

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Блинова Екатерина Валериевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент

Демура Татьяна Александровна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ: ПЕРСПЕКТИВЫ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИСХОДОВ И ВЫЖИВАЕМОСТИ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	15
1.1 Вызовы, стоящие на пути к внедрению молекулярных маркеров в клиническую практику	16
1.2 Биомаркеры клинического стадирования рака мочевого пузыря	17
1.2.1 Мочевые маркеры для скрининга рака мочевого пузыря и дифференциальной диагностики гематурии.....	17
1.2.2 Использование мочевых биологических маркеров в программах наблюдения за течением и прогрессией РМП.....	20
1.3 Тканевые маркеры мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря	25
1.3.1 Тканевые прогностические маркеры прогрессии мышечно-неинвазивного РМП	26
1.3.2 Тканевые биологические маркеры при инвазивном РМП	28
1.3.3 Биологические маркеры РМП, определяемые в крови.....	31
1.4 Маркеры прогноза и ответа на системное лечение рака мочевого пузыря	33
1.4.1 Биологическое прогнозирование ответа на системную иммунотерапию рака мочевого пузыря	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1 Дизайн исследования	41
2.2 Соблюдение этических и организационно-нормативных процедур при выполнении исследования.....	46
2.3 Формирование ксенографтных линий различных молекулярных подтипов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря.....	47
2.3.1 Лабораторные животные	47
2.3.2 Характеристика опухолевого биологического материала	47
2.3.3 Гуманизация животных, контроль болевого синдрома.....	51
2.3.4 Формирование экспериментальных групп и наблюдение за животными – носителями ксенографтной опухоли	52

2.4 Клинико-патологическая характеристика биопсийного материала.....	53
2.4.1 Обоснование размера клинической выборки. Критерии включения и исключения из исследования	53
2.4.2 Характеристика лечебных процедур и программы наблюдения за лицами, включенными в исследование. Безрецидивная выживаемость	56
2.5 Морфологические методы исследования.....	57
2.5.1 Классический светооптический метод исследования.....	57
2.5.2 Иммуногистохимический метод исследования	58
2.5.2.1 ИГХ метод определения молекулярного типа мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, экспрессии p53, CD8+ Т-лимфоцитов	59
2.5.2.2 ИГХ метод определения экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани	60
2.6 Иммуноферментный метод определения плазменной концентрации растворимой фракции PD-L1 (sPD-L1)	62
2.7 Молекулярно-генетические методы исследования.....	62
2.7.1 Изоляция ДНК и РНК	63
2.7.2 Обратная транскрипция	63
2.7.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени	64
2.7.4 Определение мутаций горячих точек гена FGFR3.....	66
2.8 Методы статистического анализа полученных результатов.....	66
ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ PD-L1 ЭКСПРЕССИИ НА ОПУХОЛЕВУЮ ПРОГРЕССИЮ НА КСЕНОГРАФТНЫХ МОДЕЛЯХ УРОТЕЛИАЛЬНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ.....	68
3.1 Влияние степени активности PD-L1 сигнального пути на выживаемость животных – носителей ксенографтной опухоли мочевого пузыря	69
3.2 Влияние степени активности PD-L1 сигнального пути на рост и метастазирование ксенографтной опухоли мочевого пузыря	75
3.3 Оценка популяции CD 8+ лимфоцитов ксенографтных опухолей и плазменной концентрации растворимого PD-L1.....	79
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ PD-L1 НА БЕЗРЕЦИДИВНУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПАЦИЕНТОВ С МЫШЕЧНО-НЕИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВАРИАНТА ОПУХОЛИ.....	83

4.1 Экспрессия PD-L1 в первичных и рецидивных мышечно-неинвазивных опухолях мочевого пузыря	83
4.2 Интенсивность инфильтрации первичной и рецидивной опухоли иммунными клетками	89
4.3 Картирование PD-L1 экспрессии первичных и рецидивных карцином мочевого пузыря в зависимости от степени злокачественности и молекулярного варианта	92
4.4 Безрецидивная выживаемость в исследуемых группах	94
ГЛАВА 5. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ PD-L1 СТАТУСОМ, ЭКСПРЕССИЕЙ FGFR3, микроРНК-200а И 145, МУТАЦИЯМИ ГЕНА FGFR3 И ТЕЧЕНИЕМ ЛЮМИНАЛЬНОГО МЫШЕЧНО-НЕИНВАЗИВНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ.....	100
ГЛАВА 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	107
6.1 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования...	114
ВЫВОДЫ	115
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. 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 [2]. Курение сигарет связывают с возникновением до 50% всех случаев заболевания, на долю промышленных токсинов приходится до 20% неоплазий мочевого пузыря [3].

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 [4].

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 [5, 6].

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 [6, 7], таких как мутации генов TP53 и *FGFR3* [8, 9], альтерации генов, вовлеченных в клеточную морфологию, эпителиальную-мезенхимальную трансформацию, устойчивость к апоптозу и др. [10-14].

В настоящее время TNM стадирование РМП не позволяет прогнозировать поведение опухоли [15, 16], 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 соответствие с которой три основных молекулярно-патологических подтипа опухоли определяются как базальный (преимущественно CK5/6-позитивный), люминальный (преимущественно GATA3-позитивный) и двойной негативный, каждый из которых может еще содержать мутантный вариант гена *TP53* [17]. 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 [18]. 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 [19]. Значительным потенциалом с точки зрения прогнозирования течения опухолевого процесса, определения клинко-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 [20].

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 адьювантной внутрипузырной 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: СК5/6-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 внутрипузырной терапии по поводу первично-диагностированной опухоли. Доказано, что степень мембранной PD-L1-позитивности опухолевых клеток и Т-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 внутримузырной 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 одного из иммунных чекпоинтов 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 Cox-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 инфильтрирующей 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 имени 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.

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.

ГЛАВА 1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ: ПЕРСПЕКТИВЫ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИСХОДОВ И ВЫЖИВАЕМОСТИ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

Рак мочевого пузыря – это гетерогенное заболевание, диагностика, лечение и прогноз которого представляет большие трудности [21]. Современные системы стадирования заболевания и его классификации, доступные клиницистам, построены на необходимости проведения инвазивных вмешательств, таких как цистоскопия и биопсия, а также дорогих в производстве методов медицинской визуализации, в частности, компьютерной томографии или магнитно-резонансного сканирования. При этом, указанные таблицы и системы градаций заболевания часто необъективны, что приводит к ошибочной оценке степени тяжести и глубины поражения, в особенности, при микро-метастатическом поражении. Описанные неточности в оценке клинического и биологического потенциала, имеющегося в распоряжении лечащего врача или патолога, приводит к неадекватно назначенному лечению, отсутствию удовлетворительных результатов вмешательств, и, в конечном счете, снижению качества и продолжительности жизни пациентов [22].

Молекулярные маркеры, определяемые в моче, крови и тканях представляют патологу и клиницисту прекрасную возможность понять биологическую природу и вектор трансформационного развития опухоли, а также оценить ее микро- и макроокружение. Формирование молекулярных панелей с доказанной прогностической и диагностической значимостью позволяет идентифицировать заболевание на максимально ранних стадиях развития, корректно стратифицировать пациентов по категориям рисков, повысить точность прогнозирования течения, исходов заболевания и ответа на таргетную терапию или иные виды терапевтических вмешательств. При этом, стоит подчеркнуть, что уже сейчас действующие клинические рекомендации используют ряд молекулярных (в первую очередь, тканевых и полученных из плазмы крови) маркеров, тогда как другие (идентифицированные в моче) еще только широко

изучаются [23]. Настоящий литературный обзор посвящен трудностям и ключевым вопросам внедрения молекулярно-биологических маркеров опухолевой прогрессии рака мочевого пузыря в клиническую практику.

1.1 Вызовы, стоящие на пути к внедрению молекулярных маркеров в клиническую практику

Подобно разработке лекарственных средств исследования клинически-значимых биомаркеров осуществляется этапно: доклинические инициативные исследования, разработка клинически приемлемого метода или диагностикума и его валидация, небольшие ретроспективные клинические исследования, внешняя валидация в больших когортах (ретро- или проспективная, как правило, мульти-институциональная), проспективные клинические испытания и последующие постмаркетинговые исследования с возможным распространением на другие варианты клинических проявлений и стадии заболевания [24, 25]. Причем, за последнее время ряд рекомендаций по оптимизации дизайна, анализа и публикации результатов исследований биологических маркеров были разработаны и введены в практику.

Главная цель определения молекулярного маркера заключается в идентификации валидируемого диагностикума (тест-системы), которая может быть использована для улучшения принятия клинического решения при соблюдении принципов экономической целесообразности и эффективности. Следовательно, недостаточно просто установить статистически обоснованную взаимосвязь между тем или иным маркером и клиническим результатом; необходимо доказать прогностическую и предиктивную точность мультивариантной модели, включающей обнаруженный маркер, превосходящую имеющиеся клинические признаки, взятые отдельно или в их существующем многообразии. Идеальными рассматриваются модели интеграции молекулярных маркеров в клиническую практику, базирующиеся на дискриминантном анализе,

точной калибровке и других точных математико-статистических методах исследования [25].

Как мы уже упомянули в начале, учитывая крайнюю гетерогенность рака мочевого пузыря, будет заблуждением предполагать наличие одного маркера, который бы смог адекватно охарактеризовать способность к опухолевой прогрессии, поведение неоплазии для безошибочного выбора терапевтической стратегии. Этот вывод привел исследователей к необходимости оценки прогностической значимости важнейших сигнальных путей, имеющих большее биологическое и клиническое значение, чем отдельные молекулы [26, 27]. Панели маркеров, включающие дайверы основных сигнальных путей в комбинации с клиническими и патологическими признаками в настоящее время рассматриваются как наиболее многообещающие подходы к точной стратификации рисков и выработке клиничко-терапевтических решений в отношении пациентов с раком мочевого пузыря.

1.2 Биомаркеры клинического стадирования рака мочевого пузыря

В зависимости от конкретных клинических условий для выявления и клинического стадирования рака мочевого пузыря могут использовать различные маркеры, обнаруживаемые в моче, крови и биопсийном материале пациентов.

1.2.1 Мочевые маркеры для скрининга рака мочевого пузыря и дифференциальной диагностики гематурии

Для пациентов, в анамнезе которых не было рака мочевого пузыря, существует несколько возможных клинических ситуаций, при которых мочевые маркеры могут играть серьезную диагностическую роль. Первый, широко обсуждаемый до сих пор в зарубежной и отечественной научной периодике, касается использования мочевых маркеров для скрининга заболевания,

вследствие, главным образом, того, что небольшая распространенность патологии в популяции в целом, является существенным сдерживающим фактором на пути разработки эффективной скрининговой стратегии [28]. В частности, до настоящего времени число исследований эффективности скрининговых программ для ранней диагностики рака мочевого пузыря чрезвычайно мало, и не было проведено ни одного рандомизированного контролируемого исследования.

Идентификация популяций высокого риска может преодолеть описанные ограничения [29]. Однако, данные недавно проведенных исследований указывают на то, что у лиц с высоким риском развития рака мочевого пузыря, таких как у работников химической промышленности, подверженных воздействию веществ с высоким канцерогенным потенциалом, и у злостных курильщиков, частота выявления заболевания столь низка, что делает невозможным извлечение социальноэкономических выгод из проведения скрининговых программ.

Так, Lotan et al. [30], оценивали уровень маркера NMP22 в популяции высокого риска развития РМП, включающей 1175 мужчин и 327 женщин. В основу наблюдения авторы брали случаи со злостным курением не менее 10 лет и воздействием канцерогенных производственных факторов на протяжении не менее 15 лет. Лишь 85 человек, что составляло 5,7% от всей популяции, имели положительные значения NMP22. При последующем обследовании 69 лиц лишь у трех человек были выявлены патологические изменения, соответствующие РМП – у одного пациента диагностирована pTa опухоль низкого грейда, еще у одного pTa опухоль высокого грейда и у третьего пациента – атипия без признаков малигнизации. Длительное последующее наблюдение за NMP22 (ядерный матриксный белок)-позитивными лицами позволило выявить лишь 9 дополнительных случаев формирования РМП [31]. Примечательно, что ни в одном случае не был диагностирован мышечно-инвазивный пузырный рак, а NMP22-позитивность не ассоциировалась с неблагоприятной общей выживаемостью заболевших.

Второй возможный вариант, при котором определение мочевых биомаркеров может носить существенное клиническое значение – это

стратификация по группам риска пациентов с асимптомной микрогематурией. У пациентов с асимптомной макрогематурией доказан высокий риск РМП (на уровне 10%), что требует обязательного проведения инвазивных диагностических урологических манипуляций [32]. У данной категории пациентов биологические биомаркеры могут использоваться лишь в дополнение к цистоскопии и диагностической визуализации, и, вероятно, не могут существенным образом повлиять на выбор диагностической стратегии. В случае же с асимптомной микрогематурией дело обстоит иначе. Международные рекомендации существенно различаются в суждениях о необходимом диагностическом минимуме при выявлении симптома. Его частота среди взрослого населения колеблется около 18%, однако лишь у 2% из них удается диагностировать РМП. Это ведет к небрежному отношению к асимптомной микрогематурии, отсроченному проведению инвазивных урологических диагностических вмешательств и имиджингу и, как следствие, поздней диагностике РМП, особенно среди женской популяции [33].

В этих условиях мочевые биологические маркеры могут быть значительным основанием для идентификации пациентов на этапе сортировки с позиции степени риска, ранней диагностики и выявления заболевания [32, 34-36]. Cha et al. [37] провели ретроспективный анализ 1182 пациентов с гематурией, в том числе 68% из них – с микрогематурией, с оценкой цитологии, результатов лучевых методов исследования, цистоскопии и иммуноцитологии у всех пациентов. В результате им удалось построить номограммы прогнозирования риска РМП, достигающих предиктивной точности 90,8%.

Lotan с коллегами валидировали номограммы, включающие такие переменные, как вес, пол, этническую принадлежность, табачный анамнез, тип гематурии, цитологию и уровень NMP22 в когорте, включающей 381 пациента с гематурией [35]. В целом, лишь у 23 пациентов (6%) был выявлен РМП, что соответствовало предиктивной точности 80,2%.

Наконец, в когорте пациентов, включавшей 86 лиц с асимптомной микрогематурией и 83 пациентов с макрогематурией, научный коллектив под

руководством Beukert [38] использовали метод анализа метилированных маркеров OSR1, SIM2, OTX1, MEIS1, ONECUT2 для разработки своей модели предсказания рака мочевого пузыря. Помимо перечисленных биологических факторов модель также включала такие характеристики как тип гематурии, возраст, пол и результат цитологии. Система достигала показателей чувствительности 85%, специфичности – 87; площадь под характеристической кривой ошибок была равна 89%.

В целом, в той или иной степени все упомянутые исследования показывают прогностическую значимость мочевых маркеров, однако, как мы уже говорили, крупных доказательных исследований не проводилось. Кроме того, необходимо подчеркнуть, что до настоящего времени не существует и однозначных доказательств целесообразности биомаркеров в условиях раннего выявления или иных скрининговых программ с точки зрения их влияния на опухоль-специфическую смертность [23]. И, таким образом, вследствие низкого уровня доказательств, мочевые биомаркеры сегодня не рекомендованы для скрининга РМП и приоритизации пациентов с асимптомной микрогематурией.

1.2.2 Использование мочевых биологических маркеров в программах наблюдения за течением и прогрессией РМП

Мочевые биомаркеры в период наблюдения за пациентами с установленным диагнозом РМП были разработаны для преодоления известных ограничений производства диагностической цистоскопии и цитологии мочи. Недостатками цистоскопии являются инвазивность и пропуск большого количества рецидивов РМП, особенно CIS. К недостаткам цитологии мочевого осадка можно отнести низкую чувствительность к мышечно-неинвазивному раку мочевого пузыря низкого и промежуточного рисков, а также существенное несоответствие заключений различных цитопатологов, в особенности при просмотре препаратов пациентов после перенесенной внутрипузырной иммунотерапии препаратом вакцины Кальметта-Герена [39-41].

Существуют два ведущих клинико-патологических варианта применения мочевых биомаркеров в процессе наблюдения – в качестве дополнения к цистоскопии или как альтернатива инвазивной диагностике. Более того, роль биомаркеров в принятии итогового диагностического решения может меняться в случае мышечно-неинвазивного пузырного рака низкого и среднего риска и заболевания с высоким риском. Так, у пациентов с низким грейдом применение мочевых маркеров может значительно снизить число цистоскопических вмешательств, тогда как у лиц с опухолью высокой степени злокачественности биологические маркеры выступают в дополнение к инвазивной диагностике и, во-первых, повышают информированность врача и пациента, идентифицируют лиц с высоким риском прогрессии, и во-вторых, способствуют более корректной интерпретации промежуточных и сомнительных результатов цитологии и оценке ответа на БЦЖ-терапию.

Чтобы выступать в качестве эффективного заменителя цистоскопии мочевые маркеры должны обладать очень высокой чувствительностью и значением показателя NPV (negative predictive value). В частности, в одном из недавно проведенных исследований было показано, что для комфортной для пациентов замены цистоскопии определением биомаркеров в моче чувствительность последних должна колебаться в диапазоне не ниже 90-95% [42]. В среднем, известная по литературным данным чувствительность, определяемых в выпускаемой моче маркеров – цитологии осадка, ядерного матриксного протеина, ВТА (антигена рака мочевого пузыря), иммуноцитологии, UBC-теста, флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и некоторых других, варьирует в широких пределах – от 7 до 93% [43, 44]. Соответствующая ей специфичность колеблется от 49 до 99% [45, 46]. Из перечисленных биологических тестов только Sxbladder Monitor показал высокую чувствительность (91-93%), при том, что доля ложноотрицательных результатов не превышает 1,5% [44]. Обе указанные метрики являются безусловными предпосылками для включения теста в протокол наблюдений как дополнение к цистоскопии. Однако, специалисты отмечают, что для менее злокачественных опухолей мочевого пузыря его применение будет

менее клинически значимым, если небольшие опухоли будут пропускаться как при эндоскопическом, так и при биомаркерном тестировании.

Вследствие неудовлетворительных результатов, демонстрируемых отдельными биологическими маркерами, разрабатываются или панели маркеров или комбинации альтернативных маркеров для повышения чувствительности прогностических тест-систем. В таблице 1 суммирована комплексная оценка чувствительности и специфичности некоторых тест-систем в предикции РМП.

В одном из исследований было показано, что комбинация двух тестов из цитологии мочевого осадка, иммуноцитологии, флуоресцентной *in situ* гибридизации и определения уровня матриксного ядерного протеина не превышала по показателю чувствительности 89,8% (иммуноцитология + определение уровня матриксного ядерного протеина) и 92,1% (иммуноцитология и флуоресцентная *in situ* гибридизация) [47]. Если цитология сочеталась с одним из перечисленных диагностических методов, чувствительность не превышала 86,7% (при комбинации с определением уровня матриксного ядерного протеина) и 91,3% (при комбинации с иммуноцитологией) соответственно. Добавление флуоресцентной *in situ* гибридизации к обычной в таких случаях цитологии мочевого осадка ассоциировалось с показателем чувствительности 80,5% (94% для опухолей высокого риска) и частотой ложноотрицательных результатов 9,9% (1,2% для опухолей высокого риска).

Основываясь на описанных находках, Европейская (EUA) и Американская (AUA) урологические ассоциации совместно с Обществом онкоурологов (SUO) до настоящего времени не рекомендуют использование определения биологических маркеров в моче в программах динамического наблюдения за пациентами с мышечно-неинвазивным РМП [48, 49].

Так, в частности, в соответствии с совместными рекомендациями AUA/SUO, врач может использовать определение биомаркеров для оценки ответа на внутривезикулярное введение препарата БЦЖ и уточнения спорных результатов цитологии мочевого осадка [49].

Таблица 1 – Чувствительность и специфичность мочевых и тканевых тест-систем

Тест-система	Чувствительность	Специфичность	Ограничения
1	2	3	4
<i>Мочевая тест-система</i>			
ВТА-STAT	55-83%	67-72%	Высокий уровень ложноположительных результатов
ВТА-ТРАК	66-72%	51-75%	Высокий уровень ложноположительных результатов
NMP 22	51-85%	77-96%	Ложноположительные результаты в случае гематурии и воспаления МП
BLCA-4	80%	87%	Требуют дальнейшей валидации
BLCA-4	89-96%	91-100%	
UBC-Rapid test	36-78%	63-97%	Высокая вариативность показателей, низкая чувствительность при мышечно-неинвазивном РМП
UBC ELISA	40-70%	63-75%	Высокий уровень ложноположительных результатов
CYFRA 21-1	61-85%	75-91%	Высокий уровень ложноположительных результатов при воспалении МП
Survivin	64-85%	88-93%	Требуют дальнейшей валидации
<i>Клеточно-тканевые системы</i>			
ImmunoCyt/ uCyt+ Assay	68%	72%	Результаты зависят от стабильности проб
UroVision fluorescent	69-75%	82-85%	Низкая чувствительность при РМП низкого грейда, отсутствие консенсуса

Таблица 1 (продолжение)			
1	2	3	4
in situ hybridization (FISH)			по трактовке результатов

В самом деле, серийное использование тестов UroVision и флуоресцентной in situ гибридизации у пациентов, проходящих курс внутривезикулярной БЦЖ-терапии показало, что положительное значение тестов перед началом введения, на шестой неделе (перед шестым введением) и перед цистоскопией через 3 мес. после первого введения (перед началом первого поддерживающего курса) значимо ассоциируется с рецидивированием и прогрессией опухоли. Флуоресцентная in situ гибридизация через 3 мес. после первого введения БЦЖ позволяет идентифицировать 50% пациентов с опухолевой прогрессией с положительным результатом теста по сравнению с 3% тех, у кого тест был нормальным [50].

Другой подход к повышению результативности протокола наблюдения пациентов с мышечно-неинвазивным РМП и оптимизации связанных с этим экономических затрат – использование добавочных тестов. Например, у пациентов с отрицательным или сомнительным результатом одного теста производство второго – высокоточного – может существенно улучшить результат наблюдения. Как известно, иммунотерапия индуцирует формирование воспалительной реакции слизистой мочевого пузыря, делая точную оценку результатов весьма затруднительной. В этой связи, точность цитологии мочевого осадка, проводимой в качестве дополнения к цистоскопии при диагностике рецидивной уротелиальной карциномы и CIS может значительно снижаться на фоне применения внутривезикулярной БЦЖ-терапии. Поэтому флуоресцентная in situ гибридизация и иммуноцитология были изучены в условиях сомнительного результата цитологии мочевого осадка. Было установлено, что применение флуоресцентной in situ гибридизации обладает 100% чувствительностью и 100%

NPV у пациентов с отрицательными результатами цистоскопии и сомнительной цитологией [51]. Иммуноцитология имела 73% чувствительности в диагностике рецидива РПМ у пациентов с сомнительным результатом цитологии и показатель NPV на уровне 80% [52]. В результате, оба биологических теста были одобрены AUA/SUO для дополнительного производства в случае сомнительных результатов цитологии мочевого осадка для улучшения точности протокола наблюдения.

Таким образом, в рамках наблюдательных протоколов при мышечно-неинвазивном РМП до настоящего времени не получено убедительных доказательств того, что мочевые биомаркеры могут выступать как эффективная замена инвазивным диагностическим методам (цистоскопии), но, при этом, они могут быть использованы для оценки ответа пациентов на внутривезикулярную иммунотерапию или как дополнительные тесты при сомнительных результатах основных диагностических методов.

1.3 Тканевые маркеры мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря

Тканевые биологические маркеры теоретически могут применяться при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря для предикции онкологических исходов, таких как рецидив заболевания, опухолевая прогрессия в инвазивную форму, ответ на внутривезикулярное введение средств иммунотерапии (БЦЖ). Кроме того, в настоящее время проводятся широкие исследования по обоснованию применимости тканевых биомаркеров уротелиальной карциномы для улучшения исходов при разработке стратегий персонализированной терапии и проведении мониторингов, основанных на оценке индивидуальных рисков.

Кроме того, биомаркеры, определяемые в тканях, могут быть использованы как информативные показатели для определения доли пациентов с мышечно-неинвазивным пузырным раком высокого риска, у которых высока вероятность перерождения в инвазивную форму, а, следовательно, необходимо назначение исходно более агрессивной терапевтической и/или хирургической терапии, в частности, радикальной цистэктомии.

В настоящее время мы наблюдаем настоящий бум изучения сигнальных регуляторов клеточного цикла, ангиогенеза, программируемой гибели клеток, сигнальных белков и гормонов, обладающих потенциальным влиянием на опухолевый рост, прогрессию и метастазирование.

1.3.1 Тканевые прогностические маркеры прогрессии мышечно-неинвазивного РМП

Маркер p53, продукт экспрессии гена TP53, наиболее распространенного гена-онкосупрессора, мутации которого наблюдаются во всех видах злокачественных новообразований человека. Определение мутаций гена и его продукта ассоциировано с признаками опухолевой агрессивности и коррелирует с неблагоприятным прогнозом развития заболевания [26, 53-57]. Кроме того, в случае с рассматриваемым мышечно-неинвазивным РМП, мутантный p53 тип опухоли ассоциирован с наиболее агрессивной T1 формой опухоли 3 грейда.

Два крупных проведенных мета-анализа, суммировавших роль p53 при мышечно-неинвазивном РМП, показали, что гиперэкспрессия маркера может быть фактором предсказания прогрессии у пациентов с T1 карциномой высокого грейда, но не обладает способностью прогнозировать ответ на внутривезикулярное введение БЦЖ [58, 59]. Однако, неоднородность дизайна исследований, включенных в мета-анализ, наряду с ограничениями метода иммуногистохимии, используемого для определения экспрессии p53 во всех исследованиях, существенно ограничивают достоверность сделанных выводов [58].

Взаимоотношение между изменением экспрессии опухолевого супрессора ретинобластомы (Rb) и онкологическими исходами РМП имеют слабую доказательную базу ввиду того, что большинство исследований, проводимых для выявления биологической роли фактора в прогрессии и рецидивировании пузырного рака, не установили закономерностей [60]. Однако, совсем недавно было показано, что маркер Rb можно использовать для прогнозирования

прогрессии и рецидивирования РМП, но лишь в составе панели других маркеров, включающих p53 и/или p27 [26, 54].

Прогностическая роль прогрессии и рецидивирования мышечно-неинвазивного РМП была установлена для регулятора программируемой гибели клеток (ингибитор апоптоза) сурвивина [61, 62]. В более масштабном исследовании, Fristrup и соавторы анализировали экспрессию сурвивина у 283 пациентов с мышечно-неинвазивным РМП у выявили сильную взаимосвязь между маркером и прогрессией, рецидивированием опухоли и общей выживаемостью пациентов [63].

Совсем недавно были опубликованы результаты мета-анализа 14 исследований, продемонстрировавшего статистически достоверную ассоциацию между экспрессией сурвивина и рецидивированием, опухолеспецифической и общей выживаемостью пациентов с мышечно-неинвазивным РМП [64]. Однако, проспективные большие исследования не смогли подтвердить этих находок. Другие маркеры-регуляторы апоптоза, такие как livin, Vcl-2, Вах также были изучены, однако всего в нескольких небольших исследованиях [65, 66].

Наконец, у биомаркеров клеточной сигнализации, таких как ErbB, семейство рецепторов фактора роста фибробластов (FGFR), факторов ангиогенеза (VEGF, MVD, HIF-1a), маркеров инвазии опухолевых клеток (Е-кадгерин, N-кадгерин) также показана способность влиять на исходы мышечно-неинвазивного уротелиального рака мочевого пузыря [67, 68].

Так, основываясь на современных данных отечественной и зарубежной литературы, может создаться впечатление, что ни один из перечисленных биологических маркеров не может быть использован как единственный критерий в повседневной клинической практике для прогнозирования исходов мышечно-неинвазивного РМП с высокой точностью, достаточной для изменения привычной модели принятия диагностического решения. В то же время, очевидно, что панель биологических маркеров может существенным образом улучшить прогнозирование течения и исходов заболевания при сравнении только лишь с оценкой клинических признаков болезни [69, 70]. Вместе с тем, даже в

таких условиях финальные результаты довольно противоречивы, поэтому сейчас, вследствие низкого уровня доказательности, спорности результатов проводимых исследований, рутинное применение тканевых биологических маркеров при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря также не рекомендовано вследствие того, что это не влияет на процедуру принятия итогового клинико-диагностического решения.

1.3.2 Тканевые биологические маркеры при инвазивном РМП

Развитие мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря включает повреждение многих гомеостатических систем с глубокой дисрегуляцией сложных сигнальных механизмов. Следовательно, указанные нарушения могут в определенной степени выступать как прогностические маркеры исходов заболевания, предикторы ответа на терапию и как мишени для терапевтического воздействия.

Несколько ретроспективных исследований показали, что внутриядерное накопление p53 может рассматриваться как фактор прогноза мышечно-инвазивного пузырного рака, особенно у пациентов, которым применялась радикальная цистэктомия как хирургическое лечебное воздействие [71, 72]. Однако, и поныне клиническое использование p53 как прогностического маркера при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря не применяется, несмотря на почти 100 исследований, проведенных по данному вопросу. Так, последнее клиническое исследование 3 фазы, спланированное для оценки применимости стратификации пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря, не выходящим за пределы органа, для адъювантной терапии цисплатином на основе оценки экспрессии p53 не смогло достичь необходимого уровня доказательности [73].

Инактивирующие мутации Rb наряду с другими протеинами – регуляторами клеточного цикла, как показали исследования, обладают прогностической значимостью при мышечно-инвазивном РМП [74]. Комплексная

иммуногистохимическая оценка уровня экспрессии p53, p21, Rb, циклина E1 и p27 показала, что указанная панель биомаркеров способна достичь прогностической значимости у пациентов с уротелиальным раком мочевого пузыря на фоне радикальной цистэктомии, превышающей предсказательный потенциал каждого маркера в отдельности, и улучшить стратификацию риска до значимого статистического уровня [75-77].

