

*На правах рукописи*

**Жданов Павел Николаевич**

**Значение PD-L1 сигнального пути в прогрессии основных молекулярных типов  
мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря**

14.03.02 – Патологическая анатомия

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент

**Блинова Екатерина Валериевна**

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, доцент

**Демура Татьяна Александровна**

**Официальные оппоненты:**

**Орлинская Наталья Юрьевна** – доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии, заведующая кафедрой

**Абакушина Елена Вячеславовна** – доктор медицинских наук, ООО «Текон Медицинские приборы», отдел по разработке и исследованиям в области иммунологии, руководитель отдела, заместитель генерального директора

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» декабря 2021 г. в 14.00 ч на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 в ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: [www.sechenov](http://www.sechenov).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, доцент



**Блинова Екатерина Валериевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы

Рак мочевого пузыря (РМП) занимает девятое место в мире по частоте встречаемости в структуре онкологической заболеваемости и является одной из наиболее частых причин смерти повсеместно [Ferlay et al., 2015]. Мужчины, при этом, болеют чаще, чем женщины с соотношением 3,5:1, а первичная заболеваемость растет с возрастом, различаясь в том числе и в зависимости от географии проживания популяции. В европейских странах (Испания, Италия, Дания и Швейцария), Северной Америке, некоторых государствах Северной Африки и Западной Азии регистрируется наивысшая заболеваемость, тогда как в странах Южной и Центральной Африки и Юго-Восточной Азии наблюдается самая низкая частота встречаемости РМП [Antoni et al., 2017]. Курение сигарет связывают с возникновением до 50% всех случаев заболевания, на долю промышленных токсинов приходится до 20% неоплазий мочевого пузыря [Bachir et al., 2012]. Наиболее типичным симптомом РМП является гематурия. Макрогематурия ассоциируется с прогрессивным состоянием опухоли и, как правило, запущенной стадией заболевания. В то же время, микрогематурия зачастую остается недиагностированной вследствие отсутствия эффективных скрининговых программ РМП [Ramirez et al., 2016].

Порядка 70% впервые диагностированных опухолей мочевого пузыря представлены неоплазиями низкой степени злокачественности (Ta, T1, CIS), как правило мышечно-неинвазивными формами, растущими как поверхностные сосочковые неоплазии, генетически ассоциированные с мутациями *FGFR3*, характеризующиеся высоким риском рецидивирования, но низкой степенью злокачественности, низкой инвазивной и метастатической способностью. Однако, около 10-15% опухолей с низкой степенью злокачественности имеют тенденцию к инвазии и метастазированию, что, по мнению исследователей, сопряжено с наличием TP53 мутаций [Kirkali et al., 2005; Sanli et al., 2017].

Оставшиеся 30% РМП – опухоли первично с высокой степенью злокачественности с TP53 мутациями, склонные к быстрому прогрессированию и инвазии (T2-T4). Они макроморфологически представлены плоскими карциномами, образованными из тяжелых дисплазий или CIS. В большинстве своем эти опухоли резистентны к терапии и обладают плохим прогнозом. В настоящее время идентифицирован ряд генетических факторов, ассоциированных с опухолевым ростом и прогрессией уротелиальных карцином [Sanli et al., 2017; Urquidid et al., 2012], таких как мутации генов TP53 и *FGFR3* [Weyerer et al., 2017; Billerey et al., 2001], альтерации генов, вовлеченных в клеточную морфологию, эпителиальную-мезенхимальную трансформацию, устойчивость к апоптозу и др. [Southgate, 1999; Cheng et al., 2011, 2013; Omran et al., 2012].

В настоящее время TNM стадирование РМП не позволяет прогнозировать поведение опухоли [Lamm et al., 2014; Hussain et al., 2015], что требует разработки новых моделей и прогностических маркеров, надежно предсказывающих вероятность прогрессии неоплазии, уровень ее ответа на химиотерапевтическое воздействие, что и обуславливает актуальность проведения настоящего исследования.

### **Степень разработанности темы исследования**

Биологическая и молекулярная гетерогенность мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря служит основой его современной классификации, в соответствии с которой три основных молекулярно-патологических подтипа опухоли определяются как базальный (преимущественно СК5/6-позитивный), люминальный (преимущественно GATA3-позитивный) и двойной негативный, каждый из которых может еще содержать мутантный вариант гена *TP53* [Appolo et al., 2019]. В последнее десятилетие идентифицирована и детально изучена роль молекул – ингибиторов естественного иммунного ответа на опухолевую трансформацию клеток, в частности, PD1/PD-L1. В результате изменились подходы к оценке клинического течения заболевания, к терапии опухолей, в том числе и РМП [Wu et al., 2019]. Было показано, что степень активности PD1/PD-L1 сигнального пути широко варьирует в зависимости от типа опухоли, а также от плотности иммунного микроокружения, выступающего в качестве ключевого показателя эффективности иммунного ответа на опухолевые клетки [Samishina et al., 2019]. Значительным потенциалом с точки зрения прогнозирования течения опухолевого процесса, определения клиничко-патологической траектории его развития обладают и такие молекулярные маркеры как рецептор фактора роста фибробластов (*FGFR3*), кодирующий его ген, а также некодирующие нуклеотидные молекулы микроРНК, среди которых при раке мочевого пузыря установлено значение микроРНК-145 и микроРНК-200a [Blinova et al., 2019].

### **Цель работы**

Обосновать прогностическое и патологическое значение степени активности PD-L1 сигнального пути в основных молекулярных подтипах первичного и рецидивного мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, а также установить взаимосвязь уровня экспрессии PD-L1 с экспрессией ряда других имеющих диагностическое значение маркеров опухолевой прогрессии.

### **Задачи исследования**

1. Разработать биологическую *in vivo* экспериментальную модель для формирования основных молекулярных подтипов гетеротопического ксенографтного человеческого мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря с использованием в качестве носителя гуманизированных иммунодефицитных мышей BALB/c nu/nu.

2. Определить влияние степени активности PD-L1 сигнального пути на выживаемость животных с ксенографтом первичного и рецидивного базального, люминального и двойного негативного p53-мутантного молекулярных подтипов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря.

3. Изучить влияние вида адъювантной внутривезикулярной лекарственной терапии по поводу первичной опухоли на безрецидивную выживаемость пациентов с базальным, люминальным и двойным негативным p53-экспрессирующим молекулярных подтипов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря.

4. Изучить зависимость между уровнем экспрессии PD-L1 на мембранах опухолевых клеток и CD8+-лимфоцитах и показателем безрецидивной выживаемости пациентов с первичным базальным, люминальным и двойным негативным p53-мутантным молекулярных подтипов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря разной степени злокачественности опухоли (высокого и низкого грейда).

5. Установить взаимосвязь опухолевой PD-L1-позитивности, степени активности сигнального пути, уровнем экспрессии и частоты мутаций гена *FGFR3*, а также уровня тканевой экспрессии микроРНК-145 и микроРНК-200a при первичном и рецидивном люминальном молекулярном подтипе мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря.

6. Обосновать прогностическое значение комплексного маркера безрецидивной выживаемости пациентов с первичным люминальным молекулярным подтипом мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря.

