



Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации



Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации
Институт молекулярной медицины

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

к.м.н., доц. Михайленко Д.С.

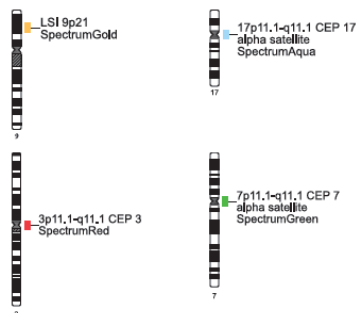
Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Проблемы лабораторной диагностики РМП

1. Цитологический анализ мочи – чувствительность падает до 25-50% при диагностике небольших высокодифференцированных опухолей
2. UBC-антиген (комбинация цитокератинов 8 и 18), определение NMP22, ВТА-тест – пока не имеют широкого распространения в практике по ряду причин
4. **UroVysion – FISH-анализ клеток в осадке мочи для выявления анеуплоидии хромосом 3, 7, 17 и потери 9p21.**
5. **SxBladder – системы экспрессионных РНК-маркеров**
SxBladder Detect – для неинвазивной лабораторной диагностики РМП у пациентов с гематурией
SxBladder Triagle – для неинвазивной лабораторной диагностики РМП у пациентов низкого риска с микрогематурией
SxBladder Monitor – для мониторинга рецидива поверхностного РМП

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

UroVysion – FISH осадка мочи в диагностике РМП



- анализируют первые 25 атипичных клеток
- минимум 4 из 25 атипичных клеток показывают aberrации 2 и более исследуемых хромосом в каждой из них
- 12 и более атипичных клеток несут гомозиготную делецию 9p21



Результат теста считают положительным

Ограничения метода:

- необходимость валидации результатов теста вторым специалистом при пограничном уровне хромосомных aberrаций
- некорректность его результатов при бактериурии
- недостаточное для анализа количество атипичных клеток в осадке мочи при опухоли размером менее 5 мм
- возможность ложноположительного результата у пациентов с опухолями мочевого пузыря и других локализаций, также несущими множественные хромосомные aberrации

Клиническая чувствительность и специфичность UroVysion составляет 71 и 66%, соответственно (суммарно для всех подгрупп РМП). UroVysion одобрен FDA как диагностический тест у пациентов с гематурией при подозрении на РМП.

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Что исследуют в качестве молекулярно-генетических маркеров РМП?

- 1. РНК** – измерение экспрессии генов на уровне мРНК. Изменение паттерна экспрессии панели генов-кандидатов ассоциировано с прогнозом; гиперэкспрессия определенных генов ассоциирована с РМП
- 2. ДНК** – различные паттерны мутаций и CNV ассоциированы с прогнозом; точковые мутации в определенных локусах характерны для РМП

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

CxBladder Triage – на основе панели РНК-маркеров



$$P\ INDEX = -3.78 + (0.81 \times Age + 0.46 \times Gender + 0.78 \times Smoking\ history + 0.59 \times Hfreq)$$

+

$$G\ INDEX = -6.22 + (0.77 \times IGFBP5 - 1.11 \times HOXA13 + 1.56 \times MDK + 1.24 \times CDK1 - 0.43 \times CXCR2)$$



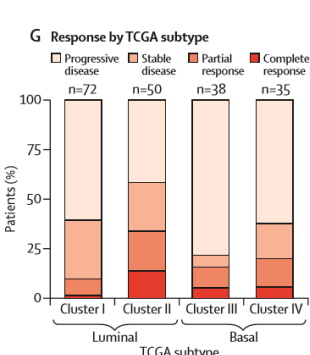
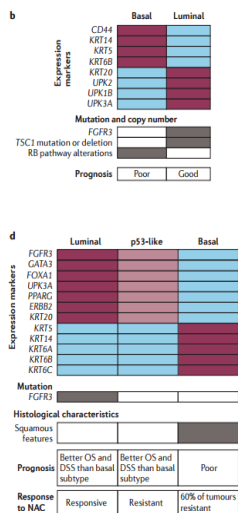
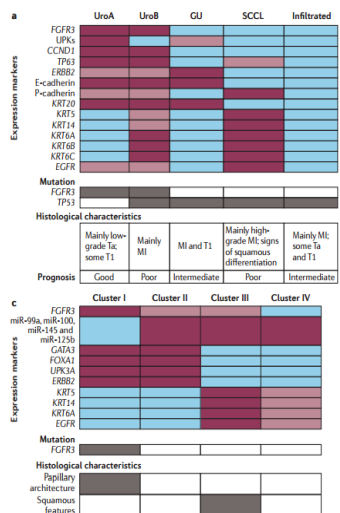
$$G + P\ INDEX = -8.46 + (0.79 \times IGFBP5 - 1.60 \times HOXA13 + 2.10 \times MDK + 0.95 \times CDK1 - 0.38 \times CXCR2) + (0.64 \times Age + 1.11 \times Gender + 0.98 \times Smoking\ history + 0.56 \times Hfreq)$$