Подобно мышечно-неинвазивному раку при мышечно-инвазивной уротелиальной карциноме регуляторы апоптоза, такие как сурвивин и представители семейства Bcl-2 играют определенную роль в прогнозировании исходов заболевания [27]. Было установлено, что доля препаратов с гиперэкспрессией сурвивина прогрессивно увеличивается от мышечно-неинвазивного к инвазивному раку мочевого пузыря и далее – к тканям метастаза в лимфатические узлы [61]. В большом международном многоцентровом валидационном исследовании определение экспрессии сурвивина значимо увеличивало точность стандартных клинико-патологических признаков, учитываемых при оценке вероятности рецидива опухоли и опухолеспецифической выживаемости в подгруппе пациентов с pT1-3 N0M0 стадией заболевания [78].

Биологические маркеры ангиогенеза – Ki-67, VEGF, и плотность микрососудов ассоциированы с более высокой патологической стадией, лимфоваскулярной инвазией, метастазами в лимфатические узлы, рецидивом опухоли и опухолеспецифической выживаемостью [79-82].

Кроме перечисленных выше биологических маркеров, определяемых в тканях, в последние годы изучается прогностическая способность генетического и транскриптомного профилирования тканей опухоли у пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря [83]. Сравнительная характеристика геномного ландшафта пузырного рака в рамках проекта The Cancer Genome Atlas Research Network, привела к идентификации четырех кластеров экспрессии для мышечно-инвазивного рака с высокой степенью злокачественности [84]. Опухоли 1 кластера имеют сосочковую морфологию с повышением экспрессии *FGFR3* и

накоплением мутаций соответствующего гена, что предполагает возможный ответ на назначение ингибиторов *FGFR3* или регулируемых им биологических мишеней. Опухоли этого кластера также характеризуются снижением экспрессии микроРНК-99а и 100, которые, в свою очередь, ингибируют экспрессию *FGFR3* [85]. Причем, следует подчеркнуть растущую прогностическую роль микро РНК (рисунок 1).

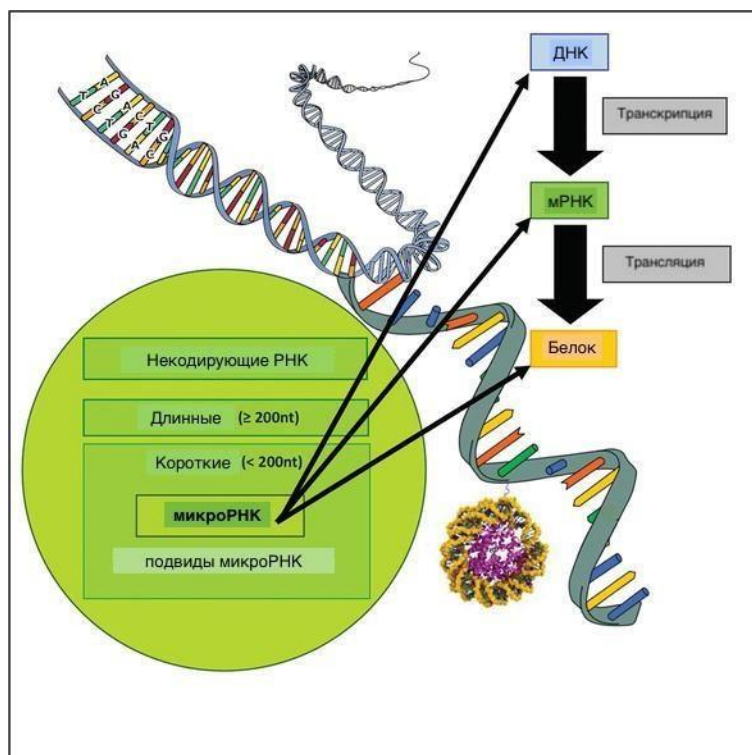


Рисунок 1 – Природа и биологическая роль микроРНК по [111]

Опухоли кластеров 1 и 2 обладают очень схожей молекулярной характеристикой с люминальным раком молочной железы типа А и также экспрессируют факторы протоковой дифференцировки ткани молочной железы – GATA3 и FOXA1. Эти опухоли также накапливают высокие концентрации уроплакина, Е-кадгерина и представителей семейства микроРНК-200. Повышенная экспрессия V2 субъединиц бета-эстрогеновых рецепторов и бета-эстрогеновых рецепторов этими опухолями также свидетельствует о возможной эффективности средств гормональной терапии.

Профиль экспрессии генов опухолей 3 кластера (так называемые базальноподобные или плоскоклеточные) подобны по своей молекулярной характеристике с базальноподобным раком молочной железы и плоскоклеточными раками головы и шеи, легких, и характеризуются повышенной экспрессией эпителиальной линии генов. Описанные находки предполагают наличие вполне определенных молекулярных подтипов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря, которые могут служить как надежные маркеры прогноза течения заболевания [86].

1.3.3 Биологические маркеры РМП, определяемые в крови

Использование биологических маркеров, определяемых в периферической крови в онкологии вообще и уроонкологии в частности, обладает рядом несомненных преимуществ по сравнению с тканевыми маркерами: во-первых, относительная легкость биологического процессинга, минимальная инвазивность забора биологического материала и, что немаловажно, большая гомогенность образцов. Забор образцов при этом осуществляется в процессе так называемой жидкостной биопсии (рисунок 2). Однако, клиническая применимость и ценность интерпретации подобных биологических маркеров при раке мочевого пузыря остается сомнительной и требует проведения больших, многоцентровых контролируемых исследований.

Как мы уже неоднократно упоминали на страницах настоящего обзора, биологические маркеры, ассоциированные с процессами клеточной пролиферации имеют важнейшее значение в клинической онкологии. Так, протеины, связывающие инсулинозависимый фактор роста (IGFBPs), играют центральную роль в регуляции роста клетки, ее пролиферации и трансформации. IGFBP-3 – это один из представителей семейства, имеющий собственный проапоптотический эффект. Низкий уровень маркера в плазме крови в предоперационном периоде у пациентов, которым показана радикальная цистэктомия, свидетельствует о вовлеченности в патологический процесс

лимфатических узлов, а также обладает прогностической способностью в отношении повышенного риска рецидива заболевания и роста опухолеспецифической смертности [87].

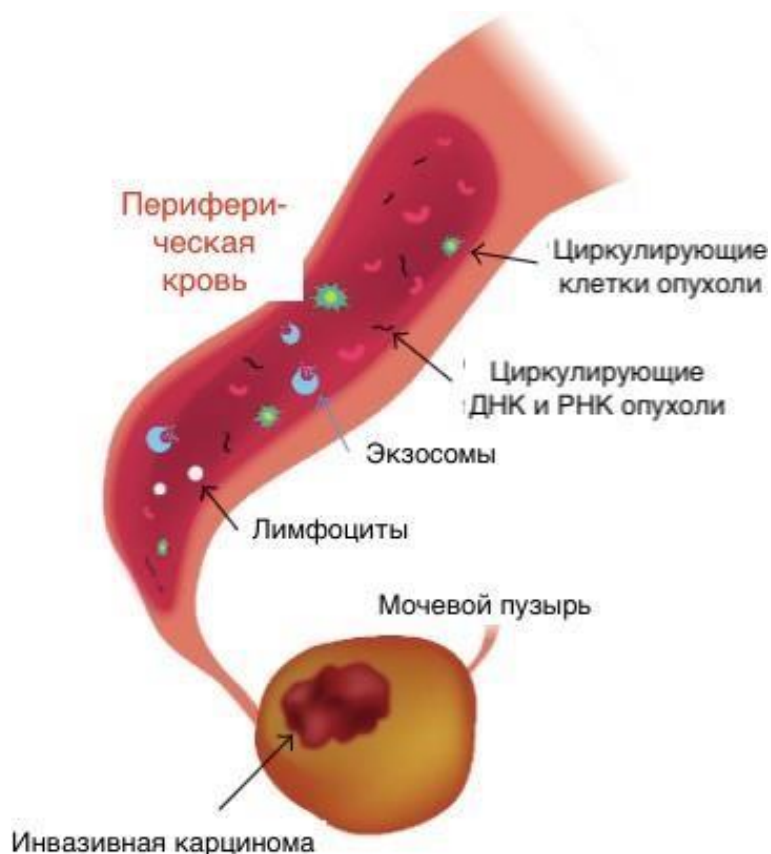


Рисунок 2 – Схема жидкостной биопсии при раке мочевого пузыря по [112]

Подобно описанному выше, доказано, что повышенный уровень протеина трансформирующего фактора роста – бета 1 (TGF- β 1) значимо ассоциирован с вовлечением в опухолевый процесс лимфоваскулярного аппарата, наличием метастазов в лимфатические узлы и отдаленные метастазы, повышенным риском рецидива заболевания и роста опухолеспецифической смертности [88, 89].

Биологические маркеры воспаления и иммунной системы, такие как интерлейкин-6 и С-реактивный белок (является наиболее изученным плазменным воспалительным маркером при пузырном раке) имеют прямую зависимость с неблагоприятными исходами и снижением выживаемости пациентов как с мышечно-неинвазивным, так и с инвазивными формами РМП [90-92].

Повышенный уровень фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) также значимо ассоциирован с вовлечением в опухолевый процесс лимфоваскулярного аппарата, наличием метастазов, высокими стадией развития опухоли и уровнем ее злокачественности, повышенным риском рецидива заболевания и роста опухолеспецифической смертности [93].

Присутствие циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови может рассматриваться как ранний признак метастатической прогрессии рака мочевого пузыря. У 55 пациентов с мышечно-инвазивной формой заболевания, перенесших радикальную цистэктомию, появление циркулирующих опухолевых клеток было ассоциировано с выживаемостью [94]. Исследование показало, что пациенты с одним или несколькими эпизодами положительной регистрации циркулирующих опухолевых клеток в крови имели более короткую безрецидивную и опухолеспецифическую выживаемость [94]. Подобные же закономерности были установлены и на большей когорте – 100 пациентах с неметастатическим пузырьным раком, перенесших радикальную экстирпацию мочевого пузыря [95]. При этом, несмотря на столь обнадеживающие результаты, как уже неоднократно упоминалось ни плазменные, ни тканевые маркеры не рассматриваются в настоящее время в качестве строгих прогностических маркеров при принятии диагностических и терапевтических решений у пациентов с мышечно-неинвазивным и мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря.

1.4 Маркеры прогноза и ответа на системное лечение рака мочевого пузыря

Лекарственная терапия при раке мочевого пузыря может осуществляться как местно – внутривезикулярно (обычно при мышечно-неинвазивной форме заболевания), так и системно (при мышечно-инвазивном раке и метастатических формах онкологической пузырьной патологии). Прогнозирование ответа на местную или системную химиотерапию может быть очень полезным и значимым, с точки зрения выбора способа лечения, времени и продолжительности введения химиотерапевтических лекарственных средств.

Как хорошо известно, одним из отличительных признаков рака, в том числе и рака мочевого пузыря, является дизрегуляция клеточного цикла в сторону пролонгации продолжительности стимулирующей пролиферацию клеточной сигнализации, так необходимой для формирования пула злокачественных клеток и их накопления и стабилизации.

Несколько регуляторов клеточного цикла и маркеров клеточной пролиферации были изучены с позиции их предсказательной способности в отношении возможного ответа на химиотерапию. Среди них – циклин D1, CCND1 и Ki-67. Вторым отличительным признаком раковых клеток является способность подавлять или избегать программируемой гибели – апоптоза – процесса, контролируемого каспазами. Каспазы, в свою очередь, регулируются несколькими молекулярными ансамблями, участвующими в детекции повреждения ДНК и митохондриального аппарата, включая p53 и Bcl-2.

В предыдущих разделах настоящего обзора мы уже излагали результаты изучения p53 как маркера прогноза течения РМП, однако не упомянули о том, что указанная молекула также широко изучалась как маркер ответа на химиотерапию пациентов с пузырным раком. Тем не менее, несмотря на многообещающие результаты ретроспективных исследований, рандомизированные контролируемые проспективные исследования не подтвердили возможную прогностическую роль p53 как фактора предикции ответа на консервативное лечение рака мочевого пузыря [73, 96].

Многие химиотерапевтические лекарственные средства в механизме своего действия имеют повреждение ДНК, в результате которого опухолевая клетка теряет возможность к делению. Опухолевые клетки, в которых наряду с повреждением наследственного аппарата также наблюдается дефицит механизмов и систем восстановления целостности ДНК представляются наиболее чувствительными к повреждающему действию цитотоксических лекарственных средств.

Среди внутриклеточных молекулярных структур, участвующих в распознавании повреждения ДНК и последующем восстановлении целостности

макромолекул, при раке мочевого пузыря наибольшую роль играют BRCA-1, BRCA-2, RAD51, PARP1, ERCC1, ERCC2, ATM, RB1 и FANCC. В исследовании, проводимом Plimack и соавт., была показана связь между ответом на неoadъювантную химиотерапию перед радикальной цистэктомией у пациентов с раком мочевого пузыря (стадия T1 и ниже) и нарушениями регуляции ATM, RB1 и FANCC [97]. А при проведении валидационного исследования роли ERCC1 и ERCC2, мутации были установлены у 80% пациентов с T1 мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря ко времени проведения радикальной цистэктомии после проведенной до этого неoadъювантной химиотерапией [98, 99].

На протяжении десятилетий мы знаем, что митогенные сигналы, возникающие вследствие взаимодействия факторов роста с соответствующими рецепторами играют значительную роль в формировании злокачественных новообразований. Многие факторы роста и их рецепторные комплексы, при этом, функционально опосредуют свое сигнальное внутриклеточное воздействие через так называемые рецепторные тирозинкиназы. В свою очередь, рецепторные тирозинкиназы являются мишенями для ряда новых таргетных лекарственных средств – препаратов направленного действия (среди них наиболее известны лапатиниб, пазопаниб и сунитиниб). Однако, в связи с тем, что все перечисленные таргетные лекарственные средства имеют пределы химиотерапевтического действия при раке мочевого пузыря, были проведены исследования по поиску биологических маркеров, которые бы могли повысить терапевтическую эффективность таргетных препаратов и, тем самым, прогнозировать благоприятный исход химиотерапевтического лечения [100].

Наконец, экспрессия некодирующих микроРНК, полиморфизм одиночных зародышевых нуклеотидов, ДНК полиплоидия, индекс пролиферации (продолжительность S-фазы), иммунные маркеры, такие как количество лимфоцитов, тканевая и плазменная концентрация цитокинов (в частности, интерлейкина-8) уже были подробно изучены в качестве биологических предикторов эффективности химиотерапии, в том числе биологической и таргетной.

Однако, несмотря на такое интенсивное изучение, ни один из перечисленных биологических объектов не продемонстрировал достаточного уровня доказательности для того, чтобы его можно было рассматривать как предиктора эффективности ответа на консервативное лечение при раке мочевого пузыря, что обосновывает необходимость дальнейшего поиска.

1.4.1 Биологическое прогнозирование ответа на системную иммунотерапию рака мочевого пузыря

За последние годы иммунотерапевтические лекарственные средства показали беспрецедентную активность в терапии рака мочевого пузыря на фоне неэффективности цисплатин-содержащих протоколов лечения или у пациентов, которым не показано назначение цисплатин-содержащих схем химиотерапии.

Ингибирование иммунных чекпоинтов было установлено для нескольких молекул, мишенями для которых выступали рецептор программируемой гибели 1 типа (PD-1) или лиганд этого рецептора (PD-L1), а также антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4).

Однако, подавляющее большинство пациентов или не могут получить соответствующее лечение в силу чрезвычайно высокой стоимости антительных лекарственных средств, либо вследствие потенциальных нежелательных эффектов, делающих их назначение нецелесообразным или невозможным [101-108]. Таким образом, в данном случае поиск потенциальных биологических маркеров, которые бы с высокой вероятностью спрогнозировали вероятность положительного ответа на биологическую терапию, необходим.

Экспрессия корегуляторных Т-клеточных протеинов нарушается у большинства лиц, страдающих раком мочевого пузыря, и проявляется гиперэкспрессии дифференциации в раковых клетках по сравнению с неизменным уротелием, либо в ассоциации В7-Н1 и смертности после проведения радикальной цистэктомии у пациентов с инвазивной формой заболевания [109].

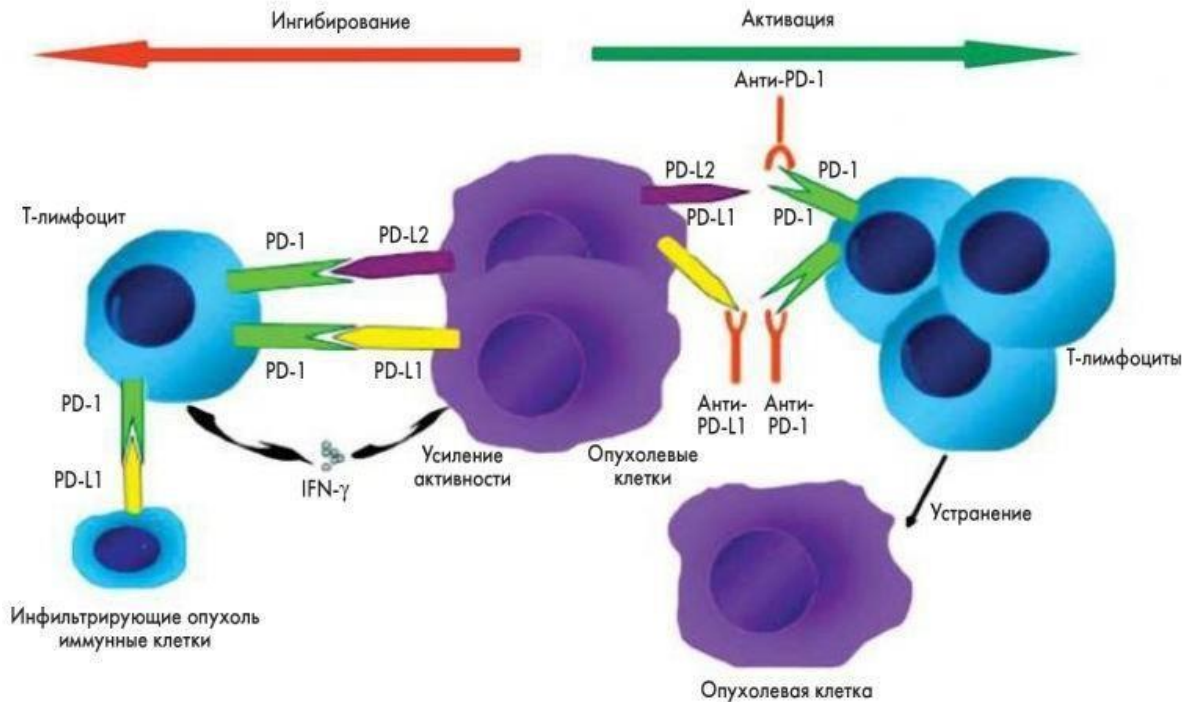


Рисунок 3 - Механизм блокирования иммунных контрольных точек ингибиторами PD-1 и PD-L1 по [168] в ред. автора

Определение уровня экспрессии PD-L1 с помощью метода иммуногистохимии (ИГХ) было изучено в ряде исследований для установления прогностической способности молекулы. Однако, поскольку определение уровня экспрессии маркера до сих пор не стандартизировано, все проведенные исследования имеют ряд ограничений в плане возможных обобщений полученных результатов.

В исследовании Imvigor 210 у пациентов с предшествующим платино-содержащим лечением была показана связь между частотой положительного ответа на атезолизумаб и уровень экспрессии PD-L1 (частота положительных ответов превышала 27% у пациентов с уровнем PD-L1-иммунопозитивности более или равной 5% против 18% ответа у лиц с низкой экспрессией маркера – более 1% и 15% ответа в среднем в исследуемой популяции) [101]. В то же время в когорте пациентов, не получавших цисплатин-содержащую схему лечения,

уровень ответа на ингибитор иммунного чекпойнта не зависел от PD-L1-статуса [104].

В другом исследовании, CheckMate 032, не было установлено зависимости между частотой положительных ответов на химиотерапию препаратами антител у пациентов с низкой экспрессией PD-L1 (менее 1 %) и с теми лицами, у которых экспрессия маркера превышала 1% (частота положительных ответов 26,2 и 24,0% соответственно) [107]. В клиническом исследовании CheckMate 275, объектом которого был ниволумаб у пациентов с метастатической формой уротелиальной карциномы после терапии препаратами платины, была установлена связь между уровнем положительного ответа и экспрессией PD-L1 (28,4; 23,8 и 16,1% пациентов позитивно отвечали на лечение с уровнем экспрессии PD-L1 5% и выше, 1% и выше и ниже 1% соответственно) [102].

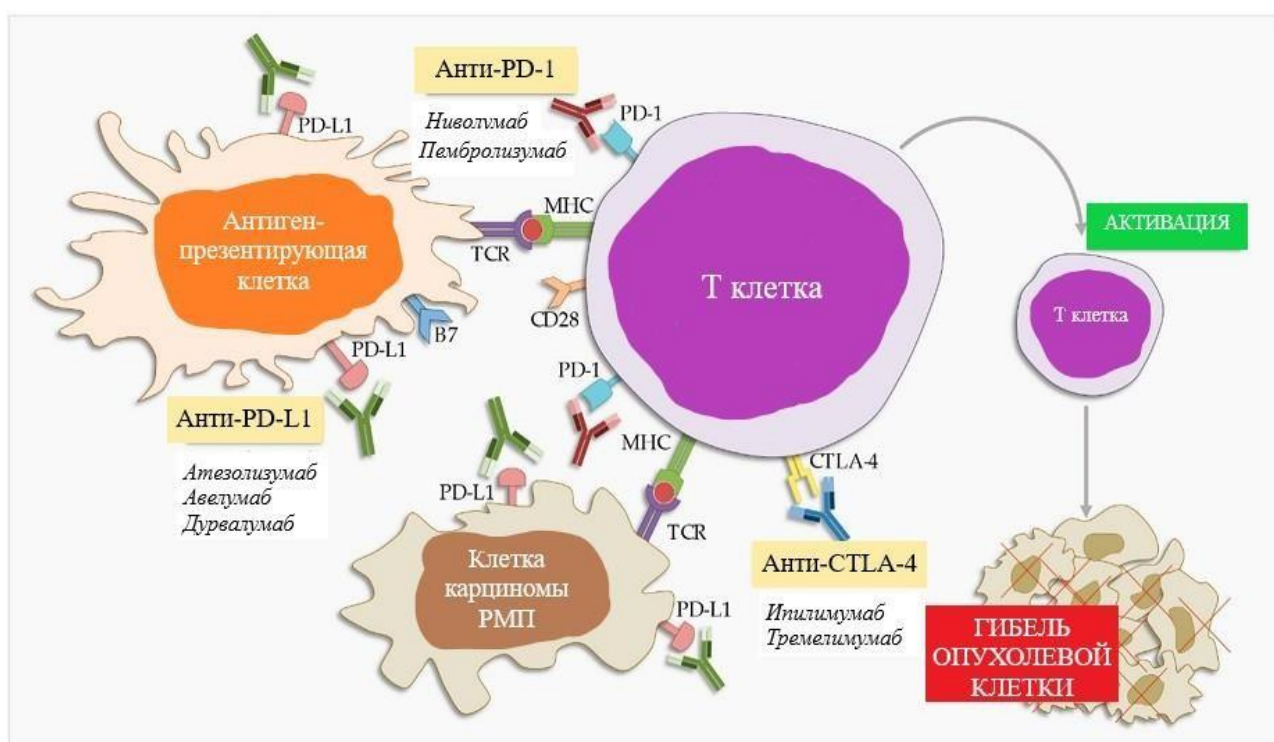


Рисунок 4 – Влияние ингибиторов контрольных точек при лечении рака мочевого пузыря. Блокаторы PD-1/PD-L1 и CTLA-4 воздействуют на ингибирующие контрольные молекулы иммунной системы, приводя к активации Т-клеток и гибели опухолевых клеток по [168] в ред. автора

Наконец, в исследовании KEYNOTE-045, не было установлено зависимости между частотой позитивного ответа на системную терапию пембролизумабом и уровнем экспрессии PD-L1 как в опухолевых клетках, так и в инфильтрирующих опухоль иммунных клетках [103].

Таким образом, пространственная характеристика микропрепарата, время регистрации экспрессии, гетерогенность выборок представляют собой существенные ограничивающие факторы для изучения PD-L1 системы [110].

Молекулярные подтипы мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря недавно были категоризированы, основываясь на результатах изучения профиля экспрессии генов. Основываясь на кластерном анализе и типировании мРНК The Cancer Genome Atlas (TCGA) выделяет 4 молекулярных типа. Анализ результатов исследования Imvigor 210 у пациентов, пролеченных цисплатином, установил независимую прогностическую значимость каждого молекулярного подтипа в отношении ответа на терапию атезолизумабом [101]. Ответ на лекарственное средство наблюдали со стороны опухолей всех молекулярных типов, однако наибольшим он был у пациентов с люминальным типом кластера II [101].

У пациентов, не получавших в анамнезе цисплатин-содержащего протокола химиотерапии, сохранялась описанная выше закономерность – наилучший ответ у пациентов с люминальным типом кластера II на фоне общего ответа на введение [104].

В исследовании CheckMate 275, введение нивалумаба вызывало наибольший терапевтический ответ у пациентов – носителей базального мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря 1 молекулярного подтипа [102].

Высокая частота мутаций может также ассоциироваться с лучшим эффектом от проведения иммунотерапии, особенно при помощи ингибиторов иммунных чекпоинтов. В частности, подобные результаты были получены в клиническом исследовании Imvigor 210 [101]. Помимо описанного, некоторой прогностической способностью могут обладать и определенные гены (например, гены интерферонов), а также изменения в иммунном микроокружении опухоли (хемокины, CD8+ Т-лимфоциты и др.) [101, 102], что требует проведения

дальнейших исследований и обуславливает несомненную актуальность выполнения настоящей работы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование было проведено в два этапа. На первом – экспериментальном этапе – была разработана биологическая модель гетеротопического ксенографта мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, в которой в качестве носителя опухоли использовались гуманизированные животные – взрослые (10-14 недельные BALB/c nu/nu мыши). На втором этапе в качестве объекта исследования выступали образцы опухоли мышечно-неинвазивного рака пациентов.

2.1 Дизайн исследования

Схема первого - экспериментального – этапа исследования представлена на рисунке 5.

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) или отделе онкоурологии НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.И. Лопаткина – филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России.

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*.



Рисунок 5 – Схема дизайна первого этапа работы – изучение влияния PD-L1 сигнального пути в МНИ РМП на сформированных ксенографтных моделях (пояснения в тексте)

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) или отделе онкоурологии НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.И. Лопаткина – филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России.

Схема этапа представлена на рисунке 6.

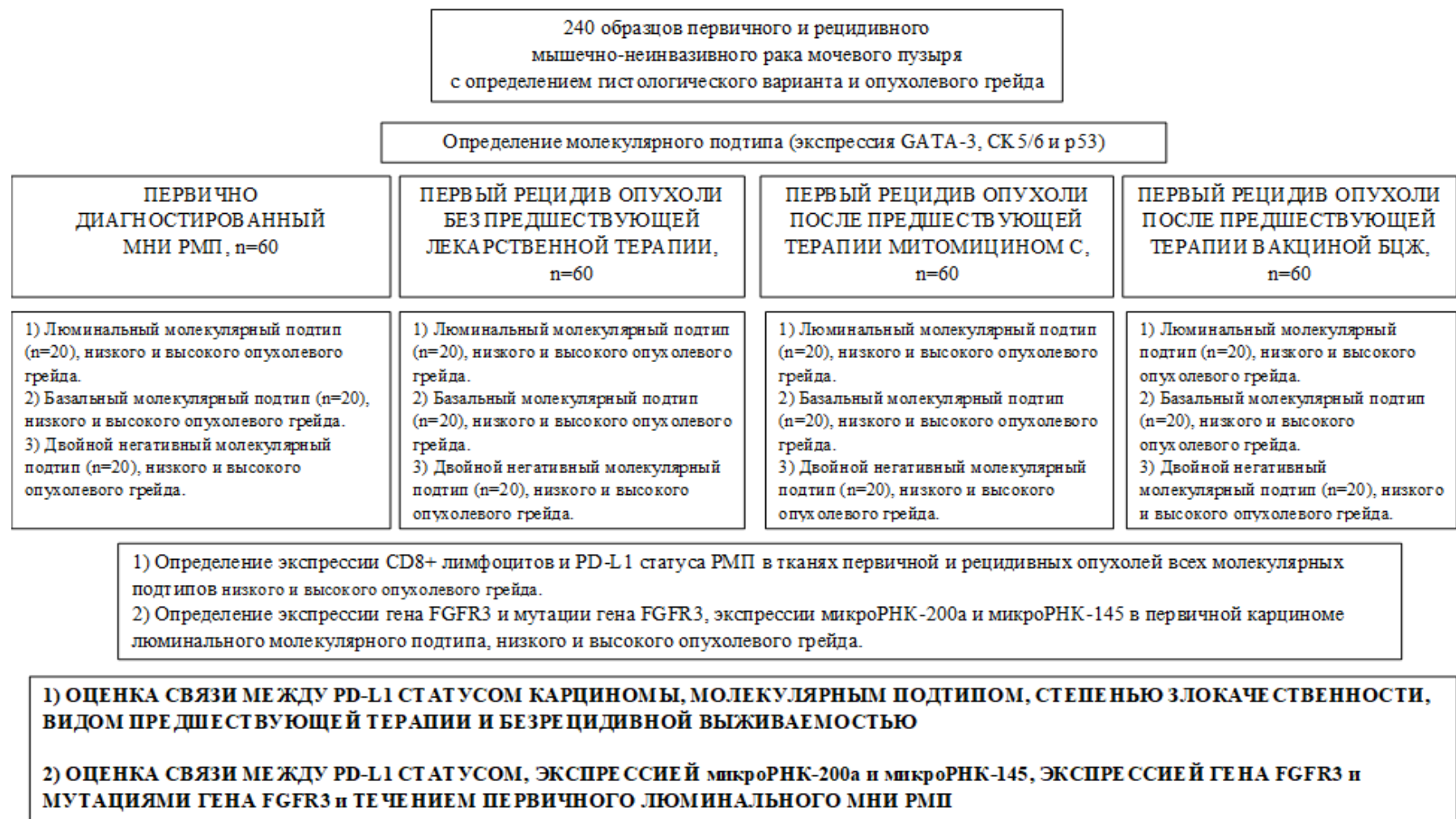


Рисунок 6 – Схема дизайна второго этапа работы – изучение влияния PD-L1 сигнального пути и других, имеющих диагностическое значение маркеров опухолевой прогрессии в МНИ РМП на биопсийном материале пациентов (пояснения в тексте)

В исследование были включены образцы опухолевой ткани пациентов, проходивших цистоскопию с биопсией с первичным диагнозом мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря за период с января 2014 по июнь 2015 года и образцы опухолей тех пациентов, у которых, при последующем динамическом наблюдении с момента проведения лечебных процедур по поводу первичной опухоли выявляли рецидив заболевания при выполнении диагностической цистоскопии с биопсией или трансуретральной резекции МП. Для каждого клинического случая определялся морфологический вариант опухоли, а также степень ее злокачественности в соответствии с действующими рекомендациями (WHO, 2004, 2016; EORTC).

