center of Genetics and Reproductive Medicine Genetico PJSC

Anna B. Semenova – D. Sci. (Med.), Moscow State Budgetary Healthcare Institution "Moscow City Hospital named after S.S. Yudin, Moscow Healthcare Department". ORCID: 0000-0002-8433-0837

Alexander A. Veshchevailov – pathologist, Moscow State Budgetary Healthcare Institution "Moscow City Hospital named after S.S. Yudin, Moscow Healthcare Department". ORCID: 0009-0003-4372-6135

Experience of Next-Generation Sequencing in urothelial carcinoma specimens with panel for 523 genes

Yana V. Gridneva^{1,2}, Darya N. Khmelkova^{3,4}, Maria I. Volkova^{1,5}, Konstantin A. Blagodatskikh³, Anna A. Zheludkevich³, Anna B. Semenova¹, Alexander A. Veshchevailov¹, Alexandra V. Babkina¹, Sergey A. Bondarev¹, Vsevolod N. Galkin^{1,2}

¹Moscow City Hospital named after S.S. Yudin, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia;

²Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

³Center of Genetics and Reproductive Medicine Genetico PJSC, Moscow, Russia;

⁴ITGen Labs LLC, Moscow, Russia;

⁵Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Abstract

Background. Genomic alterations in urothelial carcinoma (UC) cells range from point DNA mutations to complex chromosomal rearrangements and changes in the number of chromosomes in the tumor cell. The UC genetic profile is highly heterogeneous, leading to significant variability in the natural history of the disease, prognosis, and responses to treatment. To evaluate the genetic alterations of Russian patients with bladder cancer is of great interest.

Aim. To evaluate the mutation profile in UC specimens with the next-generation sequencing (NGS) panel for 523 genes.

Materials and methods. Thirty-six patients' UC samples fixed in formalin and embedded in paraffin were studied. Carcinoma in situ without papillary tumor was verified in 1 (2.9%), Ta in 14 (38.8%), T1 in 19 (52.7%), T>T1 in 2 (5.6%) patients. High-grade UC was verified in 14 (38.9%) specimens. DNA and RNA were isolated from the paraffin blocks, libraries were prepared with the Illumina TruSight Oncology 500 panel, and then NGS was performed, followed by bioinformatics data processing.

Results. The median tumor mutation burden (TMB) was 14.1 (1.6–102.9) mutations/Mb: TMB $\geq$ 20 mutations/Mb – 6 (16.7%). In all cases, the level of microsatellite instability was low. In 36 specimens, 181 therapeutically significant and oncogenic mutations were identified in 62 genes; the median was 5 (1–16) mutations per specimen. Single nucleotide variants prevailed in the mutation structure: 123 (68%); G>A had the highest frequency 36 (29.3%). There were 47 (26.0%) indel mutations, 10 (5.5%) amplifications, and 1 (0.6%) translocation. Clinically significant mutations were detected in all specimens. The highest frequency of clinically significant mutations was observed in the *FGFR3* genes – 22 (61.1%) specimens with mutations in this gene, *KDM6A* – 22 (61.1%), *STAG2* – 13 (36.1%), *PIK3CA* – 9 (25.0%), and *ARID1A* – 9 (25.0%). Pathogenic level 1–2 mutations providing potential therapeutic targets were detected in 29 (80.6%) of 36 specimens and included alterations of 13 genes (*AKT1*, *ATM*, *BRAF*, *CHEK2*, *ERBB2*, *FGFR3*, *IDH1*, *MLH1*, *NF1*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, and *TSC1*). Frequent mutations of level 3–4 therapeutic significance were in *KDM6A* (61.6%), *ARID1A* (25.0%), and *CDKN2A* (11.4%) genes.

Conclusion. A 523-gene NGS panel study confirmed the high TMB and low rate of microsatellite instability in UC tumor cells. The most common pathogenic mutations associated with potential therapeutic targets in UC were *FGFR3*, *PIK3CA*, and *ERBB2* alterations.

Keywords: urothelial carcinoma, next-generation sequencing, mutation profile

For citation: Gridneva YaV, Khmelkova DN, Volkova MI, Blagodatskikh KA, Zheludkevich AA, Semenova AB, Veshchevailov AA, Babkina AV, Bondarev SA, Galkin VN. Experience of Next-Generation Sequencing in urothelial carcinoma specimens with panel for 523 genes. *Journal of Modern Oncology*. 2024;26(4):489–494. DOI: 10.26442/18151434.2024.4.203018

Введение

Уротелиальная карцинома (УК) занимает третье место по уровню заболеваемости среди опухолей мочеполовой системы. УК может поражать все отделы мочевыводящих путей, однако наиболее распространенной локализацией опухолей данного гистологического строения является мочевого пузыря (МП). Принципиальным для выбора лечебной тактики является выделение мышечно-неинвазивного (МНИРМП), мышечно-инвазивного (МИРМП) и неоперабельного местно-распространенного или диссеминированного рака МП (РМП). Существующие подходы к ведению больных РМП данных категорий хорошо изучены и унифицированы, однако результаты лечения существенно варьируют [1].