### **Научная новизна**

Впервые разработана биологическая *in vivo* экспериментальная модель с использованием в качестве носителя гуманизированных иммунодефицитных мышей BALB/c nu/nu и сформированы модели гетеротопических ксенографтных человеческих злокачественных опухолей – основных молекулярных подтипов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря: SK5/6-экспрессирующего базального, GATA3-экспрессирующего люминального и двойного негативного p53-мутантного. Показано, что выживаемость животных-акцепторов ксенографта, прогрессия опухоли и ее метастазирование в легкие определяются молекулярным типом, клеточным составом иммунного микроокружения опухоли (популяцией CD8+ Т-супрессоров), а также уровнем экспрессии PD-L1 как опухолевыми клетками, так и Т-лимфоцитами в образцах первичных и рецидивных неоплазий.

Также впервые установлено, что ИГХ-типирование и определение молекулярного подтипа первичной опухоли, наряду с установлением степени ее злокачественности в соответствии с действующими международными рекомендациями, позволяет спрогнозировать безрецидивную выживаемость пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря в

зависимости от проводимой внутривезикулярной терапии по поводу первично-диагностированной опухоли. Доказано, что степень мембранной PD-L1-позитивности опухолевых клеток и T-супрессоров, инфильтрирующий неоплазию, является независимым предиктором безрецидивной выживаемости для пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря люминального молекулярного подтипа.

При проведении молекулярно-генетического исследования методом секвенирования и ПЦР в реальном времени установлено, что экспрессия рецептора фактора роста фибробластов 3 типа наряду с частотой мутаций гена данного рецептора и тканевым уровнем микроРНК-145 взаимосвязана со степенью злокачественности первичной люминальной неинвазивной опухоли мочевого пузыря и активностью PD-L1 сигнального пути.

Установлено, что комплексная оценка экспрессии PD-L1, FGFR3 и опухолевого грейда при первичной люминальной уротелиальной карциноме мочевого пузыря без инвазии в мышечную стенку выступает как предиктор безрецидивной выживаемости пациентов.

### **Научно-практическая значимость работы**

Разработанная при выполнении диссертационного исследования биологическая *in vivo* экспериментальная модель с использованием в качестве носителя гуманизированных иммунодефицитных мышей BALB/c nu/nu и сформированные модели гетеротопических ксенографтных человеческих злокачественных опухолей – основных молекулярных подтипов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря могут быть использованы в фундаментальных и прикладных исследованиях биологии, патологии, фармакологии данного вида злокачественных новообразований.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке национальных клинических рекомендаций для диагностики и лечения пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря для определения безрецидивной выживаемости пациентов с люминальным молекулярным подтипом опухоли наряду с определением степени ее злокачественности при решении вопроса о назначении вида внутривезикулярной терапии. Совокупность методов ИГХ определения молекулярного подтипа опухоли, PD-L1-экспрессии может быть применена при проведении популяционных исследований для выявления общих закономерностей канцерогенеза при данном типе опухолей.

### **Методология и методы исследования**

В рамках проекта по определению патологического и прогностического значения PD-L1 сигнального пути была разработана животная модель для прижизненного изучения человеческого мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря. Настоящее диссертационное сочинение посвящено изучению прогностического значения одной из иммунных контрольных точек в развитии и прогрессировании одной из наиболее часто встречающейся человеческой

опухоли. Описанная концепция работы обусловила необходимость проведения комплексного экспериментального *in vivo* и клинико-патологического исследования с применением методов классической светооптической микроскопии, а также иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования.

Гуманизацию животных проводили последовательным сублетальным рентгеновским облучением и внутрибрюшинной трансплантацией человеческой лейкоцитарной массы. Формирование ксенографтных моделей выполняли трехэтапной перевивкой образцов типированных живых опухолей человека. Морфологический тип, молекулярный подтип и степень злокачественности оценивали методами светооптической микроскопии, иммуногистохимии, клинико-эпидемиологических данных.

Молекулярно-генетический анализ проводили методами секвенирования по Сэнгеру и ПЦР в режиме реального времени. Анализ результатов осуществляли методами вариационной статистики. Роль отдельных факторов в предикции выживаемости устанавливали с помощью Соx-регрессии, метода Каплана-Мейера.

#### **Связь диссертации с основными научными темами**

Диссертация подготовлена при частичной финансовой и методической поддержке федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (проект №14.N08.11.084), внутреннего гранта ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) в рамках федеральной программы «5-100».

Важнейшие положения диссертационной работы используются в научной работе кафедр патологической анатомии имени академика Струкова, оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), внедрены в исследовательский процесс кафедры онкологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева».

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. С использованием биологических гуманизированных *in vivo* экспериментальных моделей мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря показано, что применение специфического ингибитора PD-L1 сопровождается снижением количества PD-L1-позитивно окрашенных клеток во всех препаратах опухолей, как первичных, так и рецидивных раков, при этом повышение выживаемости отмечается у животных – акцепторов GATA3- и CK5/6-позитивных первичных и рецидивных опухолей.

2. Высокий уровень экспрессии PD-L1 на опухолевых и иммунных клетках отмечается в рецидивном МНИ РМП люминального и двойного негативного p53-мутантного молекулярного подтипов высокой степени злокачественности после предшествующей терапии вакциной БЦЖ. Высокий уровень экспрессии PD-L1 с преимущественным окрашиванием инфильтрирующих опухоль Т-супрессоров отмечается в первичном МНИ РМП высокой степени злокачественности базального и двойного негативного p53-мутантного молекулярного подтипов, а также в рецидивных МНИ РМП: люминального и базального молекулярного подтипов без предшествующей лекарственной терапии, люминальной карциномы и высокой степени злокачественности базальной и двойной негативной p53-мутантной подтипов после внутривезикулярного введения митомицина С, низкой степени злокачественности люминального и базального подтипов после предшествующей терапии вакциной БЦЖ. Низкий уровень экспрессии PD-L1 отмечается в первичном МНИ РМП люминального подтипа, базального подтипа низкой степени злокачественности первичной и рецидивной карциномы после внутривезикулярного введения митомицина С, а также в первичной и рецидивной опухоли низкой степени злокачественности двойного негативного p53-мутантного подтипа и высокой степени злокачественности этого подтипа без предшествующего лечения.

3. Уровень экспрессии PD-L1 детерминирует безрецидивную выживаемость пациентов с первичной карциномой люминального молекулярного подтипа, не получавших внутривезикулярного лечения, а также пациентов с рецидивной люминальной опухолью мочевого пузыря, получавших по поводу первичной опухоли внутривезикулярное лечение вакциной БЦЖ.

4. Первичный МНИ РМП люминального молекулярного подтипа высокого опухолевого грейда характеризуется низкой экспрессией гена FGFR3 и меньшей частотой мутацией по сравнению с люминальной карциномой с низкой степенью злокачественности, при этом первичная карцинома люминального подтипа высокой степени злокачественности экспрессирует микроРНК-145 в 5,9 раза выше, чем образцы люминального первичного МНИ РМП низкой степени злокачественности.

5. Уровень экспрессии PD-L1 в сочетании со степенью злокачественности опухоли и экспрессией FGFR3 является независимым прогностическим фактором бессобытийной выживаемости пациентов с GATA3(+) первичным мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря.

### **Степень достоверности**

Достоверность полученных результатов определяется использованием линейных лабораторных животных, приобретенных в сертифицированном питомнике в количестве достаточном для получения достоверных результатов, а также методов гуманизации, описанных в международной научной периодике. Достоверность результатов подтверждается также



применением общеизвестных морфологических и иммуногистохимических методов исследования с использованием сертифицированного научного оборудования, наборов антител и реактивов, строгим следованием исследовательским методикам. Молекулярно-генетический раздел работы выполнен на оборудовании экспертного класса с применением известных праймеров. Анализ результатов проведен с применением современных методов количественной статистики и с применением сертифицированных пакетов программ.