После этого в первичных образцах опухоли проводили ИГХ-анализ 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. Каждая группа определенного молекулярного типа включала 20 образцов.

В каждом образце оценивали популяцию инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, экспрессию PD-L1. В зависимости от получаемой терапии первичной опухоли (внутрипузырное введение митомицина С или иммунотерапия внутрипузырной инстилляцией препарата БЦЖ) оценивали безрецидивную выживаемость пациентов.

Для молекулярных типов опухоли, для которых установлена прогностическая роль PD-L1 сигнального пути в безрецидивной выживаемости, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, ДНК и РНК-гибридизации оценили прогностическую роль экспрессии микро-РНК 200a и микроРНК 145, экспрессию *FGFR3* и мутаций горячих точек гена *FGFR3*.

2.2 Соблюдение этических и организационно-нормативных процедур при выполнении исследования

Настоящее исследование выполнено в полном соответствии с положениями Федерального закона «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21 ноября 2011 года №323-ФЗ и приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» от 1 апреля 2016 года №199-н, при полном соблюдении прав пациентов.

Все манипуляции с биологическим материалом и лабораторными животными, результаты которых представлены в настоящем исследовании были регламентированы Протоколами, рассмотренными и одобренными на заседаниях Локального этического комитета при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) от 02.06.2021.

Все пациенты, чей биопсийный материал использован для формирования ксенографтов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, а также для лабораторного изучения, дали информированное добровольное согласие на использование данных истории болезни в обезличенном виде, а также биологического материала в научных целях. Данные истории болезни, содержащие сведения о возрасте и поле пациентов, а также сведения о морфологическом варианте опухоли, характере медицинского вмешательства и последующего лечения, результатов динамического наблюдения шифровались и вносились в специальный журнал без возможности доступа к нему посторонних лиц. Все манипуляции и процедуры с лабораторными животными, сопровождавшимися причинением боли, в том числе выведение животных из эксперимента, выполнялись в условиях адекватного обезболивания (уретан 800 мг/кг внутривенно). В процессе наблюдения за динамикой опухолевого процесса у животных-носителей ксенографтных неоплазий осуществляли контроль болевого синдрома в соответствии с международными рекомендациями (более подробное описание представлено в п. 2.3 настоящей главы).

2.3 Формирование ксенографтных линий различных молекулярных подтипов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря

Биологическая экспериментальная модель для изучения патологических основ прогрессии ключевых молекулярных подтипов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря была разработана с использованием линейных гуманизированных иммунодефицитных мышей в качестве носителя ксенографтов человеческих опухолей.

2.3.1 Лабораторные животные

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 23-27⁰С и относительной влажности воздуха 55-65%. Кормление животных осуществлялось автоклавированным гранулированным кормом и стерилизованной водой. Ежедневно в клетках менялся подстил из автоклавированной стружки лиственных пород деревьев.

2.3.2 Характеристика опухолевого биологического материала

Тридцать девять образцов опухоли мочевого пузыря были получены хирургическим путем посредством проведения цистоскопии с биопсией или при проведении цистэктомии у пациентов Института урологии и репродуктивного

здоровья человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), однако для формирования ксенографтов опухолей по результатам предварительного морфологического и иммуногистохимического исследования были отобраны 6 образцов PD-L1-экспрессирующего рака, сведения о которых представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика пациентов и опухолевых образцов, используемых для формирования ксенографтов

№	Пол	Возраст	Гистологический вариант, источник опухоли	Гистологический вариант, ксенографт	Грэйд, стадия	Ксенографт
1	Мужчина	47	Уротелиальная карцинома, первичная	Уротелиальная карцинома	Грэйд 1 T1	Создан
2	Женщина	67	Железистый рак, первичная	Железистый рак	Грэйд 2 T1	Создан
3	Мужчина	61	Микрососочковая карцинома, первичная	Микрососочковая карцинома	Грэйд 2 T1	Создан
4	Мужчина	53	Уротелиальная карцинома, рецидив	Уротелиальная карцинома	Грэйд 3 T1	Создан
5	Женщина	72	Плоскоклеточный рак, рецидив	Плоскоклеточный рак	Грэйд 2 T1	Создан
6	Мужчина	59	Уротелиальная карцинома, рецидив	Уротелиальная карцинома	Грэйд 3 T1	Создан

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 клинико-морфологические данные были использованы в работе. На момент забора материала ни у одного пациента не было документально подтвержденного метастатического процесса.

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 (Dulbecco's modified minimal essential medium (Sigma-Aldrich [Merck], Германия)) без антибиотиков и бычьей сыворотки и хранилась при температуре 4°C до трансплантации. Первая часть, при этом использовалась для ИГХ исследования, а вторая часть, для изучения экспрессии микроРНК, *FGFR3* и мутаций в горячих точках гена *FGFR3*.

Перед трансплантацией фрагментов опухоли животным в каждом фрагменте определяли экспрессию p53, GATA3 и CRT5/6 для определения принадлежности образца к люминальному, базальному и двойному негативному p53-экспрессирующему молекулярным подтипам. В исследование были включены только PD-L1-экспрессирующие опухоли.

После проведения предварительного морфологического и ИГХ анализа, кусочки опухоли, хранящиеся в специальной среде, с помощью стерильных микрохирургических ножниц производства «Precision Instruments» (США) разделяли на фрагменты размером $0,7-4,0 \text{ мм}^3$, отбирали 7-9 фрагментов и при помощи трансплантационной иглы вводили животным подкожно в область бедра, как показано на рисунке 7.



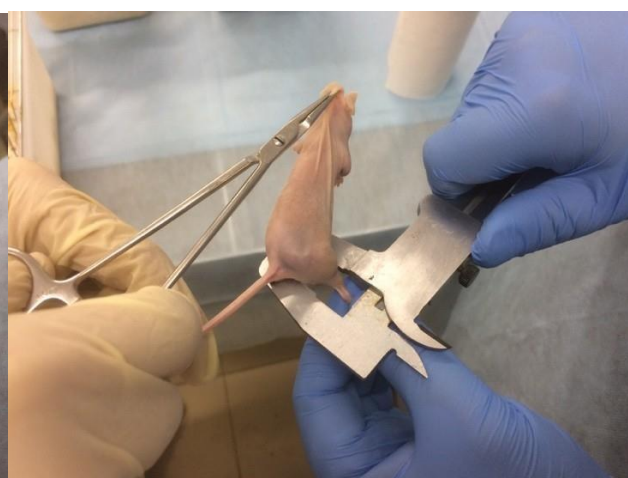
а



б



в



г



д



е

Рисунок 7 – Формирование ксенографтной модели, основные этапы: а), б) – подкожная гетеротопическая трансплантация фрагментов опухоли; в), г) – контроль роста и размера первичного опухолевого узла; д), е) – контроль болевого синдрома (внутрижелудочное введение кетопрофена)

После того, как размер пересаженной опухоли увеличивался четырехкратно, опухолевый узел извлекали и, повторяя вышеописанную процедуру, вновь пересаживали следующему животному.

После трех серий трансплантаций вновь проводили морфологическое и ИГХ исследование биоптатов опухоли. При подтверждении морфологической идентичности исходному образцу, ксенографт считали сформированным.

2.3.3 Гуманизация животных, контроль болевого синдрома

Гуманизация экспериментальных животных преследовала цели предотвращения взаимодействия опухоли с иммунным микроокружением мышцакцептора. Решение вопроса гуманизации имело принципиальное значение в силу того, что в ходе выполнения исследования изучалась роль сигнального пути в регуляции иммунных чекпоинтов. При этом экспрессия PD-L1 оценивалась как в опухолевых, так и в инфильтрирующих опухоль CD8⁺ Т-лимфоцитах.

С этой целью перед пересадкой опухолевых фрагментов животные опытных и контрольной групп перенесли однократное сублетальное рентгеновское облучение в дозе 3,5 Гр на аппарате «Рентген-ТА 150/10» производства АО «Спектр АП» (Россия), после чего каждой мышце внутрибрюшинно была введена взвесь человеческих лимфоцитов в концентрации 5×10^7 / мышь [113, 114]. Лимфоциты были получены от здоровых доноров в Институте урологии и репродуктивного здоровья человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Количество лимфоцитов в 1 мл массы был определен на поточном цитометре.

Опухолевый рост сопровождался формированием у животных болевого синдрома. Для его диагностики и контроля использовали так называемую лицевую шкалу оценки боли по [115, 116]. В соответствии с характером гримас, продолжительностью отрицательных эмоций, болевой синдром классифицировали на легкий, умеренный и тяжелый. Животным с умеренным и тяжелым болевым синдромом вводили внутривенно ежедневно дважды

в сутки кетопрофен (субстанция K1751 производства «Sigma-Aldrich», Германия) в дозе 10 мг/кг массы тела животного [117]. Животные с неконтролируемым тяжелым болевым синдромом выводились из эксперимента. Первичные опухоли и метастазы в легкие забирались, проводился их морфологический и молекулярный анализ.

2.3.4 Формирование экспериментальных групп и наблюдение за животными – носителями ксенографтной опухоли

При достижении ксенографтной опухоли размера 100-200 мм³, 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 (Durvalumab (ImfinziTM, AstraZeneca, Великобритания) 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 [118-120].

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 TouchTM 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 [121,

122]. 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.

2.4 Клинико-патологическая характеристика биопсийного материала

Биопсийный материал был получен в Институте урологии и репродуктивного здоровья человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и отделе онкоурологии НИИ урологии и интервенционной радиологии имени Н.И. Лопаткина – филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России.

2.4.1 Обоснование размера клинической выборки. Критерии включения и исключения из исследования

До настоящего времени в литературе встречаются весьма противоречивые данные об экспрессии PD-L1 в мышечно-неинвазивных опухолях мочевого пузыря. Ограничено и число исследований, в которых использовались различные диагностические приемы к определению активности изучаемого сигнального пути, различные клоны антител, а также диагностически-значимые уровни экспрессии [123-126].

Мы использовали два методологических подхода к вычислению объема выборки – метода хи-квадрат и z-тест. Ввиду того, что данные об экспрессии PD-L1 базальным, люминальным и дважды негативным мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря не известны, мы применили сведения, доступные в целом для популяции пациентов с уротелиальной карциномой. Ряд авторов в своих

исследованиях указывают на 70% уровень экспрессии PD-L1 как признак PD-L1-позитивности, другие – 5%. В своем исследовании мы воспользовались рекомендациями производителя анти-PD-L1 антител компании Roch (Швейцария). Размер выборки был определен с использованием программы G*Power 3.1.9.4 for Mac OS X 10.7 (HNU, Германия). Объем каждой группы составил не менее 20 опухолевых образцов и клинических случаев (таблица 3).

Критерии включения в исследование:

- 1) возраст постановки первичного диагноза не менее 18 лет;
- 2) первичный диагноз мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря;
- 3) доступные для исследования формалиновые и глубоко замороженные образцы опухоли пациента.

Критерии исключения:

- 1) первичная мышечно-инвазивная карцинома мочевого пузыря;
- 2) смерть пациента, наступившая до возникновения первого рецидива заболевания;
- 3) мочевая инфекция на момент проведения биопсии.

Исследуемая популяция включала 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) [127].

У трех пациентов, одного с первично-диагностированным заболеванием и двух с рецидивной опухолью, был выявлен CIS (cancer in situ) высокой степени злокачественности, морфологически представленный микропапиллярной карциномой и плоскоклеточным раком.

В целом, с половозрастной, клинической и морфологической точек зрения все группы были достаточно однородны как среди выборок с первичными опухолями, так и среди выборок с пролеченными рецидивными опухолями мочевого пузыря.

Таблица 3 – Опухолеспецифическая характеристика популяций, составивших группы исследования

Группа исследования	Стадия и грэйд опухоли, n	Пол (n)	Возраст, Mean \pm SD	Морфологический вариант опухоли
Первичная опухоль, n=20 в каждой группе				
Люминальный рак	T1, ВГ, n=8	М (3), Ж (5)	54.2 \pm 4.1	Уротелиальная карцинома, микропапиллярная карцинома
	T1, НГ, n=12	М (8), Ж (4)	57.6 \pm 3.8	
Базальный рак	T1, ВГ, n=6	М (3), Ж (3)	61.4 \pm 5.3	
	T1, НГ, n=14	М (9), Ж (5)	60.2 \pm 4.4	
Дважды-негативный рак	CIS, ВГ, n=1	М (0), Ж (1)	72	
	T1, ВГ, n=7	М (4), Ж (3)	58.3 \pm 2.9	
	T1, НГ, n=12	М (7), Ж (5)	55.9 \pm 3.7	
Всего	LG (41), ВГ (19)	М (34), Ж (26)	Медиана 57.7 \pm 3.6	
Рецидивные опухоли без предшествующего местного лечения, n=20 в группе				
Люминальный рак	T1, ВГ, n=9	М (6), Ж (3)	63.7 \pm 4.1	Уротелиальная карцинома
	T1, НГ, n=11	М (8), Ж (3)	58.7 \pm 4.6	
Базальный рак	T1, ВГ, n=7	М (4), Ж (3)	64.3 \pm 3.3	
	T1, НГ, n=13	М (8), Ж (5)	51.5 \pm 4.5	
Дважды-негативный рак	T1, ВГ, n=5	М (3), Ж (2)	53.1 \pm 5.4	
	T1, НГ, n=15	М (7), Ж (8)	54.6 \pm 2.8	
Всего	НГ (39), ВГ (21)	М (36), Ж (24)	Медиана 55.4 \pm 3.8	
Первый рецидив на фоне внутривезикулярной терапии митомизином, n=20 в группе				
Люминальный рак	T1, ВГ, n=8	М (4), Ж (4)	50.2 \pm 3.2	Уротелиальная карцинома
	T1, НГ, n=12	М (7), Ж (5)	54.2 \pm 2.7	
Базальный рак	T1, ВГ, n=6	М (2), Ж (4)	64.0 \pm 3.6	
	T1, НГ, n=14	М (11), Ж (3)	59.4 \pm 3.5	
Дважды-негативный рак	T1, ВГ, n=9	М (3), Ж (6)	55.6 \pm 4.8	
	T1, НГ, n=11	М (5), Ж (6)	54.7 \pm 3.5	
Всего	НГ (37), ВГ (23)	М (32), Ж (28)	Медиана 56.4 \pm 3.5	
Первый рецидив на фоне внутривезикулярной терапии БЦЖ, n=20 в группе				
Люминальный рак	CIS, ВГ, n=2	М (2), Ж (0)	56; 67	Уротелиальная карцинома, микропапиллярная карцинома, плоскоклеточный рак
	T1, ВГ, n=7	М (4), Ж (3)	61.1 \pm 3.2	
	T1, НГ, n=11	М (7), Ж (4)	58.9 \pm 2.6	
Базальный рак	T1, ВГ, n=3	М (2), Ж (1)	48.4 \pm 4.5	
	T1, НГ, n=17	М (9), Ж (8)	53.2 \pm 2.9	
Дважды-негативный рак	T1, ВГ, n=4	М (3), Ж (1)	55.9 \pm 3.8	
	T1, НГ, n=16	М (9), Ж (7)	57.5 \pm 3.0	
Всего	НГ (46), ВГ (14)	М (36), Ж (24)	Медиана 53.8 \pm 3.4	

Примечания: М – мужчина, Ж – женщина, НГ – низкий грэйд, ВГ – высокий грэйд

2.4.2 Характеристика лечебных процедур и программы наблюдения за лицами, включенными в исследование. Безрецидивная выживаемость

Проводимое лечение первично-диагностированного мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, а также протокол последующего наблюдения были разработаны в соответствие с такими исходными клинико-патологическими данными, как: стадия опухолевого процесса, степень злокачественности (грэйд) и степень риска в соответствие с действующими классификациями и прогностическими таблицами (WHO, 2004, 2016; EORTC) [127, 128].

Пациентам с первичным раком низкой злокачественности (низкий грэйд) после проведения трансуретральной резекции мочевого пузыря (ТУР) внутривезикулярно вводили 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 осуществляли внутривезикулярными 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.

У пациентов с первичным мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря рассчитывали показатель безрецидивной выживаемости, который определяли как

время после постановки первичного диагноза до первого документированного рецидива опухолевого процесса или смерти пациента от любой причины.

2.5 Морфологические методы исследования

В своем исследовании мы использовали как методы световой микроскопии микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, так и иммуногистохимические (ИГХ) методы окрашивания с применением международных рекомендаций по оценке степени экспрессии.

2.5.1 Классический светооптический метод исследования

Фрагменты биопсийного материала, полученные при проведении диагностической цистоскопии или трансуретральной резекции мочевого пузыря помещали в нейтральный 10%-ный формалин (забуференный). Биопсийный материал подвергался гистологической проводке, которую осуществляли в автоматическом режиме на станции «STP-120» (типа «Карусель», Германия), также в автоматическом режиме проводилась последующая парафинизация сформированных блоков, для этого использовали систему марки «ЕС350» (Германия). Микропрепараты изготавливали на ротационном микротоме марки «НМ340Е» (производитель компания «Microm Laborgerate GmbH», Германия). По 6-10 срезов (толщина каждого от 4 до 5 мкм) изготавливали из каждого парафинового блока, после чего проводили влажным способом, наклеивали полученные срезы на предметные стекла. После этого в термостате при температуре 37 °С высушивали готовые срезы (продолжительностью не менее двух суток). В дальнейшем осуществляли депарафинирование и регидратацию срезов в колонке, состоящей из следующих реагентов:

Ксилол – 7 минут, 2 смены

Абсолютный этиловый спирт – 5 мин

Этиловый спирт 96% – 5 мин

Дистиллированная вода – от 6 до 9 мин

Подобная процедура необходима для проведения окрашивания гематоксилином и эозином.

Окрашивание гематоксилином и эозином. Окрашивание проводили по методу Хеллендахеля, в соответствии с которым предварительно депарафинированные предметные стекла с препаратами опухолей мочевого пузыря на полторы-две минуты помещали в емкость с квасцовым гематоксилином Караца, после чего дважды промывали водопроводной проточной водой. Затем проводили окрашивание вторым красителем – эозином в течение полуминуты. После этого препараты двукратно промывались водой дистиллированной, обезвоживались погружением в 96% раствор этилового спирта (в течение одной мин) и просветлялись (в течение полуминуты использовался ксилол). В завершении готовые препараты накрывали покровным стеклом с канадским бальзамом.

2.5.2 Иммуногистохимический метод исследования

С помощью иммуногистохимии (ИГХ) определяли молекулярный подтип опухоли (люминальный, базальный или двойной-негативный p53-экспрессирующий), идентифицировали CD8⁺ Т-лимфоциты в опухолевой ткани, а также устанавливали экспрессию PD-L1 в опухолевой ткани.

2.5.2.1 ИГХ метод определения молекулярного типа мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, экспрессии p53, CD8⁺ Т-лимфоцитов

Иммуногистохимическое исследование проводилось на парафиновых срезах толщиной 3 мкм, расположенных на стеклах с полилизинным слоем (Leica, Германия). Исследование проводили на полностью автоматизированном иммуногистостейнере Leica Bond max (Германия), позволяющим депарафинизировать срезы, проводить инкубацию с антителами при постоянной

заданной температуре, проводить энзиматическую демаскировку антигенов, высокотемпературную демаскировку антигенов в буферах рН 6,0 и 8,8, подкрашивать препараты гематоксилином. Исследование проводилось по стандартным протоколам, рекомендованным фирмой-производителем с антителами, представленными в таблице 4.

Таблица 4 – Основные характеристики антител, использующихся при определении молекулярных подтипов РМП

Антите- ло	Клон	Источник	Фирма- производи- тель	Разведе- ние	Положитель- ный контроль
GATA3	L50-823	Мышиное/ моноклональное	Cell Marque, США	1:100	Рак молочной железы
P53	DO-7	Кроличьё/ моноклональное	Leica, Германия	RTU	Серозная карцинома яичника
CK5/6	D5/16 B4	Мышиное/ моноклональное	Dako, Дания	RTU	Кожа
CD8+	SP239	Кроличьё/ поликлональное	Abcam, Великобри- тания	RTU	Ткань миндалины человека

Для иммуногистохимических реакций ставили положительные контроли, которые выбирали в соответствии со спецификациями от фирмы производителя.

Для отнесения образца уротелиальной опухоли мочевого пузыря к базальному молекулярному или люминальному молекулярному подтипам мы использовали точки отсечения экспрессии GATA3, CK5/6 в соответствии с консенсусом [129, 130]. 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.

2.5.2.2 ИГХ метод определения экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани

Материалом для исследования послужили 360 образцов операционного и биопсийного материала мышечно-неинвазивного уротелиального рака мочевого пузыря. Все образцы ткани были зафиксированы в забуференном 10% растворе формалина в течение от 6 до 72 ч, обезвожены, обезжирены и пропитаны парафином по стандартному протоколу. Гистологическое исследование для уточнения гистологического варианта опухоли, стадии и степени злокачественности (грейд) проводили на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Все парафиновые блоки содержали достаточное количество материала для исследования экспрессии белка с использованием как позитивного, так и негативного контролей. Исследование проводилось иммуногистохимическим методом с использованием антител PD-L1 SP263 с системой детекции OptiView DAB IHC Detection Kit (Cat. No. 760-700/06396500001, США) с амплификацией сигнала (Ventana Medical Systems, Inc., США).

Из каждого образца опухоли готовили по 2 среза для исследования и для негативного контроля. При негативном контроле срез окрашивали по протоколу, аналогичному основному исследованию, однако в качестве первичных антител использовали реагент негативного контроля VENTANA Rabbit Monoclonal Negative Control Antibody (Cat. No. 790-4795/06683380001, США). В качестве позитивного контроля применяли стекла с образцами ткани миндалина или плаценты в каждом цикле постановки реакции. Для всех антител применялся автоматизированный метод иммуногистохимического исследования с использованием Ventana BenchMark ULTRA ICH stainer (Ventana Medical Systems Inc., США). Для постановки реакции с антителом SP263 (Ventana Medical Systems, Inc., США) после процесса депарафинизации и демаскировки антигенов

кроличьи моноклональные антитела PD-L1 (SP263) в рабочем разведении наносили на подготовленные срезы из блока первичной опухоли. После инкубации с первичным антителом или реагентом негативного контроля применяли систему детекции OptiView DAB IHC Detection Kit с амплификатором OptiView Amplification Kit. Последним этапом проводили докрасивание гематоксилином. Все этапы реакции проводили в автоматизированном режиме на иммуногистохимическом стейнере VENTANA BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Inc.) по протоколам, рекомендованным в инструкциях к антителам и системой внешнего контроля качества NordiQC.

На первом этапе анализа оценивалась правильность окрашивания позитивных и негативных клеточных линий и позитивного тканевого контроля (ткань миндалин и плаценты). Затем проводили оценку иммуногистохимических реакций на образцах уротелиального рака. Для каждого антитела наличие фактической иммуногистохимической реакции как в опухолевых клетках (ОК), так и в иммунных клетках (ИК) оценивали визуально (Manual Scoring), а также оценивали PD-L1 статус опухоли по пороговым значениям (cut-off), рекомендованным в настоящее время для рака мочевого пузыря: для SP263: ИК \geq 25%.

Высокоэкспрессирующий PD-L1 статус опухоли определяли при уровне экспрессии PD-L1 \geq 25% мембранами опухолевых клеток и/или \geq 25% иммунных CD8+ 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.

В соответствии с рекомендациями по оценке результатов экспрессии PD-L1 оценивалось только наличие мембранного окрашивания в опухолевых и иммунных клетках независимо от его интенсивности. Все полученные препараты анализировались визуально независимо друг от друга 2 патоморфологами и затем сканировались для создания цифрового архива

изображений. При расхождении в оценке препаратов специалисты принимали консенсусное решение.

2.6 Иммуноферментный метод определения плазменной концентрации растворимой фракции PD-L1 (sPD-L1)

Для определения растворимой фракции PD-L1 (sPD-L1) в сыворотке крови экспериментальных мышей – носителей ксенографтного рака мочевого пузыря использовали иммуноферментный сэндвич-анализ. На завершающем этапе наблюдения за животными перед их выведением из эксперимента под общим обезболиванием (хлоралоза 800 мг/кг внутривенно) из сокращающегося левого желудочка мыши забирали около 2 мл крови, помещали ее в гепаринизированные флаконы типа «Vacutainer heparin tubes» (Becton Dickinson, Германия), центрифугировали в течение 10 мин на охлаждающей центрифуге производства «SANYO» (Корея) при 600 оборотах в минуту, надосадочную жидкость переливали в отдельные флаконы и хранили при температуре -80°C до определения уровня sPD-L1.

Для количественного определения sPD-L1 использовали Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Antibody CD-274 (каталожный No. Abx111472) производства Abbeva (Великобритания). Определение проводили на автоматическом ридере StatFax 4200 (США).

2.7 Молекулярно-генетические методы исследования

С использованием молекулярно-генетических методов изучили экспрессию рецептора 3 типа фактора роста фибробластов (*FGFR3*), микроРНК-200а и 145, а также мутации горячих точек гена *FGFR3*.

2.7.1 Изоляция ДНК и РНК

После оттаивания свежзамороженные образцы опухолевой ткани гомогенизировали в 600 мкл растворе литического буфера RLT Plus (Qiagen, Германия) с 1% бета-меркаптоэтанолом с гомогенизатором TissueLyser LT (Qiagen, Германия) в специальных тубах «Lysing Matrix A» производства «MP Biomedicals» (США). Изоляцию нуклеиновых кислот проводили при помощи набора AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit производства «Qiagen» (Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Измеряли концентрации ДНК и РНК на флюориметре «Qubit 4» производства “Thermo Fisher Scientific” (США), для чего использовали диагностические наборы «Qubit dsDNA HS Assay» и «Qubit RNA BR Assay» производства “Thermo Fisher Scientific” (США).

2.7.2 Обратная транскрипция

Для каждого образца 100 нг общей РНК смешивали с 20 пм олигонуклеотидным праймером обратной транскрипции (использовали случайные декамеры для определения экспрессии *FGFR3* и *ACTB*; для определения экспрессии микроРНК-200а и 145 использовали специфические олигонуклеотидные праймеры) в 9 мкл и инкубировали при 70⁰С в течение 2 минут, после чего охлаждали на льду. Обратную транскрипцию проводили при 42⁰С в течение 30 минут с использованием набора MMLV RT производства «Евроген» (Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Реакцию останавливали путем инкубации реакционной смеси с инактивирующей обратной транскриптазой при 70⁰С в течение 10 минут. Полученную комплиментарную (кДНК) десятикратно разводили и использовали для анализа экспрессии РНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

2.7.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени

Эксперименты с ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе «DTPrime» производства «DNA technology» (Россия). Для определения экспрессии *FGFR3* и *ACTB* применяли наборы qPCRmix-NS SYBR производства «Evrogen» (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. 1,5 мкл раствора кДНК амплифицировали с 4 пм каждого ПЦР праймера в 25 мкл, используя следующий протокол:

- 1) денатурация ДНК при 95⁰С в течение 2 мин;
- 2) 45 циклов последовательных реакций денатурации ДНК при 95⁰С в течение 10 секунд, отжиг праймера при 67⁰С в течение 3 секунд, элонгация при 72⁰С в течение 18 секунд;
- 3) анализ кривой.

Для определения экспрессии *FGFR3* применяли следующие олигонуклеотиды:

FGFR3RT-F, 5'-CCCAAATGGGAGCTGTCTCG-3';

FGFR3RT-R, 5'-CATCTCAGACACCAGGTCCG-3.

Для определения экспрессии *ACTB* применяли следующие олигонуклеотиды:

b-act-for, 5'-GAGCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3';

b-act-rev; 5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'.

Для определения экспрессии микроРНК и *RNU6-1* применяли наборы qPCRmix-NS производства «Evrogen» (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. 1,5 мкл раствора кДНК амплифицировали с 4 пм каждого ПЦР праймера и 3 пм двойного меченного флюоресцентной меткой зонда в 25 мкл, используя следующий протокол:

- 1) денатурация ДНК при 94⁰С в течение 2 мин;
- 2) 50 циклов последовательных реакций денатурации ДНК при 94⁰С в течение 10 секунд, отжиг праймера и элонгация при 53⁰С в течение 20 секунд;
- 3) хранение при 4⁰С.

Для определения экспрессии микроРНК применяли следующие олигонуклеотиды:

- для микроРНК-200а: праймер обратной транскрипции *200a-RT*,

5'GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTCGACACGACACATCGTT-3';

прямой праймер *200a-Fw*, *5'-CCAGCTAACACTGTCTGGT-3'*;

обратный праймер *UR-3*, *5'-CTGAGGCTCACTGAGACCT-3'*.

- для микроРНК-145: праймер обратной транскрипции *145-RT*,

5'GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTGACACGACAGGGATTTC-3';

прямой праймер *145-FW*, *5'-CCACAGTCCAGTTTTCCCAG-3'*;

обратный праймер *UR-3*, *5'-CTGAGGCTCACTGAGACCT-3'*.

