

Противоположные ассоциации мутаций генов *HRAS* и *KRAS* с клиническими параметрами рака мочевого пузыря

М.П. Смаль¹, А.И. Ролевич², Т.И. Набебина², С.А. Красный², Р.И. Гончарова¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Лесной, Минский р-н, Беларусь

Продукты генов *HRAS*, *KRAS* и *NRAS* принадлежат к суперсемейству малых гуанозинтрифосфатаз (ГТФаз), осуществляющих регуляцию клеточного ответа на внешние стимулы посредством активации различных сигнальных путей. В настоящее время доказана роль активирующих мутаций этих генов в патогенезе различных типов раковых заболеваний человека. Вместе с тем значение молекулярных изменений генов семейства *RAS* при раке мочевого пузыря (РМП) остается мало изученным. Целью настоящего исследования явилось изучение частоты и спектра мутаций генов *HRAS*, *KRAS* и *NRAS*, анализ их связи с клинико-морфологическими характеристиками, а также оценка прогностического значения молекулярных изменений этих генов в отношении отдаленных результатов лечения в проспективной когорте из 249 пациентов с РМП. Выявленные с помощью метода SNaPshot мутации генов *HRAS* наблюдались с частотой 11,2 %, причем на мутации гена *HRAS* приходилось 64,3 %, *KRAS* – 28,6 % и *NRAS* – 7,1 %. Нами не обнаружено связи между всеми мутациями генов семейства *RAS* и патоморфологическими характеристиками. Однако при индивидуальном анализе впервые показаны противоположные ассоциации мутаций генов *HRAS* и *KRAS* с клиническими параметрами РМП: мутации *HRAS* были статистически значимо ассоциированы с низкой степенью распространения, высокой степенью дифференцировки, папиллярным характером роста и небольшими размерами опухоли ($p < 0,05$), тогда как мутации *KRAS* наблюдались чаще в уротелиальных карциномах, характеризующихся солидным характером роста и наличием метастазов ($p < 0,05$). При анализе прогностического значения молекулярных изменений показана связь мутаций гена *KRAS* со сниженным уровнем онкоспецифической выживаемости в общей группе пациентов, а также в подгруппе с немышечно-инвазивным РМП. Полученные данные свидетельствуют о том, что молекулярные изменения генов *HRAS* и *KRAS*, по-видимому, характеризуют альтернативные пути патогенеза РМП: мутации *HRAS* связаны с благоприятным, а *KRAS* – с агрессивным течением заболевания.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря; *HRAS*; *KRAS*; *NRAS*; SNaPshot; мутация; прогностическое значение.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Смаль М.П., Ролевич А.И., Набебина Т.И., Красный С.А., Гончарова Р.И. Противоположные ассоциации мутаций генов *HRAS* и *KRAS* с клиническими параметрами рака мочевого пузыря. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):638-646. DOI 10.18699/VJ15.081

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Smal M.P., Rolevich A.I., Nabebina T.I., Krasny S.A., Goncharova R.I. The opposite association of *HRAS* and *KRAS* mutations with clinical variables of bladder cancer. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):638-646. DOI 10.18699/VJ15.081

DOI 10.18699/VJ15.081

УДК 616.62-006.6-089-036.868 (476)

Поступила в редакцию 06.07.2015 г.

Принята к публикации 09.09.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

The opposite association of *HRAS* and *KRAS* mutations with clinical variables of bladder cancer

M.P. Smal¹, A.I. Rolevich², T.I. Nabebina², S.A. Krasny², R.I. Goncharova¹

¹ Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

² N.N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Lesnoy, Minsk District, Belarus

HRAS, *KRAS* and *NRAS* gene products belong to the superfamily of small GTPases. These proteins regulate cellular response to extracellular stimuli by means of activation of different signaling pathways. Although the role of *RAS* gene mutations in the pathogenesis of various human cancers has been established, the clinical significance of these molecular alterations in bladder cancer remains unclear. The aim of this study was to determine the frequency and spectrum of *HRAS*, *KRAS* and *NRAS* mutations, to analyze their relationships with clinicopathological variables and to determine the prognostic value of these alterations in terms of recurrence, progression and mortality, in a prospective cohort of 249 bladder cancer patients. The frequency of *RAS* mutations detected by the SNaPshot method, was found to be 11.2 %, of which *HRAS* mutations accounted for 64.3 %, *KRAS*, for 28.6 % and *NRAS*, for 7.1 %. We failed to find any correlation between all *RAS* mutations and pathomorphological characteristics. However, when analyzed separately, *HRAS* and *KRAS* mutations were for the first time shown to be associated with the opposite clinical parameters of bladder cancer: *HRAS* mutations were significantly associated with low-stage low-grade papillary tumors of a small size ($p < 0.05$), whereas *KRAS* mutations were associated with non-papillary urothelial carcinomas and the presence of metastasis ($p < 0.05$). Analysis of the prognostic value of molecular alterations revealed an association of *KRAS* mutations with decreased cancer-specific survival in both the whole group of patients and the subgroup with non-muscle invasive disease. The data obtained suggest that *HRAS* and *KRAS* gene mutations may characterize alternative pathways of bladder cancer pathogenesis: *HRAS* mutations indicating benign and *KRAS* mutations, aggressive disease course.

Key words: bladder cancer; *HRAS*; *KRAS*; *NRAS*; SNaPshot; mutation; prognostic value.