#### **Апробация диссертационной работы**

Апробация диссертационной работы проведена на совместном расширенном заседании кафедр патологической анатомии имени академика Струкова и оперативной хирургии и топографической анатомии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол №1 от 06.09.2021 г.

Результаты представленного исследования докладывались и обсуждались на конгрессе «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» XVIII-й Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей с международным участием (Санкт-Петербург, 2018), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2018), International Congress of Anatomy (London, 2019).

#### **Личный вклад автора**

Диссертант лично сформулировал гипотезу и основную научную идею своего исследования, на основании которых построил план будущей работы. Лично автором проанализирован большой объем научной периодики, что позволило ему написать литературный обзор и остановиться на наиболее адекватных методологических подходах к выполнению поставленных в работе задач. Лично автор выполнил весь экспериментальный фрагмент работы. Автор лично осуществлял подготовку микропрепаратов, окрашивание, их просмотр, анализ и интерпретацию. Автор деятельно участвовал в выполнении молекулярно-генетического раздела работы, проведении статистической обработки полученных данных, построении кривых выживаемости и их анализа. Автор принимал включенное участие в подготовке научных публикаций.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02 – Патологическая анатомия, области исследований: «Распознавание и характеристика этиологических факторов, определяющих возникновение и развитие конкретных заболеваний (нозологических форм), на основании прижизненных и постмортальных морфологических исследований при использовании современных технических возможностей патологической анатомии», «Прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных

материалов, научный анализ патологического процесса, лежащего в основе заболевания», «Исследование патогенетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ патогенетической терапии».

### **Публикации по теме диссертационной работы**

По теме диссертационного исследования опубликовано 5 научных работ, из них 3 полнотекстовых статьи изданы в зарубежных научных рецензируемых журналах, индексируемых международными системами цитирования Scopus и Web of Science, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

### **Объём и структура работы**

Диссертация написана по традиционному плану, включает следующие разделы: введение, главу 1 – литературный обзор, главу 2 с описанием материалов и методов исследования. В главе 3 изложены результаты исследований на экспериментальных животных, в главах 4 – 5 результаты морфологических и молекулярно-генетических исследований. Глава 6 (заключение) обобщает полученные научные результаты.

Диссертация изложена на 139 страницах компьютерного текста, иллюстрирована двадцатью семью рисунками и восемью таблицами. Библиографический список содержит выходные данные 172 работ, из которых 2 работы отечественных и 170 зарубежных авторов.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Настоящее диссертационное исследование выполнено в соответствии с требованиями приказа Минздрава России №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», иными нормативными правовыми актами, регламентирующими использование биологического материала человека в научных исследованиях, доклинические лабораторные исследования, основываясь на принципах гуманного обращения с подопытными животными. Протокол исследования прошли этическую экспертизу на заседании Локального этического комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (02 июня 2021 года, протокол № 09-21).

Для формирования ксенографтных опухолей мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря использовали материал, полученный при проведении цистоскопии с биопсией или радикальной цистэктомии в Институте урологии и репродуктивного здоровья человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Каждый фрагмент биопсийного материала, полученного от пациента, разделялся на 3 части: первая часть фиксировалась в забуференном 10% формалине и отправлялась на

гистологический анализ, вторая часть подвергалась глубокой заморозке (-86°C), а третья – помещалась в специальную среду и хранилась при температуре 4°C до трансплантации. Первая часть, при этом использовалась для ИГХ исследования, а вторая – для изучения экспрессии микроРНК, *FGFR3* и мутаций в горячих точках гена *FGFR3*. После определения гистологического варианта опухоли, определения ее грейда с учетом действующих методических рекомендаций, ИГХ-анализа экспрессии молекулярных маркеров базального и люминального мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря отбирали случаи, классифицируемые в соответствие со следующими критериями: 1) люминальный рак низкого грейда; 2) люминальный рак высокого грейда; 3) базальный рак низкого грейда; 4) базальный рак высокого грейда; 5) двойной негативный рак p53-экспрессирующий низкого грейда; 6) двойной негативный рак p53-экспрессирующий высокого грейда. Третьи фрагменты отобранных таким образом опухолей перевивали гуманизированным животным, формируя ксенографтную модель. На сформированных биологических экспериментальных моделях оценивали популяцию инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, исходную экспрессию PD-L1, определяли концентрацию свободного PD-L1 в плазме крови животных. Животных в каждой группе ксенографтных опухолей случайным образом разделяли на 2 подгруппы: мышам (носителям опухоли) первой подгруппы назначали введение моноклональных анти-PD-L1 антител, мышам второй подгруппы – плацебо. Оценивали рост и метастазирование ксенографтных опухолей в каждой группе и подгруппе.

На втором этапе оценили прогностическую способность уровня активности PD-L1 сигнального пути в прогрессировании мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря у пациентов, наблюдавшихся в Институте урологии и репродуктивного здоровья человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

#### **Лабораторные животные и соблюдение требований к их содержанию**

В работе использованы шести-восьминедельные самки мышей иммунодефицитной линии BALB/c nu/nu, полученные из питомника SPF (specific pathogen-free) животных ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук. Экспериментальные животные содержались в виварии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) в полимерных индивидуально вентилируемых клетках в стерильных условиях при свободном доступе к воде и пище, естественном световом режиме, температуре окружающего воздуха 23-27°C и относительной влажности воздуха 55-65%. У всех животных осуществляли контроль болевого синдрома с использованием мимической шкалы оценки боли. Мышам с умеренным болевым синдромом вводили внутривенно кетопрофен (K1751, Merch-SIGMA-Aldrich, Германия) в

дозе 100 мг/кг дважды в сутки. Животных с тяжелым неконтролируемым болевым синдромом выводили из эксперимента под эфирным обезболиванием.

### **Формирование ксенографтной модели**

Для формирования ксенографтной модели мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря использовали метод, описанный нами ранее [Blinova E. et al., 2019]. Первичные фрагменты опухоли были получены от четырех мужчин в возрасте от 47 лет до 61 года (средний возраст  $54,3 \pm 3,7$  лет) с сосочковой уротелиальной карциномой и микропапиллярной карциномой, и у двух женщин – 67 лет с железистым раком и 72 лет с плоскоклеточным раком. Добровольное информированное согласие на использование биологического опухолевого материала в научных целях было получено от каждого пациента, чьи клинично-морфологические данные были использованы в работе. На момент забора материала ни у одного пациента не было документально подтвержденного метастатического процесса. Кусочки опухоли, отобранные для перевивки, делили микрохирургическими ножницами (Precision Instruments, США) на мелкие фрагменты объемом 0,8-5,0 мм<sup>3</sup>, и с помощью трансплантационной иглы 8-10 кусочков пересаживали подкожно в области наружной поверхности бедра задней конечности мыши. После увеличения размера опухоли в четыре раза по сравнению с исходно-пересаженным объемом опухоль извлекали и процедуру повторяли трижды. Ксенографт считали сформированным после гистологического и ИГХ подтверждения идентичности опухоли первичному материнскому образцу. Животных – акцепторов ксенографтной опухоли перед финальной инокуляцией опухоли облучали в дозе 3,5 Гр на аппарате Рентген-ТА 150/10 (ОАО «Спектр», Россия), после чего каждой мыши внутрибрюшинно вводили приблизительно  $5 \times 10^7$  клеток/мышь человеческих лимфоцитов. Лимфоциты получали из пакетов с лейкоцитарной массой и известным количеством лимфоцитов в 1 мл.

