

МІЩУК Я.М.¹, СЕРГА С.В.¹, СТАХОВСЬКИЙ Е.А.², ВІТРУК Ю.В.², КОНОНЕНКО А.А.², ШКЛЯР С.Є.¹, ДЕМИДОВ С.В.¹, КОЗЕРЕЦЬКА І.А.¹✉

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Навчально-науковий центр «Інститут біології», Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: slavamishchuk@gmail.com

² Національний інститут раку, Україна, 03022, м. Київ, вул. Ломоносова, 33/43, e-mail: estakhovsky@yahoo.com

✉ iryna.kozeretska@gmail.com, (044) 522-39-95

СОМАТИЧНА МУТАЦІЯ R248C (742 C>T) ГЕНА *FGFR3* ЗА РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА

Серед онкологічних захворювань рак сечового міхура (PCM) становить близько 4% всіх онкопатологій та посідає п'яте місце після пухлин легень, шлунку, стравоходу та гортані [1], у зв'язку з чим є значною соціальною проблемою. Близько 5000 нових випадків захворювання та 2200 смертей від раку сечового міхура зареєстровано в Україні станом на 2013 р [2].

PCM – це гетерогенна група захворювань, розвиток яких залежить від багатьох чинників та може зумовлюватися двома різними молекулярними шляхами. Один з них визначає розвиток неінвазивного раку і характеризується високою частотою мутацій гена *FGFR3* (*Fibroblast growth factor receptor 3*) в пухлинах рTa/T1, низьким ризиком прогресії і сприятливим клінічним прогнозом. Інший показаний для м'язово-інвазивного раку, для якого характерні мутації гена *TP53* та несприятливий клінічний прогноз [3].

Соматичні мутації *FGFR3* є найбільш поширеними мутаціями онкогенів при PCM [4, 5]. Ген білка *FGFR3* знаходиться на 4p16.3 і складається з 19 екзонів. Кодуюча послідовність *FGFR3* охоплює екзони 2–19, а соматичні мутації в пухлинах сечового міхура локалізовані в екзонах 7, 10 і 15 [6]. Найпоширенішими мутаціями є одонуклеотидні заміни, зокрема R248C, S249C, G372C, Y375C та K652E [7, 8]. Мутація R248C в 7 екзоні гена призводить до заміни аргініну на цистеїн у складі екстрацелюлярного домену рецептора [8]. Така мутація за різними даними детектується у 1,9–7,7% випадків [8–14].

FGFR3 є важливим прогностичним маркером [15], проте на сьогодні залишається невідомою частота мутацій цього гена у хворих на рак сечового міхура в Україні. Тому метою нашої роботи був пошук соматичної мутації R248C гена *FGFR3* у пухлинах у пацієнтів з PCM в Україні.

Матеріали і методи

У дослідження були залучені 90 людей з діагнозом карцинома сечового міхура віком від 28 до 76 років. Усі обстежувані є вихідцями і проживають на території України. Зразки для дослідження були надані з інформаційної згоди обстежуваних.

Виділення геномної ДНК проводили з пухлинного матеріалу за допомогою фенол-хлороформного методу за стандартним протоколом та з периферійної крові за допомогою набору «ДНК-сорб В» («AmpliSens», Росія) за протоколом фірми-виробника.

Детекцію мутації R248C здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням алель-специфічних праймерів: R248m/F248-9 (R248m: 5' ATGGGCCCGGTGCGGG GACCA; F248-9: 5' CAGTGGCGGTGGTGGTGA GG) – для мутантного алеля; R248/F248-9 (R248: 5' ATGGGCCCGGTGCGGGGAGCG; F248-9: 5' CAGTGGCGGTGGTGGTGA GG) – для нормально-го алеля [16]. Продуктом обох реакцій є продукт 78 п.о. ПЛР проводили за схемою, описаною в літературі [16], з деякими модифікаціями: денатурація 3 хв при 95 °С, 40 циклів (денатурація 40 с/95 °С, відпал праймерів 30 с/64 °С, синтез 40 с/72 °С), заключний синтез 4 хв при 72 °С.

Для кожної проби проводилося 2 реакції: перша з використанням пари праймерів R248m/F248-9 та друга з використанням пари праймерів R248/F248-9. Реакція проводилась у суміші об'ємом 20 мкл (2,5 мкл геномної ДНК, 2 мкл 10× ПЛР-буфера (10× DreamTaq Buffer, «Bio-Rad», USA), 0,5 мкл 50 мМ MgCl₂ («Bio-Rad», USA) 2 мкл 2 мМ дНТФ («AmpliSens», Росія), по 0,5 мкл 20 мМ кожного праймера, 0,2 мкл Taq-полімерази (5 од. акт/мкл «Bio-Rad», USA), 11,8 мкл дистильованої води), яка готувалася для всіх проб разом, а вже потім додавалася ДНК.