Рак мочевого пузыря (РМП) является третьим по частоте встречаемости онкоурологическим злокачественным новообразованием после рака простаты и почки и в структуре онкологической заболеваемости Республики Беларусь занимает 7-е место среди мужского населения (Океанов и др., 2013). Уротелиальная, или переходноклеточная, карцинома составляет 90 % от всех случаев РМП. На момент постановки диагноза большинство опухолей мочевого пузыря (55 %) являются немышечно-инвазивными (НМИ РМП) и характеризуются как Ta, Tis или T1 (Babjuk et al., 2013). После проведенного лечения у большинства пациентов с НМИ РМП (70–80 %) в течение 5 лет возникают рецидивы, причем у некоторых из них (10–20 %) развивается прогрессия в мышечно-инвазивную форму. У остальных 45 % пациентов уже на стадии выявления заболевания регистрируется мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (МИ РМП) \geq T2, характеризующийся неблагоприятным прогнозом ввиду развития отдаленных метастазов в 50 % случаев (Stenzl et al., 2012).

Рядом исследователей была выдвинута гипотеза о том, что морфологическая и клиническая гетерогенность опухолей мочевого пузыря обусловлена различными молекулярно-генетическими путями патогенеза уротелиальной карциномы (Spruck et al., 1994; van Rhijn et al., 2004; Knowles, 2008). Для НМИ РМП характерны мутации приобретения функции («gain-of-function»), затрагивающие онкогены *FGFR3* и *PIK3*, а также делеции длинного плеча хромосомы 9, в то время как для МИ РМП – мутации потери функции («loss-of-function»), наблюдаемые в генах-супрессорах опухолей *TP53*, *RB* и *PTEN*.

Полученные нами ранее данные также подтверждают идею о том, что мутации генов *FGFR3* и *TP53* определяют альтернативные генетические пути патогенеза РМП (Смал и др., 2013; Smal et al., 2014). Однако только 62 % опухолей мочевого пузыря имеют мутации в этих генах. В связи с этим важным является изучение молекулярных изменений других генов, вовлеченных в канцерогенез. Понимание роли тех или иных молекулярно-генетических изменений позволит установить причину дивергентного клинического поведения обоих типов РМП и определить потенциальные маркеры прогноза клинического течения болезни и таргетной терапии.

Гены семейства *RAS* (*HRAS*, *KRAS* и *NRAS*) являются клеточными протоонкогенами, кодирующими белки с молекулярной массой 21kDa (Yan et al., 1997), которые принадлежат к суперсемейству малых гуанозинтрифосфатаз (ГТФаз) (Castellano, Santos, 2011). На уровне аминокислотной последовательности белки семейства *RAS* имеют высокую степень гомологии (приблизительно 80 %) и обладают общей способностью связывать и осуществлять гидролиз гуаниловых нуклеотидов (Castellano, Santos, 2011). Эти белки принимают сигналы с поверхности клеток и передают их внутрь клеток, регулируя клеточный ответ на внешние стимулы посредством активации различных сигнальных путей, включая *RAF-MAPK*, *PI3K* и *Ral-GEF* (*Ral-GDS*) (Malumbres, Barbacid, 2003). Сигнальные пути, активируемые белками *RAS*, участвуют в регуляции таких клеточных процессов, как пролиферация, рост, диф-

ференцировка, миграция, апоптоз и выживание (Pollard et al., 2010; Hansel et al., 2012).

Соматические точковые мутации генов *RAS*, приводящие к замене аминокислот в 12-й, 13-й или 61-й позициях, присутствуют в 20–30 % злокачественных опухолей человека (Forbes et al., 2015). Такие молекулярные изменения обуславливают нарушение ГТФазной активности белка *RAS*, что проявляется в его конститутивно активном состоянии. Последнее в свою очередь ведет к активации нисходящих сигнальных каскадов даже в отсутствие внеклеточных стимулов и, как следствие, к злокачественной трансформации клеток.

Несмотря на то что онкогенная активация генов семейства *RAS* была впервые обнаружена в клеточной линии уротелиальной карциномы человека, роль мутаций этих генов при РМП остается мало изученной, а данные об их частоте и связи с определенным опухолевым фенотипом являются противоречивыми. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение частоты и спектра мутационной изменчивости генов семейства *RAS*, анализ связей между мутациями и клинико-морфологическими параметрами опухоли, а также оценка прогностического значения молекулярных изменений генов *RAS* в отношении отдаленных результатов лечения в проспективной когорте пациентов с РМП.

Материалы и методы

Группа обследования состояла из 249 пациентов с подтвержденным диагнозом РМП, проходивших лечение в ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» в период с 2010 по 2014 гг. В исследование включены 195 мужчин и 54 женщины в возрасте от 31 до 88 лет (медиана – 68 лет). Биологическим материалом для анализа служили образцы свежего опухолевого материала и срезов парафиновых блоков от пациентов с РМП. Степень местной распространенности (T) устанавливалась согласно данным патоморфологического анализа удаленного при трансуретральной резекции (ТУР) опухолевого материала. Категории \geq T2 определялись по данным анализа цистэктомических препаратов или клинического стадирования с использованием методов визуализации, если пациенту не выполнялась цистэктомия. Степень дифференцировки опухолевой ткани (G) определялась гистологически в соответствии с классификациями ВОЗ 1973 и 2004 гг. За местный рецидив принимали появление морфологически верифицированной переходноклеточной карциномы в стадиях Ta, T1 или Tis, локализующейся в мочевом пузыре. Прогрессирование опухолевого процесса устанавливалось в случае развития мышечно-инвазивной опухоли и/или регионарных либо отдаленных метастазов у пациентов, ранее получавших лечение по поводу НМИ РМП. Под скорректированной (онкоспецифической) выживаемостью понимали время от включения пациента в исследование до смерти от РМП. Клинико-анамнестические данные пациентов представлены в табл. 1.