При достижении ксенографтной опухоли размера 100-200 мм<sup>3</sup>, лабораторные животные каждой из 7 групп (шесть групп соответствовали молекулярному подтипу опухоли и соответствующему грэйду, одна группа – животные контрольной серии, в каждой группе по 20 мышей – носителей опухоли) случайным образом были разделены на две подгруппы, по 10 мышей в каждой: животным первой подгруппы внутривенно вводили моноклональные антитела к PD-L1 в разовой дозе 118 мг/кг веса животного, две инъекции. Первая инъекция была проведена в день деления животных на подгруппы, вторая – спустя 4 недели. Вводимая доза антагониста PD-L1-сигнального пути была рассчитана исходя из данных о терапевтических человеческих дозах (10 мг/кг массы тела) с учетом применения коэффициента пересчета 11,8, установленного для мышей [Gad et al., 2001]. Животные второй подгруппы каждой группы в указанные временные интервалы получали соответствующее по объему количество изотонического 0,9%

раствора хлорида натрия. Инфузии антагониста и физиологического раствора проводились в вену хвоста при помощи программируемой двухканальной помпы «Genie Touch™ Syringe Pump» (Kent Scientific Corporation, США). Контроль за ростом опухоли осуществляли дважды в неделю, начиная с первого дня после последнего введения антагониста PD-L1-сигнального пути или плацебо. Объем опухолевого узла вычисляли по известной формуле [Geran et al., 1972]. Время удвоения размера опухоли во всех подгруппах определялось как период, в течение которого объем узла увеличился на 100%. Кривые выживаемости были построены на основе регистрации летальности животных в экспериментальных группах. Рост опухоли анализировали по коэффициенту максимального ингибирования, вычисляемому как отношение медианы объема опухоли в подгруппах, получавших антагонист PD-L1-сигнального пути к медиане объема опухоли у контрольных животных, умноженное на 100.

### **Характеристика гистологического и клинического материала пациентов**

Ретроспективное патологоанатомическое исследование было проведено с использованием архива гистологического материала, полученного от 140 мужчин со средним возрастом  $59,6 \pm 3,8$  лет и 100 женщин (средний возраст  $61,3 \pm 2,9$  лет). Большинство первичных и рецидивных опухолей было представлено сосочковой уротелиальной карциномой T1 стадии высокой (61) и низкой (176) степени злокачественности (грэйд) в соответствии с действующими классификациями (WHO 2004/2016). Пациентам с первичным раком низкой злокачественности (низкий грэйд) после проведения трансуретральной резекции мочевого пузыря (ТУР) внутрипузырно вводился митомицин С (КИОВА ХАККО КОГИО Ко., Лтд., Япония) в дозе 40 мг еженедельно в течение 6 недель с последующими контрольными цистоскопией и цитологией мочевого осадка через три месяца после лечения и, в случае негативного результата, через 9 месяцев после последнего введения митомицина С. Затем, в данной группе диагностическое эндоскопическое исследование проводилось ежегодно в течение последующих 5 лет. У пациентов с первичной опухолью высокого уровня злокачественности (высокий грэйд) лечение после проведения ТУР осуществлялось внутрипузырными инстилляциями вакцины БЦЖ (уро-БЦЖ медак, Билтховен Биолоджикалс Б.В., Нидерланды) в концентрации  $2-3 \times 10^8$  на одно введение в том же режиме, который был описан для митомицина выше. Инвазивные наблюдения (диагностическая цистоскопия) с цитологическим анализом мочевого осадка проводились ежеквартально в течение первых двух лет после лечения, а затем, с третьего по пятый год – каждые полгода, при условии, что в течение этого времени не возникало рецидива опухолевого процесса.

### **Методы исследования**

Фрагменты биопсийного материала фиксировали в нейтральном 10% забуференном формалине. Проводку гистологического материала проводили в автоматическом режиме на

станции «STP-120» (типа «Карусель», Германия). Микропрепараты изготавливали на ротационном микротоме марки «HM340E» («Microm Laborgerate GmbH», Германия). Проводили окрашивание микропрепаратом гематоксилином и эозином методом Хеллендаделя.

Определение молекулярного подтипа опухоли (люминальный, базальный или двойной-негативный p53-экспрессирующий), идентификацию CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в опухолевой ткани, а также установление уровня экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани проводили иммуногистохимически на парафиновых срезах толщиной 3 мкм с использованием автоматизированного иммуногистостейнера Leica Bond max (Германия). Для отнесения образца уротелиальной опухоли мочевого пузыря к базальному или люминальному молекулярному подтипам использовали точки отсечения экспрессии GATA3, CK5/6 в соответствии с консенсусом [Lerner et al., 2016; Dadhania et al., 2016]. Так, базальный подтип определялся если высокая (более 80%) экспрессия CK5/6 в цитоплазме опухолевых клеток сочеталась с низкой или неопределяемой (менее 10%) экспрессией GATA3 в ядрах опухолевых клеток. Люминальный подтип определялся если низкая или неопределяемая (ниже 10%) экспрессия CK5/6 в цитоплазме опухолевых клеток сочеталась с высокой (более 80%) экспрессией GATA3 в ядрах опухолевых клеток. Двойной негативный мышечно-неинвазивный РМП диагностировали при низкой или неопределяемой экспрессии как GATA3, так и CK5/6 в образце опухолевой ткани.

Определение уровня экспрессии PD-L1 проводили с использованием антител PD-L1 SP263 с системой детекции OptiView DAB IHC Detection Kit (США) с амплификацией сигнала (Ventana Medical Systems, Inc., США). Применяли автоматизированный метод иммуногистохимического исследования с использованием Ventana BenchMark ULTRA ICH stainer (Ventana Medical Systems Inc., США). Высокоэкспрессирующий PD-L1 статус опухоли определяли при уровне экспрессии PD-L1  $\geq 25\%$  мембранами опухолевых клеток и/или  $\geq 25\%$  иммунных CD8<sup>+</sup> клеток (при условии, если они представляют более 1% клеточной популяции в препарате). Позитивное мембранное окрашивание клеток в диапазоне от 0 до 25% расценивалось как низкоэкспрессирующий статус опухоли, тогда как отсутствие окрашивания относили к PD-L1-неэкспрессирующим опухолям.

Количественное определение плазменной концентрации sPD-L1 использовали ИФА типа «сэндвич», PD-L1 Antibody CD-274 (каталожный No. Abx111472) производства Abbeba (Великобритания). Определение проводили на автоматическом ридере StatFax 4200 (США).

С использованием молекулярно-генетических методов изучили экспрессию рецептора 3 типа фактора роста фибробластов (*FGFR3*), микроРНК-200a и 145, а также мутации горячих точек гена *FGFR3*. Изоляцию нуклеиновых кислот проводили при помощи набора AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit производства «Qiagen» (Германия). Обратную транскрипцию проводили при 42<sup>0</sup>С в течение 30 минут с использованием набора MMLV RT производства

«Евроген» (Россия). Эксперименты с ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе «DTPrime» производства «DNA technology» (Россия). Для определения экспрессии *FGFR3* применяли наборы qPCRmix-HS SYBR производства «Evrogen» (Россия). Для определения экспрессии микроРНК применяли наборы qPCRmix-HS производства «Evrogen» (Россия). Мутации в кодонах 248 и 249 гена *FGFR3* определяли ПЦР-амплификацией в режиме реального времени 7-го экзона *FGFR3*, используя 100 мг геномной ДНК, набор qPCRmix-HS производства «Evrogen» (Россия) и 10 пм специфического олигонуклеотидного праймера. Продукты ПЦР реакции очищали электрофорезом в агарозном геле с использованием колонки «Cleanup Standard» производства «Evrogen» (Россия). Очищенные ПЦР продукты секвенировали по Sanger, используя отдельно оба *FGFR3-7F* и *FGFR3-7R* праймера. Результаты секвенирования анализировали в специальной программной среде Chromas 2.6.6 software («Technelysium», Австралия).