Клінічні та гістопатологічні характеристики

Клінічні характеристики	Стадія				Загалом
	T1	T2	T3	T4	
Кількість	20	41	19	10	90
Ступінь злоякісності пухлини					
G1	7	3	0	0	10
G2	10	30	16	4	60
G3	3	8	3	6	20
Тип					
Інвазивний	4	40	19	10	73
Неінвазивний	16	1	0	0	17
Вік (років)					
Середнє значення	59	59	63	60	
Діапазон	31–76	28–78	52–76	43–69	
Тютюнопаління					
Так	9	15	9	3	36
Ні	11	26	10	7	54
Шкідливі умови праці					
Так	1	6	5	3	15
Ні	19	35	14	7	75

Візуалізацію продуктів ПЛР проводили в 8% поліакриламідному гелі.

Результати та обговорення

Основні клінічні і гістопатологічні характеристики обстежуваної групи пацієнтів наведені в таблиці.

У результаті проведеного аналізу мутацію R248C було виявлено в одного хворого. Мутація була детектована в пухлинному матеріалі, тоді як у крові хворого її виявлено не було, що є свідченням соматичного, а не генеративного походження мутації. Пацієнту з такою мутацією був встановлений діагноз перехідно-клітинна карцинома сечового міхура G2, з глибокою інвазією м'язового шару, здухвинні та обтураторні лімфовузли без ознак метастатичного ураження. Вік пацієнта становив 64 роки. Було проведено оперативне втручання – радикальну нервозберігаючу цистектомію, ілеонеоцистопластику. Перебіг післяопераційного періоду без особливостей протягом 2-х років. У віддаленому післяопераційному періоді отримано задовільні онкологічні та функціональні результати. Пацієнт мав звичку тютюнопаління протягом 30 років та, за його словами,

не підлягав впливу шкідливих умов у процесі трудової діяльності. У сім'ї хворого не спостерігалися випадки злоякісних новоутворень.

Попри те, що мутації *FGFR3* асоційовані з ранніми стадіями РСМ (T1) та пухлинами низького ступеня злоякісності (G1), вони не виключені на пізніх стадіях (T2–T4) та в слабо диференційованих пухлинах (G2, G3), проте трапляються зі значно меншою частотою [4, 9, 11]. Зокрема, виявляють мутації гена *FGFR3* у 7–84% випадків неінвазивного та в 20–22% випадків інвазивного РСМ [17]. Відомо, що мутації *FGFR3* при неінвазивному РСМ корелюють із сприятливим прогнозом перебігу захворювання [4, 9], та незважаючи на те, що пацієнту з ідентифікованою нами мутацією встановлений діагноз інвазивний РСМ, стан хворого після операції є задовільним.