- для *U6* малой ядерной РНК (snRNA): праймер обратной транскрипции *U6-RT*,

5'-

GTCGTGTCTGAGGCTGACTGAGACCTATTCGCACCTGACACGACGGCCATGC-3';

прямой праймер *U6-Fw*, *5'-GGCCGCATACAGAGAAGATTA-3'*;

обратный праймер *U6-Rv*, *5'-CTGAGGCTGACTGAGACCT-3'*.

Мы использовали следующие меченные флюоресцентной меткой зонды для определения транскриптов:

для микроРНК-200а – *200a-Pb*, *5'-(R6G)-ATTCGCACC(T-BHQ1)CGACACGACACATCGTT-p-3'*;

для микроРНК-145: *Pb-145*, *5'-(R6G)-ATTCGCACC(T-BHQ1)GACACGACAGGGATTTC-p-3'*;

для *U6* мяРНК: *U6-Pb*, *5'-(R6G)-ATTCGCACC(T-BHQ1)GACACGACGGCCATGC-p-3'*.

2.7.4 Определение мутаций горячих точек гена *FGFR3*

Мы определяли мутации в кодонах 248 и 249 гена *FGFR3*. Для этого проводили ПЦР-амплификацию 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 (*FGFR3-7F*, 5'-*AGTGGCGGTGGTGGTGAGGGAG-3'*; *FGFR3-7R*, 5'-*ACCTTGAGCACGGTAACGTAGGGTGT-3'*) в соответствии со следующим протоколом:

- 1) денатурация ДНК при 95⁰С в течение 3 мин;
- 2) 32 цикла последовательных реакций денатурации ДНК при 94⁰С в течение 20 секунд, отжиг праймера при 70⁰С в течение 20 секунд и элонгация при 72⁰С в течение 20 секунд;
- 3) хранение при 4⁰С.

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). Применяли немодифицированные олигонуклеотидные праймеры производства «Evrogen» (Россия) и меченные флюоресцентной меткой олигонуклеотидные зонды производства «DNA-Synthesis» (Россия).

2.8 Методы статистического анализа полученных результатов

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 Сох-регрессионных моделей.

ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ PD-L1 ЭКСПРЕССИИ НА ОПУХОЛЕВУЮ ПРОГРЕССИЮ НА КСЕНОГРАФТНЫХ МОДЕЛЯХ УРОТЕЛИАЛЬНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Исследования биологической природы уротелиального рака мочевого пузыря идентифицировали определенные молекулярные и генетические маркеры, связанные с опухолевой прогрессией, метастазированием и ответом на современные химиотерапевтические протоколы. При этом несколько научных групп использовали полногеномный профиль для установления наличия базального, люминального и дважды негативного РМП, с различной экспрессией p53 [131]. Три молекулярных подтипа обладают различным клиническим течением, по-разному отвечают на терапию. Так, установлено, что нелеченный базальный вариант неинвазивного РМП более агрессивен по сравнению с люминальным вариантом, ему присуща меньшая выживаемость пациентов. В то же время этот подтип более восприимчив к химиотерапевтическим лекарственным средствам и демонстрирует больший успех от терапевтических вмешательств, нежели люминальный подтип [132].

Лиганд 1 типа программируемой клеточной гибели (PD-L1), как известно, является представителем семейства B7 костимуляторных молекул, по своей природе – поверхностный мембранный гликопротеин, стимулирующий апоптоз путем связывания с соответствующим рецептором на поверхности клетки Т- или В-лимфоцита, таким образом, ингибируя естественный иммунный ответ, в том числе на опухолевые антигены [133-135].

В силу вышесказанного в настоящее время существует острая необходимость создания соответствующих реальным клиническим обстоятельствам доклинической модели, на которой можно было бы досконально изучить как патологоанатомические аспекты опухолевого процесса в зависимости от молекулярного варианта, так и обосновать эффективность и безопасность новых перспективных терапевтических подходов в борьбе с болезнью. В частности, несколько моделей ортотопических и гетеротопических

ксенографтных опухолей мочевого пузыря были разработаны и подробно изучены и валидированы [113, 114, 136].

В качестве биологических объектов – носителей опухоли предлагались иммунодефицитные животные – BALB/c или SCID-beige мыши, позволяющие исключить влияние иммунной системы хозяина на течение опухолевого процесса человеческой неоплазии [114, 136]. Однако, ни одна из описанных моделей не учитывала PD-1/PD-L1-экспрессирующий статус. Вместе с тем, поскольку механизм избегания собственной клеточной иммунной реакции предполагает участие Т-лимфоцитов человека в реализации патологического процесса, разработка ксенографтной модели предьявляет дополнительное условие к гуманизации животных, то есть наделения животного – акцептора опухоли – свойствами человеческого организма – хозяина [137, 138]. В нашей работе мы использовали метод гуманизации, описанный в фундаментальной работе Gong и соавт., которые воспроизводили опухоль мочевого пузыря с помощью злокачественных клеток линии ВU-87 [134].

В соответствие с ранее описанными подходами мы сформировали свою модель человеческой ксенографтной мышечно-неинвазивной уротелиальной PD-1/PD-L1-экспрессирующей карциномы мочевого пузыря основных молекулярных типов для выявления роли PD-L1 сигнального пути в динамике опухолевого процесса, метастазировании опухоли, а также выживаемости животных – носителей ксенографта в зависимости от экспрессии PD-L1.

3.1 Влияние степени активности PD-L1 сигнального пути на выживаемость животных – носителей ксенографтной опухоли мочевого пузыря

Шесть линий ксенографтов – первичных и рецидивных опухолей основных молекулярных подтипов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря были успешно сформированы. Все исходные опухолевые фрагменты, полученные от пациентов, экспрессировали PD-L1 (рисунки 8 и 9). Аналогичным был уровень экспрессии и гетеротопических ксенографтов.

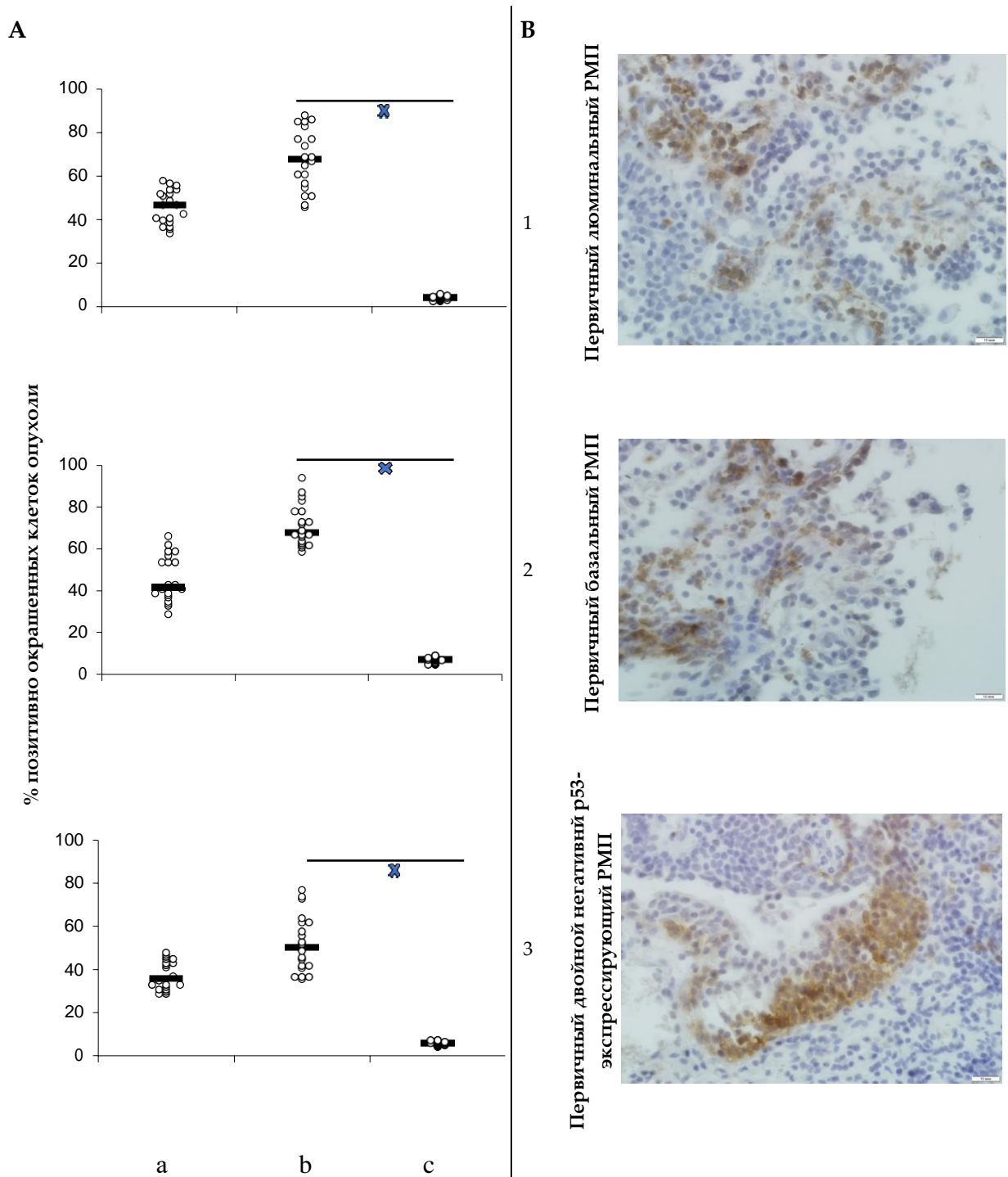


Рисунок 8 – Экспрессия PD-L1 первичными опухолями мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря: А) Доля позитивно окрашенных мембран клеток первичных опухолей в зависимости от применения антагониста PD-L1 выражена точечной диаграммой со значением медианы для опухоли, используемой для трансплантации (а) n=20, опухоли без воздействия ингибитора (б) n=10; опухоли на фоне ингибитора (с) n=10; Б) Положительное анти-PD-L1 окрашивание, ИГХ, x400. ^x p<0,05 – критерий t для независимых выборок

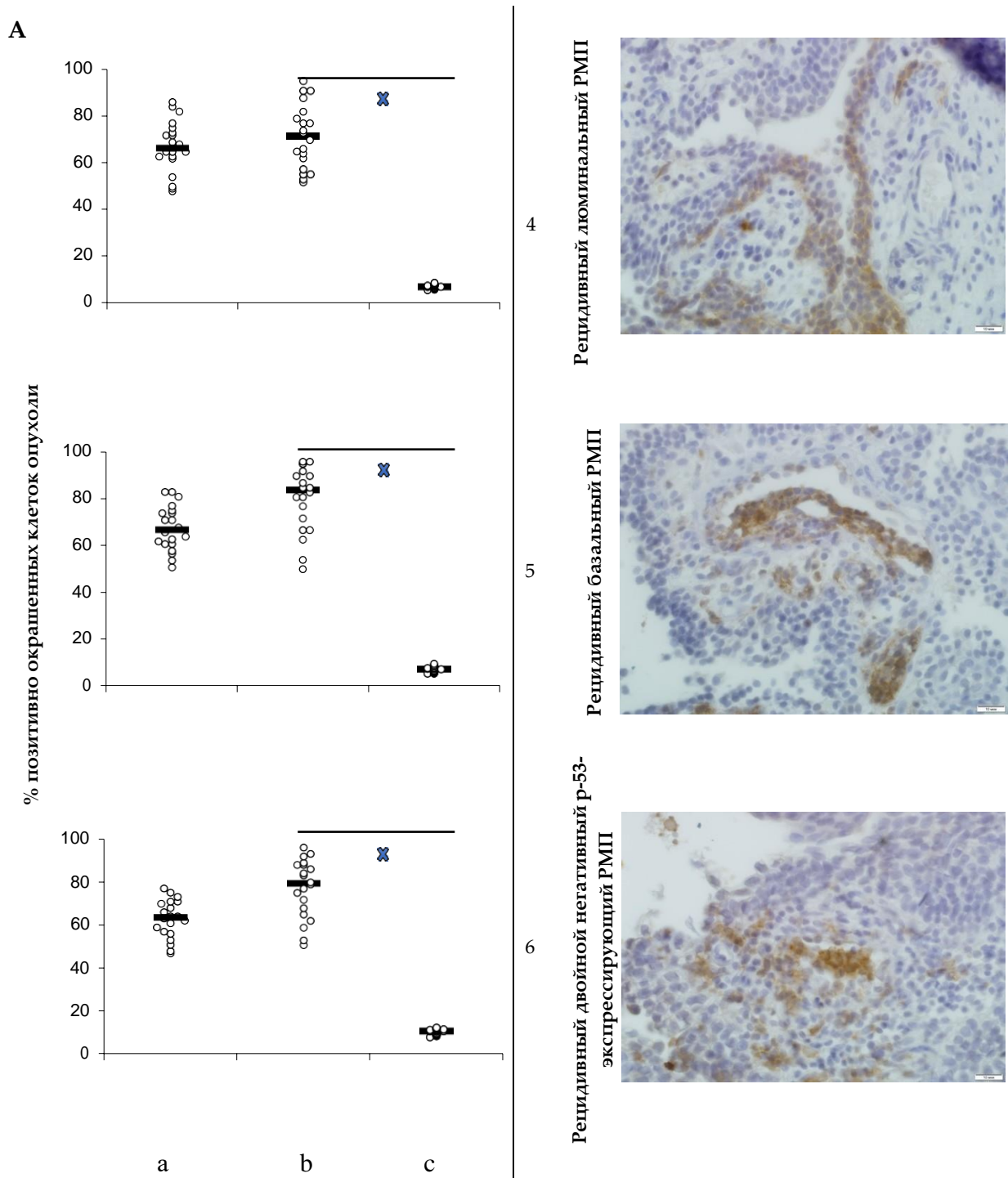


Рисунок 9 – Экспрессия PD-L1 рецидивными опухолями мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря: А) Доля позитивно окрашенных клеток рецидивных опухолей в зависимости от применения антагониста PD-L1 выражена точечной диаграммой со значением медианы для опухоли, используемой для трансплантации (а) $n=20$, опухоли без воздействия ингибитора (б) $n=10$; опухоли на фоне ингибитора (с) $n=10$; В) Положительное анти-PD-L1 окрашивание, ИГХ, $\times 400$. ^x $p < 0,05$ – критерий t для независимых выборок

Применение специфического ингибитора PD-L1 (моноклональные антитела к PD-L1 «Дурвалумаб» производства компании «AstraZeneca», Великобритания) статистически значимо снижало количество позитивно окрашенных клеток во всех препаратах опухолей, полученных от мышей, перенесших специфическую терапию (рисунки 8 и 9) – как первичных, так и рецидивных раков.

Выживаемость экспериментальных животных – носителей ксенографтных опухолей значительно различалась в зависимости как от молекулярного подтипа мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, так и от использования специфического ингибитора (рисунки 10 и 11).

В контрольной группе животных – носителей люминального первичного РМП экспериментальную летальность регистрировали, начиная с 38 дня после трансплантации опухоли до 53 дня со средним временем выживания $46,2 \pm 4,1$ дней. Среднее время выживаемости мышей – носителей базального молекулярного подтипа первичного мышечно-неинвазивного PD-L1-экспрессирующего уротелиального рака составляло $43,4 \pm 3,8$ дней, в то время как средняя продолжительность жизни животных – носителей двойного негативного p53-экспрессирующего молекулярного подтипа РМП не превышала $41,5 \pm 3,5$ дней.

В группах мышей, являющихся акцепторами рецидивных опухолей мочевого пузыря, опухолеспецифическая выживаемость была существенно короче: выживаемость мышей с люминальным – GATA3-позитивным – раком составила $31,5 \pm 2,4$ дней ($p=0,003$ при сравнении с первичной опухолью), с базальным – CK5/6-экспрессирующим – мышечно-неинвазивным РМП опухолеспецифическая выживаемость составляла $27,3 \pm 2,6$ дней ($p=0,005$ при сравнении с первичной опухолью).

В группе рецидивного двойного негативного p53-экспрессирующего мышечно-неинвазивного уротелиального РМП выживаемость животных равнялась $37,8 \pm 4,2$ дням, что не отличалось от группы мышей с первичными опухолями того же молекулярного подтипа.

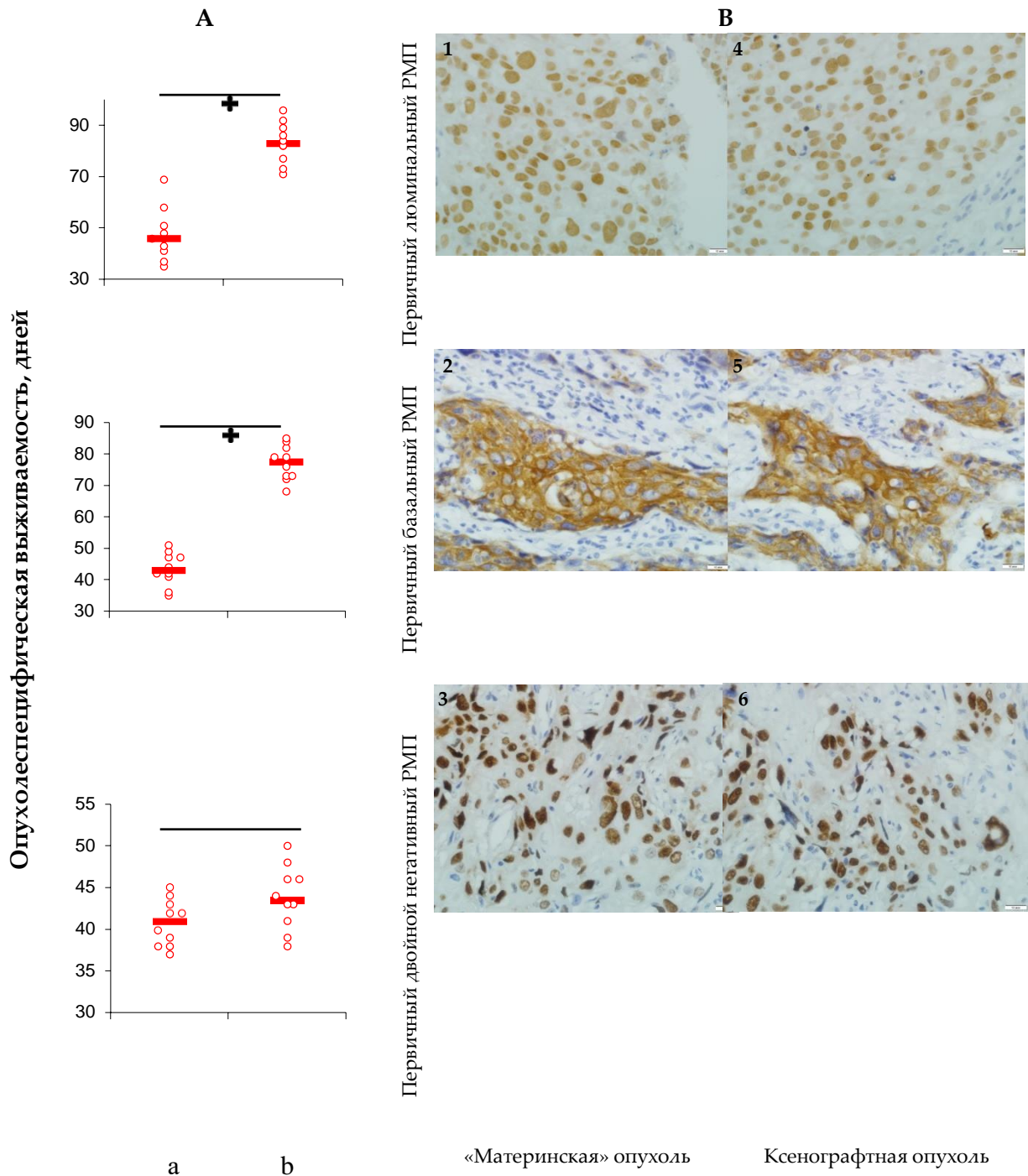


Рисунок 10 – Выживаемость мышей с первичными опухолями мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря: А) Опухолеспецифическая выживаемость животных выражена точечной диаграммой со значением медианы для опухоли без применения специфического ингибитора (а) $n=10$, опухоли на фоне воздействия ингибитора (b) $n=10$; В) Экспрессия GATA3 (1, 4), CK5/6 (2, 5) и p53 (3, 6) в материнских и ксенографтных образцах опухолей, ИГХ, $\times 400$. + $p < 0,05$ – критерий t для независимых выборок

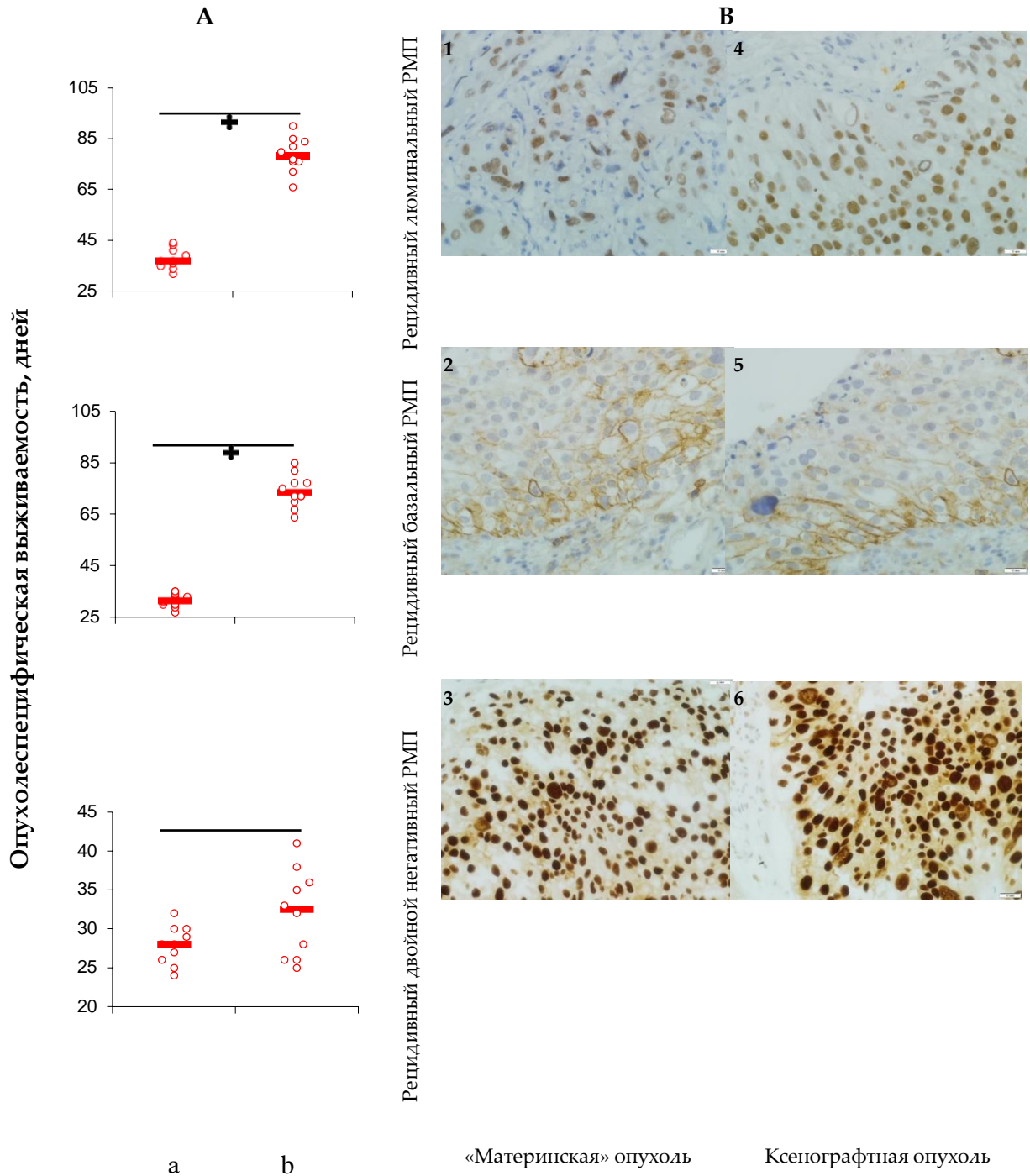


Рисунок 11 – Выживаемость мышей с рецидивными опухолями мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря: А) Опухолеспецифическая выживаемость животных выражена точечной диаграммой со значением медианы для опухоли без применения специфического ингибитора (а) $n=10$, опухоли на фоне воздействия ингибитора (b) $n=10$; В) Экспрессия GATA3 (1, 4), CK5/6 (2, 5) и p53 (3, 6) в материнских и ксенографтных образцах опухолей, ИГХ, $\times 400$. + $p < 0,05$ – критерий t для независимых выборок

Блокирование активности PD-L1 сигнального пути пролонгировало опухолеспецифическую выживаемость экспериментальных животных – носителей опухолей мочевого пузыря: до $83,0 \pm 5,7$ дней ($p=0,001$ при сравнении с соответствующей контрольной подгруппой) в случае с люминальным подтипом первичного мышечно-неинвазивного РМП; до $74,5 \pm 4,0$ дней ($p=0,001$ при сравнении с соответствующей контрольной подгруппой, не получавшей интревенции специфическим блокатором) в случае с базальным подтипом рецидивного мышечно-неинвазивного РМП; до $67,8 \pm 3,5$ дней ($p=0,03$ при сравнении с соответствующей контрольной подгруппой, не получавшей интревенции специфическим блокатором) в случае с базальным подтипом первичного мышечно-неинвазивного РМП; и до $77,8 \pm 5,3$ дней ($p=0,0021$ при сравнении с соответствующей контрольной подгруппой, не получавшей интревенции специфическим блокатором) в случае с люминальным подтипом рецидивного мышечно-неинвазивного РМП.

В то же время, нами не было установлено статистически значимых различий в продолжительности опухолеспецифической выживаемости животных – носителей как первичного, так и рецидивного двойного негативного РМП, экспрессирующего мутантный тип p53, как в контрольных подгруппах, так и в подгруппах, с заблокированным PD-L1 сигнальным механизмом.

3.2 Влияние степени активности PD-L1 сигнального пути на рост и метастазирование ксенографтной опухоли мочевого пузыря

Подавление активности PD-L1 сигнального пути сопровождалось ингибированием роста как первичной, так и рецидивной ксенографтной мышечно-неинвазивной опухоли мочевого пузыря люминального и базального молекулярного подтипов, тогда как двойной негативный p53-мутантный подтип как первичной, так и рецидивной опухоли оставался нечувствительным к подавлению роли иммунного чекпойнта, как это хорошо видно в таблице 5.

Таблица 5 – 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		Число метастазов, М ± SEM
	7 день	14 день	21 день	К	М ± SEM	
Первичный люминальный МНИ РМП	89	80	76	К	9.4 ± 0.3	24.6 ± 3.9
				Д	21.2 ± 2.8 [†]	0 ± 0 [†]
Первичный базальный МНИ РМП	71	65	63	К	10.8 ± 1.6	16.5 ± 2.4
				Д	17.3 ± 1.7 [†]	4.3 ± 1.7 [†]
Первичный двойной негативный МНИ РМП	32	17	4	К	8.3 ± 0.9	44.7 ± 4.5 [‡]
				Д	12.7 ± 2.6	16.2 ± 5.8 [†]
Рецидивный люминальный МНИ РМП	76	62	50	К	9.6 ± 0.7	56.1 ± 6.4 [‡]
				Д	15.2 ± 1.4 [†]	13.5 ± 4.3 [†]
Рецидивный базальный МНИ РМП	77	58	53	К	10.0 ± 0.5	47.8 ± 6.1 [‡]
				Д	18.3 ± 1.9 [†]	7.2 ± 3.5 [†]
Рецидивный двойной негативный МНИ РМП	47	29	17	К	10.1 ± 0.7	63.4 ± 7.5 [‡]
				Д	13.4 ± 2.1	22.8 ± 5.4 [†]

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

Индекс торможения роста опухоли (ТРО), измеряемый через 7, 14 и 21 день после последней инъекции блокатора иммунного чекпойнта, принимал значение выше 75 в группах первичного люминального рака во всех точках измерения, в группах рецидивных люминального и базального мышечно-неинвазивного РМП на 7 день после второй инъекции дурвалумаба (таблица 5).

Подавление активности PD-L1 сигнального пути приводило также к увеличению времени удвоения объема первичного опухолевого узла. Так, в случае с люминальным первичным мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря удвоение объема опухоли регистрировали через $21,2 \pm 2,8$ дней, что было статистически значимо при сравнении с аналогичным показателем в соответствующей контрольной группе, составившим $9,4 \pm 0,3$ дней ($p=0,001$). В группе базальной первичной мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномы удвоение объема опухоли регистрировали через $17,3 \pm 1,7$ дней, что было достоверно при сравнении с аналогичным показателем в соответствующей контрольной группе, составившим $10,8 \pm 1,6$ дней ($p=0,01$).

В подгруппах с ксенографтами рецидивных опухолей также были получены статистически достоверные результаты: в случае с люминальным рецидивным мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря удвоение объема опухоли регистрировали через $15,2 \pm 1,4$ дней, что было статистически значимо при сравнении с аналогичным показателем в соответствующей контрольной группе ($p=0,05$); удвоение базальной первичной мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномы регистрировали через $18,3 \pm 1,9$ дней, что было достоверно при сравнении с аналогичным показателем в соответствующей контрольной группе ($p=0,03$).

Как мы уже отмечали выше, ни в группе первичного, ни вторичного двойного негативного p53-мутантного рака мочевого пузыря не отмечали реакции опухоли на подавление активности PD-L1 сигнального пути.

Все опухоли в исследуемых группах давали метастазы в легкие (рисунок 12), однако их количество зависело как от молекулярного типа, так и от активности PD-L1 сигнального пути. В частности, ингибирование

иммунного чекпоинта приводило к полному предотвращению метастазирования люминальной первичной мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномы.