Полученные первичные данные анализировали с использованием пакета программ SPSS версии 22.0 (SPSS, Inc., США). Результаты представлены в виде медианы или средней арифметической со среднеквадратическим отклонением или средней ошибкой средней арифметической. Критерий t для независимых выборок, критерии Ньюмена-Кейлса и Даннета, а также одномерный дисперсионный анализ (analysis of variance (ANOVA)) использовали для определения межгрупповых различий экспрессии PD-L1, miR-200a, miR-145 and *FGFR3*. Критерий Манна-Уитни использовали для определения различий экспрессии гена *FGFR3* между группами. Для построения кривых выживаемости и определения времени до первого рецидива опухоли в группах применяли метод Каплана-Мейера, а для вычисления различий показателя использовали log-rank statistics. Прогностическую значимость уровня злокачественности опухоли, экспрессии PD-L1, miR-200a, miR-145 и *FGFR3* определяли с использованием одномерных Cox-регрессионных моделей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап нашей работы был посвящен разработке биологической экспериментальной платформы для изучения человеческой опухоли. Для этого были сформированы шесть типов PD-L1-экспрессирующих ксенографтных моделей первичных и рецидивных человеческих МНИ РМП, представленных люминальным (GATA3-экспрессирующим), базальным (CK5/6-экспрессирующим) и двойным негативным p53-мутантным молекулярными подтипами опухоли. Мы установили, что ингибирование PD-L1 сигнального пути приводит к подавлению роста PD-L1-экспрессирующей опухоли **не** всех молекулярных подтипов и вариантов злокачественности.

В частности, рецидивный базальный молекулярный подтип и двойной негативный p53-мутантный подтип ксенографта мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря был

нечувствителен к ингибированию экспрессии иммунных контрольных точек, что имело достоверные отличия от соответствующих контрольных подгрупп и подгрупп с другими молекулярными формами опухоли (таблица 1). Вместе с тем, во всех исследуемых подгруппах введение животным моноклональных анти-PD-L1 антител сопровождалось супрессией метастатической активности опухолей, что подтверждало вовлеченность сигнального пути в этот механизм опухолевой прогрессии. Возможное объяснение полученных результатов может быть найдено в гетерогенности популяции Т-супрессорных лимфоцитов в микроокружении опухолей различных молекулярных подтипов, пациентов с первичным и рецидивным раком и видом внутривезикулярного лечения на фоне трансуретральной резекции мочевого пузыря [Boorjian et al., 2008; Carosella et al., 2015].

Таблица 1 – Ингибирование роста молекулярных подтипов ксенографтной опухоли мочевого пузыря под действием блокады PD-L1 сигнального пути

Молекулярный подтип опухоли	Индекс ТРО			Время удвоения объема опухоли, дни М ± SEM		Число метастазов, М ± SEM
	7 день	14 день	21 день			
Первичный люминальный МНИ РМП	89	80	76	К	9.4 ± 0.3	24.6 ± 3.9
				Б	21.2 ± 2.8 <sup>†</sup>	0 ± 0 <sup>†</sup>
Первичный базальный МНИ РМП	71	65	63	К	10.8 ± 1.6	16.5 ± 2.4
				Б	17.3 ± 1.7 <sup>†</sup>	4.3 ± 1.7 <sup>†</sup>
Первичный двойной негативный МНИ РМП	32	17	4	К	8.3 ± 0.9	44.7 ± 4.5 <sup>‡</sup>
				Б	12.7 ± 2.6	16.2 ± 5.8 <sup>†</sup>
Рецидивный люминальный МНИ РМП	76	62	50	К	9.6 ± 0.7	56.1 ± 6.4 <sup>‡</sup>
				Б	15.2 ± 1.4 <sup>†</sup>	13.5 ± 4.3 <sup>†</sup>
Рецидивный базальный МНИ РМП	77	58	53	К	10.0 ± 0.5	47.8 ± 6.1 <sup>‡</sup>
				Б	18.3 ± 1.9 <sup>†</sup>	7.2 ± 3.5 <sup>†</sup>
Рецидивный двойной негативный МНИ РМП	47	29	17	К	10.1 ± 0.7	63.4 ± 7.5 <sup>‡</sup>
				Б	13.4 ± 2.1	22.8 ± 5.4 <sup>†</sup>

Примечания: МНИ РМП – мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря; ТРО – индекс торможения роста опухоли; К – контроль, Д – блокатор, <sup>†</sup> p < 0,05 при сравнении с контролем (t критерий Стьюдента); <sup>‡</sup> p < 0,05 при сравнении с первичными люминальными и базальными опухолями (ANOVA, критерий Тьюки)

Мы изучили взаимосвязь ответа на анти-PD-L1 антитела и популяции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, а также плазменной концентрации растворимой формы лиганда у животных – носителей опухоли. Оказалось, что в случае как с первичным, так и с рецидивным двойным негативным p53-мутантным раком мочевого пузыря иммунное микроокружение было явно недостаточным для реализации своего противоопухолевого потенциала даже на фоне относительно невысокой концентрации уровня растворимого лиганда в плазме крови животных (таблица 2).



Таблица 2 – CD8+ экспрессия в образцах опухоли и плазменная концентрация sPD-L1 у мышей в зависимости от активности PD-L1 сигнального пути ( $n=10$  в каждой подгруппе)

Молекулярный подтип опухоли	Группа	CD8+ экспрессия, %	sPD-L1, нг / мл	Корреляция
Первичный люминальный МНИ РМП	К	27.6±2.7	17.6±1.4	$r = 0.17 P = 0.4$
	Б	33.4±4.1	2.7±0.5 <sup>†</sup>	$r = -0.99 P = 0.001$
Первичный базальный МНИ РМП	К	18.5±3.2	21.8±4.3	$r = 0.15 P = 0.3$
	Б	25.7±2.9	4.1±1.3 <sup>†</sup>	$r = -0.93 P = 0.001$
Первичный двойной негативный МНИ РМП	К	3.6±1.1 <sup>‡</sup>	31.5±3.6 <sup>‡</sup>	$r = -0.99 P = 0.001$
	Б	5.4±2.3 <sup>‡</sup>	8.4±2.8 <sup>‡†</sup>	$r = 0.15 P = 0.3$
Рецидивный люминальный МНИ РМП	К	19.2±2.1	25.4±2.0	$r = 0.19 P = 0.3$
	Б	26.1±3.5	6.2±0.8 <sup>†</sup>	$r = -0.99 P = 0.001$
Рецидивный базальный МНИ РМП	К	22.5±2.1	18.4±1.3	$r = 0.16 P = 0.4$
	Б	27.7±3.8	5.2±1.2 <sup>†</sup>	$r = -0.97 P = 0.001$
Рецидивный двойной негативный МНИ РМП	К	2.1±0.9 <sup>‡</sup>	37.5±3.8 <sup>‡</sup>	$r = -0.99 P = 0.001$
	Б	4.2±1.5 <sup>‡</sup>	10.3±2.1 <sup>‡†</sup>	$r = -0.38 P = 0.06$

Примечания: МНИ РМП – мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря; К – контроль, Д – блокатор, <sup>†</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с контролем ( $t$  критерий Стьюдента); <sup>‡</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с первичными люминальными и базальными опухолями (ANOVA, критерий Тьюки)

На следующем этапе нашей работы, учитывая молекулярную гетерогенность первичных и рецидивных опухолей мочевого пузыря, мы проанализировали влияние экспрессии PD-L1 на безрецидивную выживаемость пациентов с GATA3-позитивным, CK5/6-экспрессирующим и двойным негативным раком мочевого пузыря высокой и низкой степени злокачественности в зависимости от полученной терапии по поводу первично-диагностированного опухолевого процесса (рисунки 1 и 2).