Kavalieris L. et al., BMC Urology. 2015; 15:23

AUC для P-индекса 0,66 → AUC для G+P-индекса 0,86
 AUC для G-индекса 0,83

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Панели прогностических экспрессионных маркеров при РМП



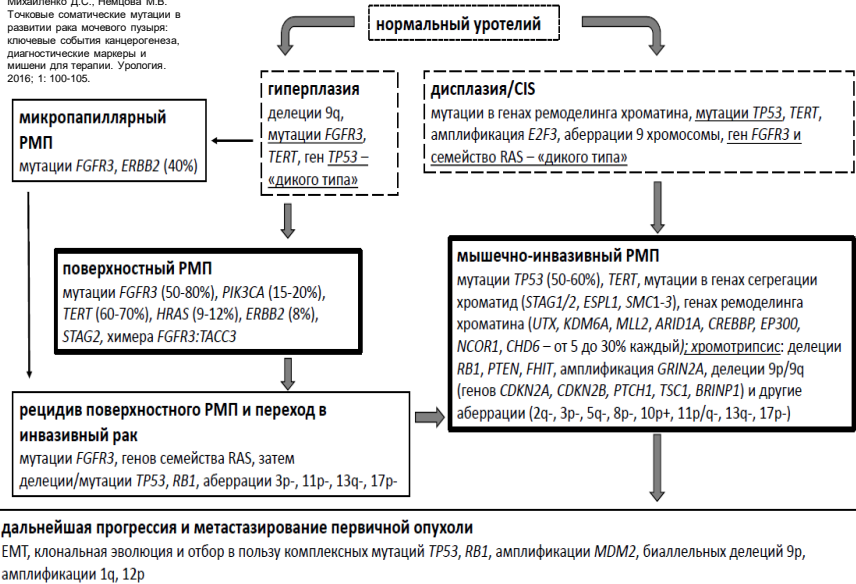
Knowles M.A., Hurst C.D., 2014.

Rosenberg J.E. et al., 2016.
 Лучше отвечают на атезолизумаб (ингибитор PD-L1) пациенты со II кластером по TCGA.

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Мутации-драйверы в канцерогенезе рака мочевого пузыря

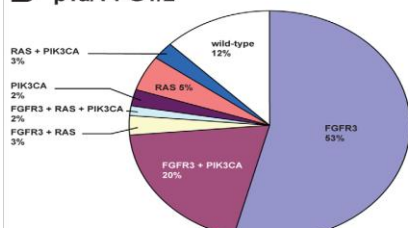
Михайленко Д.С., Немцова М.В.
Точковые соматические мутации в развитии рака мочевого пузыря: ключевые события канцерогенеза, диагностические маркеры и мишени для терапии. Урология. 2016; 1: 100-105.



Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Частые точковые мутации в онкогенах при РМП

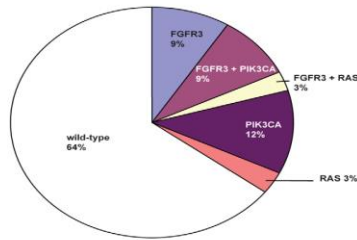
B pTa/T1 G1/2



Ген *FGFR3* локализован в области 4p16, содержит 19 экзонов.

«Горячие точки» мутагенеза находятся в 7 и 10 экзонах. Точковые активирующие мутации в нем описаны с частотой до 50% в опухолях из уротелия.

D ≥ pT2



Мутации *FGFR3* ассоциированы с высокодифференцированным и опухолями РМП и ранними стадиями заболевания.

Kompier L.C. et al. *FGFR3*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* and *PIK3CA* mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One*. 2010; 5(11): e13821.