Рисунок 12 – Поверхностные метастазы мышечно-неинвазивного ксенографтного рака мочевого пузыря в легкие. Макропрепарат легких мыши BALB/c nu/nu, 21 сутки наблюдения

Наблюдала статистически достоверное снижение числа поверхностных метастазов в группах первичного базального мышечно-неинвазивного РМП до $4,3 \pm 1,7$ ($16,5 \pm 2,4$ в соответствующем контроле, $p=0,03$); первичного двойного негативного p53-экспрессирующего мышечно-неинвазивного РМП до $16,2 \pm 5,8$ ($44,7 \pm 4,5$ в соответствующем контроле, $p=0,01$).

Антиметастатический эффект угнетения экспрессии иммунного чекпоинта обнаруживался и в группах с рецидивными ксенографтными опухолями. В частности, в группе базальной рецидивной уротелиальной карциномы на фоне ингибирования PD-L1 сигнального пути регистрировали лишь $7,2 \pm 3,5$ поверхностных легочных метастазов против $47,8 \pm 6,1$ в соответствующей контрольной группе ($p=0,001$); в группе двойного негативного p53-экспрессирующего рецидивного уротелиального РМП на фоне ингибирования иммунного чекпоинта регистрировали $22,8 \pm 5,4$ поверхностных легочных метастазов против $63,4 \pm 7,5$ в соответствующей контрольной группе ($p=0,03$).

В группе люминального рецидивного МНИ РМП наблюдали снижение числе метастазов до $13,5 \pm 4,3$ против $56,1 \pm 6,4$ в контроле ($p=0,001$).

3.3 Оценка популяции CD 8+ лимфоцитов ксенографтных опухолей и плазменной концентрации растворимого PD-L1

Для понимания биологической природы влияния PD-L1 сигнального пути на опухолевую прогрессию чрезвычайно важно оценить, с одной стороны, иммунное микроокружение опухоли, а с другой, - циркулирующую в плазме растворимую фракцию лиганда. Фундаментальный смысл изучения сводится к тому, что знание доли иммунных клеток в структуре клеточной популяции опухоли, экспрессирующей PD-L1, может объяснить каким образом подавление иммунного чекпойнта активирует естественный противоопухолевый T-клеточный иммунитет в случае с конкретным молекулярным вариантом уротелиального рака. Наличие циркулирующего в крови растворимого лиганда может свидетельствовать о потенциально неблагоприятном ответе на ингибирование PD-L1 сигнального пути.

На рисунке 13 представлены микрофотографии препаратов исследуемых в работе первичных и рецидивных молекулярных вариантов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, специфически окрашенных анти-CD 8+ антителами. В таблице 6 дана количественная характеристика уровня экспрессии иммунных клеток в препаратах опухолей. Оценка проводилась на этапе выведения животных – носителей ксенографтов – из эксперимента.

Люминальный GATA3-экспрессирующий вариант как первичной, так и рецидивной ксенографтной опухоли мочевого пузыря наряду с базальным – CK5/6-экспрессирующим молекулярным подтипом мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномы содержал от 22,5 до 33,4% CD 8+-позитивных клеток (T-супрессоров) в стромальном компоненте. В то же время, популяция T-супрессоров в опухолевых образцах первичной и рецидивной двойной негативной уротелиальной карциномы мочевого пузыря не превышала 5,4% (в случае

первичной опухоли). При этом во всех наблюдениях, экспрессия CD 8+ лимфоцитов не зависела от предварительно проводимого ингибирования PD-L1 сигнального пути.

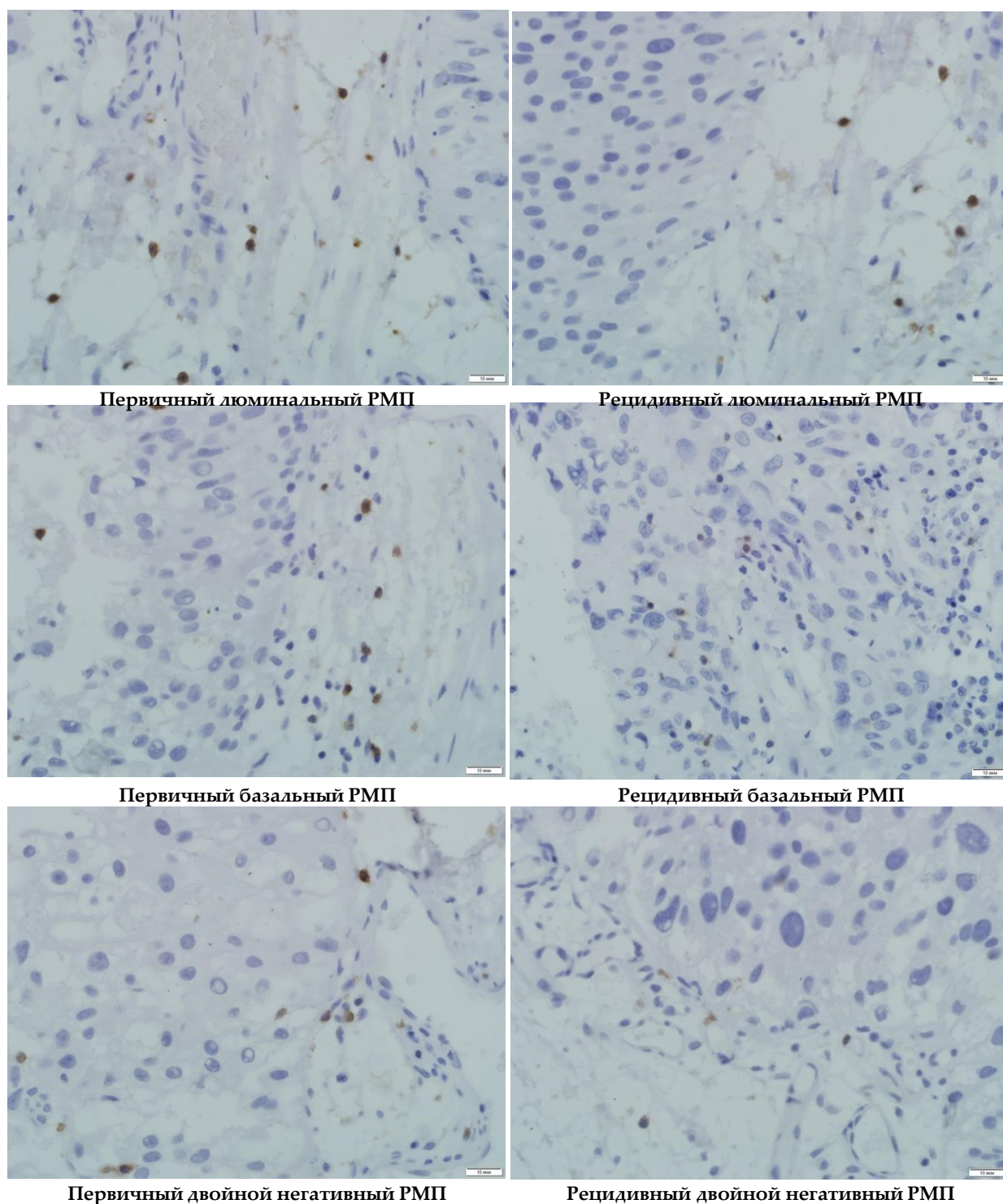


Рисунок 13 – CD8+ популяция в образцах ксенографтных опухолей мочевого пузыря на фоне ингибирования PD-L1 сигнального пути. ИГХ, x400

В отличие от экспрессии Т-супрессоров плазменная концентрация лиганда 1 типа рецептора программируемой гибели клеток широко варьировала в зависимости от предварительного введения специфического антагониста (таблица 6).

Таблица 6 – 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	$r = 0.17 P = 0.4$
	Д	33.4±4.1	2.7±0.5 [†]	$r = - 0.99 P = 0.001$
Первичный базальный МНИ РМП	К	18.5±3.2	21.8±4.3	$r = 0.15 P = 0.3$
	Д	25.7±2.9	4.1±1.3 [†]	$r = - 0.93 P = 0.001$
Первичный двойной негативный МНИ РМП	К	3.6±1.1 [‡]	31.5±3.6 [‡]	$r = - 0.99 P = 0.001$
	Д	5.4±2.3 [‡]	8.4±2.8 ^{‡†}	$r = 0.15 P = 0.3$
Рецидивный люминальный МНИ РМП	К	19.2±2.1	25.4±2.0	$r = 0.19 P = 0.3$
	Д	26.1±3.5	6.2±0.8 [†]	$r = - 0.99 P = 0.001$
Рецидивный базальный МНИ РМП	К	22.5±2.1	18.4±1.3	$r = 0.16 P = 0.4$
	Д	27.7±3.8	5.2±1.2 [†]	$r = - 0.97 P = 0.001$
Рецидивный двойной негативный МНИ РМП	К	2.1±0.9 [‡]	37.5±3.8 [‡]	$r = - 0.99 P = 0.001$
	Д	4.2±1.5 [‡]	10.3±2.1 ^{‡†}	$r = - 0.38 P = 0.06$

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

Во всех группах, в которых животным проводилось ингибирование PD-L1 сигнального пути плазменная концентрация растворимой фракции лиганда была статистически значимо ниже, чем в группах без предварительной специфической терапии. Установлена обратная корреляционная зависимость между концентрацией sPD-L1 и экспрессией CD8+ в соответствующих образцах первичного и рецидивного люминального и базального рака мочевого пузыря на фоне внешнего подавления экспрессии PD-L1, тогда как в соответствующих контрольных подгруппах корреляции не было установлено.

В группах животных – носителей первичного и рецидивного мышечно-неинвазивного двойного негативного p53-мутантного рака мочевого пузыря корреляции между экспрессией Т-супрессоров и концентрацией растворимого лиганда в плазме крови не удалось установить ни для групп с ингибированным сигнальным путем, ни у животных, не получавших соответствующей специфической терапии.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ PD-L1 НА БЕЗРЕЦИДИВНУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПАЦИЕНТОВ С МЫШЕЧНО-НЕИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВАРИАНТА ОПУХОЛИ

Как мы уже упоминали, до настоящего времени вопрос о прогностической роли PD-L1 сигнального пути при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря в зависимости от его молекулярных вариантов не изучена. В то же время, в литературе существуют довольно серьезные противоречия в целом по рассматриваемому вопросу. Так, одни исследователи заявляют о неблагоприятном прогнозе при высокой экспрессии PD-L1 опухолью [139-141], тогда как другие ученые полагают обратное [142]. В частности, Kawahara с сотрудниками (2018) полагают, что корреляция между экспрессией PD-L1 и клиническим прогнозом не совсем ясна [143]. Именно поэтому один из разделов нашего исследования мы посвятили выяснению этого важнейшего как с позиции фундаментальной науки, так и прикладной патологии вопроса: существует ли связь между экспрессией PD-L1, молекулярным подтипом опухоли, степенью ее первичной злокачественности, видом предшествующей терапии и безрецидивной выживаемостью?

4.1 Экспрессия PD-L1 в первичных и рецидивных мышечно-неинвазивных опухолях мочевого пузыря

Мы сформировали 4 больших группы пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря, отражающих индивидуальную историю формирования и развития заболевания: 1) первично диагностированная уротелиальная карцинома; 2) первый рецидив опухоли с отсутствием в анамнезе химио- и иммунотерапии; 3) первый рецидив после предшествующей терапии митомицином С; 4) первый рецидив опухоли после предшествующей терапии вакциной БЦЖ. Каждая группа включала опухоли основных молекулярных вариантов по Dadhania и соавт. [132] (рисунок14).

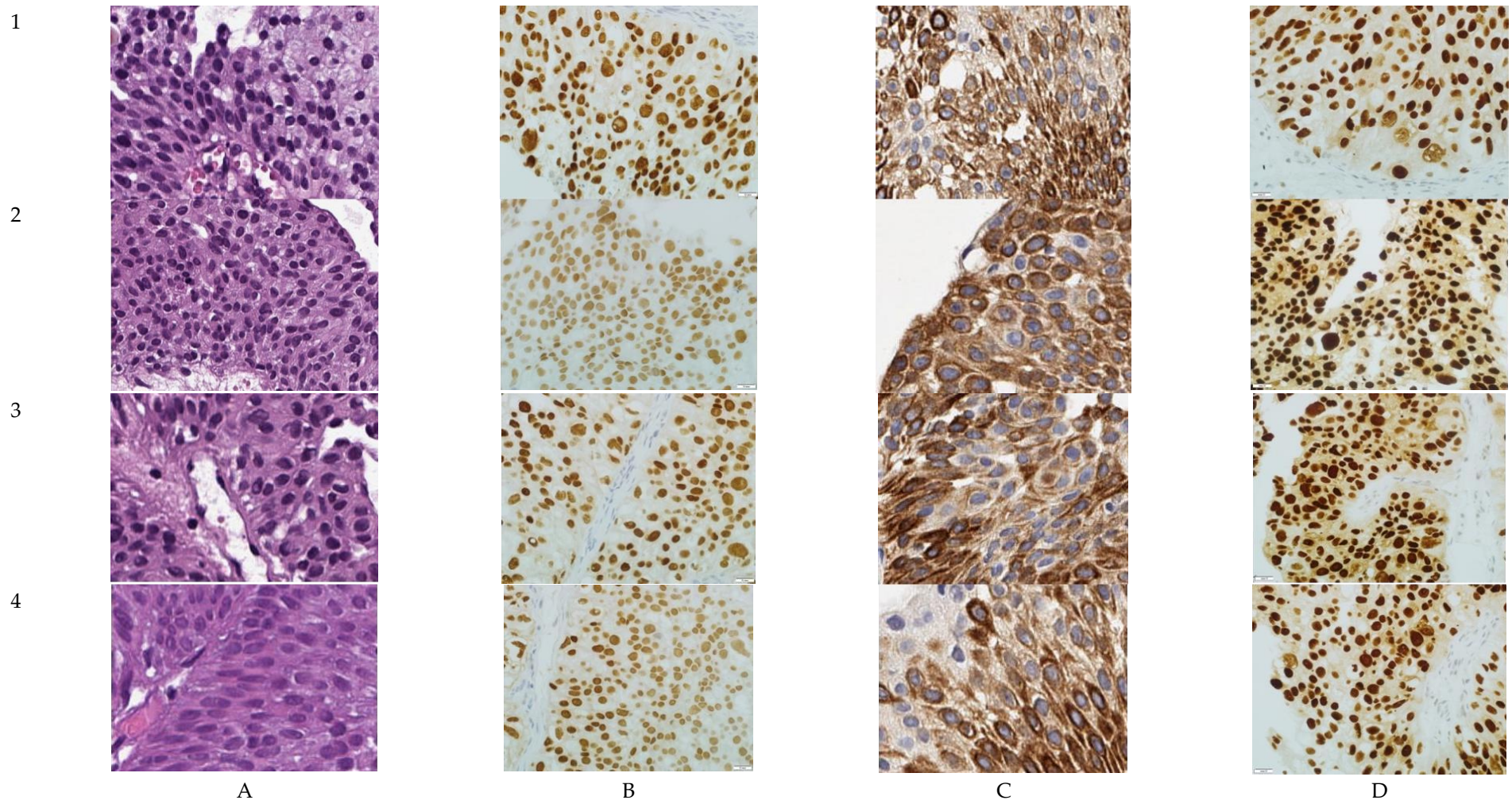


Рисунок 14 – Гистологическая и ИГХ характеристика групп: 1) Первичный МНИ РМП; 2) Первый рецидив МНИ РМП без предшествующей химио- или иммунотерапии; 3) Первый рецидив опухоли после лечения митомицином С; 4) Первый рецидив опухоли после лечения вакциной БЦЖ. А. Гематоксилин и эозин, х400. В. ИГХ с anti-GATA3 антителами, х500. С. ИГХ с anti-CK5/6 антителами, х400. D. ИГХ окрашивание с anti-p53 антителами, х400

Так, были выделены следующие подгруппы: GATA3(+)/CK5/6(-) (люминальный молекулярный вариант), GATA3(-)/CK5/6(+) (базальный молекулярный вариант) и GATA3(-)/CK5/6(-) (двойной негативный p53-экспрессирующий молекулярный вариант). В соответствии с классификация-ми ВОЗ 2004/2016, результатами гистологического исследования и таблицами риска в каждом молекулярном варианте выделяли подтипы опухоли с высоким и низким уровнем злокачественности (высокий и низкий грейд). Мы установили, что первичные опухоли по-разному экспрессировали PD-L1, что определялось как молекулярным вариантом, так и степенью злокачественности (рисунки 15 и 16). В частности, $19,6 \pm 1,3$ клеток люминальной первичной мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномы низкой злокачественности экспрессировали PD-L1, в то время как в препаратах более злокачественного подтипа того же молекулярного варианта опухоли уже $29,3 \pm 1,3$ обладали мембранной PD-L1-позитивностью ($p=0,001$ при межгрупповом сравнении). Уровень PD-L1 экспрессии первично диагностированного базального мышечно-неинвазивного пузырного рака высокого уровня злокачественности определялся на уровне $5,0 \pm 0,6\%$ и повышался до $8,4 \pm 0,6\%$ в случае с группой опухолей низкой степени злокачественности.

Двойной негативный p53-мутантный первичный рак мочевого пузыря высокого уровня злокачественности характеризовался низкой экспрессией PD-L1, не превышавшей в своем среднегрупповом значении $2,0 \pm 0,4\%$, тогда как опухоли низкого грейда не экспрессировали лиганд вовсе.

Рецидивные опухоли различались по уровню экспрессии лиганда 1 типа рецептора программируемой гибели клеток в зависимости от вида предшествующей внутривезикулярной лекарственной терапии после трансуретральной резекции первичного опухолевого узла. Люминальный и базальный варианты пузырного рака высокой степени злокачественности характеризовались высоким уровнем мембранного окрашивания на PD-L1, охватывавшего $26,7 \pm 0,7\%$ и $24,7 \pm 0,6\%$ клеток опухоли соответственно.

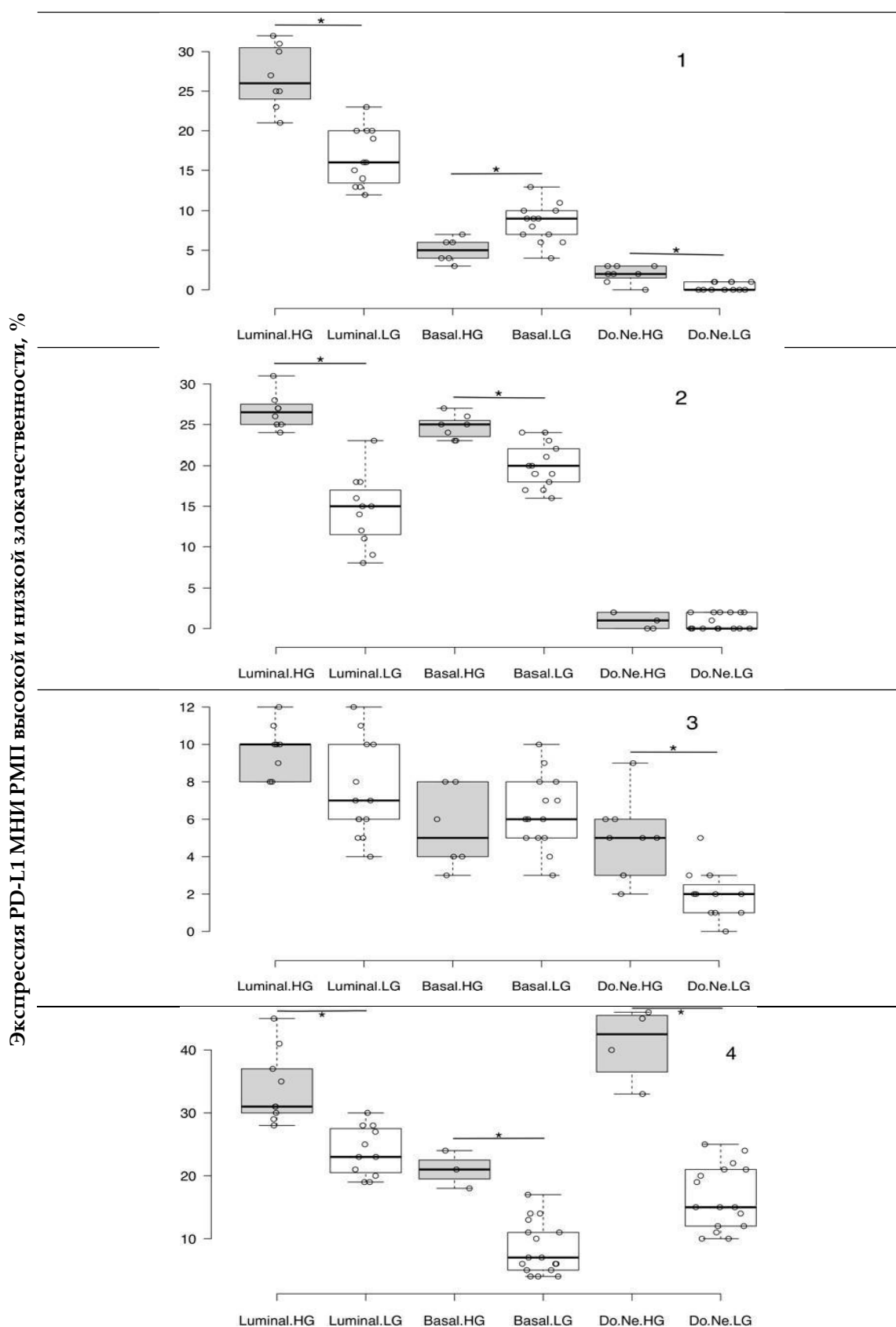


Рисунок 15 – Уровень экспрессии PD-L1 клетками МНИ РМП в зависимости от предшествующей терапии и молекулярного вида опухоли: LG – низкого, HG – высокого уровня злокачественности; Basal – базальный, Luminal – люминальный, Do.Ne. – двойной негативный; * – $p < 0,05$ (ANOVA)

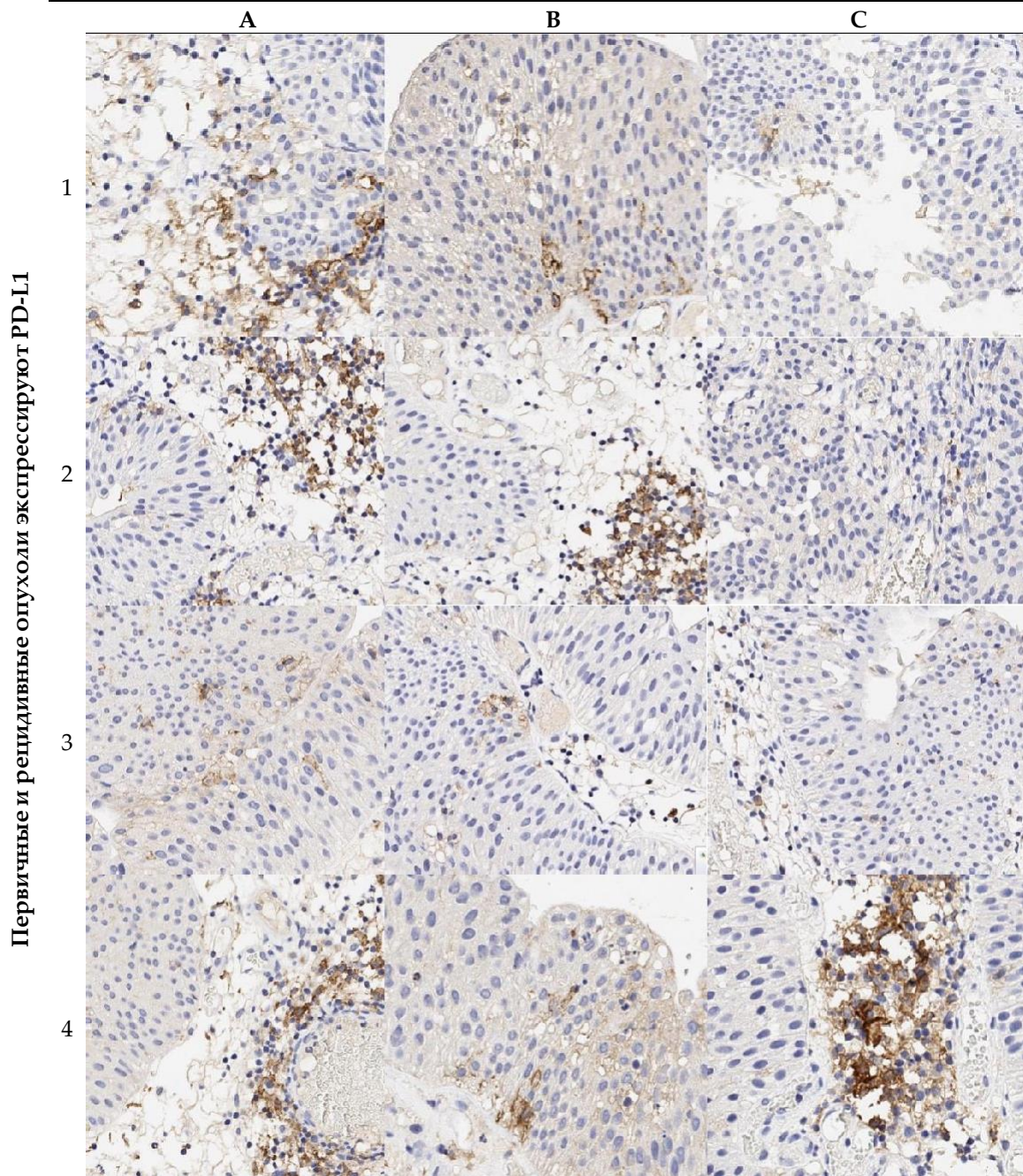


Рисунок 16 – Экспрессия PD-L1 первичными и рецидивными МНИ РМП: первичной (1), рецидивной без предшествующего лечения (2), рецидивной после лечения митомицином С (3), рецидивной после лечения вакциной БЦЖ (4); люминального молекулярного варианта (А), базального молекулярного варианта (В) и двойного негативного р53-мутантного молекулярного варианта (С). Микрофотографии препаратов, окрашенных anti-PD-L1 антителами, ИГХ, х400

Препараты рецидивного люминального молекулярного подтипа низкой степени злокачественности мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря в меньшей степени экспрессировали PD-L1 ($14,8 \pm 1,1\%$) нежели опухоли высокой степени злокачественности ($p=0,005$). Образцы рецидивного двойного негативного p53-позитивного РМП не отличались по уровню экспрессии лиганда иммунного чекпоинта в зависимости от степени злокачественности: в обоих случаях наблюдалась низкая мембранная экспрессия ($1,0 \pm 0,5\%$ - для опухолей с низким уровнем злокачественности, $0,8 \pm 0,2\%$ - для опухолей с высоким уровнем злокачественности).

Рецидивные опухоли пациентов, получавших по поводу первично-диагностированного МНИ РМП митомицин С в виде внутривезикулярных инстилляций, сопутствовавших трансуретральной резекции опухоли, характеризовались в целом низким уровнем экспрессии PD-L1. Так, GATA3-позитивные рецидивные опухоли высокой и низкой степени злокачественности экспрессировали PD-L1 на уровне $9,8 \pm 0,5\%$ и $7,8 \pm 0,7\%$ соответственно ($p=0,06$). Между CK5/6-позитивными рецидивными опухолями высокого и низкого уровня злокачественности нами была установлена достоверная разница – $5,2 \pm 0,7\%$ и $0,8 \pm 0,5\%$ соответственно ($p=0,001$). Также межгрупповые различия в уровне экспрессии мы регистрировали в группах двойного негативного рака мочевого пузыря высокой и низкой степени злокачественности – $4,3 \pm 0,7\%$ и $2,0 \pm 0,4\%$ соответственно ($p=0,005$).

Согласно нашим наблюдениям, внутривезикулярная терапия первичного РМП вакциной БЦЖ оказывала существенное влияние на экспрессию PD-L1 рецидивной опухоли. Так, люминальный вариант РМП высокой степени злокачественности и опухоль низкой степени злокачественности обладали высоким уровнем экспрессии маркера на уровне $36,0 \pm 2,0\%$ и $24,1 \pm 1,2\%$ соответственно, при этом отмечали значимое межгрупповое различие ($p=0,005$). Базальный молекулярный вариант рецидивной опухоли отличался более низким уровнем мембранной экспрессии PD-L1, при том, что между неоплазиями высокого и низкого уровня злокачественности также имелись статистически

достоверные различия – $21,0 \pm 1,7\%$ и $6,9 \pm 1,0\%$ ($p=0,001$). Двойной негативный рецидивный рак мочевого пузыря в этой группе демонстрировал высокую экспрессию маркера в подгруппе неоплазии высокой степени злокачественности ($40,8 \pm 3,2\%$) и умеренную PD-L1-позитивность в подгруппе опухолей с низкой степенью злокачественности – $16,8 \pm 1,1\%$ ($p=0,001$).

4.2 Интенсивность инфильтрации первичной и рецидивной опухоли иммунными клетками

Как известно, опухолевое микроокружение широко вовлечено в процесс туморогенеза и прогрессирования злокачественного новообразования [144-147]. В соответствие с основной линией нашего исследования, следует указать на то, что Т-лимфоциты могут демонстрировать PD-L1-позитивность, что свидетельствует о подавлении иммунной реакции на опухолевые антигены. В связи с этим, при выборе метода воздействия на опухоль необходимо оценивать какой тип клеток в опухоли экспрессирует PD-L1. Для этого оценили клеточную популяцию Т-супрессоров в образцах опухоли всех исследуемых групп и подгрупп (рисунки 17 и 18). В первичной люминальной опухоли мочевого пузыря CD8+ лимфоцитами представлено $26,7 \pm 1,4\%$ клеточной популяции неоплазии высокой степени злокачественности и $16,8 \pm 0,8\%$ клеточной популяции опухоли низкого грейда ($p=0,001$). Базальный первичный рак мочевого пузыря слабо инфильтрирован Т-супрессорами, причем для опухолей с низкой степенью злокачественности показатель был значимо выше ($8,0 \pm 0,8\%$), чем для подтипа ($5,3 \pm 0,7\%$) опухоли высокой степени злокачественности ($p=0,005$). Первичный двойной негативный p53-экспрессирующий рак мочевого пузыря был равноинфильтрирован CD8+ лимфоцитами вне зависимости от степени злокачественности первичной опухоли – они занимали $2,8 \pm 0,4\%$ и $2,4 \pm 0,4\%$ клеточной популяции соответственно.