В клетках всех злокачественных новообразований человека выявляются соматические мутации. Частота и разнообразие генетических альтераций выше при экзогенно-индуцированных опухолях, к которым относится и УК. Геномные дефекты

в клетках УК варьируют от точечных мутаций ДНК до комплексных хромосомных перестроек и изменения числа хромосом в опухолевой клетке. Генетический профиль УК крайне разнороден, что приводит к существенным различиям в естественном течении заболевания, прогнозе в популяции заболевших, а также ответах на лечение. Так, по данным ряда исследований, некоторые альтерации коррелируют с прогнозом течения заболевания, отдельные мутации определяют чувствительность к стандартной противоопухолевой терапии, а белковые продукты экспрессии ряда мутированных генов являются мишенями для таргетных препаратов. При этом мутационный профиль УК в разных демографических когортах может различаться [2]. Все это обуславливает актуальность изучения генетических альтераций российских пациентов с РМП.

Цель исследования – оценить профиль мутаций опухолевых образцов УК с помощью панели секвенирования нового поколения (next generation sequencing – NGS) на 523 гена.

Информация об авторах / Information about the authors

Бабкина Александра Владимировна – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения №2 ГБУЗ «ГКБ им. С.С. Юдина»

Бондарев Сергей Анатольевич – д-р мед. наук, зам. глав. врача по медицинской части и научно-образовательной работе ГБУЗ «ГКБ им. С.С. Юдина»

Галкин Всеволод Николаевич – д-р мед. наук, проф., глав. врач ГБУЗ «ГКБ им. С.С. Юдина», каф. онкологии, радиотерапии и реконструктивной хирургии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет)

Alexandra V. Babkina – pathologist, Moscow State Budgetary Healthcare Institution "Moscow City Hospital named after S.S. Yudin, Moscow Healthcare Department". ORCID: 0000-0001-5485-5803

Sergey A. Bondarev – D. Sci. (Med.), Moscow State Budgetary Healthcare Institution "Moscow City Hospital named after S.S. Yudin, Moscow Healthcare Department". ORCID: 0009-0000-6205-3106

Vsevolod N. Galkin – D. Sci. (Med.), Prof., Moscow State Budgetary Healthcare Institution "Moscow City Hospital named after S.S. Yudin, Moscow Healthcare Department", Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). ORCID: 0000-0002-6619-6179

Материалы и методы

Нами инициирован проект, направленный на изучение альтераций в ДНК и РНК клеток опухолевой ткани больных с УК путем NGS с использованием панели из 523 генов, позволяющей выявлять однонуклеотидные замены (single nucleotide variants – SNV), малые инсерции и делеции, вариации числа копий ДНК, включая крупные делеции и амплификации, транслокации, а также оценивать комплексные молекулярные биомаркеры, такие как мутационная нагрузка (tumor mutation burden – TMB) и микросателлитная нестабильность (microsatellite instability – MSI).

Запланирован набор биологического материала 100 больных гистологически верифицированным МННРМП (n=50) и МННРМП (n=50). В настоящее время выполнено секвенирование 36 образцов опухолевой ткани, результаты которого представлены в данной публикации.

Медиана возраста – 69 (31–86) лет. Мужчин – 27 (75,0%). Во всех случаях выявлен РМП cTa-T4N0-2M0, диагноз УК верифицирован путем гистологического исследования образцов опухолевой ткани, полученной при трансуретральной резекции МП. У 34 (94,4%) пациентов диагностирован МННРМП: CIS без папиллярной опухоли выявлена в 1 (2,9%), Ta – в 14 (38,8%), T1 – в 19 (52,7%) образцах. В 2 (5,6%) случаях имел место МННРМП. УК high-grade верифицирована в 14 (38,9%) наблюдениях.

В качестве биоматериала использованы образцы опухоли, фиксированные в формалине и залитые в парафин. С парафиновых блоков сделаны гистологические срезы толщиной 5–10 мкм, из которых произведено выделение ДНК с помощью набора GeneJET FFPE DNA Purification Kit (ThermoFisher) и РНК с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen). В работу брали образцы с концентрацией ДНК не ниже 0,5 нг/мкл, измеренной с помощью набора Qubit™ dsDNA Quantitation, High Sensitivity (ThermoFisher), и с концентрацией РНК не ниже 4 нг/мкл, измеренной с помощью набора Qubit™ RNA High Sensitivity (ThermoFisher). Библиотеки для секвенирования готовили с помощью набора Illumina TruSight Oncology 500. Длину фрагментов готовых библиотек измеряли с помощью TapeStation High Sensitivity DNA ScreenTape Analysis (Agilent). Концентрацию библиотек оценивали с помощью набора Qubit™ dsDNA Quantitation, High Sensitivity (ThermoFisher). Секвенирование производили на приборах Illumina Novaseq 6000 и Illumina NextSeq 550.