Мы установили, что в первых рецидивных опухолях базального и люминального МНИ РМП обнаруживается низкая экспрессия иммунной контрольной точки вне зависимости от степени злокачественности (грэйда) и предшествующей терапии, за исключением лишь рецидива базального рака низкой степени злокачественности, возникающего после предшествующей терапии митомицином С. Напротив, рецидив двойного негативного p53-мутантного подтипа опухоли высокой степени злокачественности относится к высокоэкспрессирующим PD-L1 опухолям, тогда как опухоли с низкой степенью злокачественности этого молекулярного подтипа как правило были PD-L1-негативными. Ранее в исследовании Davick и соавт. уже был показан низкий уровень экспрессии иммунного чекпойнта первичными уротелиальными пузырными карциномами с высокой степенью злокачественности, однако без упоминания отдельных молекулярных подтипов опухоли. Также как и в случае с ксенографтными моделями, для формулирования корректных выводов исследовали опухолевые популяции CD8+ лимфоцитов в образцах. Мы установили, что в целом все опухолевые образцы были инфильтрированы Т-супрессорами с высоким их содержанием (более 10% клеточной популяции опухоли) в ткани

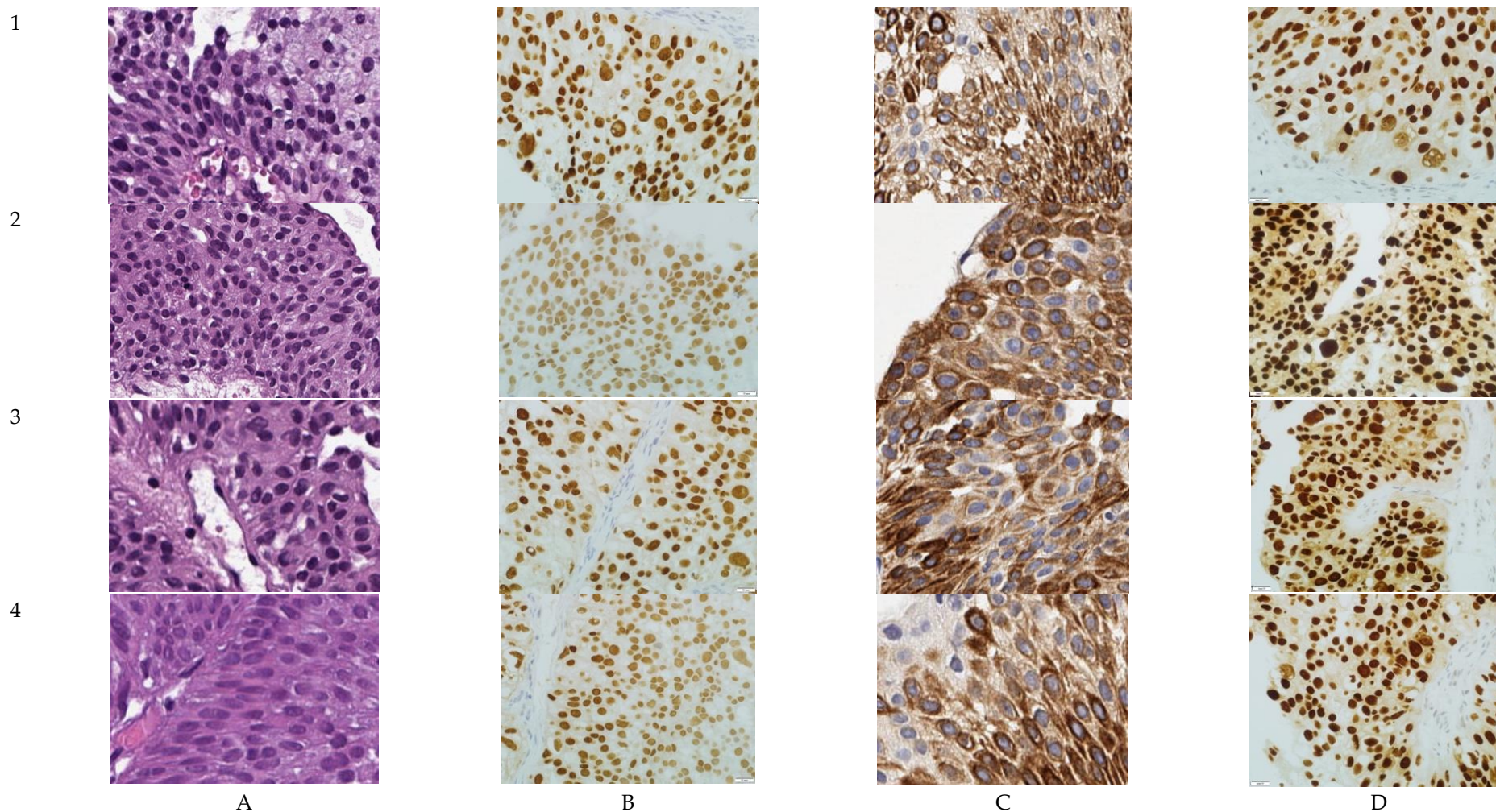




Рисунок 1 – Гистологическая и ИГХ характеристика групп: 1) Первичный МНИ РМП; 2) Первый рецидив МНИ РМП без предшествующей химио- или иммунотерапии; 3) Первый рецидив опухоли после лечения митомицином С; 4) Первый рецидив опухоли после лечения вакциной БЦЖ. А. Гематоксилин и эозин, х500. В. ИГХ с anti-GATA3 антителами, х500. С. ИГХ с anti-CK5/6 антителами, х500. D. ИГХ окрашивание с anti-p53 антителами, х500

	Люминальный подтип		Базальный подтип		Двойной негативный p53-мутантный	
	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>
<b>П</b>	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %
	IC+ < 25 %	IC+ < 25 %	IC+ < 25 %	IC+ < 25 %	IC+ > 25 %	IC+ < 25 %
	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %
<b>РН</b>	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>
	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %
	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ < 25 %	IC+ < 25 %
<b>РМ</b>	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>
	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %
	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ < 25 %	IC+ > 25 %	IC+ < 25 %
<b>РВ</b>	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>	<b>ВЗ</b>	<b>НЗ</b>
	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %
	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ < 25 %
	TC+ > 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ > 25 %	TC+ < 25 %

**Примечания:** П – первичная опухоль; РН – первый рецидив в отсутствие предшествующей фармакологической терапии; РМ – первый рецидив после внутривпузырного введения митомицина С; РВ – первый рецидив после внутривпузырного введения вакцины БЦЖ; ICP – популяция Т-клеток, IC+ / TC+ – CD8+ / опухолевая PD-L1-позитивность; ВЗ – высокая степень злокачественности, НЗ – низкая степень злокачественности

 Высокая PD-L1 экспрессия с преимущественным окрашиванием инфильтрирующей опухоли Т-супрессоров