Для выделения ДНК образцы свежего опухолевого материала гомогенизировали, а из парафиновых блоков получали срезы толщиной 10–15 мкм каждый, которые

Таблица 1. Клинико-анамнестические характеристики пациентов

Характеристика	Класс	Количество пациентов	Частота, %
Пол	Мужской	195	78,3
	Женский	54	21,7
Возраст	До 60 лет	67	26,9
	61–70 лет	73	29,3
	71 и более лет	109	43,8
Опухоль	Стадия		
	Ta	38	15,3
	T1	130	52,2
	T ≥ 2	81	32,5
Степень дифференцировки	Классификация ВОЗ 1973		
	G1	88	35,3
	G2	110	44,2
	G3	48	19,3
	Нет данных	3	1,2
Классификация ВОЗ 2004	PUNLMP* / Low grade	148	59,4
	High grade	98	39,4
	Нет данных	3	1,2
Мультифокальность	Одиночная	95	38,2
	Множественная	154	61,8
Макроскопический вид	Папиллярная	185	74,3
	Солидная / смешанная	64	25,7
Размер	До 3 см	108	43,4
	3 см и более	141	56,6
Наличие метастазов	Да	20	8,0
	Нет	229	92,0
Статус курения	Не курит	75	30,1
	Курил ранее	70	28,1
	Курит	95	38,2
	Нет данных	9	3,6

* Здесь и в табл. 3: PUNLMP (русс. ПУОНЗП) – папиллярная уротелиальная опухоль с низким злокачественным потенциалом, low grade – низкая степень злокачественности, high grade – высокая степень злокачественности.

затем депарафинизировали с использованием ксилола. Геномную ДНК выделяли посредством ферментативной обработки образцов протеиназой К с последующей фенол-хлороформной экстракцией.

Для анализа мутационной изменчивости генов семейства *RAS* первоначально проводили амплификацию шести фрагментов, покрывающих сайты наиболее часто встречающихся мутаций, методом ПЦР с праймерами, предложенными Kompier с коллегами (Kompier et al., 2010). Реакционная смесь общим объемом 15 мкл содержала 1–250 нг геномной ДНК, 1× ПЦР буфер (100 мМ Tris-HCl, pH 8,3, 500 мМ KCl), 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTPs, праймеры в конечной концентрации 0,4 мкМ, 3 % ДМСО и 0,5 единиц активности Dream Taq полимеразы (Thermo Scientific, Литва). После 4-минутной инкубации при 94 °C проводили 35 циклов амплификации (денатурация при 94 °C – 30 с, отжиг при 56 °C – 30 с, элонгация при

72 °C – 50 с) в термоциклере C1000 Thermal cycler (Bio-Rad, США). Конечную элонгацию осуществляли в течение 5 мин при 72 °C. Не вошедшие в реакцию праймеры и dNTPs инактивировали экзонуклеазой I (Thermo Scientific, Литва) и щелочной фосфатазой (Thermo Scientific, Литва). SNaPshot реакцию проводили с использованием подобранных для каждого SNP внутренних праймеров, описанных в работе Kompier с коллегами (2010), и набора ABI Prism SNaPshot multiplex kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ продуктов реакции SNaPshot выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США). После окончания разделения образцов полученные данные анализировали с помощью программы GeneMapper v 4.1.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ SPSS Sta-

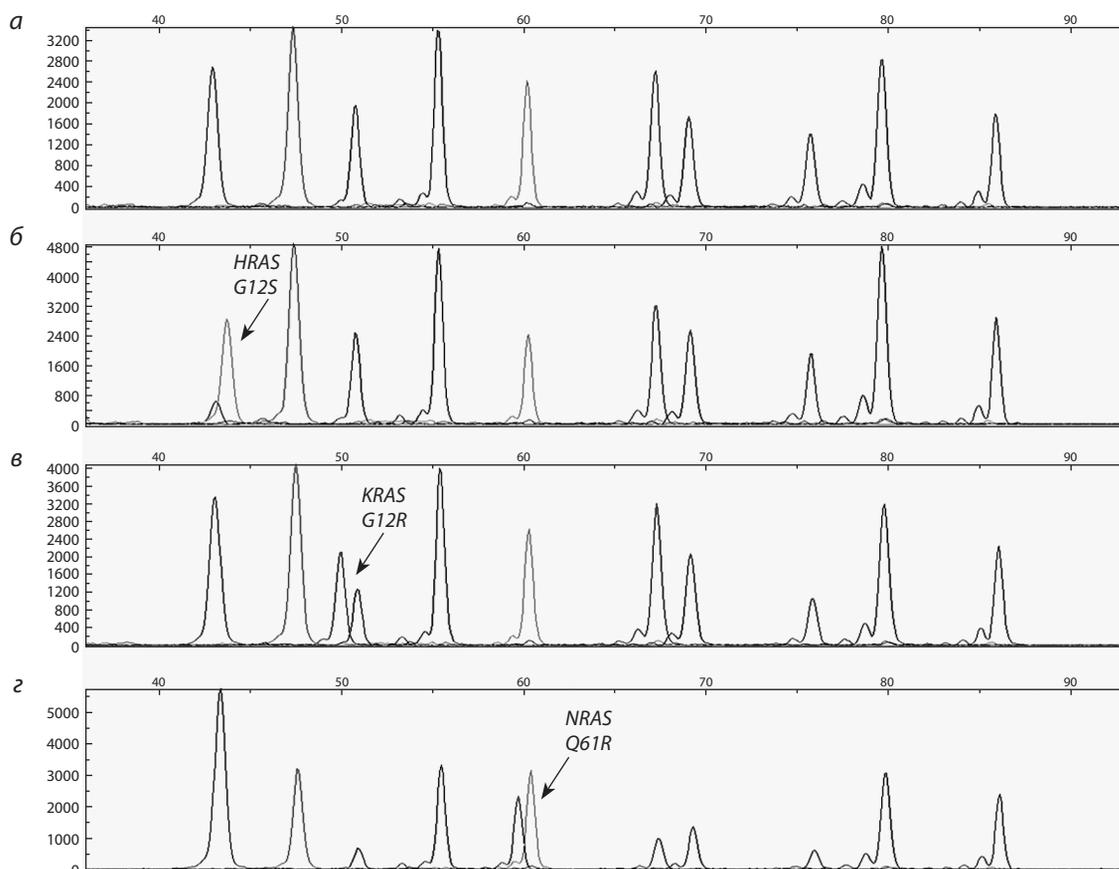


Рис. 1. Результаты SNaPshot анализа мутационного статуса генов семейства *RAS*.