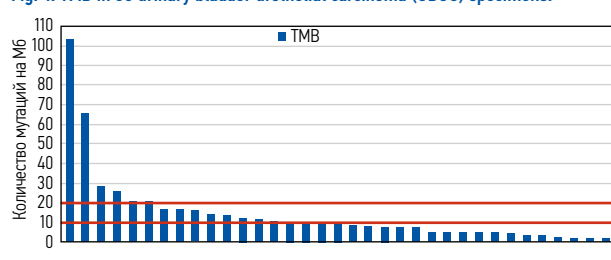
Для биоинформатической обработки «сырых» данных секвенирования использовали программное обеспечение, предоставленное производителем [3]. Фильтрацию выявленных точечных генетических вариантов по каждому образцу осуществляли по следующим параметрам:

- 1) частота в контрольной популяционной выборке (gnomad v.2.1.1 [4]) не более 5%;
- 2) расположение варианта в кодирующей части гена или в каноническом сайте сплайсинга (кроме вариантов, аннотированных в базе данных ClinVar [5] как патогенные или вероятно патогенные);
- 3) синонимичные замены исключали из анализа, за исключением патогенных и вероятно патогенных вариантов согласно ClinVar;
- 4) при фильтрации исключали варианты, аннотированные в ClinVar как доброкачественные или вероятно доброкачественные.

Клиническую интерпретацию проводили в соответствии с международными клиническими рекомендациями по интерпретации данных NGS в онкологии [6]. Для оценки терапевтической значимости и категоризации нуклеотидных вариантов использовали онкологическую базу данных OncoKB (MSK's Precision Oncology Knowledge Base). К 1-му уровню терапевтической значимости относили мутации, для которых имеются данные клинических исследований (КИ), подтверждающие их ассоциацию с ответом на терапию; ко 2-му уровню – мутации, для которых существует достаточный объем доказательств их взаимосвязи с терапией вне рамок формальных КИ; к 3-му уровню – мутации, характеризующиеся определенным, но недостаточным набором клинических доказательств

Рис. 1. TMB в 36 образцах УК МП.

Fig. 1. TMB in 36 urinary bladder urothelial carcinoma (UBUC) specimens.



их терапевтической значимости в отношении того или иного препарата; к 4-му уровню – мутации, в отношении которых есть только биологические свидетельства их возможной связи с ответом на терапию. В отдельный класс онкогенных мутаций выделяли патогенные и вероятно патогенные варианты, не имеющие на данный момент терапевтического значения, в генах, ассоциированных с процессами канцерогенеза [7].

Вся клиническая информация, а также результаты NGS формализованы в виде электронных таблиц Microsoft Excel с помощью специально созданного кодификатора и подвергнуты статистической обработке с применением блока статистических программ IBM SPSS Statistics.

Результаты

Медиана TMB в изученных образцах составила 14,1 (1,6–102,9) мутации в 1 мегабазе генома (мутаций/Мб), при этом низкая TMB (<10 мутаций/Мб) выявлена в 20 (55,6%), средняя (10–20 мутаций/Мб) – в 10 (27,7%), высокая (≥20 мутаций/Мб) – в 6 (16,7%) из 36 случаев (рис. 1).

Во всех 36 (100,0%) образцах уровень MSI оказался низким.

В 36 образцах выявлена 181 терапевтически значимая и онкогенная мутация в 62 генах: медиана – 5 (1–16) мутаций в образце. В структуре мутаций доминировали SNV – 123 (68%), при этом наибольшую частоту имели нуклеотидные замены G>A – 36 (29,3%) из 123 и C>T – 35 (28,5%) из 123. Выявлено 47 (26,0%) indel-мутаций, 10 (5,5%) амплификаций и 1 (0,6%) транслокация.

Клинически значимые мутации обнаружены во всех 36 (100,0%) наблюдениях. Наибольшая частота клинически значимых мутаций отмечена в генах *FGFR3* – 22 (61,1%) образцов, *KDM6A* – 22 (61,1%), *STAG2* – 13 (36,1%), *PIK3CA* – 9 (25,0%), *ARID1A* – 9 (25,0%); также с частотой ≥10% выявлялись альтерации генов *ERBB2* – 6 (16,7%), *TP53* – 6 (16,7%), *TSC1* – 5 (13,9%), *CDKN2A* – 4 (11,4%), *CTNNB1* – 4 (11,4%), *EP300* – 4 (11,4%) и *TERT* – 4 (11,4%). Патогенные мутации 1–2-го уровня, обеспечивающие потенциальные точки воздействия для противоопухолевых препаратов, обнаружены в 29 (80,6%) из 36 образцов: в одном гене – 14 (38,9%), в двух генах – 8 (22,2%), в трех генах – 7 (19,4%). Данные альтерации выявлены в 13 генах: *AKT1*, *ATM*, *BRAF*, *CHEK2*, *ERBB2*, *FGFR3*, *IDH1*, *MLH1*, *NF1*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN* и *TSC1*.