 Высокая PD-L1 экспрессия опухолевых и иммунных клеток

 Низкая PD-L1 экспрессия

Рисунок 2 – Карта опухолевой PD-L1-позитивности

неоплазий пациентов с рецидивными люминальными и базальными опухолями разной степени злокачественности, не получавшими внутривезикулярного лечения по поводу первичной неоплазии, а также в образцах люминального и двойного негативного РМП вне зависимости от степени злокачественности и базальном рецидиве рака высокой степени злокачественности после предшествующей терапии вакциной БЦЖ. Подобный уровень иммунной инфильтрации Т1 уротелиальных карцином высокой степени злокачественности по сравнению с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря был установлен Wankowitz с коллегами (2017). При этом авторы подчеркнули, что в мышечно-неинвазивной уротелиальной карциноме обнаруживается преобладание лимфоцитарной PD-L1-позитивности над опухолевой, которая наблюдается в мышечно-инвазивных образцах рака. В нашем исследовании мы показали, что уровень PD-L1 экспрессии в рецидивных опухолях также определяется молекулярным подтипом опухоли и видом предшествующего химио/иммунотерапевтического воздействия. Так, в частности, установлено, что в группе пациентов, перенесших по поводу первичной опухоли только трансуретральную резекцию мочевого пузыря, наблюдается значимое различие в безрецидивной выживаемости между опухолями высокого и низкого уровня злокачественности базального и люминального молекулярных подтипов. Продолжительность времени до первого рецидива не отличалась в зависимости от высокой и низкой злокачественности и не различалось в подгруппах двойного негативного рака мочевого пузыря. Мы определили, что единственной группой, в которой имеется взаимосвязь между уровнем экспрессии лиганда и безрецидивной выживаемостью является рецидивный люминальный рак.

Внутрипузырная адьювантная лекарственная терапия митомицином С по поводу первичной опухоли мочевого пузыря достоверно увеличивала безрецидивную выживаемость пациентов с люминальным и базальным молекулярными подтипами опухоли низкой степени злокачественности, в отличие от двойного негативного рака, где мы не получили существенных различий. Также пролонгировало безрецидивное время в подгруппах люминального и базального раков низкой степени злокачественности внутривезикулярное введение вакцины БЦЖ с сильной связью с уровнем экспрессии иммунного чекпоинта в случае с люминальным молекулярным подтипом неоплазии.

В этой связи на заключительном этапе нашей работы именно для люминального молекулярного подтипа МНИ РМП мы определили взаимосвязь экспрессии PD-L1, безрецидивной выживаемости и такими важнейшими маркерами с установленной прогностической значимостью, как микроРНК-145 и микроРНК-200а, экспрессией *FGFR3* и частотой мутаций горячих точек гена *FGFR3*.

В нашем исследовании мы установили, что первичный люминальный рак мочевого пузыря высокой степени злокачественности экспрессирует *FGFR3* ниже, чем люминальная

карцинома с низким уровнем злокачественности. При этом, несмотря на то, что получены межгрупповые различия в частоте мутаций между более и менее злокачественными люминальными опухолями связи с уровнем экспрессии фактора роста установить не удалось. Мы не установили отличий в тканевой экспрессии микроРНК-200а в исследуемых подгруппах, тогда как экспрессия микроРНК-145 имела значимые различия в подгруппах более и менее злокачественной опухоли мочевого пузыря люминального молекулярного подтипа, при этом зависимость между уровнями экспрессии *FGFR3* и микроРНК-145 носила обратный характер (рисунок 4).

Следует обратить внимание, что мы впервые в мировой практике установили взаимосвязь между этими молекулами, что требует дальнейшего исследования, тем более, что в недавнем исследовании Zhu et al. показано значение оси ATG7/аутофагия/FOXO3A/микроРНК-145 для опухолевой экспрессии PD-L1.

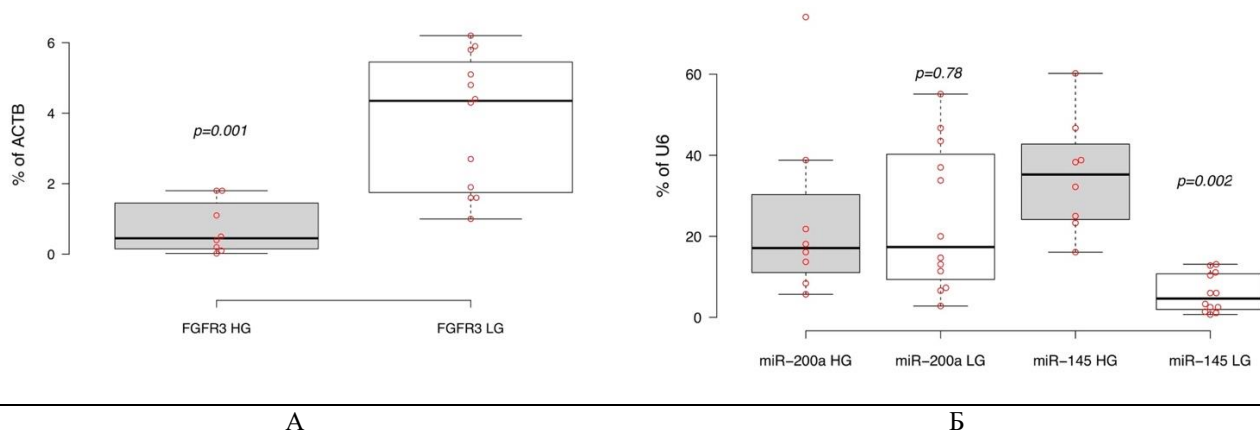


Рисунок 4 – Экспрессия *FGFR3* (выраженная в процентах от экспрессии доменного гена *ACTB*) и экспрессия микроРНК-200а и микроРНК-145 (выраженная в процентах от экспрессии домена U6 малой ядерной РНК) опухолевыми клетками люминального варианта первичного МНИ РМП. Достоверность различий определена при помощи t-теста для независимых выборок; HG – высокий уровень злокачественности, LG – низкий злокачественности

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Итоги выполненного диссертационного исследования

Таким образом, в результате выполнения работы удалось разработать гетеротопические модели PD-L1-экспрессирующего первичного и рецидивного люминального, базального и двойного негативного p53-мутантного мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря. Подавление PD-L1 сигнального пути ингибировало метастатическую активность всех молекулярных подтипов опухоли, тогда как рост рецидивных базальной и двойной негативной опухоли не зависел от мембранной PD-L1-позитивности. Также было показано, что первичные опухоли МНИ РМП низкой степени злокачественности всех молекулярных подтипов и высокой степени злокачественности люминального подтипа характеризуются низким уровнем PD-L1

экспрессии, при этом первичные опухоли высокой степени злокачественности базального и двойного негативного p53-мутантного подтипов характеризуются высоким уровнем экспрессии PD-L1 за счет окрашивания иммунных клеток. Рецидивные опухоли высокой степени злокачественности люминального и двойного негативного p53-мутантного подтипов после лечения вакцинной БЦЖ характеризуются наибольшим уровнем экспрессии PD-L1 за счет окрашивания опухолевых и иммунных клеток. Рецидивные опухоли без предшествующего лечения люминального и базального подтипов, рецидивные опухоли после лечения митомицитом С люминального и высокой степени злокачественности базального и двойного негативного p53-мутантного подтипов, а также рецидивные опухоли после лечения вакциной БЦЖ базального и низкой степени злокачественности люминального подтипов характеризуются высоким уровнем экспрессии PD-L1 за счет окрашивания иммунных клеток. Рецидивные опухоли двойного негативного p53-мутантного подтипа низкой степени злокачественности и высокой степени злокачественности без предшествующего лечения характеризуются низким уровнем PD-L1 экспрессии. Также установлено, что степень злокачественности опухоли, мембранная экспрессия PD-L1 и экспрессия *FGFR3* в совокупности являются комплексным прогностическим признаком безрецидивной выживаемости пациентов с люминальным первичным мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Результаты, полученные в настоящем диссертационном исследовании, обозначают новые горизонты для проведения дальнейшего изучения прогностического, патологического и клинического значения клеточно- и тканеассоциированных маркеров в опухолевой прогрессии опухолей эпителиального происхождения, в том числе и рака мочевого пузыря.