CD8+ клеточная популяция в опухолях высокой и низкой злокачественности, %

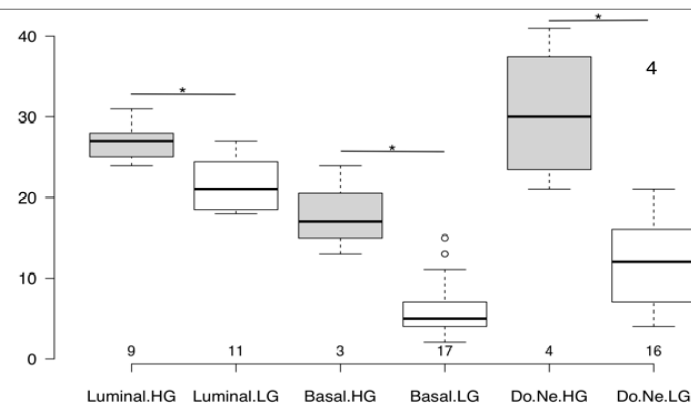
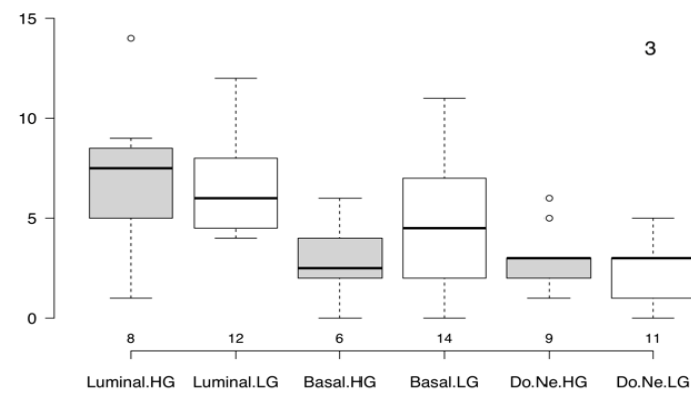
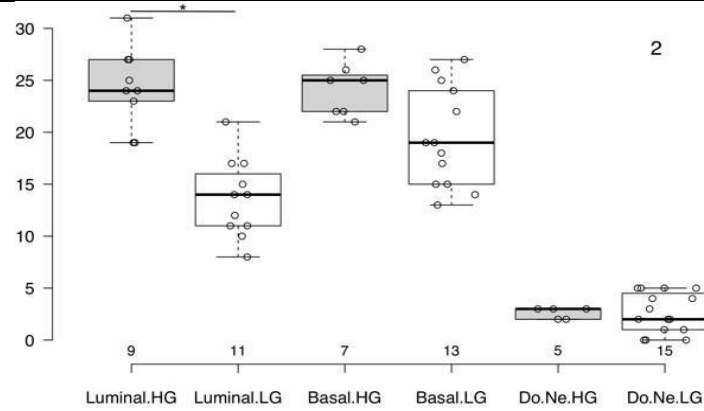
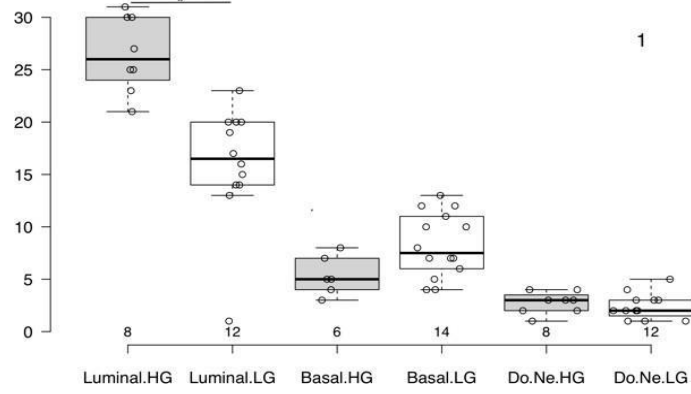


Рисунок 17 – Инфильтрация МНИ РМП CD8+ клетками в зависимости от предшествующей терапии и молекулярного вида опухоли: LG – низкого, HG – высокого уровня злокачественности; Basal – базальный, Luminal – люминальный, Do.Ne. – двойной негативный; * – $p < 0,05$ (ANOVA)

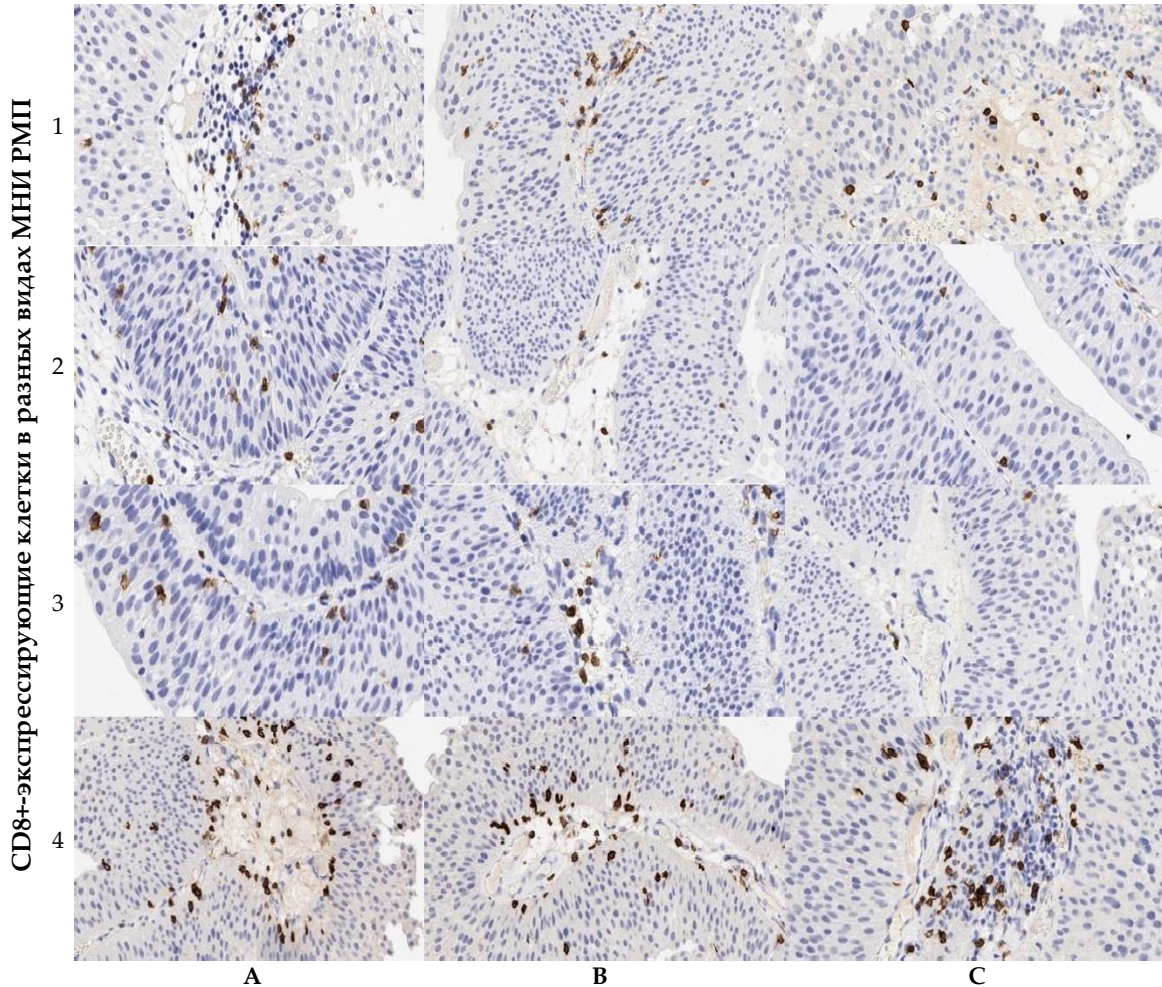


Рисунок 18 – CD8+-экспрессирующие Т-лимфоциты в первичных и рецидивных МНИ РМП: первичной (1), рецидивной без предшествующего лечения (2), рецидивной после лечения митомицином С (3) и рецидивной после лечения вакциной БЦЖ (4); люминального молекулярного варианта (А), базального молекулярного варианта (В) и двойного негативного р53-мутантного молекулярного варианта (С). Микрофотографии препаратов, окрашенных anti-CD8+ антителами, ИГХ, x400

Рецидивные опухоли базального и люминального молекулярного подтипа высокой степени злокачественности были интенсивно инфильтрированы иммунными клетками, которые занимали до $24,9 \pm 1,3\%$ и $24,1 \pm 1,0\%$ клеточной популяции соответственно, в то время как экспрессия CD8+ наблюдалась на $13,4 \pm 1,2\%$ популяции клеток люминального рака низкой злокачественности ($p=0,002$ при сравнении с высоким грейдом опухоли) и $19,5 \pm 1,3\%$ клеточной

популяции базального рака. Двойной негативный рак в этой группе демонстрировал схожую экспрессию Т-супрессоров в клеточной популяции без достоверных различий между опухолями высокой и низкой степени злокачественности.

Первый рецидив мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря после внутрипузырного введения митомицина С в целом характеризовался низкой инфильтрацией Т-супрессоров и не демонстрировал значимых различий в зависимости от степени злокачественности опухоли. Напротив, рецидивы после внутрипузырного лечения первичной опухоли вакциной БЦЖ отличались крайней разнородностью иммунного микроокружения в зависимости как от молекулярного варианта, так и от степени злокачественности неоплазии (рисунки 17 и 18).

Так, в частности, $26,8 \pm 1,8\%$ клеток GATA3-положительного рака высокой степени злокачественности были представлены Т-супрессорами и $21,7 \pm 1,5\%$ популяции опухолей с низкой степенью злокачественности экспрессировали CD8+. SK5/6-положительные рецидивы РМП высокой степени злокачественности были инфильтрированы Т-супрессорами на $17,1 \pm 1,4\%$, тогда как опухоли низкой степени злокачественности – лишь на $5,1 \pm 0,8\%$ ($p=0,001$). Двойной негативный p53-экспрессирующий рецидивный рак высокой степени злокачественности на $29,7 \pm 1,2\%$ был инфильтрирован Т-супрессорами, тогда как опухоли низкой степени злокачественности – лишь на $12,3 \pm 0,9\%$ ($p=0,001$).

4.3 Картирование PD-L1 экспрессии первичных и рецидивных карцином мочевого пузыря в зависимости от степени злокачественности и молекулярного варианта

Как мы уже упоминали выше, для корректной оценки PD-L1-экспрессирующего статуса необходимо принимать во внимание какой тип клеток проявляет свойства мембранной PD-L1-положительности (рисунок 19)

	Люминальный подтип		Базальный подтип		Двойной негативный p53-мутантный	
	ВЗ	НЗ	ВЗ	НЗ	ВЗ	НЗ
П	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 %
PH	ВЗ	НЗ	ВЗ	НЗ	ВЗ	НЗ
	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %
	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ < 25 %	IC+ < 25 %
PM	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %
	ВЗ	НЗ	ВЗ	НЗ	ВЗ	НЗ
	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %	ICP > 1 %
PB	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ > 25 %	IC+ < 25 %	IC+ > 25 %	IC+ < 25 %
	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %	TC+ < 25 %
	ВЗ	НЗ	ВЗ	НЗ	ВЗ	НЗ
PB	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; PH – первый рецидив в отсутствие предшествующей фармакологической терапии; PM – первый рецидив после внутривезикулярного введения митомицина С; PB – первый рецидив после внутривезикулярного 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 инфильтрирующих опухоль Т-супрессоров
-  Высокая PD-L1 экспрессия опухолевых и иммунных клеток
-  Низкая PD-L1 экспрессия

Рисунок 19 – Карта опухолевой PD-L1-позитивности

Мы рассчитали уровни экспрессии маркера отдельно опухолевыми клетками и Т-супрессорами в соответствие с валидированными международными рекомендациями производителя антител Ventana (Hoffmann la Roch, Швейцария) [148] и представили результаты в виде цветной карты. Все первичные опухоли низкой степени злокачественности наряду с люминальным РМП высокой степени злокачественности в группах имели низкий статус PD-L1-позитивности. В случае с базальными и двойными негативными опухолями высокой степени злокачественности высокий статус PD-L1-позитивности был обусловлен преимущественным окрашиванием мембран иммунных клеток. Также иммунная PD-L1-позитивность обуславливала высокий PD-L1-экспрессирующий статус люминального и базального вариантов рецидивных опухолей без предшествующих иммуно- и химиотерапевтических воздействий. Напротив, в этой группе двойной негативный p53-мутантный РМП не обладал PD-L1-позитивностью. В группе рецидивных опухолей после предшествующего внутривезикулярного введения митомицина С базальный и двойной негативный РМП низкой степени злокачественности характеризовались низким статусом экспрессии лиганда, тогда как люминальный вариант мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномы и более агрессивные подтипы базального и двойного негативного рака в большей степени экспрессировали PD-L1. Внутривезикулярное введение вакцины БЦЖ сопровождалось формированием высокоэкспрессирующих PD-L1 рецидивов люминального и двойного негативного раков высокой степени злокачественности. При этом, лиганд экспрессировался на мембранах иммунных и опухолевых клеток.

4.4 Безрецидивная выживаемость в исследуемых группах

Для каждого молекулярного подтипа опухоли в исследуемых группах была определена зависимость безрецидивной выживаемости от степени злокачественности опухоли (рисунки 20-22). В группе пациентов, не получавших химио- и иммунотерапии по поводу первичной опухоли время до

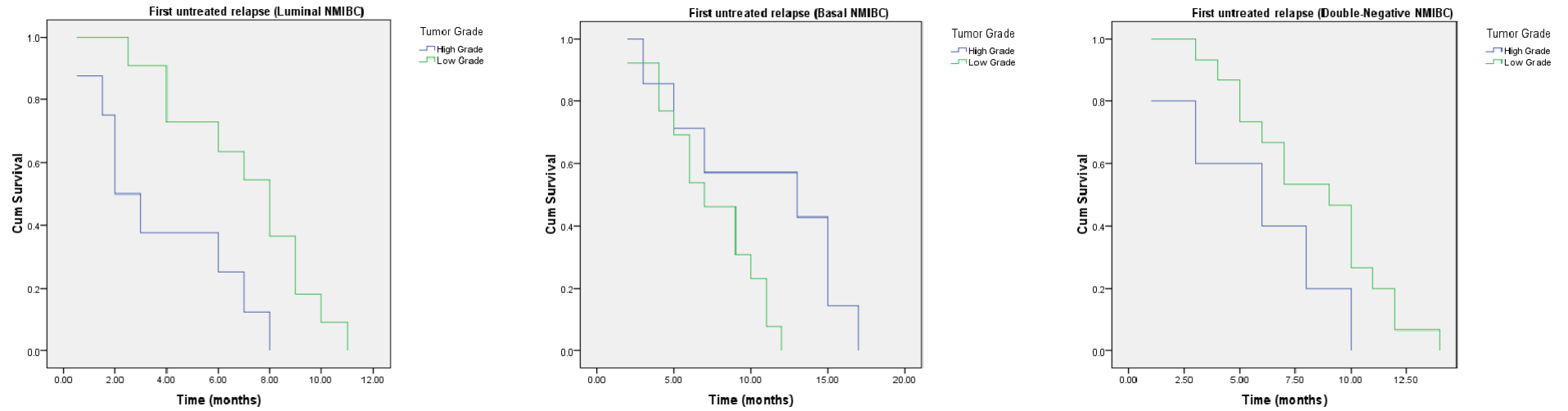


Рисунок 20 – Безрецидивная выживаемость пациентов с МНИ РМП, не получавшим химио- и иммунотерапии по поводу первичной опухоли (кривые Каплан-Мейера)

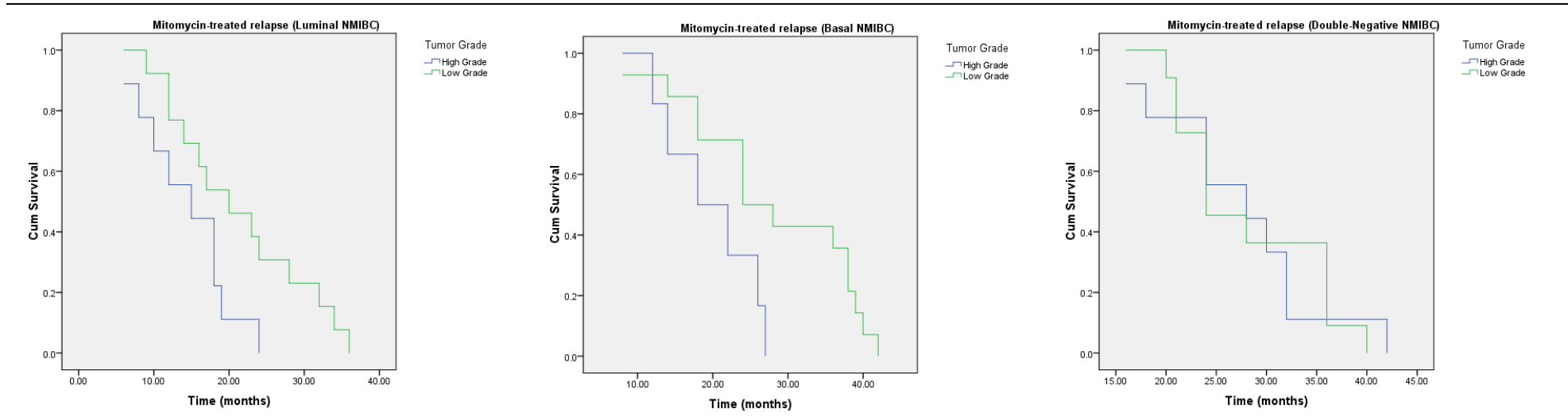


Рисунок 21 – Безрецидивная выживаемость пациентов с МНИ РМП, получавших по поводу первичной опухоли внутрипузырные инстилляции митомицина С (кривые Каплан-Мейера)

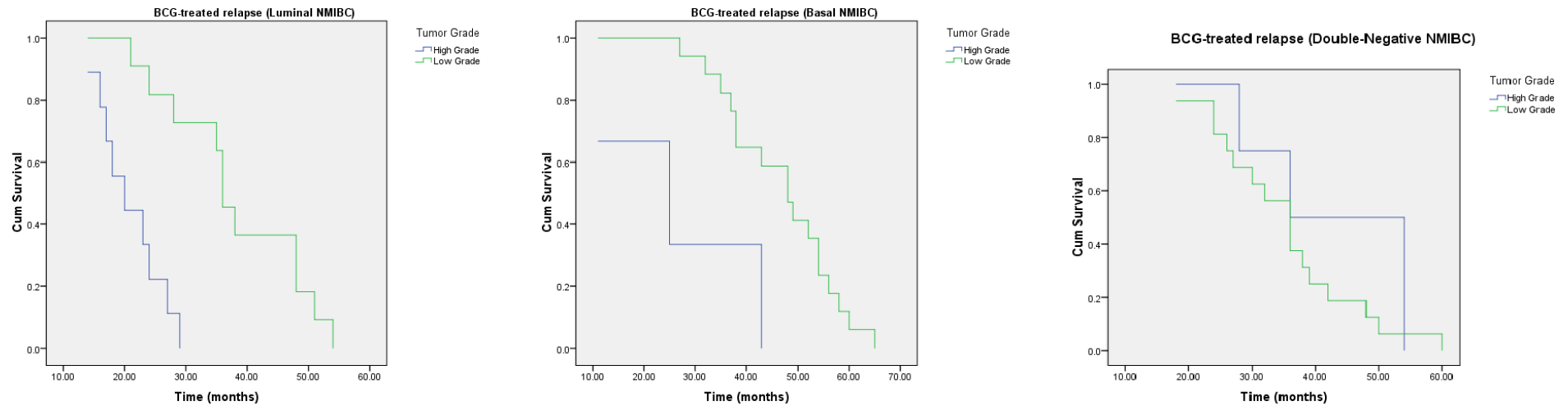


Рисунок 22 – Безрецидивная выживаемость пациентов с МНИ РМП, получавших по поводу первичной опухоли внутрипузырные инстилляции вакцины БЦЖ (кривые Каплан-Мейера)

первого рецидива было наименьшим в подгруппе люминального варианта неоплазии высокой степенью злокачественности. Выживаемость пациентов с базальным вариантом опухоли в этой группе была выше у лиц с менее злокачественной неоплазией. В группе двойного негативного рака опухоли с высокой степенью злокачественности характеризовались меньшей безрецидивной выживаемостью. Применение логрангового теста показало достоверное различие во времени выживаемости в подгруппах базального и люминального варианта в зависимости от степени злокачественности ($p < 0,05$).

В группе пациентов с МНИ РМП, получавшим по поводу заболевания внутрипузырное введение митомицина С на фоне трансуретральной резекции, мы установили, что для люминального и базального молекулярного вариантов рака время безрецидивной выживаемости было достоверно меньшим в подгруппах с высокой степенью злокачественности опухоли ($p < 0,05$). Для двойного негативного рака мочевого пузыря в данной группе зависимости времени безрецидивной выживаемости от грейда опухоли не установлено.

В группе пациентов с МНИ РМП, получавшим по поводу заболевания внутрипузырное введение вакцины БЦЖ на фоне трансуретральной резекции, было установлено, что для люминального и базального молекулярного вариантов рака время безрецидивной выживаемости было достоверно меньшим в подгруппах с высокой степенью злокачественности опухоли ($p < 0,05$). Для двойного негативного рака мочевого пузыря в данной группе зависимости времени безрецидивной выживаемости от грейда опухоли, также как и в предыдущих группах, не установлено.

С использованием унивариантного анализа мы установили, что уровень PD-L1 экспрессии взаимосвязан с временем безрецидивной выживаемости пациентов с люминальным вариантом опухоли, не получавшим внутрипузырного лечения, а также с люминальным вариантом опухоли у пациентов, получавшим по поводу заболевания внутрипузырное введение вакцины БЦЖ (таблица 7). В то же время от уровня PD-L1 экспрессии не зависит безрецидивная выживаемость базального и двойного негативного вариантов РМП, не получавших внутрипузырного

лечения вакциной БЦЖ. Также не установлено связи между экспрессией PD-L1 и выживаемостью пациентов, получавших по поводу первичной опухоли внутривузырное введение митомицина С.

Таблица 7 – Унивариантный анализ (Cox-регрессия) связи между PD-L1 экспрессией (высокая или низкая) и безрецидивной выживаемостью в исследуемых группах

Рецидив	Подгруппы	HR	95% CI	p
Первый рецидив, без внутрипузырного лечения	Люминальный	0.29	0.10-0.83	0.022
	Базальный	3.59	0.98-13.14	0.053
	Двойной негативный	-	-	-
Первый рецидив, митомицин С	Люминальный	-	-	-
	Базальный	-	-	-
	Двойной негативный	-	-	-
Первый рецидив, Вакцина БЦЖ	Люминальный	0.04	0.006-0.37	0.004
	Базальный	-	-	-
	Двойной негативный	1.44	0.49-4.17	0.50

ГЛАВА 5. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ PD-L1 СТАТУСОМ, ЭКСПРЕССИЕЙ *FGFR3*, МИКРОРНК-200а И 145, МУТАЦИЯМИ ГЕНА *FGFR3* И ТЕЧЕНИЕМ ЛЮМИНАЛЬНОГО МЫШЕЧНО-НЕИНВАЗИВНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

В нашем исследовании мы показали, что уровень экспрессии лиганда 1 типа рецептора программируемой гибели клеток широко варьирует в зависимости от молекулярного варианта и степени злокачественности мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря [10]. Кроме того, нами было установлено, что безрецидивная выживаемость пациентов помимо лекарственной терапии (внутрипузырное введение митомицина С или вакцины БЦЖ) определяется также молекулярным вариантом опухоли и уровнем экспрессии PD-L1 опухолевыми клетками и иммунным микроокружением [149,150].

МикроРНК – это небольшие некодирующие олигонуклеотидные молекулы, вовлеченные в различные регуляторные функции и процессы внутриклеточной сигнализации [151, 152]. В многочисленных исследованиях показана прогностическая роль микроРНК не только в виде тканеспецифическом виде, но также в форме свободных циркулирующих молекул [153-155]. Так, Yun с соавт. установил зависимость между выявляемостью МНИ РМП и его прогрессией и концентрацией микроРНК-145 и 200а в биологических жидкостях (в частности, в моче) [154]. МикроРНК влияют на прогрессию опухоли посредством модуляции факторов роста, в том числе фактора роста фибробластов 3 типа и его гена (*FGFR3*) [156, 157]. Была установлена прогностическая роль *FGFR3* и мутации его гена при МНИ РМП [158].

Поскольку мы установили, что существует зависимость между экспрессией PD-L1 и безрецидивной выживаемостью у пациентов с люминальным вариантом МНИ РМП в случае отсутствия внутрипузырного лечения, а также на фоне внутрипузырных введений вакцины БЦЖ, сопровождающих трансуретральную резекцию, большой научно-практический интерес представляет изучения

взаимосвязи этих показателей с экспрессией некоторых микроРНК, *FGFR3* и мутацией его гена при указанном варианте опухоли.

Мы оценили экспрессию генного транскрипта *FGFR3* как процент от концентрации мРНК доменного гена *ACTB* (рисунок 23). Мы установили, что люминальный вариант МНИ РМП высокой степени злокачественности характеризовался низкой клеточной экспрессией *FGFR3* по сравнению с опухолевой тканью низкой степени злокачественности ($p=0,001$).

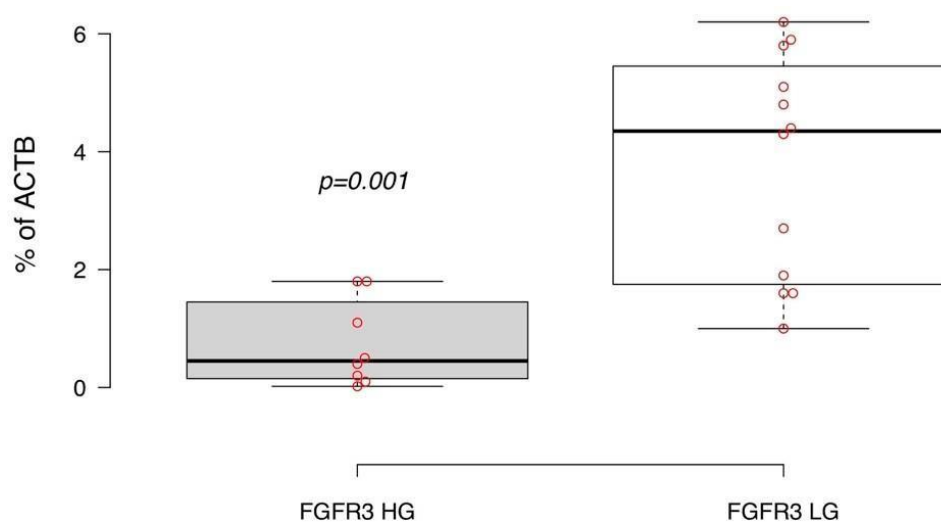


Рисунок 23 – Экспрессия *FGFR3* опухолевыми клетками люминального варианта первичного МНИ РМП (выраженная в процентах от экспрессии доменного гена *ACTB*). Достоверность различий определена при помощи t-теста для независимых выборок; HG – высокая степень злокачественности, LG – низкая степень злокачественности

Секвенирование гена *FGFR3* по Sanger в образцах как высокой, так и низкой степени злокачественности люминального варианта мышечно-неинвазивной первичной уротелиальной карциномы мочевого пузыря позволило установить (рисунки 24 и 25), что частота мутаций в кодонах 248 и 249 (мутации горячих точек гена *FGFR3*) превалирует в клетках опухолей с низкой степенью

злокачественности (66,6% мутаций) по сравнению с клетками с высоким уровнем злокачественности (25% мутаций).