В настоящее время наибольший клинический интерес представляет профиль мутаций в гене *FGFR3*, выявленных в 22 (61,1%) образцах. У 19 (52,8% от общего числа) пациентов с МННРМП обнаружены известные биомаркеры ответа на эрдафитиниб; у 2 (5,6%) больных – мутации 3–4-го уровня терапевтической значимости; у 1 (2,8%) – патогенная мутация, влияние которой на чувствительность к эрдафитинибу на данный момент неизвестно (табл. 1).

В 28 (77,8%) образцах выявлены мутации 3–4-го уровня в 9 генах: в одном гене – 17 (47,2%), в двух генах – 7 (19,4%), в трех генах – 4 (11,1%) образца. Наиболее часто среди мутаций 3–4-го уровня терапевтической значимости встречались альтерации в генах *KDM6A* (61,1%), *ARID1A* (25,0%) и *CDKN2A* (11,4%). Частота и вид клинически значимых мутаций, выявленных в 36 образцах УК МП, отражены на рис. 2.

Онкогенные мутации, не ассоциированные с появлением белков-мишеней для противоопухолевой терапии, выявлены у 30 (83,3%) пациентов: в одном гене – 6 (16,7%), в двух

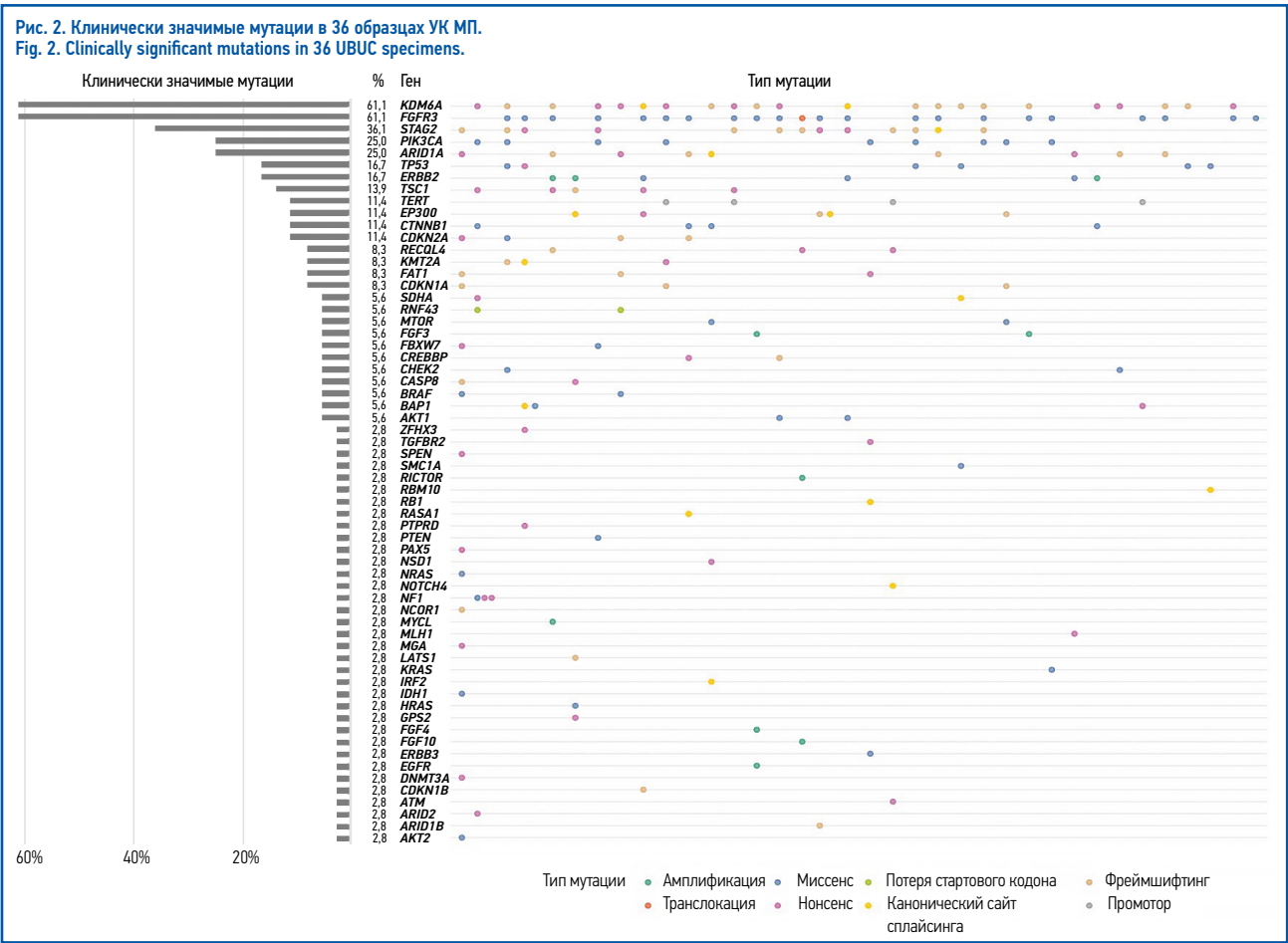


Таблица 1. Мутации, выявленные в гене *FGFR3* в клетках образцов УК МП
Table 1. Mutations identified in the *FGFR3* gene in UBUC specimen cells