а – анализ образца ДНК дикого типа; *б–г* – анализ образцов ДНК, содержащих мутации *HRAS G12S*, *KRAS G12R* и *NRAS Q61R*.

tistics 17.0. Статистическую значимость различий между исследуемыми группами анализировали с помощью непараметрического теста Манна–Уитни и двустороннего точного критерия Фишера. Безрецидивную выживаемость и выживаемость до прогрессирования для группы из 154 пациентов с НМИ РМП, а также скорректированную (онкоспецифическую) выживаемость для общей группы пациентов ($n = 230$) определяли по методу Каплана–Мейера. Значимость различий между показателями выживаемости в зависимости от мутационного статуса генов *RAS* оценивали при помощи log-rank теста. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Частота и спектр мутаций в генах семейства *RAS*

Для оценки мутационной изменчивости генов семейства *RAS* был использован метод SNaPshot, позволяющий определять 19 наиболее распространенных мутаций одновременно. Примеры мутаций каждого из трех генов представлены на рис. 1.

В целом молекулярные изменения исследуемых генов выявлены в 28 из 249 уротелиальных карцином (11,2 %), причем на мутации гена *HRAS* приходилось 64,3 %, *KRAS* – 28,6 % и *NRAS* – 7,1 %. Частота и спектр всех выявленных мутаций указаны в табл. 2. Ни в одном образце

не обнаружено двойных мутаций. Все молекулярно-генетические изменения были 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). Наиболее часто встречались мутации *HRAS Q61R*.

Ассоциация мутаций с клиническими параметрами

Мутации всех исследованных генов достоверно чаще встречались у пациентов более молодого возраста ($p < 0,001$, тест Манна–Уитни). При распределении пациентов по возрастным группам мутации генов семейства *RAS* выявлены с частотой 25,4 % (17 из 67) у пациентов до 60 лет, 6,8 % (5 из 73) – у пациентов от 61 до 70 лет и 5,5 % (6 из 109) – у пациентов старше 71 года ($p < 0,001$, точный критерий Фишера). Эта зависимость сохранялась и в случае анализа мутационной изменчивости генов *HRAS* ($p = 0,022$) и *KRAS* по отдельности ($p = 0,013$) (табл. 3). Нами не обнаружено связи между всеми мутациями генов семейства *RAS* и патоморфологическими характеристиками. Однако при индивидуальном анализе молекулярных изменений онкогенов *HRAS* и *KRAS* отмечались различия в их корреляции с определенными клиническими параметрами.

Так, мутации гена *HRAS* были статистически значимо ассоциированы с такими благоприятными прогностическими характеристиками, как низкая степень распростра-

Таблица 2. Мутации в генах семейства *RAS*, выявленные в уротелиальных карциномах

Ген	Экзон	Замена нуклеотида	Замена аминокислоты	Количество мутаций (n)
<i>HRAS</i>	1	c.34 G→T	G12C	2
	1	c.34 G→A	G12S	3
	1	c.35 G→A	G12D	1
	1	c.37 G→C	G13R	1
	2	c.181 C→A	Q61K	2
	2	c.182 A→T	Q61L	4
	2	c.182 A→G	Q61R	5
<i>KRAS</i>	1	c.34 G→T	G12C	2
	1	c.34 G→C	G12R	1
	1	c.35 G→A	G12D	4
	1	c.35 G→T	G12V	1
<i>NRAS</i>	2	c.182 A→G	Q61R	2

нения, высокая степень дифференцировки, папиллярный характер роста и небольшие размеры опухоли ($p < 0,05$) (табл. 3). Частота молекулярных изменений гена *HRAS* 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 ($p < 0,05$) (табл. 3). Кроме того, наблюдалась тенденция к более высокой частоте мутаций гена *KRAS* в мышечно-инвазивных опухолях (4,9 %) по сравнению с немышечно-инвазивными (2,4 %) ($p = 0,28$). Мутации генов *HRAS* и *KRAS* отмечались чаще в одиночных опухолях, однако эта зависимость не достигла уровня статистической значимости. Корреляции между молекулярными изменениями исследуемых генов и такими характеристиками, как пол и статус курения, обнаружено не было.

Прогностическое значение мутаций генов *HRAS* и *KRAS*

Оценка прогностического значения мутаций генов семейства *RAS* проводилась на выборке из 230 пациентов, отдаленные результаты лечения 19 пациентов не прослежены. Длительность наблюдения колебалась от 32 до 60 мес., медиана наблюдения составила 46 мес. В течение этого периода у 46 из 154 (31,8 %) пациентов с НМИ РМП выявлены рецидивы, в 5,8 % (9 из 154) случаев зарегистрировано прогрессирование в мышечно-инвазивную форму, 70 пациентов умерли, в том числе 34 – от РМП.

В отношении рецидивирования и прогрессирования не выявлено прогностическое значение мутационного статуса генов *HRAS* и *KRAS* (табл. 4).