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Комбинация анализа мутаций *FGFR3* с метилированием других генов

Table 4 Comparison of sensitivities of *FGFR3* mutations, methylation, and combined markers according to stage and grade

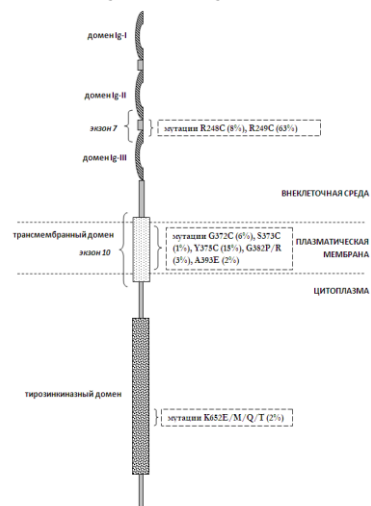
A. Diagnosis study		Primary tumor (n = 167)				Tumor grade, % (no.)	
Markers	Tumor stage, % (no.)						
	pTa (n = 126)	pT1 (n = 25)	CIS (n = 6)	Other (n = 10)	Low (n = 100)	High (n = 67)	
<i>FGFR3</i>							
All mutations	46.0 (58)	28.0 (7)	16.7 (1)	30.0 (3)	53.0 (53)	23.9 (16)	
S249C	69.0 (40)	42.8 (3)			62.2 (33)	62.5 (10)	
Y375C	13.8 (8)	28.6 (2)		33.3 (1)	17.0 (9)	12.5 (2)	
R248C	10.3 (6)	28.6 (2)	100 (1)	33.3 (1)	11.3 (6)	25.0 (4)	
G372C	5.2 (3)				5.7 (3)		
S249C/R248C	1.7 (1)				1.9 (1)		
S249C/Y375C				33.3 (1)	1.9 (1)		
Methylation	90.5 (114)	100 (25)	100 (6)	90.0 (9)	89.0 (89)	100 (67)	
Combined markers	94.4 (119)	100 (25)	100 (6)	90.0 (9)	94.0 (94)	100 (67)	
B. Follow-up study							
Markers	Recurrence (n = 72)						
	pTa (n = 55)	pT1 (n = 11)	CIS (n = 2)	Other (n = 4)	Low (n = 47)	High (n = 25)	
<i>FGFR3</i>							
All mutations	43.6 (24)	36.4 (4)		50.0 (2)	46.8 (22)	32.0 (8)	
S249C	58.3 (14)	100 (4)			54.6 (12)	75.0 (6)	
Y375C	20.8 (5)				13.7 (3)	25.0 (2)	
R248C	16.7 (4)			50.0 (1)	22.7 (5)		
G372C	4.2 (1)				4.5 (1)		
S249C/R248C				50.0 (1)	4.5 (1)		
Methylation	89.1 (49)	90.9 (10)	100 (2)	50.0 (2)	85.1 (40)	96.0 (24)	
Combined markers	96.4 (53)	100 (11)	100 (2)	50.0 (2)	93.6 (44)	96.0 (24)	

Roperch J.P. et al. Promoter hypermethylation of HS3ST2, SEPTIN9 and SLIT2 combined with *FGFR3* mutations as a sensitive/specific urinary assay for diagnosis and surveillance in patients with low or high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *BMC Cancer*. 2016; 16: 704.

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Локализация и аннотация мутаций в осадке мочи при РМП

Активирующие мутации в *FGFR3*



Михайленко Д.С., Кушлинский Н.Е.; 2016

Мутации гена *FGFR3* в исследованной выборке

Кодирующая ДНК	Рецептор	rs, HGMD
c.746C→G	p.S249C	CM950470 rs121913483
c.753C→G	p.H251G	rs377554120
c.1124A→G	p.Y375C	CM960657 rs121913485
c.1144G→C	p.G382R	CM940785 rs28931614
c.1156T→C	p.F386L	HM040060 rs17881656