Мутация	Количество образцов	Уровень клинической значимости	Представляет терапевтическую мишень
S249C	9	1	Да
Y373C	5	1	
R248C	2	1	
G370C	1	1	
FGFR3-TACC3	1	1	
S371C	1	2	Нет
K650M	1	3	
K650E	1	4	
G380R	1	Онкогенная	

генах – 11 (30,6%), в трех генах – 7 (19,4%), в четырех генах – 4 (11,1%), в семи генах – 1 (2,8%) и в десяти генах – 1 (2,8%).

Обсуждение

Мы провели исследование 36 образцов УК МП, среди которых доминировали мышечно-неинвазивные варианты опухоли (94,4%), путем NGS с использованием панели на 523 гена. Медиана TMB составила 14,1 мутации/Мб, при этом высокая TMB выявлена в 16,7% образцов. Эти результаты соответствуют ранее опубликованным данным, свидетельствующим о высокой TMB при РМП [8, 9]. Высокая TMB характерна для экзогенно-индуцированных опухолей, прежде всего – рака легкого и РМП. Большая частота, значительное разнообразие мутаций и, как следствие, белковых продуктов экспрессии мутированных генов обеспечивают потенциальное повышение активности

иммунной системы, с чем связана большая клиническая эффективность терапии ингибиторами контрольных точек противоопухолевого иммунного ответа при опухолях с высокой TMB [10]. Необходимо подчеркнуть, что порог отсечки уровня TMB, ассоциированного со значимым улучшением результатов иммунотерапии при РМП, нуждается в изучении и валидации.

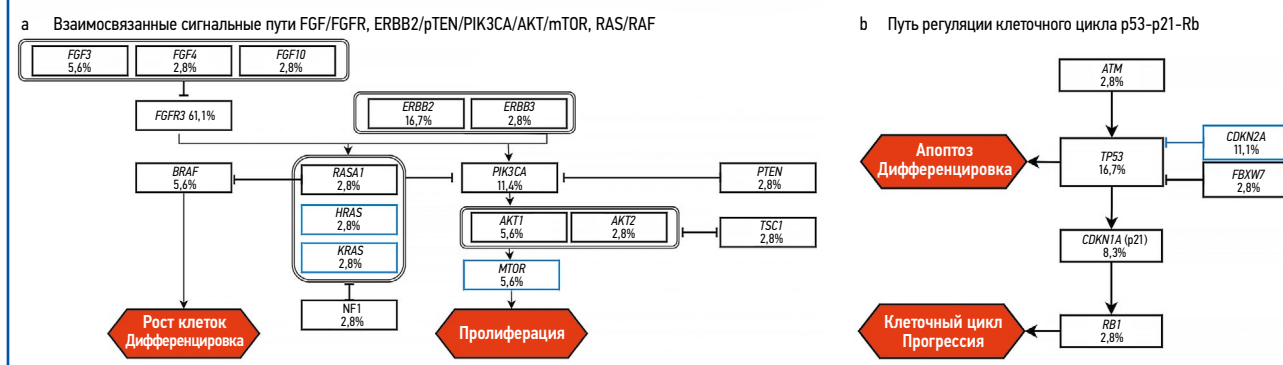
Случаев высокой MSI в нашей серии наблюдений не зарегистрировано, что согласуется с результатами метаанализа 110 исследований, согласно которому высокая MSI выявляется только у 2,11% больных с УК [11].

Во всех изученных образцах УК мы идентифицировали патогенные мутации 62 генов, приводящие к активации онкогенов (*FGF/FGFR*, *PIK3CA*, *ERBB2*) либо обуславливающие аномальные изменения путей передачи сигнала и экспрессии белков, участвующих в подавлении апоптоза (*p53*, *RBI*, *PTEN*), регуляции клеточного цикла (*p53*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN1B*), модификации и регуляции хроматина (*EP300*, *STAG2*, *TERT*) и репарации ДНК (*ATM*, *CHEK2*), а также клеточной адгезии (*CTNNB1*) [2, 12]. Доминировали точечные мутации с преобладанием SNV G>A и C>T, реже идентифицировались амплификации и транслокации.