Вместе с тем мутации *KRAS* были статистически значимо ассоциированы со сниженной онкоспецифической выживаемостью в общей группе пациентов (рис. 2), а также в подгруппе с НМИ РМП (табл. 4). Трехлетняя скорректированная выживаемость в группе пациентов, страдающих НМИ и МИ РМП и имеющих молекулярные изменения *KRAS*, составила 47,6 % (ДИ 3,5–91,7 %); в группе без му-

таций этого гена – 86,5 % (ДИ 81,8–91,2 %). При анализе пациентов только с немышечно-инвазивными опухолями выявлено, что смертность от РМП при наличии мутации гена *KRAS* составила 33,3 %, тогда как при отсутствии мутации – 5,4 %.

В зависимости от мутационного статуса гена *HRAS* не обнаружено статистически значимых различий в онкоспецифической выживаемости как при совместном, так и при раздельном анализе пациентов с НМИ и МИ РМП.

Обсуждение

Согласно современным данным, около трети всех злокачественных новообразований ассоциированы с мутациями в генах семейства *RAS*. Однако частоты мутаций этих генов значительно варьируют в зависимости от определенного типа рака: активирующие мутации *KRAS* часто обнаруживаются при немелкоклеточном раке легкого (15–20 %), раке толстой кишки (40 %) и аденокарциноме поджелудочной железы (95 %); *NRAS*-мутации выявляются с высокой частотой в гематологических злокачественных новообразованиях (20–30 %) (Castellano, Santos, 2011; Forbes et al., 2015). Опухоли различных локализаций, но имеющие одни и те же мутации генов *RAS*, могут проявлять противоположное биологическое поведение. Так, аденокарцинома легкого и колоректальный рак, несущие мутации *KRAS* в 12-м или 13-м кодонах, являются агрессивными, часто летальными формами рака; карциномы щитовидной железы с такими же мутациями, напротив, характеризуются относительно благоприятным течением (Radkay et al., 2014).

Онкогенная роль мутаций генов семейства *RAS* показана и для РМП. Согласно данным разных авторов, частота молекулярных изменений этих генов при РМП варьирует в пределах от 0 до 45 % (Czerniak et al., 1992; Fitzgerald et al., 1995; Karimianpour et al., 2008; Boulalas et al., 2009; Sjudahl et al., 2011; Ouerhani, Elgaaied, 2011–2012). Подобно результатам, полученным Jebar с коллегами и Kompier с коллегами (Jebar et al., 2005; Kompier et al., 2010), в нашем исследовании частота мутаций генов

Таблица 3. Частоты мутаций генов *HRAS* и *KRAS* в зависимости от клинично-анамнестических характеристик

Характеристика	Мутация <i>HRAS</i>		<i>p</i>	Мутация <i>KRAS</i>		<i>p</i>
	да <i>n</i> (%)	нет		да <i>n</i> (%)	нет	
Пол			0,55			1,0
Мужской	13 (6,7)	182		7 (3,6)	188	
Женский	5 (9,3)	49		1 (1,9)	53	
Возраст			0,022			0,013
До 60 лет	10 (14,9)	57		6 (9,0)	61	
61–70 лет	4 (5,5)	69		1 (1,4)	72	
71 и более лет	4 (3,7)	105		1 (0,9)	108	
Опухоль						
Стадия			0,02			0,43
Ta	4 (10,5)	34		0 (0)	38	
T1	13 (10,0)	117		4 (3,1)	126	
T ≥ 2	1 (1,2)	80		4 (4,9)	77	
Степень дифференцировки						
Классификация ВОЗ 1973			0,074			0,37
G1	11 (12,5)	77		1 (1,1)	87	
G2	6 (5,5)	104		5 (4,5)	105	
G3	1 (2,1)	47		2 (4,2)	46	
Классификация ВОЗ 2004			0,002			0,48
PUNLMP / low grade	17 (11,5)	131		6 (4,1)	142	
High grade	1 (1,0)	97		2 (2,0)	96	
Мультифокальность			0,13			0,49
Одиночная	10 (10,5)	85		4 (4,2)	91	
Множественная	8 (5,2)	146		4 (2,6)	150	
Макроскопический вид			0,049			0,028
Папиллярная	17 (9,2)	168		3 (1,6)	182	
Солидная/ смешанная	1 (1,6)	63		5 (7,8)	59	
Размер			0,013			0,14
До 3 см	13 (12,0)	95		1 (0,9)	107	
3 см и более	5 (3,5)	136		7 (5,0)	134	
Метастазы			0,38			0,019
Да	0 (0)	20		3 (15,0)	17	
Нет	18 (7,9)	211		5 (2,2 %)	224	
Статус курения			0,39			0,40
Не курит	8 (10,7)	67		2 (2,7)	73	
Курил ранее	4 (5,7)	66		1 (1,4)	69	
Курит	5 (5,3)	90		5 (5,3)	90	

RAS составила 11,2 %. Молекулярные изменения гена *HRAS* выявлены в 18, *KRAS* – 8 и *NRAS* – 2 уротелиальных карциномах. При РМП наблюдаемое в настоящей работе превалирование частоты мутаций в гене *HRAS* по сравнению с другими членами семейства *RAS* согласуется с данными, представленными в Каталоге соматических мутаций при раке (COSMIC) (Forbes et al., 2015). В гене *HRAS* наиболее часто встречались мутации Q61L и Q61R, а в гене *KRAS* – G12D. Все выявленные мутации в кодонах 12, 13 и 61 нарушают присущие белкам *RAS* ГТФазную активность и способность взаимодействовать с клеточными регуляторами GAPs.