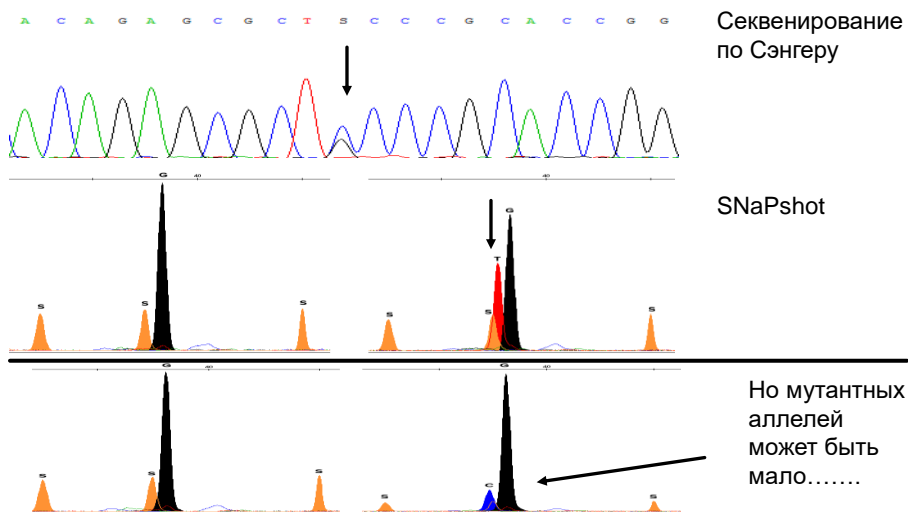
Обнаруженные однонуклеотидные замены представляли собой патогенные миссенс-мутации *FGFR3*

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Определение мутаций в гене *FGFR3* в осадках мочи (НИИ урологии)

Мутация с.746C→G (p.S249C)

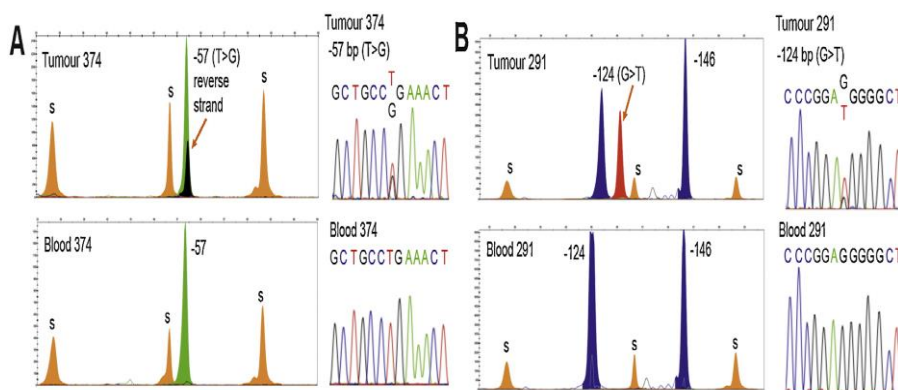
Д.С. Михайленко, Д.В. Перелечин, Г.Д. Ефремов, А.В. Сивков, О.И. Аполихин. Определение мутаций в гене *FGFR3* и РНКЗСА в ДНК из осадка мочи у больных раком мочевого пузыря // Экспериментальная и клиническая урология. 2015, 4: 38-41.



Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Выявление мутаций *TERT* в осадке мочи

Мутации в «горячих точках» промотора *TERT* выявляют 60% случаев рака мочевого пузыря. Это транзиции С-Т в позициях -124 и -146, которые создают новые сайты связывания транскрипционных факторов ETS/ELK.



Hurst C.D., Platt F.M., Knowles M.A. Comprehensive mutation analysis of the *TERT* promoter in bladder cancer and detection of mutations in voided urine // Eur Urol. – 2013., 5287.

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Исследование мутаций при РМП в осадке мочи с помощью NGS

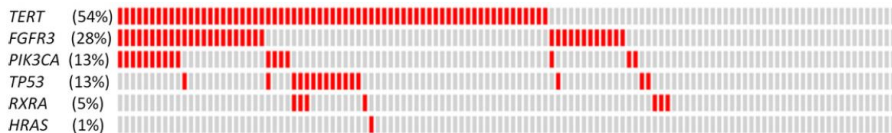


Fig 4. Occurrence of cosmic listed point mutations in urinary DNA from UBC patients. Each column represents an individual patient. Oncoprint representation generated at <http://www.cbioportal.org/>.

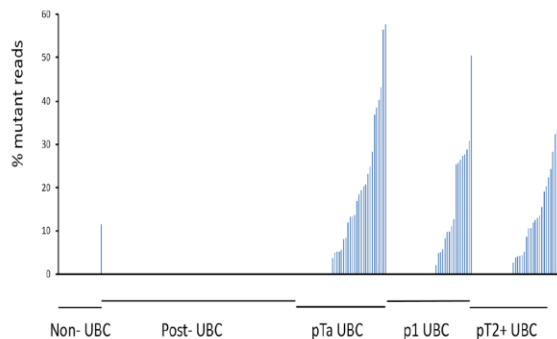


Fig 1. Frequency of mutant *TERT* promoter reads in urinary DNA. The graph shows the percentage of mutant reads in each patient sample considering point mutations at positions chr5:1295228, chr5:1295242/1295243 and chr:1295250.