При МНИРМП доминировали активирующие мутации классических онкогенов по типу приобретения функций (gain-of-function). Так, патогенные альтерации генов, вовлекающие сигнальный путь *FGF/FGFR* (*FGF3*, *FGF4*, *FGF10*, *FGFR3*), связанный с каскадом *PIK3CA/АКТ/mtOR*, идентифицировали в 22 (61,1%) образцах, мутации гена *PIK3CA* – в 9 (25%), *AKT1/2* – в 3 (8,3%), *MTOR* – 2 (5,6%). В 6 (16,7%) образцах наблюдались мутации в гене *ERBB2*, в том числе амплификации – в 3 случаях (рис. 3).

Реже регистрировали инактивирующие мутации генов-онкосупрессоров. В нашей серии наблюдений альтерации *TP53* отмечены в 16,7% случаев, *TSC1* – 13,9%, *BAP1* – 5,6%, реже регистрировали мутации генов *NF1* (2,8%), *PTEN* (2,8%) и *RBI* (2,8%); см. рис. 3.

Рис. 3. Частота мутаций генов: а – сигнальных путей FGF/FGFR, ERBB2/pTEN/PIK3CA/AKT/mTOR и RAS/RAF; б – пути регуляции клеточного цикла p53-p21-Rb (черная рамка – мутации 1–2-го уровня терапевтической значимости, синяя рамка – мутации 3–4-го уровня терапевтической значимости).
Fig. 3. Frequency of gene mutations: а – FGF/FGFR signaling pathways, ERBB2/pTEN/PIK3CA/AKT/mTOR and RAS/RAF; б – p53-p21-Rb cell cycle regulation pathways (black frame – mutations of therapeutic significance level 1-2, blue frame – mutations of therapeutic significance level 3-4).



Спектр выявленных нами генетических изменений во многом соответствует ранее опубликованным данным, согласно которым наиболее распространенными мутациями при МНИРМП являются альтерации генов *FGFR3* и *PIK3CA* [12], частота которых в нашей серии наблюдений достигла 61,1 и 25%. В исследовании С. Hurst и соавт. (2021 г.), основанном на анализе альтераций числа копий участков ДНК и экспрессии матричной РНК в 217 образцах МНИРМП, частота мутаций *FGFR3* достигла 62%, далее в порядке убывания регистрировались альтерации генов *PIK3CA* (54%) и *STAG2* (37%); другими генами, мутации в которых регистрировались с частотой $\geq 10\%$, являлись *KMT2A*, *KMT2C*, *KMT2D*, *CREBBP*, *EP300*, *RYR2*, *CDKN1A*, *ATM*, *ZFP36L1* и *TSC1*. Интересно, что, по данным авторов, мутации *FGFR3* и *HRAS* являлись взаимоисключающими [2].

Следует отметить частые мутации 3–4-го уровня терапевтической значимости, отмеченные в 77,8% наших наблюдений. Наиболее распространенными являлись варианты в генах *KDM6A* (61,1%) и *ARID1A* (25,0%). В исследованиях других авторов частота мутаций в гене *KDM6A* достигает 20–52%, *ARID1A* – 18–25% [2, 13].

Наибольший клинический интерес представляют патогенные мутации, обеспечивающие мишень для противоопухолевых препаратов и выявленные в 29 (80,6%) из 36 образцов наших пациентов. При распространенной УК с патогенными мутациями гена *FGFR3*, включая точечные мутации внеклеточного домена *FGFR3* (R248C, S249C, G370C, Y373C) и транслокации/химеры *FGFR3:TACC3*, *FGFR3:BAIAP2L1*, *FGFR2:CASP7* и *FGFR2:BICC1*, *FGFR*-ингибитор эрдафитиниб продемонстрировал преимущество по сравнению со стандартной химиотерапией при резистентных формах заболевания в рандомизированном КИ III фазы THOR. В настоящее время внутрипузырная форма доставки эрдафитиниба изучается при МНИРМП у пациентов с позитивным мутационным статусом. Кроме того, проводится ряд КИ других таргетных анти-*FGFR*-препаратов [14]. В нашей серии терапевтически значимые мутации *FGFR3* выявлены у 52,8% больных.

Патогенные мутации *ERBB2* (*HER2*), выявленные у 16,7% наших пациентов, обеспечивают потенциальную мишень для антител к *HER2*, в том числе входящих в состав конъюгатов. Эффективность ингибитора *ERBB2* трастузумаба дерукстекана доказана у пациентов с позитивным *HER2*-статусом опухолевых клеток при резистентной УК в КИ DESTINY-PanTumor02 [15].

При патогенных мутациях в генах *AKT1* и *PIK3CA*, выявленных у 5,6 и 25,0% наших пациентов соответственно, потенциальными лечебными опциями могут служить конкурентные и аллостерические ингибиторы АКТ, а также блокаторы *PIK3CA*, имеющие доказанную эффективность при раке молочной железы (РМЖ) [16]. При РМЖ доказано снижение эффективности *HER2*-таргетной терапии при *HER2*-позитивной опухоли с патогенными мутациями *PIK3CA* [17]. Данные, касающиеся пациенток с РМЖ, требуют дальнейшего изучения

влияния коэкспрессии мутантных белков на прогноз эффективности таргетной терапии УК.