Известно, что частота молекулярно-генетических и эпигенетических изменений увеличивается с возрастом. Однако в рамках данной работы установлено, что мутации генов семейства *RAS* статистически значимо чаще наблюдались в группе более молодых пациентов с РМП. Эта зависимость сохранялась и в случае анализа мутаций генов *HRAS* и *KRAS* по отдельности. Похожие результаты были получены и в работе Beukers с коллегами, согласно которым наибольшая частота мутаций *RAS* отмечалась в группе пациентов до 20 лет, равная 40 %; у пациентов старше 60 лет этот показатель составил 11 % (Beukers et al., 2014).

Таблица 4. Анализ прогностического значения мутационного статуса генов *HRAS* и *KRAS* в отношении безрецидивной выживаемости, выживаемости до прогрессирования и онкоспецифической выживаемости

Отдаленные результаты лечения	Подгруппа	Количество событий/ общее число пациентов	3-летняя выживаемость, %	<i>p</i>
Рецидивирование	<i>HRAS wt</i>	41/138	73,9 ± 3,9	0,93
	<i>HRAS mut</i>	5/16	67,7 ± 11,9	
	<i>KRAS wt</i>	45/151	73,6 ± 3,7	
	<i>KRAS mut</i>	1/3	нет данных	
Прогрессирование	<i>HRAS wt</i>	9/138	93,1 ± 2,2	0,29
	<i>HRAS mut</i>	0/16	100	
	<i>KRAS wt</i>	9/151	93,8 ± 2,0	
	<i>KRAS mut</i>	0/3	100	
Скорректированная выживаемость	<i>HRAS wt</i>	34/213	84,2 ± 2,6	0,079
	<i>HRAS mut</i>	0/17	100	
	<i>KRAS wt</i>	31/223	86,5 ± 2,4	
	<i>KRAS mut</i>	3/7	47,6 ± 22,5	
Скорректированная выживаемость при НМИ РМП	<i>HRAS wt</i>	9/134	94,3 ± 2,1	0,28
	<i>HRAS mut</i>	0/16	100	
	<i>KRAS wt</i>	8/147	95,6 ± 1,8	
	<i>KRAS mut</i>	1/3	50,0 ± 35,4	
Скорректированная выживаемость при МИ РМП	<i>HRAS wt</i>	25/79	66,1 ± 5,7	0,52
	<i>HRAS mut</i>	0/1	100	
	<i>KRAS wt</i>	23/76	67,8 ± 5,7	
	<i>KRAS mut</i>	2/4	50,0 ± 25,0	

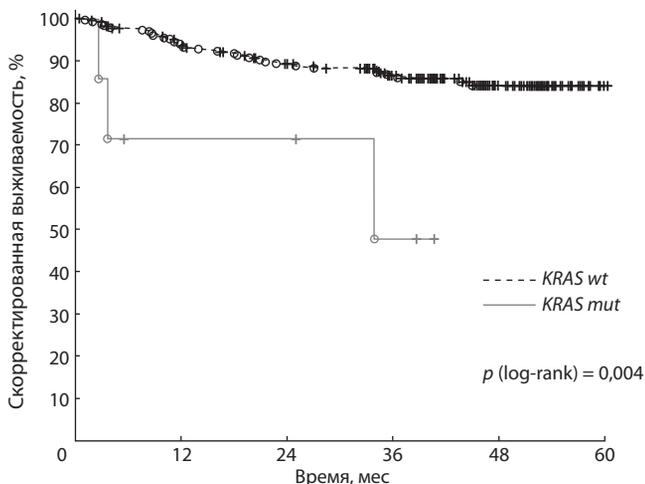


Рис. 2. Скорректированная выживаемость в зависимости от мутационного статуса гена *KRAS* в общей группе пациентов с РМП.

Первоначально предполагалось, что сверхэкспрессия *RAS*, вызванная онкогенной мутацией, изменяет клеточный фенотип таким образом, что клетки приобретают черты, характерные для более агрессивных опухолей (Theodorescu et al., 1990). Однако последующие работы не

подтвердили наличие корреляции мутаций генов *RAS* со стадией и степенью дифференцировки опухоли (Jebar et al., 2005; Kompier et al., 2010; Pandith et al., 2010; Ouerhani, Elgaaied, 2011–2012). Нами также не обнаружена связь между всеми мутациями генов семейства *RAS* и патоморфологическими характеристиками. Однако индивидуальный анализ мутаций *HRAS* и *KRAS* показал различия в их распределении в зависимости от клинических параметров уротелиальных карцином.

В настоящей работе мутации гена *HRAS* статистически значимо чаще наблюдались в немышечно-инвазивных высокодифференцированных опухолях небольших размеров. Представленные результаты согласуются с данными, полученными в экспериментах на трансгенных мышах (Zhang et al., 2001). С использованием уротелий-специфичного промотора гена уроплакина II Zhang с коллегами продемонстрировали, что экспрессия мутантного гена *HRAS* в трансгенных мышах индуцирует развитие исключительно гиперплазии и поверхностных папиллярных опухолей мочевого пузыря. Отметим, что в течение всего периода наблюдения, равного 26 месяцам и эквивалентного средней продолжительности жизни здоровой мыши, ни в одном случае авторы не наблюдали прогрессирования в мышечно-инвазивную форму. Несмотря на то что в большинстве исследований не выявлена статистически значимая корреляция мутаций отдельных генов семейства *RAS* с клиническими параметрами, в некоторых из

них прослеживалась тенденция к более высокой частоте мутаций *HRAS* в высокодифференцированных немышечно-инвазивных опухолях (Jebar et al., 2005; Boulalas et al., 2009; Kompier et al., 2010; Wang et al., 2012).