Ward D.J. et al. Multiplex PCR and Next Generation Sequencing for the Non-Invasive Detection of Bladder Cancer. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0149756.

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Мутации *ERBB2* и чувствительность к лапатинибу

Cancer Biology & Therapy 15:9, 1239–1247; September 2014; © 2014 Landes Bioscience

RESEARCH PAPER

Impact of *ERBB2* mutations on in vitro sensitivity of bladder cancer to lapatinib

Michela de Martino¹, Dazhong Zhuang², Tobias Klatter¹, Malte Rieken², Morgan Rouprêt^{3,4}, Evangelos Xylinas², Thomas Clozel¹, Martin Krzywinski¹, Olivier Elemento⁷, and Shahrokh F Shariat^{1,2,4,*}

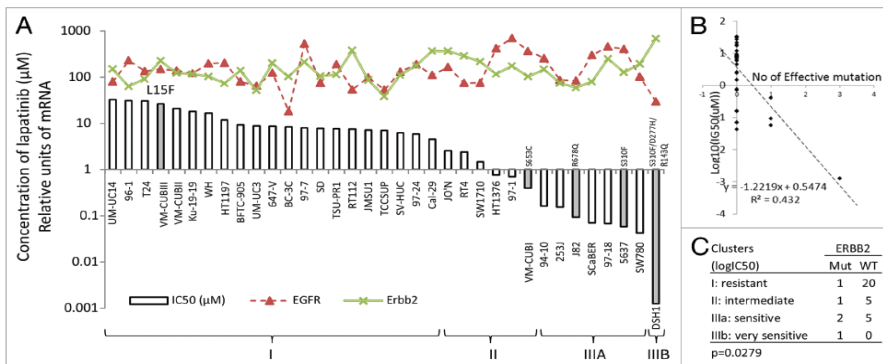


Figure 5. Response to lapatinib by *ERBB2* mutational status. (A) Cluster according to the sensitivity to lapatinib (upper panel) and IC_{50} for the cell lines as well as the relative expression levels of EGFR and ErbB2 (lower panel). The gray IC_{50} bars refer to cell lines with *ERBB2* mutation. DSH1 containing three *ERBB2* mutations was found to be the most sensitive cell line among all (group IIIb). (B and C) Correlation slope and contingency table of the numbers of *ERBB2* mutations and the sensitivity of cell lines to lapatinib, showing that the sensitivity was significantly increased in cell lines with *ERBB2* mutations.

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.

Миссенс-мутации *ERBB2* и чувствительность к препаратам платины

ERBB2 Mutations Characterize a Subgroup of Muscle-invasive Bladder Cancers with Excellent Response to Neoadjuvant Chemotherapy

Floris H. Groenendijk^a, Jeroen de Jong^{b,†}, Elisabeth E. Fransen van de Putte^{c,†}, Magali Michaut^a, Andreas Schlicker^a, Dennis Peters^d, Arno Velds^e, Marja Nieuwland^e, Michel M. van den Heuvel^f, Ron M. Kerkhoven^e, Lodewijk F. Wessels^a, Annegien Broeks^d, Bas W.G. van Rhijn^c, René Bernards^a, Michiel S. van der Heijden^{a,g,*}

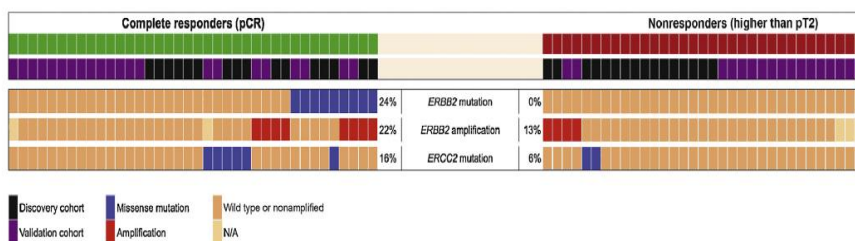


Fig. 2 - OncoPrint showing *ERBB2* missense mutations, *ERBB2* amplifications, and *ERCC2* missense mutations in the 38 complete responders and 33 nonresponders to neoadjuvant chemotherapy in this study. Individual patients are represented as columns.
N/A = not available; pCR = pathologic complete response.

Научно-практическая конференция «Онкоурология»; Москва, 29-30 сентября 2017 г.