У пациентов с УК ингибитор *PIK3CA* алпелисиб, имеющий доказанную эффективность при РМЖ с позитивным статусом гормональных рецепторов и мутацией *PIK3CA* [18], в комбинации с *FGFR*-ингибитором нинтеданибом продемонстрировал обнадеживающие результаты в клеточной линии УК. При этом показано, что активация *PIK3CA* обуславливает анти-*FGFR*-резистентность, которая может быть подавлена алпелисибом [19].

Помимо частых патогенных мутаций мы выявляли редкие альтерации, которые также позволяют рассматривать возможность применения таргетных противоопухолевых препаратов у пациентов с УК, резистентной к стандартному противоопухолевому лечению. Так, позитивный мутационный статус *MLH1* (2,8% образцов УК) может рассматриваться как показание к анти-PD-(L)1-терапии при опухолях любого гистогенеза [20]. При инактивирующих мутациях генов гомологичной рекомбинации ДНК (*HRR*) *ATM* (2,8% образцов УК) и *CHEK2* (5,6% образцов УК) допустимо рассмотреть назначение *PARP*-ингибиторов, продемонстрировавших эффективность при РМЖ, раке предстательной железы и раке яичников у пациентов с позитивным мутационным статусом [21]. Продукт экспрессии мутантного гена *BRAF* (5,6% образцов УК) является возможной мишенью *BRAF*-ингибиторов, используемых для лечения меланомы и рака легкого [22]. Следует отметить, что активирующие мутации *BRAF* оказались связаны со снижением частоты объективного ответа на *FGFR3*-ингибитор эрдафитиниб при УК [23]. *MEK*-ингибиторы продемонстрировали эффективность при наличии мутаций *NRAS* (2,8% образцов УК), а также ограниченную противоопухолевую активность при аберрациях *KRAS* (2,8% образцов УК) при некоторых солидных опухолях [24]. При активирующих мутациях *KRAS* (2,8% образцов УК) у больных раком легкого найдено клиническое решение в виде разработки *KRASG12C*-ингибитора [25]. Позитивный мутационный статус *IDH1* (2,8% образцов УК) ассоциирован с высокой эффективностью *IDH1*-ингибиторов при глиоме, остром миелолейкозе, хондросаркоме и холангиокарциноме [26]. Активирующие мутации *TSC1* (13,9%) – возможное показание к применению ингибиторов *mTOR*, в настоящее время используемых при колоректальном и почечно-клеточном раке [27]. Возможности использования генно-таргетной терапии, эффективной при нейрофиброматозе с инактивирующими мутациями *NF1*, у пациентов с *NF1*-позитивными опухолями пока представляются сомнительными.

Заключение

Несмотря на то что не все таргетные препараты имеют доказанную эффективность при УК и не все пациенты с МНИРМП будут являться кандидатами для системной лекарственной терапии, полученные данные дают представление о дальнейших направлениях исследований.

Раскрытие интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Disclosure of interest. The authors declare that they have no competing interests.

Вклад авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Я.В. Гриднева, В.Н. Галкин – сбор клинического материала, написание текста статьи; М.И. Волкова – анализ данных, написание текста статьи; Д.Н. Хмелькова – биоинформатическая обработка и интерпретация данных секвенирования нового поколения, анализ данных, написание текста статьи; К.А. Благодатских, А.А. Желудкевич – секвенирование нового поколения, написание текста статьи; А.Б. Семенова, А.А. Вещевайлов, С.А. Бондарев, А.В. Бабкина – гистологическое исследование образцов опухолевой ткани, написание текста статьи.

Authors' contribution. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. Ya.V. Gridneva, V.N. Galkin – clinical data collection,

writing the article; M.I. Volkova – data analysis, writing the article; D.N. Khmelkova – bioinformatics processing and interpretation of new-generation sequencing data, data analysis, writing the article; K.A. Blagodatskikh, A.A. Zheludkevich – new-generation sequencing, writing the article; A.B. Semenova, A.A. Veshchevailov, S.A. Bondarev, A.V. Babkina – histological examination of tumor tissue samples, writing the article.

Источник финансирования. Исследование проводится в рамках проекта Московского центра инновационных технологий в здравоохранении №2002-32/23 от 21.04.2023.

Funding source. The study is conducted as a part of the project of the Moscow Center for Innovative Technologies in Healthcare No. 2002-32/23 dated April 21, 2023.

Информированное согласие на публикацию. Пациенты подписали форму добровольного информированного согласия на публикацию медицинской информации.