Нами установлено, что мутации гена *KRAS* в отличие от *HRAS* статистически значимо ассоциированы с такими агрессивными характеристиками, как солидный характер роста опухоли и наличие метастазов. Кроме того, наблюдалась тенденция к увеличению частоты молекулярных изменений *KRAS* в мышечно-инвазивных опухолях (4,9 %) по сравнению с немышечно-инвазивными (2,4 %). В научной литературе встречаются единичные работы, в которых сообщается о достоверной связи мутаций *KRAS* с метастазированием в регионарные лимфоузлы при РМП (Nanda et al., 2010). По данным Ouerhani с коллегами, 90 % всех выявленных мутаций гена *KRAS* были обнаружены в низкодифференцированных мышечно-инвазивных опухолях, тогда как только 10 % – в высокодифференцированных (Ouerhani et al., 2013). Формирование метастатического фенотипа ассоциировано с нарушением адгезивных свойств и клеточной подвижности. В ряде работ приводились данные, свидетельствующие о том, что *KRAS* является более эффективным по сравнению с *HRAS* стимулятором клеточной подвижности за счет предпочтительной активации Ras белком *KRAS* и изменения экспрессии различных внутриклеточных протеинов, отвечающих за адгезию (Yan et al., 1997; Castellano, Santos, 2011). Способность *KRAS* нарушать межклеточную адгезию и стимулировать клеточную подвижность могла бы объяснить высокоинвазивный и метастатический фенотип опухолевых клеток, несущих *KRAS*-мутации.

В настоящем исследовании нами впервые показана связь мутаций *HRAS* и *KRAS* с противоположными патоморфологическими характеристиками при РМП. Большинство авторов анализировали мутации этих генов совместно, возможно, из-за невысокой частоты их встречаемости при РМП либо небольших объемов анализируемых выборок. В пользу того, что мутации генов *HRAS* и *KRAS* могут обуславливать развитие карцином с различным опухолевым фенотипом, свидетельствует их ассоциация со специфическими типами рака и наследственными синдромами. Кроме того, показано, что, несмотря на участие в одних и тех же сигнальных путях, RAS-изоформы проявляют «предпочтительную» специфичность к активации тех или иных эффекторов: *KRAS* является более сильным активатором RAS-MAPK и Ras-зависимого сигнального пути, тогда как *HRAS* более эффективно активирует фосфатидилинозитол-3-киназу (Castellano, Santos, 2011).

Наиболее актуальной проблемой в исследованиях РМП является выявление дополнительных маркеров прогноза клинического течения болезни, поскольку стандартные патоморфологические параметры не всегда обеспечивают его точность. Согласно результатам Kompier с коллегами (Kompier et al., 2010), мутации генов *RAS* не обладают прогностической ценностью. Однако данное заключение было сделано при совместном рассмотрении молекулярных изменений генов *HRAS*, *KRAS* и *NRAS*. В нашем исследовании определение роли мутаций *HRAS* и *KRAS* в предсказании отдаленных результатов лечения

проводилось отдельно для каждого гена. В зависимости от мутационной изменчивости гена *HRAS* нами не выявлено статистически значимых различий в отношении рецидивирования, прогрессирования и смертности. Как и в случае с геном *HRAS*, мутации гена *KRAS* не влияли на безрецидивную выживаемость и выживаемость до прогрессирования. Вместе с тем они были статистически значимо ассоциированы со сниженной онкоспецифической выживаемостью в общей группе пациентов и в подгруппе с НМИ РМП.

Таким образом, в настоящем исследовании определена частота мутаций генов семейства *RAS*, равная 11,2 %; обнаружена ассоциация молекулярных изменений исследуемых генов с более молодым возрастом пациентов, а также выявлен противоположный характер распределения мутаций *HRAS* и *KRAS* в зависимости от клинических характеристик. Кроме того, выявлена статистически значимая ассоциация мутаций гена *KRAS* с более низким уровнем онкоспецифической выживаемости в общей группе пациентов, а также в подгруппе с НМИ РМП. Согласно полученным данным можно предположить, что продукты генов семейства *RAS*, по-видимому, выполняют различные функции, а молекулярные изменения этих онкогенов характеризуют альтернативные пути патогенеза РМП: мутации *HRAS* связаны с благоприятным, а *KRAS* – с агрессивным течением заболевания.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (№ договора M15-046).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Океанов А.Е., Моисеев П.И., Левин Л.Ф. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2003–2012). Минск: РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, 2013.
- Смаль М.П., Кужир Т.Д., Ролевич А.И., Поляков С.Л., Набебина Т.И., Красный С.А., Гончарова Р.И. Мутационный статус гена *FGFR3* в проспективной когорте пациентов, страдающих раком мочевого пузыря. Докл. НАН Беларуси. 2013;57(1):96-101.
- Babjuk M., Burger M., Zigeuner R., Shariat S.F., van Rhijn B.W., Comperat E., Sylvester R.J., Kaasinen E., Bohle A., Palou Redorta J., Roupret M. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. Eur. Urol. 2013;64(4):639-653. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.06.003
- Beukers W., Heccegovic A., Zwarthoff E.C. HRAS mutations in bladder cancer at an early age and the possible association with the Costello Syndrome. Eur. J. Hum. Genet. 2014;22(6):837-839. DOI: 10.1038/ejhg.2013.251
- Boulalas I., Zaravinos A., Karyotis I., Delakas D., Spandidos D.A. Activation of RAS family genes in urothelial carcinoma. J. Urol. 2009; 181(5):2312-2319. DOI: 10.1016/j.juro.2009.01.011
- Castellano E., Santos E. Functional specificity of Ras isoforms: so similar but so different. Genes Cancer. 2011;2(3):216-231. DOI: 10.1177/1947601911408081
- Czerniak B., Cohen G.L., Etkind P., Deitch D., Simmons H., Herz F., Koss L.G. Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the Ha-ras gene in urinary bladder carcinomas. Hum. Pathol. 1992;23(11):1199-1204. DOI: 10.1016/0046-8177(92)90285-B
- Fitzgerald J.M., Ramchurren N., Rieger K., Levesque P., Silverman M., Libertino J.A., Summerhayes I.C. Identification of H-ras mu-