Среди наиболее очевидных направлений дальнейшего развития темы можно выделить следующие: 1) идентификация взаимосвязи между экспрессией фактора роста фибробластов 3 типа и частотой мутаций кодирующего его гена не только в клетках люминального, но и других молекулярных подтипов рака мочевого пузыря; 2) дальнейшее исследование взаимосвязи оси ATG7/аутофагия/FOXO3A/микроРНК-145 для опухолевой экспрессии PD-L1 в отношении к изучаемому типу опухоли; 3) изучение роли экспрессии и блокады иммунных контрольных точек лимфоцитов и опухолевых клеток в прогнозировании общей выживаемости пациентов с неоплазиями мочевого пузыря.

### **ВЫВОДЫ**

1. Ингибирование PD-L1 сигнального пути сопровождается снижением клеточной PD-L1-позитивности во всех опухолевых образцах первичных и рецидивных мышечно-неинвазивных ксенографтных гетеротопических карцином мочевого пузыря на сформированной *in vivo* экспериментальной модели с применением гуманизированных животных в качестве носителя

опухоли. При этом, выживаемость животных-носителей опухолей определялась как молекулярным типом опухоли, так и объемом популяции PD-L1 позитивных клеток. Наименьшая выживаемость регистрировалась в группе рецидивных опухолей. Во всех группах с подавлением активности иммунной контрольной точки наблюдали ингибирование метастатической активности опухоли.

2. Подавление PD-L1 сигнального пути приводит к увеличению продолжительности жизни животных – носителей как первичного, так и рецидивного GATA3-позитивного и CK5/6-позитивного подтипов опухоли, тогда как выживаемость мышей с дважды негативным p53-экспрессирующим типом опухоли не зависела от уровня мембранной экспрессии PD-L1. Плохой ответ на анти-PD-L1 терапию дважды негативного рака мочевого пузыря объясняется бедностью CD8+ популяции Т-лимфоцитов в указанных опухолях.

3. В группе пациентов, не получавших по поводу мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномы внутрипузырного лечения, безрецидивная выживаемость определялась как степенью злокачественности опухоли, так и ее молекулярным подтипом. Наименьшей выживаемостью характеризовалась CK5/6-экспрессирующая карцинома высокой степени злокачественности. Внутрипузырная терапия митомицином С и вакциной БЦЖ повышала безрецидивную выживаемость пациентов с базальным и люминальным подтипом опухоли, но не влияла на выживаемость при двойном негативном раке.

4. Установлена взаимосвязь между статусом экспрессии PD-L1 сигнального пути и безрецидивной выживаемостью для пациентов, не получавших внутрипузырного лечения и пациентов с рецидивным люминальным молекулярным подтипом рака мочевого пузыря, получавшим по поводу первичной опухоли внутрипузырное лечение вакциной БЦЖ.

5. Люминальный подтип первичного мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря высокой степени злокачественности характеризуется большей экспрессией PD-L1 сигнального пути и микроРНК-145, чем менее злокачественный вариант данного подтипа опухоли, в большей степени чем первый экспрессирующий *FGFR3* и содержащий мутации гена *FGFR3*.

6. Степень злокачественности опухоли (HR = 571,72 [11,03 – 2,96]  $p=0,002$ ), мембранная экспрессия PD-L1 (HR = 2,33 [0,92 – 1,92]  $p=0,012$ ) и экспрессия *FGFR3* (HR = 0,08 [0,17 – 0,42]  $p=0,003$ ) в совокупности являются комплексным прогностическим признаком безрецидивной выживаемости пациентов с люминальным первичным мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная биологическая *in vivo* экспериментальная модель для ксенографтного первичного и рецидивного мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря может быть использована для изучения патологоанатомических характеристик опухолей, процессов

опухолевой прогрессии, а также для оценки эффективности ответа опухолевой ткани на различные виды противоопухолевой лекарственной терапии.

2. При определении прогноза безрецидивной выживаемости пациентов с первично-диагностированным люминальным первичным мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря разной степени злокачественности, а также ответа на внутривезикулярную терапию необходимо определять экспрессию PD-L1 и *FGFR3* с последующей их комплексной оценкой.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 4-алкил-замещенное производное 2-аминохромена подавляет рост и метастазирование ксенографтной аденокарциномы легкого / Е.А. Самышина, М.О. Дудина, Е.В. Блинова, И.Р. Сулова, О.Н. Дерябина, Д.С. Блинов, **П.Н. Жданов**, В.И. Шаробаро // Сеченовский Вестник. – 2019. – Т. 2(2). – С. 15-20.
2. Patient-Derived Non-Muscular Invasive Bladder Cancer Xenografts of Main Molecular Subtypes of the Tumor for Anti-Pd-11 Treatment Assessment/ E. Blinova, D. Roshchin, E. Kogan, E. Samishina, T. Demura, O. Deryabina, I. Suslova, D. Blinov, **P. Zhdanov**, U. Osmanov, M. Nelipa, A. Kaprin // **Cells**. – 2019. – Vol. 8(6). – P.1-17. [**Web of Science, PubMed**]
3. Programmed death-ligand 1 signaling pathway involves in bladder cancer growth and progression / Elena A. Samishina, Ekaterina V. Blinova, Dmitry A. Roshchin, Irina A. Suslova, Dmitry S. Blinov, **Pavel N. Zhdanov**, Olga N. Deryabina, Olesia V. Kit'ko // **Journal of Carcinogenesis**. – 2019. – Vol. 18(1). – P. 3-10. [**Web of Science, Scopus, PubMed**]
4. Development of patient-derived PD-L1-expressing grade 2 non-muscular invasive bladder cancer in NOG/SCID female mice / E. Blinova, D. Roshchin, E. Samishina, I. Suslova, O. Deryabina, **P. Zhdanov**, D. Blinov, A. Chudaikin, T. Bogoyavlenskaya, Yu. Vasiliev // Journal of anatomy. – 2020. Vol. 236, Suppl. 1. – P. 139-140.
5. Prognostic Role of *FGFR3* Expression Status and Tumor-Related MicroRNAs Level in Association with PD-L1 Expression in Primary Luminal Non-M. uscular Invasive Bladder Carcinoma / E. Blinova, A. Buzdin, D. Enikeev, **P. Zhdanov** [et al.] // **Life**. – 2020. – Vol. – 10. – P.305. [**Web of Science, Scopus, PubMed**]

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БЦЖ – вакцина Кальметта-Герена  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ИГХ – иммуногистохимия  
ИФА – иммуноферментный анализ  
МИ РМП – мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря  
МНИ РМП – мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря  
МП – мочевой пузырь

ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
CIS – cancer in situ  
FGFR3 – fibroblast growth factor receptor 3  
EORTC – European Organization  
NMP – nuclear matrix protein  
PD-L1 – programmed death ligand 1  
WHO – World Health Organization