Consent for publication. Written consent was obtained from the patients for publication of relevant medical information and all of accompanying images within the manuscript.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Gladkov O.A., Bulychkin P.V., Volkova M.I., et al. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака мочевого пузыря. Практические рекомендации RUSSCO, ч. 1. Злокачественные опухоли. 2023;13(3s2):620-39 [Gladkov OA, Bulychkin PV, Volkova MI, et al. Prakticheskie rekomendatsii po lekarstvennomu lecheniiu raka mochevogo puzrya. Prakticheskie rekomendatsii RUSSCO, ch. 1. Zlokachestvennye Opukholi. 2023;13(3s2):620-39 (in Russian)].
- Hurst CD, Cheng G, Platt FM, et al. Stage-stratified molecular profiling of non-muscle-invasive bladder cancer enhances biological, clinical, and therapeutic insight. *Cell Rep Med*. 2021;2(12):100472.
- Illumina, Inc. Available at: <https://support.illumina.com>. Accessed: 15.06.2024.
- Gudmundsson S, Singer-Berk M, Watts NA, et al. Variant interpretation using population databases: Lessons from gnomAD. *Human Mutation*. 2021;43(8):1012-30.
- ClinVar. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Accessed: 12.01.2024.
- Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):4-23. DOI:10.1016/j.jmoldx.2016.10.002
- Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol*. 2017;2017:PO.17.00011. DOI:10.1200/PO.17.00011
- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-21.
- Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*. 2017;9(1):34.
- Marabelle A, Fakih M, Lopez J, et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol*. 2020;21(10):1353-65.
- Chandran EBA, Iannantuono GM, Atiq SO, et al. Mismatch repair deficiency and microsatellite instability in urothelial carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Oncol*. 2024;3(1):e000335.
- Kang HW, Kim WJ, Yun SJ. The therapeutic and prognostic implications of molecular biomarkers in urothelial carcinoma. *Transl Cancer Res*. 2020;9(10):6609-23.
- Hurst CD, Alder O, Platt FM, et al. Genomic Subtypes of Non-invasive Bladder Cancer with Distinct Metabolic Profile and Female Gender Bias in KDM6A Mutation Frequency. *Cancer Cell*. 2017;32(5):701-15.e7. DOI:10.1016/j.ccell.2017.08.005
- Ascione CM, Napolitano F, Esposito D, et al. Role of FGFR3 in bladder cancer: Treatment landscape and future challenges. *Cancer Treat Rev*. 2023;115:102530.
- Wosocki PJ, Jung KH, Oh DY, et al. Efficacy and safety of trastuzumab deruxtecan (T-DXd) in patients (pts) with HER2-expressing solid tumors: Results from the bladder cohort of the DESTINY-PanTumor02 (DP-02) study. *J Clin Oncol*. 2024;42(16):4565.
- Shariati M, Meric-Bernstam F. Targeting AKT for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019;28(11):977-88.
- Carmona FJ, Montemurro F, Kannan S, et al. AKT signaling in ERBB2-amplified breast cancer. *Pharmacol Ther*. 2016;158:63-70.
- André F, Ciruelos E, Rubovszky G, et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(20):1929-40.
- Marqués M, Corral S, Sánchez-Díaz M, et al. Tumor and Stromal Cell Targeting with Nintedanib and Alpelisib Overcomes Intrinsic Bladder Cancer Resistance. *Mol Cancer Ther*. 2023;22(5):616-29.
- Maio M, Ascierto PA, Manzyuk L, et al. Pembrolizumab in microsatellite instability high or mismatch repair deficient cancers: updated analysis from the phase II KEYNOTE-158 study. *Ann Oncol*. 2022;33(9):929-38.
- Wicks AJ, Krastev DB, Pettitt SJ, et al. Opinion: PARP inhibitors in cancer-what do we still need to know? *Open Biol*. 2022;12(7):220118.
- Hertzman JC, Egyhazi BS. BRAF inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2014;142(2):176-82.
- Thomas J, Sonpavde G. Molecularly Targeted Therapy towards Genetic Alterations in Advanced Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(7):1795.
- Farnsworth DA, Inoue Y, Johnson FD, et al. MEK inhibitor resistance in lung adenocarcinoma is associated with addiction to sustained ERK suppression. *NPJ Precis Oncol*. 2022;6(1):88.
- Li BT, Skoulidis F, Falchook G, et al. CodeBreak 100: Registrational Phase 2 Trial of Sotorasib in KRAS p.G12C Mutated Non-small Cell Lung Cancer. Presented at: International Association for the Study of Lung Cancer 2020 World Conference on Lung Cancer; January 28-31, 2021; virtual. Abstract PS01.07.
- Tian W, Zhang W, Wang Y, et al. Recent advances of IDH1 mutant inhibitor in cancer therapy. *Front Pharmacol*. 2022;13:982424.
- Ali ES, Mitra K, Akter S, et al. Recent advances and limitations of mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Cancer Cell Int*. 2022;22(1):284.

Статья поступила в редакцию / The article received: 14.10.2024

Статья принята к печати / The article accepted for publication: 07.12.2024



OMNIDOCTOR.RU