Висновки

У результаті досліджень в одного хворого з інвазивним типом карциноми сечового міхура G2 ступеня злоякісності пухлини було виявлено мутацію. Післяопераційний стан хворого протягом 2-х років є задовільним.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пасічник С.М., Босак М.В., Артишук О.М., Борис Ю.Б. Застосування локальної хіміотерапії у лікуванні поверхневих форм раку // *Acta Medica Leopoliensia*. – Л.: Leopoli, 2012. – № 2. – С. 65–68.
2. Федоренко З.П., Гулак Л.О., Михайлович Ю.Й., Горох Є.Л., Рижов А.Ю., Сумкіна О.В., Куценко Л.Б. Бюлетень національного онкологічного центру України № 16 [Електронний ресурс]. – К., 2015. – Режим доступу: http://ncru.inf.ua/publications/BULL_16/index.htm.
3. Смал М.П., Ролевич А.И., Красный С.А., Гончарова Р.И. Мутационный статус гена *FGFR3* у больных с раком мочевого пузыря в Республике Беларусь // Матер. междунар. конфер. «Молекулярная генетика соматических клеток», 6–9 декабря 2011 г. – Звенигород, РАН, 2011. – С. 26.
4. Liu X., Zwang W., Geng D., He J., Zhao Y., Yu L. Clinical significance of fibroblast growth receptor-3 mutations in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis // *Genet. Mol. Res.* – 2014. – 13, № 1. – P. 1109–1120.
5. Kompier L.C., Lukin I., van der Aa M.N., van Rhijn B.W., van der Kwast T.H., Zwarthoff E.C. *FGFR3*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* and *PIK3CA* mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy // *Plos One*. – 2010. – 5, № 11. – P. 1–13.
6. Полищук Л.А., Телегеева П.Г., Стаховский А.Э., Телегеев Г.Д., Стаховский Э.А. Новые специфичные молекулярные диагностические маркеры при урокологических заболеваниях // *Лабораторная диагностика*. – 2010. – 4, № 54. – С. 46–51.
7. Bakkar A.A., Quach V., Le Borgne A., Toublanc M., Henin D., Wallerand H., Radvanyi F., Bittard H., Ravery V., Gibod L.B., de Medina S.G., Chopin D.K., Grandchamp B. Sensitive allele-specific PCR assay able to detect *FGFR3* mutations in tumors and urine from patients with urothelial cell carcinoma of the bladder // *Clinical Chemistry*. – 2005. – 51, № 8. – P. 1555–1557.
8. Billerey C., Chopin D., Aubriot-Lorton M.-H., Ricol D., Gil Diez de Medina S., Van Rhijn B., Bralet M.P., Lefrere-Belda M.A., Lahaye J.B., Abbou C.C., Bonaventure J., Zafrani E.S., van der Kwast T., Thiery J.P., Radvanyi F. Frequent *FGFR3* mutation in papillary non-invasive bladder tumors // *AJP*. – 2001. – 158, № 6. – P. 1955–1959.
9. Smal M.P., Rolevich A.I., Polyakov S.L., Krasny S.A., Goncharova R.I. *FGFR3* and *TP53* mutations in a prospective cohort of Belarusian bladder cancer patients // *Exp Oncol*. – 2014. – 36, № 4. – P. 246–251.
10. Wang K., Liu T., Liu C., Meng Y., Yuan X., Liu L., Ge N., Liu J., Wang C., Ren H., Yan K., Hu S., Xu Z., Fan Y., Xu D. *TERT* promoter mutations and *TERT* mRNA but not *FGFR3* mutations are urinary biomarkers in Han Chinese patients with urothelial bladder cancer // *Oncologist*. – 2015. – 20, № 3. – P. 263–269.
11. Bodoor K., Ghabkari A., Jaradat Z., Alkhateeb A., Jaradat S., Al-Ghazo M.A., Matalka I., Musleh H., Haddad Y. *FGFR3* mutational status and protein expression in patients with bladder cancer in a Jordanian population // *Cancer Epidemiol.* – 2010. – 34, № 6. – P. 724–732.
12. Jantip J., Tanthanuch M., Kannun S., Karnchanawanichkul W., Pripatnanont C., Sangkhathat S., Thongsuksai P. Mutations of fibroblast growth factor receptor 3 gene (*FGFR3*) in transitional cell carcinoma of urinary bladder in Thai patients [Revision-2a] // *J Med Assoc Thai*. – 2013. – 96, № 8. – P. 976–983.
13. Kompier L.C., Lurkin I., van der Aa M.N., van Rhijn B.W., van der Kwast T.H., Zwarthoff E.C. *FGFR3*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* and *PIK3CA* mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy // *PLoS One*. – 2010. – 5, № 11. – P. 1–13.
14. van Rhijn B.W., Montironi R., Zwarthoff E.C., Jöbsis A.C., van der Kwast T.H. Frequent *FGFR3* mutations in urothelial papilloma // *J Pathol.* – 2002. – 198, № 2. – P. 245–251.
15. Ye F., Wang L., Castillo-Martin M., McBride R., Galsky M.D., Zhu J., Boffetta P., Zhang D.Y., Cordon-Cardo C. Biomarkers for bladder cancer management: present and future // *Am J Clin Exp Urol*. – 2014. – 2, № 1. – P. 1–14.
16. Bakkar A.A., Quach V., Le Borgne A., Toublanc M., Henin D., Wallerand H., Radvanyi F., Bittard H., Ravery V., Gibod L.B., de Medina S.G., Chopin D.K., Grandchamp B. Sensitive allele-specific PCR assay able to detect *FGFR3* mutations in tumors and urine from patients with urothelial cell carcinoma of the bladder // *Clin Chem*. – 2005. – 51, № 8. – P. 1555–1557.
17. Williamson S.R., Wang M., Montironi R., Eble J.N., Lopez-Beltran A., Zhang S., Fan R., Wang L., Osunkoya A.O., Koch M.O., Cheng L. Molecular characteristics of urothelial neoplasms in children and young adults: a subset of tumors from young patients harbors chromosomal abnormalities but not *FGFR3* or *TP53* gene mutations // *Modern Pathology*. – 2014. – 27. – P. 1540–1548.

MISHCHUK YA.M.¹, SERGA S.V.¹, STAKHOVSKIYI E.A.², VITRUK YU.V.², KONONENKO A.A.², SHKLIAR S.YE.¹, DEMYDOV S.V.¹, KOZERETSKA I.A.¹

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre «Institute of Biology», Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail: slavamishchuk@gmail.com

² National Cancer Institute, Ukraine, 03022, Kyiv, Lomonosova str., 33/43, e-mail: estakhovsky@yahoo.com

***FGFR3* R249C (742 C>T) MUTATION IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER**

Aim. The aim of our study was to determine the frequency of *FGFR3* R248C mutation in Ukrainian patients with a bladder cancer. **Methods.** The mutation was detected by PCR with allele specific primers. We investigated mutation in 90 DNA samples of patients with bladder cancer. **Results.** The *FGFR3* R248C mutation was found in 1 case of urothelial carcinoma. **Conclusions.** We found 1 mutation in patient with muscle invasive tumor. The prognosis of the patient is generally good.

Keywords: *FGFR3*, mutation frequency, bladder cancer.