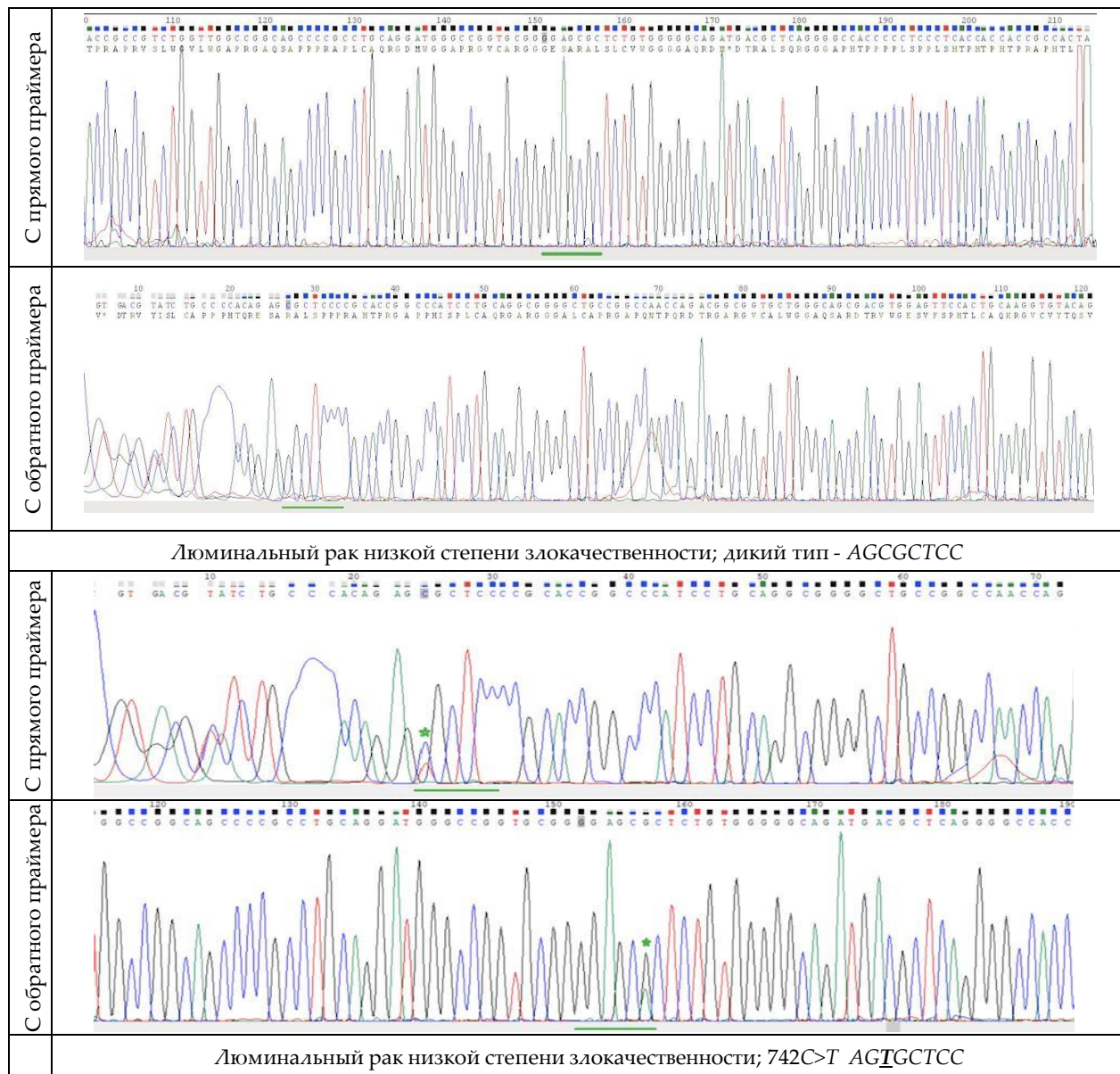


Рисунок 24 – Мутации гена *FGFR3* в кодонах 248 и 249 в образцах люминального рака мочевого пузыря низкой степени злокачественности (секвенирование по Sanger). В диком типе наблюдается последовательность AGCGCTCC, в мутантном генотипе нуклеотид C замещается на T в позиции 3 или нуклеотид C замещается на G в позиции 7

Интересно, что при этом мы не установили корреляции между уровнем экспрессии гена и частотой мутаций.

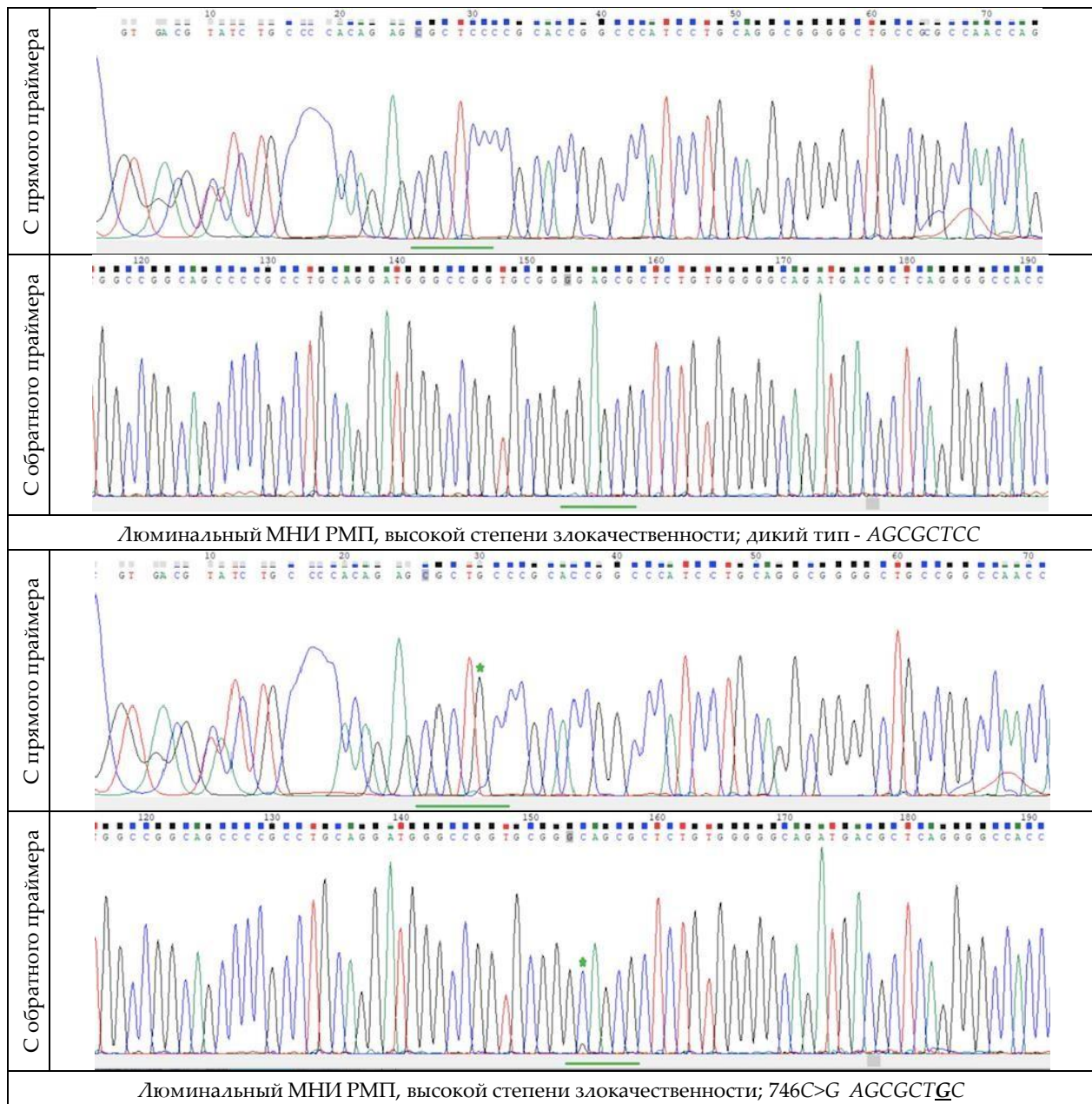


Рисунок 25 – Мутации гена *FGFR3* в кодонах 248 и 249 в образцах люминального рака мочевого пузыря высокой степени злокачественности (секвенирование по Sanger). В диком типе наблюдается последовательность *AGCGCTCC*, в мутантном генотипе нуклеотид *C* замещается на *T* в позиции 3 или нуклеотид *C* замещается на *G* в позиции 7

Также изучили экспрессию микроРНК-200а и микроРНК-145 в образцах опухоли методом количественной обратной ПЦР в режиме реального времени (рисунок 26). Уровень экспрессии микромолекул оценивался как процент от экспрессии доменной U6 малой ядерной РНК.

Мы не обнаружили статистически значимых различий в уровне экспрессии микроРНК-200а между люминальным вариантом мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря высокой и низкой степеней злокачественности. В то же время, анализируя экспрессию микроРНК-145, мы обнаружили, что опухоли высокой степени злокачественности экспрессируют маркер в 5,9 раза выше, чем образцы люминального первичного МНИ РМП низкой степени злокачественности.

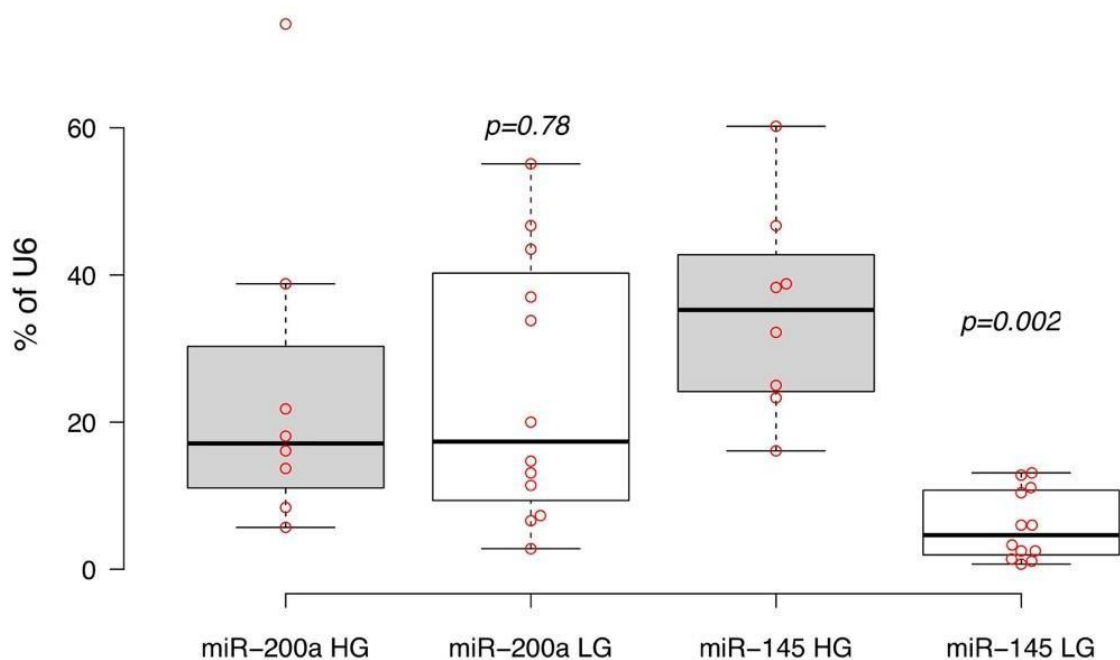


Рисунок 26 – Экспрессия микроРНК-200а и микроРНК-145 опухолевыми клетками люминального варианта первичного МНИ РМП (выраженная в процентах от экспрессии домена U6 малой ядерной РНК). Достоверность различий определена при помощи t-теста для независимых выборок; HG – высокая степень злокачественности, LG – низкая степень злокачественности

С использованием актуарного анализа Каплан-Мейера мы установили, что безрецидивная выживаемость пациентов с люминальным вариантом первичного МНИ РМП с высоким статусом экспрессии PD-L1 ниже, чем у пациентов с тем же вариантом опухоли, но низким уровнем экспрессии маркера (рисунок 27). Применение логранкового анализа позволило установить статистическую значимость различий ($p=0,03$).

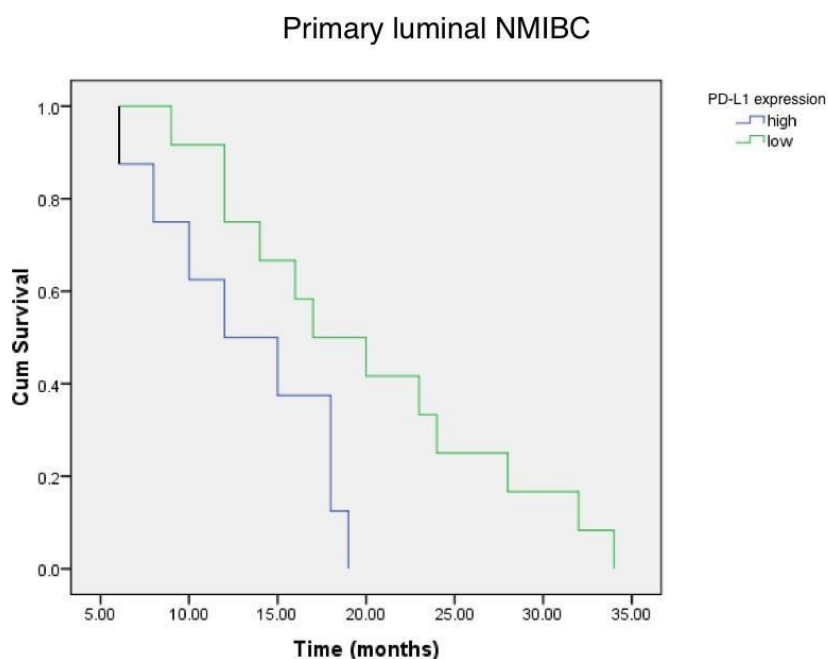


Рисунок 27 – Безрецидивная выживаемость пациентов с люминальным вариантом МНИ РМП в зависимости от статуса экспрессии PD-L1 (кривые Каплан-Мейера)

Мы применили функциональные возможности унивариантного анализа для установления предиктивной роли совокупности всех изученных маркеров в безрецидивной выживаемости пациентов с люминальным МНИ РМП (таблица 8). Нам удалось установить, что степень злокачественности опухоли, статус экспрессии PD-L1 и уровень экспрессии *FGFR3* в совокупности взаимосвязаны и

определяют безрецидивную выживаемость. В то же время экспрессия микроРНК-200а, микроРНК145 и частота мутаций гена *FGFR3* не имеют предиктивной роли.

Таблица 8 – Унивариантный анализ (Cox-регрессия) связи между PD-L1 экспрессией (высокая или низкая), экспрессией микроРНК, *FGFR3*, мутаций гена *FGFR3* и безрецидивной выживаемостью в группе пациентов с люминальным первичным МНИ РМП

Переменная	HR	95% CI	p
Степень злокачественности	571.72	11.03 – 2.96	0.002
экспрессия PD-L1	2.33	0.92 – 1.92	0.012
экспрессия микроРНК-200а	0.98	0.95 – 1.01	0.40
экспрессия микроРНК-145	0.99	0.93 – 1.06	0.96
экспрессия <i>FGFR3</i>	0.08	0.17 – 0.42	0.003
мутации гена <i>FGFR3</i>	1.46	0.35 – 6.00	0.593

ГЛАВА 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная фундаментальная и клиническая медицина продолжает испытывать острую нехватку надежных прогностических систем, позволяющих предсказывать клинические варианты течения онкологических заболеваний, их исходы, а также вероятный ответ на тот или иной вид лечебного воздействия. Сложившаяся ситуация при этом не отражает в целом высокий уровень развития молекулярной биологии, генетики, молекулярной патологии, за последние 10-20 лет идентифицировавших целые ансамбли внутри и внеклеточных сигнальных механизмов, участвующих как в формировании опухоли, так и в опухолевой прогрессии – росте, инвазии и метастазировании.

Все вышесказанное в полной мере может быть отнесено и к мышечно-неинвазивному раку мочевого пузыря – злокачественной патологии органа, занимающей 5 место в мире по уровню распространенности в популяции и несущей значительные социально-экономические потери как в развитых, так и в развивающихся странах. Значительный прогресс в области понимания биологических источников опухолевой прогрессии позволил в последнее время выделить и идентифицировать молекулярные подтипы этого заболевания – базальный CK5/6-экспрессирующий, люминальный GATA3-экспрессирующий и дважды негативный p53-мутантный. Каждый из этих подтипов обладает разной степенью злокачественности, ответом на местную химиотерапию, вероятностью рецидивирования и трансформации в мышечно-инвазивную форму.

С другой стороны, было установлено, что одним из ключевых механизмов опухолевой прогрессии является способность опухолевых клеток активировать специфический сигнальный путь Т-лимфоцитов, запуская их программируемую гибель. Этот путь получил название PD1/PD-L1 сигнальный путь. Идентификация указанного механизма обозначила в последнее десятилетие революционное изменение понимания наших подходов к таргетной терапии опухолей.

В этой связи мы поставили перед собой цель установить патологическую и прогностическую роль экспрессии PD-L1 в прогрессии и безрецидивной выживаемости мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря.

Одним из нерешенных вопросов в рассматриваемой предметной области является разработка животных моделей человеческих опухолей, которые бы соответствовали реальной клинической практике и позволяли определять патологическое значение как самой опухоли, так и воздействия микро- и макроокружения на нее [137]. Активация PD-L1 сигнального пути по мнению мировой научной общественности является краеугольным камнем в формировании и прогрессии множества злокачественных образований, таких как меланома, рак головы и шеи, неоплазий почек, легких и, в том числе, мочевого пузыря [146, 158-161]. Так, Vandever с соавт. показали высокую активность антител к PD-L1 в культуре неметастатической неинвазивной карциномы мочевого пузыря MB49^{luc} [162]. Высокая прогностическая способность экспрессии мРНК PD-L1 была продемонстрирована в культуральных исследованиях Breyer [142]. Вместе с тем, вовлеченность PD-L1 сигнального пути в прогрессию отдельных молекулярных подтипов рака мочевого пузыря до сих пор не была изучена.

В этой связи первый большой раздел нашей работы был посвящен разработке уникальной биологической экспериментальной модели для изучения человеческой опухоли. Для этого были сформированы шесть типов PD-L1-экспрессирующих ксенографтных моделей первичных и рецидивных человеческих мышечно-неинвазивных раков мочевого пузыря, представленных люминальным (GATA3-экспрессирующим), базальным (CK5/6-экспрессирующим) и двойным негативным p53-мутантным молекулярными подтипами опухоли. Для гуманизации применяли сублетальное облучение иммунодефицитных линейных BALB/c nu/nu мышей с последующей трансплантацией человеческих лимфоцитов.

Оценку эффективности формирования модели осуществляли на основе морфологического исследования исходных и трансплантированных опухолей, а

также их иммуногистохимического типирования для определения степени PD-L1-позитивности. В работе использованы моноклональные антитела IgGТ1 к PD-L1 для подавления сигнального пути у случайным образом отобранной подгруппы животных в каждой из описанных групп. Это позволило нам дать объективную оценку влияния активности PD-L1 сигнального пути на поведение ксенографтной опухоли в опытах на живом организме.

В результате, проводя сравнительный анализ кривых выживаемости животных – носителей ксенографтных опухолей, и поведение самих опухолей (рост, метастазирование) мы установили, что ингибирование PD-L1 сигнального пути приводит к подавлению роста PD-L1-экспрессирующей опухоли 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 иммунного чекпойнта, что имело достоверные отличия от соответствующих контрольных подгрупп и подгрупп с другими молекулярными формами опухоли. 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 внутрипузырного лечения на фоне трансуретральной резекции мочевого пузыря [140, 164-167].

В своей работе мы изучили взаимосвязь ответа на анти-PD-L1 антитела и популяции CD8⁺ 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.

Таким образом, нам 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.

На следующем этапе нашей работы, учитывая молекулярную гетерогенность первичных и рецидивных опухолей мочевого пузыря, мы проанализировали влияние экспрессии PD-L1 иммунного чекпоинта 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.

Мы установили, что в первых рецидивных опухолях базального и люминального МНИ РМП обнаруживается низкая экспрессия иммунного чекпоинта 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 чекпоинта первичными уротелиальными пузырьными карциномами с высокой степенью злокачественности, однако без упоминания отдельных молекулярных подтипов опухоли [168].

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 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 и Wankowitz с коллегами [169]. 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 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 степенью 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 внутрипузырное 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 мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря 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*.

Kang с сотрудниками в своей работе показал, что экспрессия *FGFR3* и частота мутаций гена *FGFR3* взаимосвязаны с выживаемостью при первичной T1 уротелиальной карциноме мочевого пузыря [170], тогда как Neuzillet с сотрудниками не увидели связи между выживаемостью и экспрессией фактора роста, показав наличие такой связи лишь для частоты генных мутаций [171]. Значение же свободных микроРНК-145 и микроРНК-200а в моче для предикции рака мочевого пузыря было установлено научной командой Yun [172].

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. Это, возможно,

объясняется недостаточным объемом сравниваемых групп и потребует дальнейшего изучения.

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. 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 [172].

Таким образом, мы установили, что низкая экспрессия *FGFR3* на фоне высокой PD-L1-позитивности является плохим прогностическим фактором для безрецидивной выживаемости пациентов с первичным люминальным мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря.

6.1 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования

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 приложении к изучаемому типу опухоли; 3) изучение роли экспрессии и блокады иммунных чекпоинтов 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 иммунного чекпоинта 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 внутривезикулярное 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 внутрипузырную терапию необходимо определять экспрессию PD-L1 и *FGFR3* с последующей их комплексной оценкой.

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferlay, J. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo et al. // *Int J Cancer*. – 2015. – Vol. 136. – E359-86.
2. Antoni, S. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends / S. Antoni, J. Ferlay, I. Soerjomataram, A. Znaor, A. Jemal, F. Bray // *Eur Urol*. – 2017. – Vol. 71. – P. 96-108.
3. Bachir BG. Cause-effect? Understanding the risk factors associated with bladder cancer / Bachir BG, Kassouf W et al. // *Expert Rev Anticancer Ther* – 2012. – Vol. 12. – P.1499–1502.
4. Ramirez, D. Microscopic haematuria at time of diagnosis is associated with lower disease stage in patients with newly diagnosed bladder cancer / D. Ramirez, A. Gupta, D. Canter, B. Harrow, R.W. Dobbs, V. Kucherov et al. // *BJU Int*. – 2016. – Vol. 117. – P. 783-786.
5. Kirkali, Z. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis / Z. Kirkali, T. Chan, M. Manoharan, F. Algaba, C. Busch, L. Cheng et al. // *Urology*. – 2005. – Vol. 66. – P. 4-34.
6. Sanli, O. Bladder cancer / O. Sanli, J. Dobruch, M.A. Knowles, M. Burger, M. Alemozaffar, M.E. Nielsen et al. // *Nat Rev Dis Primers*. – 2017. – Vol. 13. – P. 17022.
7. Urquidi, V S. Molecular diagnostic trends in urological cancer: biomarkers for non-invasive diagnosis / V. Urquidi, C.J. Rosser, S. Goodison // *Curr Med Chem*. – 2012. – Vol. 19. – P. 3653-3663.
8. Weyerer, V. Immunohistochemical and molecular characterizations in urothelial carcinoma of bladder in patients less than 45 years / V. Weyerer, R. Schneckenpointner, T. Filbeck, M. Burger, F. Hofstaedter, P.J. Wild et al. // *J Cancer*. 2017. – Vol. 8. – P. 323-331.
9. Billerey, C. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors / C. Billerey, D. Chopin, M.H. Aubriot-Lorton, D. Ricol, S. Gil Diez de Medina, B. Van Rhijn et al. // *Am J Pathol*. – 2001. – Vol. 158. – P. 1955-1959.

10. Cheng, L. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice / L. Cheng, S. Zhang, G.T. MacLennan, S.R. Williamson, A. Lopez-Beltran, R. Montironi // *Hum Pathol.* – 2011. – Vol. 42. – P. 455-481.
11. Southgate, J. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications / J. Southgate, P. Harnden, L.K. Trejdosiewicz // *Histol Histopathol.* – 1999. – Vol. 14. – P. 657-664.
12. Omran, O.M. CD44s and CD44v6 in diagnosis and prognosis of human bladder cancer / O.M. Omran, H.S. Ata // *Ultrastruct Pathol.* – 2012. – Vol. 36. – P. 145-152.
13. Omran, O.M. CD10 and E-cad expression in urinary bladder urothelial and squamous cell carcinoma / O.M. Omran // *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* – 2012. – Vol. 31. – P. 203-212.
14. Chen, X. Expression of the IAP protein family acts cooperatively to predict prognosis in human bladder cancer patients / X. Chen, T. Wang, D. Yang, J. Wang, X. Li, Z. He et al. // *Oncol Lett.* – 2013. – Vol. 5. – P. 1278-1284.
15. Lamm, D. Defining progression in nonmuscle invasive bladder cancer: it is time for a new, standard definition / D. Lamm, R. Persad, M. Brausi, R. Buckley, J.A. Witjes, J. Palou et al. // *J Urol.* – 2014. – Vol. 191. – P. 20-27.
16. Hussain, S.A. Molecular markers in bladder cancer / S.A. Hussain, N.D. James // *Semin Radiat Oncol.* – 2005. – Vol. 15. – P. 3-9.
17. Apollo, A. Molecular characterization of low grade and high grade bladder cancer / A. Apollo, V. Ortenzi, C. Scatena, K. Zavaglia, P. Aretini, F. Lessi, et al. // *PLoS ONE.* 2019. – Vol. 14. – e0210635.
18. Wu, X. Application of PD-1 blockade in cancer immunotherapy / X. Wu, Z. Gu, Y. Chen, B. Chen, W. Chen, et al. // *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:661–674.
19. Samishina, E. 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.

20. Blinova, E. 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.

21. Kamat, A.M. ICUD–EAU international consultation on bladder cancer 2012: screening, diagnosis, and molecular markers / A.M. Kamat, P.K. Hegarty, J.R. Gee, P.E. Clark, R.S. Svatek, N. Hegarty et al. // Eur Urol. – 2013. – Vol. 63. – P. 4-15.

22. Karakiewicz, P.I. Precystectomy nomogram for prediction of advanced bladder cancer stage / P.I. Karakiewicz, S.F. Shariat, G.S. Palapattu, P. Perrotte, Y. Lotan, C.G. Rogers et al. // Eur Urol. – 2006. – Vol. 50. – P. 1254-1260.

23. Tilki, D. Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer / D. Tilki, M. Burger, G. Dalbagni, H.B. Grossman, O.W. Hakenberg, J. Palou et al. // Eur Urol. – 2011. – Vol. 60. – P. 484-492.

24. Bensalah, K. Challenges of cancer biomarker profiling / K. Bensalah, F. Montorsi, S.F. Shariat // Eur Urol. – 2007. – Vol. 52. – P. 1601-1609.

25. Shariat, S.F. Statistical consideration for clinical biomarker research in bladder cancer / S.F. Shariat, Y. Lotan, A. Vickers, P.I. Karakiewicz, B.J. Schmitz-Drager, P.J. Goebell et al. // Urol Oncol. – 2010. – Vol. 28. – P. 389-400.

26. Shariat, S.F. Cooperative effect of cell-cycle regulators expression on bladder cancer development and biologic aggressiveness / S.F. Shariat, A.R. Zlotta, R. Ashfaq, A.I. Sagalowsky, Y. Lotan et al. // Mod Pathol. – 2010. – Vol. 20. – P. 445-459.

27. Karam, J.A. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy / J.A. Karam, Y. Lotan, P.I. Karakiewicz, R. Ashfaq, A.I. Sagalowsky, C.G. Roehrborn et al. // Lancet Oncol. – 2007. – Vol. 8. – P. 128-136.

28. Friedman, G.D. Problems in assessing screening experience in observational studies of screening efficacy: example of urinalysis screening for bladder cancer / G.D. Friedman, R.A. Hiatt, C.P. Quesenberry Jr, J.V. Selby, N.S. Weiss // J Med Screen. – 1995. – Vol. 2. – P. 219-223.

29. Krabbe, L.-M. Bladder cancer risk: use of the PLCO and NLST to identify a suitable screening cohort / L.-M. Krabbe, R.S. Svatek, S.F. Shariat, E. Messing, Y. Lotan // *Urol Oncol.* – 2015. – Vol. 33: - P. 65.e19–65.e25.

30. Lotan, Y. Bladder cancer screening in a high risk asymptomatic population using a point of care urine based protein tumor marker / Y. Lotan, K. Elias, R.S. Svatek, A. Bagrodia, G. Nuss, B. Moran et al. // *J Urol.* – 2012. – Vol. 182. – P. 52-57.

31. Starke, N. Long-term outcomes in a high-risk bladder cancer screening cohort / N. Starke, N. Singla, A. Haddad, Y. Lotan // *BJU Int.* – 2016. – Vol. 117. – P. 611-617.

32. Mariani, A.J. The significance of adult hematuria: 1000 hematuria evaluations including a risk-benefit and cost-effectiveness analysis / A.J. Mariani, M.C. Mariani, C. Macchioni, U.K. Stams, A. Hariharan, A. Moriera // *J Urol.* – 1989. – Vol. 141. – P. 350-355

33. Fajkovic, H. Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis / H. Fajkovic, J.A. Halpern, E.K. Cha, A. Bahadori, T.F. Chromecki, P.I. Karakiewicz et al. // *World J Urol.* – 2012. – Vol. 29. – P. 457-463.

34. Cohen, R.A. Clinical practice. Microscopic hematuria / R.A. Cohen, R.S. Brown // *N Engl J Med.* – 2002. – Vol. 348. – P. 2330-2338.

35. Lotan, Y. Prospective external validation of a bladder cancer detection model / Y. Lotan, R.S. Svatek, L.M. Krabbe, E. Xylinas, T. Klatte, S.F. Shariat // *J Urol.* – 2014. – Vol. 192. – P. 1343-1348.

36. Elias, K. High-risk patients with hematuria are not evaluated according to guideline recommendations / K. Elias, R.S. Svatek, S. Gupta, R. Ho, Y. Lotan // *Cancer.* – 2014. – Vol. 116. – P. 2954-2959.

37. Cha, E.K. Immunocytology is a strong predictor of bladder cancer presence in patients with painless hematuria: a multicentre study / E.K. Cha, L.A. Tirsar, C. Schwentner, P.J. Christos, C. Mian, J. Hennenlotter et al. // *Eur Urol.* – 2012. – Vol. 61. – P. 185-192.

38. Beukers, W. The use of molecular analyses in voided urine for the assessment of patients with hematuria / W. Beukers, R. Kandimalla, D. van Houwelingen, H. Kovacic, J.F. Chin, H.F. Lingsma et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8 . – e77657.

39. van der Aa, M.N.M. Cystoscopy revisited as the gold standard for detecting bladder cancer recurrence: diagnostic review bias in the randomized, prospective CEFUB trial / M.N.M. van der Aa, E.W. Steyerberg, C. Bangma, B.W.G. van Rhijn, E.C. Zwarthoff, T.H. van der Kwast // *J Urol*. – 2015. – Vol. 183. – P. 76-80.

40. Messer, J. Urinary cytology has a poor performance for predicting invasive or high-grade upper-tract urothelial carcinoma / J. Messer, S.F. Shariat, J.C. Brien, M.P. Herman, C.K. Ng, D.S. Scherr et al. // *BJU Int*. – 2011. – Vol. 108. – P. 701-705.

41. Karakiewicz, P.I. Institutional variability in the accuracy of urinary cytology for predicting recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder / P.I. Karakiewicz, S. Benayoun, C. Zippe, G. Lüdecke, H. Boman, M. Sanchez-Carbayo et al. // *BJU Int*. – 2006. – Vol. 97. – P. 997-1001.

42. Yossepowitch, O. Use of urinary biomarkers for bladder cancer surveillance: patient perspectives / O. Yossepowitch, H.W. Herr, S.M. Donat et al. // *J Urol*. – 2007. – Vol. 177. – P. 1277-1282.