- tations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995;87(2):129-133. DOI: 10.1093/jnci/87.2.129
- Forbes S.A., Beare D., Gunasekaran P., Leung K., Bindal N., Boutselakis H., Ding M., Bamford S., Cole C., Ward S., Kok C.Y., Jia M., De T., Teague J.W., Stratton M.R., McDermott U., Campbell P.J. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucl. Acids Res.* 2015;43:D805-811. DOI: 10.1093/nar/gku1075
- Hansel D.E., McKenney J.K., Stephenson A.J., Chang S.S. <http://www.springer.com/medicine/pathology/book/978-1-4614-5319-2> The Urinary Tract. A Comprehensive Guide to Patient Diagnosis and Management. N.Y.: Springer, 2012.
- Jebar A.H., Hurst C.D., Tomlinson D.C., Johnston C., Taylor C.F., Knowles M.A. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene.* 2005;24(33):5218-5225. DOI: 10.1038/sj.onc.1208705
- Karimianpour N., Mousavi-Shafaei P., Ziaee A.A., Akbari M.T., Pourmand G., Abedi A., Ahmadi A., Afshin Alavi H. Mutations of RAS gene family in specimens of bladder cancer. *Urol. J.* 2008;5(4):237-242.
- Knowles M.A. Molecular pathogenesis of bladder cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 2008;13(4):287-297. DOI: 10.1007/s10147-008-0812-0
- 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):e13821. DOI: 10.1371/journal.pone.0013821
- Malumbres M., Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer.* 2003;3(6):459-465. DOI: 10.1038/nrc1097
- Nanda M.S., Sameer A.S., Syeed N., Shah Z.A., Murtaza I., Siddiqi M.A., Ali A. Genetic aberrations of the K-ras proto-oncogene in bladder cancer in Kashmiri population. *Urol. J.* 2010;7(3):168-173.
- Ouerhani S., Elgaaied A.B. The mutational spectrum of HRAS, KRAS, NRAS and FGFR3 genes in bladder cancer. *Cancer Biomark.* 2011-2012;10(6):259-266. DOI: 10.3233/CBM-2012-0254
- Ouerhani S., Bougateg K., Soltani I., Elgaaied A.B., Abbes S., Menif S. The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation in bladder cancer, chronic myeloid leukemia and colorectal cancer. *Mol. Biol. Rep.* 2013;40(6):4109-4114. DOI: 10.1007/s11033-013-2512-8
- Pandith A.A., Shah Z., Rasool R., Afroz D., Yousuf A., Parveen N., Wani S., Siddiqi M. Activated H-ras gene mutations in transitional cell carcinoma of urinary bladder in a Kashmiri population. *Tumori.* 2010;96(6):993-998.
- Pollard C., Smith S.C., Theodorescu D. Molecular genesis of non-muscle-invasive urothelial carcinoma (NMIUC). *Expert. Rev. Mol. Med.* 2010;12:e10. DOI: 10.1017/S1462399410001407
- Radkay L.A., Chiosea S.I., Seethala R.R., Hodak S.P., LeBeau S.O., Yip L., McCoy K.L., Carty S.E., Schoedel K.E., Nikiforova M.N., Nikiforov Y.E., Ohori N.P. Thyroid nodules with KRAS mutations are different from nodules with NRAS and HRAS mutations with regard to cytopathologic and histopathologic outcome characteristics. *Cancer Cytopathol.* 2014;122(12):873-882. DOI: 10.1002/cncy.21474
- Sjodahl G., Lauss M., Gudjonsson S., Liedberg F., Hallden C., Chebil G., Mansson W., Hoglund M., Lindgren D. A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1. *PLoS One.* 2011;6(4):e18583. DOI: 10.1371/journal.pone.0018583
- 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):246-251.
- Spruck C.H., Ohneseit P.F., Gonzalez-Zulueta M., Esrig D., Miyao N., Tsai Y.C., Lerner S.P., Schmutte C., Yang A.S., Cote R., Dubeau L., Nichols P.W., Hermann G.G., Steven K., Horn T., Skinner D.G., Jones P.A. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 1994;54(3):784-788.
- Stenzl A., Witjes J.A., Comperat E., Cowan N.C., De Santis M., Kuczyk M., Le Bret T., Ribal M.J., Sherif A. Guidelines on bladder cancer: muscle-invasive and metastatic. **Arnhem: European Association of Urology (EAU), 2012.**
- Theodorescu D., Cornil I., Fernandez B.J., Kerbel R.S. Overexpression of normal and mutated forms of HRAS induces orthotopic bladder invasion in a human transitional cell carcinoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990;87(22):9047-9051.
- van Rhijn B.W., van der Kwast T.H., Vis A.N., Kirkels W.J., Bove E.R., Jobsis A.C., Zwarthoff E.C. FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res.* 2004;64(6):1911-1914. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2421
- Wang A.X., Chang J.W., Li C.Y., Liu K., Lin Y.L. H-ras mutation detection in bladder cancer by COLD-PCR analysis and direct sequencing. *Urol. Int.* 2012;88(3):350-357. DOI: 10.1159/000336132
- Yan Z., Chen M., Peruchio M., Friedman E. Oncogenic Ki-ras but not oncogenic Ha-ras blocks integrin beta1-chain maturation in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 1997;272(49):30928-30936. DOI: 10.1074/jbc.272.49.30928
- Zhang Z.T., Pak J., Huang H.Y., Shapiro E., Sun T.T., Pellicer A., Wu X.R. Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation. *Oncogene.* 2001;20(16):1973-1980.