43. Miyanaga, N. Usefulness of urinary NMP22 to detect tumor recurrence of superficial bladder cancer after transurethral resection / N. Miyanaga , H. Akaza, S. Tsukamoto, T. Shimazui, M. Ohtani, Ishikawa S et al. // *Int J Clin Oncol*. – 2003. – Vol. 8. – P. 369-373.

44. Kavalieris, L. Performance characteristics of a multigene urine biomarker test for monitoring for recurrent urothelial carcinoma in a multicenter study / L. Kavalieris, P. O'Sullivan , C. Frampton, P. Guilford, D. Darling, E. Jacobson et al. // *J Urol*. – 2007. – Vol.197. – P. 1419-1426.

45. Horstmann, M. Combinations of urine-based tumour markers in bladder cancer surveillance / M. Horstmann, O. Patschan, J. Hennenlotter, E. Senger, G. Feil, A. Stenzl et al. // *Scand J Urol Nephrol*. – 2009. – Vol. 43. – P. 461-466.

46. Babjuk, M. Urinary cytology and quantitative BTA and UBC tests in surveillance of patients with pTapT1 bladder urothelial carcinoma / M. Babjuk, V.

Soukup, M. Pešl, M. Koštířová, E.Drncová, H. Smolová et al. // *Urology*. – 2008. – Vol. 71. – P. 718-722.

47. Todenhöfer, T. Stepwise application of urine markers to detect tumor recurrence in patients undergoing surveillance for non-muscle-invasive bladder cancer / T.Todenhöfer, J. Hennenlotter, M. Esser, S. Mohrhardt, S. Aufderklamm, J. Böttge et al. // *Dis Markers*. – 2014. – Vol. 9. – P.e73406.

48. Babjuk, M. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update / M. Babjuk, A. Böhle, M. Burger, O. Capoun, D. Cohen, Compérat EM et al. // *Eur Urol*. – 2016. – Vol. 71. P. 447-461.

49. Chang, S.S. Diagnosis and treatment of non-muscle invasive bladder cancer: AUA/SUO guideline / S.S. Chang, S.A. Boorjian, R. Chou, P.E. Clark, S. Daneshmand, B.R. Konety et al. // *J Urol*. – 2016. – Vol. 196. – P. 1021-1029.

50. Kamat, A.M. Novel fluorescence in situ hybridization-based definition of bacille Calmette-Guérin (BCG) failure for use in enhancing recruitment into clinical trials of intravesical therapies / A.M. Kamat, D.L. Willis, R.G. Dickstein, R. Anderson, G. Nogueras-González, R.L. Katz et al. // *BJU Int*. – 2016. – Vol. 117. – P. 754 -760.

51. Schlomer, B.J. Prospective validation of the clinical usefulness of reflex fluorescence in situ hybridization assay in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder / B.J. Schlomer, R. Ho, A. Sagalowsky, R. Ashfaq, Y. Lotan et al. // *J Urol*. – 2010. – Vol. 183. – P. 62-67.

52. Odisho, A.Y. Reflex ImmunoCyt testing for the diagnosis of bladder cancer in patients with atypical urine cytology / A.Y. Odisho, A.B. Berry, A.E. Ahmad, M.R. Cooperberg, P.R. Carroll, B.R. Konety et al. // *Eur Urol*. – 2013. – Vol. 63. – P. 936-940.

53. Shariat, S.F. Prognostic value of P53 nuclear accumulation and histopathologic features in T1 transitional cell carcinoma of the urinary bladder / S.E. Shariat, A.Z. Weizer, A. Green, R. Laucirica, A. Frolov, T.M. Wheeler et al. // *Urology*. – 2000. – Vol. 56. – P. 735-740.

54. Shariat, S.F. Predictive value of cell cycle biomarkers in nonmuscle invasive bladder transitional cell carcinoma / S.F. Shariat, R. Ashfaq, A.I. Sagalowsky, Y. Lotan et al. // *J Urol.* – 2007. – Vol. 177. – P. 481-487.

55. Shariat, S.F. Combination of multiple molecular markers can improve prognostication in patients with locally advanced and lymph node positive bladder cancer / S.F. Shariat, D.C. Chade, P.I. Karakiewicz, R. Ashfaq, H. Isbarn, Y. Fradet et al. // *J Urol.* – 2010. – Vol. 183. – P. 68-75.

56. Shariat, S.F. Association of p53 and p21 expression with clinical outcome in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder / S.F. Shariat, J.Kim, G. Raptidis, G.E. Ayala, S.P.Lerner et al. // *Urology.* – 2003. – Vol. 61. – P. 1140-1145.

57. Fritsche, H-M. Characteristics and outcomes of patients with clinical T1 grade 3 urothelial carcinoma treated with radical cystectomy: results from an international cohort / H-M. Fritsche, M. Burger, R.S. Svatek, C. Jeldres, P.I. Karakiewicz, G. Novara et al. // *Eur Urol.* – 2010. – Vol. 57. – P. 300-309.

58. Du, J. p53 status correlates with the risk of progression in stage T1 bladder cancer: a meta-analysis / J. Du, S. Wang, Q. Yang, Q. Chen, X. Yao et al. // *World J Surg Oncol.* – 2016. – Vol. 14. – P. 137.

59. Zhou, X. p53 status correlates with the risk of recurrence in non-muscle invasive bladder cancers treated with bacillus Calmette–Guérin: a meta-analysis / X. Zhou, G. Zhang, Y. Tian et al. // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10. – P. e0119476.

60. Tetu, B. Prevalence and clinical significance of HER/2neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer / B. Tetu, Y. Fradet, P.Allard, C. Veilleux, N.Roberge, P. Bernard et al. // *J Urol.* – 1996. – Vol. 155. – P. 1784-1788.

61. Shariat, S.F. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality / S.F. Shariat, R. Ashfaq, P.I. Karakiewicz, O. Saeedi, A.I. Sagalowsky, Y. Lotan et al. // *Cancer.* – 2007. – Vol. 109. – P. 1106-1113.

62. Shariat, S.F. Survivin expression is associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma / S.F. Shariat, Y. Lotan, H. Saboorian, S.M. Khoddami, C.G. Roehrborn, K.M. Slawin et al. // *Cancer.* – 2004. – Vol. 100. – P. 751-757.

63. Frstrup, N. Cathepsin, E. maspin, Plk1, and survivin are promising prognostic protein markers for progression in non-muscle invasive bladder cancer / N. Frstrup, E. Cathepsin, // *Am J Pathol.* – 2012. – Vol. 180. – P. 1824-1834.
64. Jeon, C. Prognostic role of survivin in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis / C. Jeon, M. Kim, C. Kwak, H.H. Kim, J.H. Ku et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – P. e76719.
65. Xi, R.C. Expression of survivin and livin predicts early recurrence in non-muscle invasive bladder cancer / R.C. Xi, Y.R. Sheng, W.H. Chen , L. Sheng , J.J. Gang, Z. Tong et al. // *J Surg Oncol.* – 2013. – Vol. 107. – P. 550-554.
66. Ajili, F. Prognostic value of Bcl-2 and Bax tumor cell expression in patients with non muscle-invasive bladder cancer receiving bacillus Calmette–Guerin immunotherapy / F. Ajili, B. Kaabi, A. Darouiche, H. Tounsi, N. Kourda, M. Chebil et al. // *Ultrastruct Pathol.* – 2012. – Vol. 36. – P. 31-39.
67. Byrne, R.R. E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term followup / R.R. Byrne, S.F. Shariat, R. Brown, M.W. Kattan, R.A.J.R. Morton, T.M. Wheeler. et al. // *J Urol.* – 2001. – Vol. 165. – P. 1473-1479.
68. Xylinas, E. Blood- and tissue-based biomarkers for prediction of outcomes in urothelial carcinoma of the bladder / E. Xylinas, L.A. Kluth, Y. Lotan, S. Daneshmand, M. Rieken, P.I. Karakiewicz et al. // *Urol Oncol.* – 2014. – Vol. 32. – P. 230-242.
69. Zlotta, A. Long-term prognostic value of the combination of EORTC risk group calculator and molecular markers in non-muscle-invasive bladder cancer patients treated with intravesical bacille Calmette–Guérin / A. Zlotta, S. Alkhateeb, M. Neill, S. Bar-Moshe, B. Rhijn, D. Kakiashvili et al. // *Urol Ann.* – 2011. – Vol. 3. – P. 119.
70. Passoni, N. Cell-cycle markers do not improve discrimination of EORTC and CUETO risk models in predicting recurrence and progression of non–muscle-invasive high-grade bladder cancer / N. Passoni, B. Gayed, P. Kapur, A.I. Sagalowsky, S.F. Shariat, Y. Lotan et al. // *Urol Oncol Semin Orig Investig.* – 2016. – Vol. 34. – P. 485.e7–485.e14.

71. Shariat, S.F. p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer / S.F. Shariat, H. Tokunaga, J. Zhou, J. Kim, G.E. Ayala, F.W. Benedict et al. // *J Clin Oncol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 1014-1024.

72. Shariat, S.F. p53 predictive value for pT1-2 N0 disease at radical cystectomy / S.F. Shariat, Y. Lotan, P.I. Karakiewicz, R. Ashfaq, H. Isbarn, Y. Fradet et al. // *J Urol.* – 2009. – Vol. 182. – P. 907-913.

73. Stadler, W.M. Phase III study of molecularly targeted adjuvant therapy in locally advanced urothelial cancer of the bladder based on p53 status / Stadler WM, Lerner SP, Groshen S, Stein JP, Shi SR, Raghavan D et al. // W.M. Stadler, S.P. Lerner, S. Groshen, J.P. Stein, S.R. Shi, D. Raghavan et al. // *J Clin Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 3443-3449.

74. Chatterjee, S.J. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma / S.J. Chatterjee, R. Datar, D. Youssefzadeh, B. George, P.J. Goebell, J.P. Stein et al. // *J Clin Oncol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 1007-1013.

75. Shariat, S.F. Multiple biomarkers improve prediction of bladder cancer recurrence and mortality in patients undergoing cystectomy / S.F. Shariat, P.I. Karakiewicz, R. Ashfaq, S.P. Lerner, G.F. Palapattu, R.G. Cote et al. // *Cancer.* – 2008. – Vol. 112. – P. 315-325.

76. Shariat, S.F. Risk stratification of organ confined bladder cancer after radical cystectomy using cell cycle related biomarkers / S.F. Shariat, T.F. Chromecki, E.K. Cha, P.I. Karakiewicz, M. Sun, Y. Fradet et al. // *J Urol.* – 2012. – Vol. 187. – P. 457-462.

77. Shariat SF. Correlation of cyclin D1 and E1 expression with bladder cancer presence, invasion, progression, and metastasis / Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y et al. // *Hum Pathol.* – 2006. – Vol. 37. – P. 1568-1576.

78. Shariat, S.F. Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: a multicenter external validation study / S.F. Shariat, P.I. Karakiewicz, G. Godoy, J.A. Karam, R. Ashfaq, Y. Fradet et al. // *Clin Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15. – P. 7012-7019.

79. Zu, X. Vascular endothelial growth factor-C expression in bladder transitional cell cancer and its relationship to lymph node metastasis / *BJU Int.* – 2006. – Vol. 98. – P. 1090-1093.

80. Herrmann, E. VEGF-C, VEGF-D and Flt-4 in transitional bladder cancer: relationships to clinicopathological parameters and long-term survival / E. Herrmann , E. Eltze, S. Bierer, T. Köpke, T. Gorge, J. Neumann et al. // *Anticancer Res.* – 2007. – Vol. 27. – P. 3127-3133.

81. Margulis, V. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer / V. Margulis, Y. Lotan, P.I. Karakiewicz, Y. Fradet, R. Ashfaq, U. Capitanio et al. // *J Natl Cancer Inst.* – 2009. – Vol. 101. – P. 114-119.

82. Margulis, V. Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease / V. Margulis, S.F. Shariat, R. Ashfaq, A.I. Sagalowsky, Y. Lotan et al. // *Clin Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 7369-7373.

83. Bartsch, G. Expression profiling for bladder cancer: strategies to uncover prognostic factors / G.Bartsch, A.P. Mitra, R.G. Cote et al. // *Expert Rev Anticancer Ther.* – 2010. – Vol. 10. – P. 1945-1954.

84. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma / Cancer Genome Atlas Research N et al. // *Nature.* – 2014. – Vol. 507. – P. 315-322.

85. Oneyama, C. MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways / C. Oneyama, J. Ikeda, D. Okuzaki, K. Suzuki, T. Kanou, Y. Shintani et al. // *Oncogene.* – 2011. – Vol. 30. – P. 3489-3501.

86. Mitra, A.P. Potential role for targeted therapy in muscle-invasive bladder cancer: lessons from the cancer genome atlas and beyond / A.P. Mitra, S.P.Lerner et al. // *Urol Clin North Am.* – 2015. – Vol. 42. – P. 201-215.

87. Shariat, S.F. Correlation of preoperative levels of IGF-I and IGFBP-3 with pathologic parameters and clinical outcome in patients with bladder cancer / S.F.

Shariat, J. Kim, C. Nguyen, T.M. Wheeler, S.P. Lerner, K.M. Slawin et al. // *Urology*. – 2003. – Vol. 61. – P. 359-364.

88. Kim, J.H. Predictive value of expression of transforming growth factor- β 1 and its receptors in transitional cell carcinoma of the urinary bladder / J.H. Kim, S.F. Shariat, I.Y. Kim, A. Menesses-Diaz, H. Tokunaga, T.M. Wheeler et al. // *Cancer*. – 2001. – Vol. 92. – P. 1475-1483.

89. Shariat, S.F. Preoperative plasma levels of transforming growth factor β 1 strongly predict clinical outcome in patients with bladder carcinoma / S.F. Shariat, J.H. Kim, B. Andrews, M.W. Kattan, T.M. Wheeler, I.Y. Kim et al. // *Cancer*. – 2014. – Vol. 92. – P. 2985-2992.

90. Andrews, B. Preoperative plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor predict disease recurrence and survival of patients with bladder cancer / B. Andrews, S.F. Shariat, J.H. Kim, T.M. Wheeler, K.M. Slawin, S.P. Lerner et al. // *J Urol*. – 2001. – Vol. 167. – P. 1475-1481.

91. Masson-Lecomte, A. Inflammatory biomarkers and bladder cancer prognosis: a systematic review / A. Masson-Lecomte, M. Rava, F.X. Real, A. Hartmann, Y. Allory, N. Malats et al. // *Eur Urol*. – 2014. – Vol. 66. – P. 1078-1091.

92. Mbeutcha, A. Prognostic significance of markers of systemic inflammatory response in patients with non-muscle-invasive bladder cancer / A. Mbeutcha, S.F. Shariat, M. Rieken, M. Rink, E. Xylinas, C. Seitz et al. // *Urol Oncol*. – 2016. – Vol. 34. – P. 483.e17–483.e24.

93. Bernardini, S. Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer / S. Bernardini, S. Fauconnet, E. Chabannes, P.C. Henry, G. Adessi, H. Bittard et al. // *J Urol*. – 2001. – Vol. 166. – P. 1275-1279.

94. Rink, M. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer / M. Rink, F.K. Chun, S. Minner, M. Friedrich, O. Mauermann, H. Heinzer et al. // *BJU Int*. – 2011. – Vol. 107. – P. 1668-1675.

95. Rink, M. Prognostic role and HER2 expression of circulating tumor cells in peripheral blood of patients prior to radical cystectomy: a prospective study / M. Rink,

F.K. Chun, R. Dahlem , A. Soave , S. Minner , J. Hansen et al. // *Eur Urol.* – 2012. – Vol. 61. – P. 810-817.

96. Esrig, D. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer / D. Esrig , D. Elmajian , S. Groshen , J.A. Freeman , J.P. Stein , Chen SC et al. // *N Engl J Med.* – 1994. – Vol. 333. – P. 1259-1264.

97. Plimack, E.R. Defects in DNA repair genes predict response to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer / E.R. Plimack, R.L. Dunbrack , T.A. Brennan , M.D. Andrade , Y. Zhou , G.I. Serebriiskii et al. // *Eur Urol.* – 2015. – Vol. 68. – P. 959-967.

98. Liu, D. Clinical validation of chemotherapy response biomarker ERCC2 in muscle-invasive urothelial bladder carcinoma / D. Liu , E.R. Plimack , J. Hoffman-Censits , L.A. Garraway , J. Bellmunt , E. Van Allen et al. // *JAMA Oncol.* – 2016. – Vol. 2. – P. 1094-1096.

99. Xu, Z.C. ERCC1 C118T polymorphism has predictive value for platinum-based chemotherapy in patients with late-stage bladder cancer / Z.C. Xu, H.Z. Cai , X. Li , W.Z. Xu , T. Xu , B. Yu et al. // *Genet Mol Res.* – 2016.

100. Iyer, G. Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity / G. Iyer , A.J. Hanrahan, M.I. Milowsky, H. Al-Ahmadie, S.N. Scott, M. Janakiraman et al. // *Science.* – 2012. – Vol. 338. – P. 221.

101. Rosenberg, J.E. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial / J.E. Rosenberg , J. Hoffman-Censits , T. Powles , M.S. van der Heijden , A.V. Balar, A. Necchi et al. // *Lancet.* – 2016. – Vol. 387. – P. 1909-1920.

102. Sharma, P. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial / P. Sharma, M. Retz, A. Siefker-Radtke, A. Baron, A. Necchi , J. Bedke et al. // *Lancet Oncol.* – 2017. – Vol. 18. – P. 312-322.

103. Bellmunt, J. Pembrolizumab as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma / J. Bellmunt , R. de Wit , D.J. Vaughn , Y. Fradet , L.J. Lee , L. Fong et al. // *N Engl J Med.* – 2017. – Vol. 376. – P. 1015-1026.

104. Balar, A.V. Bellmunt Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial / A.V. Balar , M.D. Galsky , J.E. Rosenberg , T. Powles , D.P. Petrylak , J. Bellmunt et al. // *Lancet.* – 2017. – Vol. 389. – P. 67-76.

105. Powles, T. Efficacy and safety of durvalumab in locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: updated results from a phase 1/2 open-label study / T. Powles , P.H. O'Donnell , C. Massard , H.T. Arkenau , T.W. Friedlander , C.J. Hoimes et al. // *JAMA Oncol.* – 2017.

106. Apolo, A.B. Avelumab, an anti-programmed death-ligand 1 antibody, in patients with refractory metastatic urothelial carcinoma: results from a multicenter, phase Ib study / *J Clin Oncol.* – 2017. – Vol. 35. – P. 2117-2124.

107. Sharma, P. Nivolumab monotherapy in recurrent metastatic urothelial carcinoma (CheckMate 032): a multicentre, open-label, two-stage, multi-arm, phase 1/2 trial / P.Sharma , M.K. Callahan , P. Bono , J. Kim , P. Spiliopoulou , E. Calvo et al. // *Lancet Oncol.* – 2016. – Vol. 17.: – P. 590-1598.

108. Massard, C. Safety and efficacy of durvalumab (MEDI4736), an anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint, in patients with advanced urothelial bladder cancer / C. Massard , M.C. Gordon , S. Sharma , S. Rafii, Z.A. Wainberg, J. Luke et al. // *J Clin Oncol.* – 2016. – Vol. 34. – P. 3119-3125.

109. Xylinas, E. Association of T-cell co-regulatory protein expression with clinical outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder / E. Xylinas , B.D. Robinson , L.A. Kluth , B.G. Volkmer , R. Hautmann , R. Küfer et al. // *Eur J Surg Oncol.* – 2014. – Vol. 40. – P. 121-127.

110. Shariat, S.F. Immune therapy meets precision medicine / Shariat SF, Gust KM et al. // *Lancet Oncol.* – 2017. – Vol. 18. – P. 271-273.

111. Mariapia Viola-Magni. Bladder Cancer Markers and Recent Innovations, Bladder Cancer - Management of NMI and Muscle-Invasive Cancer, M. Hammad Ather, IntechOpen, DOI: 10.5772/67309 / Mariapia Viola-Magni, Samuela Cataldi and Daniela Marocco et al. // Available from: <https://www.intechopen.com/books/bladder-cancer-management-of-nmi-and-muscle-invasive-cancer/bladder-cancer-markers-and-recent-innovations>.
112. Masayoshi Nagata, Satoru Muto, Shigeo Horie, "Molecular Biomarkers in Bladder Cancer: Novel Potential Indicators of Prognosis and Treatment Outcomes", Disease Markers, vol. 2016, Article ID 8205836, 5 pages, 2016.
113. Chijiwa, T. Establishment of patient-derived cancer xenografts in immunodeficient NOG mice / T. Chijiwa, K. Kawai, A. Noguchi, H. Sato, A. Hayashi, H. Cho, et al. // *Int J Oncol.* – 2015. – Vol. 47. – P. 61-70.
114. Gong, Z. Establishment of a novel bladder cancer xenograft model in humanized immunodeficient mice / Z. Gong, H. Xu, Y. Su, W. Wu, L. Hao, C. Han, // *Cell Physiol Biochem.* – 2015. – Vol. 37. – P. 1355-1368.
115. Carbone, L. Pain in laboratory animals: The ethical and regulatory imperatives / L. Carbone, // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – P. e21578.
116. Langford, D.J. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse / D.J. Langford, A.L. Bailey, M.L. Chanda, S.E. Clarke, T.E. Drummond, S. Echols, et al. // *Nat Methods.* – 2010. – Vol. 7. – P. 447-449.
117. Girard, P. Nefopam and ketoprofen synergy in rodent models of antinociception / P. Girard, D. Verniers, M.C. Coppé, Y. Pansart, J.M. Gillardin, // *Eur J Pharmacol.* – 2008. – Vol. 584. – P. 263-271.
118. Imfinzi™ (durvalumab): US Prescribing Information; 2017. Access on December 04, 2018.
119. Stewart, R. Identification and characterization of MEDI4736, an antagonistic anti-PD-L1 monoclonal antibody / R. Stewart, M. Morrow, S.A. Hammond, K. Mulgrew, D. Marcus, E. Poon, et al. // *Cancer Immunol Res.* – 2015. – Vol. 3. – P. 1052-1062.
-

120. Antonia, S. Safety and antitumour activity of durvalumab plus tremelimumab in non-small cell lung cancer: A multicentre, phase 1b study / S. Antonia, S.B. Goldberg, A. Balmanoukian, J.E. Chaft, R.E. Sanborn, A. Gupta, et al. // *Lancet Oncol.* – 2016. – Vol. 17. – P. 299-308.

121. Geran, R.I. Protocols for screening chemical agents and natural products against tumor and other biological systems / R.I. Geran, N.H. Greenberg, M.M. MacDonald, A.M. Schumacher, B.J. Abbott, // *Cancer Chemother Rep.* – 1972. – Vol. 3. – P. 100-103.

122. Hodgson, A. PD-L1 immunohistochemistry assay concordance in urothelial carcinoma of the bladder and hypopharyngeal squamous cell carcinoma / A. Hodgson, E. Slodkowska, A. Jungbluth, S.K. Liu, D. Vesprini, D. Enepekides, et al. // *Am J Surg Pathol.* – 2018. – Vol. 42. – P. 1059-1066.

123. Pichler, R. PD-L1 expression in bladder cancer and metastasis and its influence on oncologic outcome after cystectomy / R. Pichler, I. Heidegger, J. Fritz, M. Danzl, S. Sprung, B. Zelger, et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – P. 66849-66864.

124. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy / D.M. Pardoll, // *Nat Rev Cancer.* – 2012. – Vol. 12. – P. 252-264.

125. Davick, J.J. PD-L1 expression in tumor cells and the immunologic milieu of bladder carcinomas: a pathologic review of 165 cases / J.J. Davick, H.F. Frierson, M. Smolkin, A.A. Gru, // *Hum Pathol.* – 2018. – Vol. 81. – P. 184-191.

126. Soukup, V. Prognostic performance and reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization grading classification systems in non-muscle-invasive bladder cancer: a European association of urology non-muscle invasive bladder cancer guidelines panel systematic review / V. Soukup, O. Capoun, D. Cohen, V. Hernandez, M. Babjuk, M. Burger, et al. // *Eur Urol.* – 2017. – Vol. 72. – P. 801-813.

127. Sylvester, R.J. Predicting Recurrence and Progression in Individual Patients with Stage Ta T1 Bladder Cancer Using EORTC Risk Tables: A Combined Analysis of 2596 Patients from Seven EORTC Trials / R.J. Sylvester, A.P. van der

Meijden, W. Oosterlinck, J.A. Witjes, C. Bouffieux, L. Denis, D.W. Newling, K. Kurth // *Eur. Urol.* – 2006. – Vol. 49. – P. 466-477.

128. Wang, C.-C. Biological significance of GATA3, cytokeratin 20, cytokeratin 5/6 and p53 expression in muscle-invasive bladder cancer / C.-C. Wang, Y.-C. Tsai, Y.-M. Jeng, // *PLoS ONE.* – 2019. – Vol. 14. – P. e0221785.

129. Lerner, S.P. Bladder cancer molecular taxonomy: summary from a consensus meeting / S.P. Lerner, D.J. McConkey, K.A. Hoadley, K.S. Chan, W.Y. Kim, F. Radvanyi, et al. // *Bladder Cancer.* – 2016. – Vol. 2. – P. 37-47.

130. Dadhania, V. Meta-analysis of the luminal and basal subtypes of bladder cancer and the identification of signature immunohistochemical markers for clinical use / V. Dadhania, M. Zhang, L. Zhang, J. Bondaruk, T. Majewski, A. Siefker-Radtke, et al. // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 12. – P. 105-117.

131. Eifler, J.B. Management of noninvasive bladder cancers / J.B. Eifler, K.R. Scarpato, P.E. Clark, // *Curr Opin Oncol.* – 2015. – Vol. 27. – P. 185-190.

132. Shi, L. The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies / L. Shi, S. Chen, L. Yang, Y. Li // *J Hematol Oncol.* – 2013. – Vol. 6. – P. 74.

133. Liu, Z.H. Effects of programmed death-ligand 1 expression on OK-432 immunotherapy following transurethral resection in non-muscle invasive bladder cancer / Z.H. Liu, F.F. Zheng, Y.L. Mao, L.F. Ye, J. Bian, D.H. Lai, et al. // *Oncol Lett.* – 2017. – Vol. 13. – P. 4818-4824.

134. Brower, V. Anti-PD-L1 inhibitor durvalumab in bladder cancer / V. Brower, // *Lancet Oncol.* – 2016. – Vol. 17. – P. e275.

135. Blinova, E.V. Novel aminochromone derivative inhibits tumor growth on xenograft model of lung cancer in mice / E.V. Blinova, M.O. Dudina, I.R. Suslova, E.A. Samishina, D.S. Blinov, D.A. Roshchin // *J Adv Pharm Technol Res.* – 2018. – Vol. 9. – P. 130-134.

136. Boorjian, S.A. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: Clinicopathologic correlations and association with survival / S.A. Boorjian,

Y. Sheinin, P.L. Crispen, S.A. Farmer, C.M. Lohse, S.M. Kuntz, et al. // *Clin Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 4800-4808.

137. Huebner, D. An orthotopic xenograft model for high-risk non-muscle invasive bladder cancer in mice: influence of mouse strain, tumor cell count, dwell time and bladder pretreatment / D. Huebner, C. Rieger, R. Bergmann, M. Ullrich, S. Meister, M. Toma, et al. // *BMC Cancer.* – 2017. – Vol. 17. – P. 790.

138. Nakanishi, J. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers / J. Nakanishi, Y. Wada, K. Matsumoto, M. Azuma, K. Kikuchi, S. Ueda, // *Cancer Immunol Immunother.* – 2007. – Vol. 56. – P. 1173-1182.

139. Xylinas, E. Hautmann, Association of T-cell co-regulatory protein expression with clinical outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder / E. Xylinas, B.H. Robinson, L.A. Kluth, B.J. Volkmer, R. Hautmann, R. Kufer, et al. // *Eur J Surg Oncol.* – 2014. – Vol. 40. – P. 121-127.

140. Boorjian, S.A. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival / S.A. Boorjian, Y. Sheinin, P.L. Crispen, S.A. Farmer, C.M. Lohse, S.M. Kuntz, et al. // *Clin Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 4800-4808.

141. Breyer, J. High PDL1 mRNA expression predicts better survival of stage pT1 non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) patients / J. Breyer, R.M. Wirtz, W. Otto, P. Erben, T.S. Worst, R. Stoehr, et al. // *Cancer Immunol Immunother.* – 2018. – Vol. 67. – P. 403-412.

142. Kawahara, T. PD-1 and PD-L1 are more highly expressed in high-grade bladder cancer than in low-grade cases: PD-L1 might function as a mediator of stage progression in bladder cancer / T. Kawahara, Y. Ishiguro, S. Ohtake, I. Kato, Y. Ito, H. Ito, et al. // *BMC Urol.* – 2018. – Vol. 18. – P. 97.

143. Dong, H. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion / H. Dong, G. Zhu, G. Tamada, L. Chen, // *Nat Med.* – 1999. – Vol. 5. – P. 1365-1369.

144. Massard, C. Safety and efficacy of durvalumab (MEDI4736), an anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint inhibitor, in patients with advanced urothelial bladder cancer / C. Massard, M.S. Gordon, S. Sharma, S. Rafii, Z.A. Wainberg, J. Luke, et al. // *J Clin Oncol.* – 2016. – Vol. 34. – P. 3119-3125.
145. Patel, S.P. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy / S.P. Patel, R. Kurzrock, // *Mol Cancer Ther.* – 2015. – Vol. 14. – P. 847-856.
146. Descamps-Dudez, O. Heterogeneity in PD-L1 expression and CD8+ infiltrates in low grade versus high grade serous ovarian carcinomas. Personal communication, 2016.
147. Ventana PD-L1 (SP263) Assay staining in urothelial carcinoma. Interpretation guide. Date of access December 26, 2019.
148. Blinova, E. Relapse-free survival and PD-L1 expression in first high- and low-grade relapsed luminal, basal and double-negative p53-mutant non-muscular invasive bladder cancer depending on previous chemo- and immunotherapy / E. Blinova, D. Enikeev, D. Roshchin, E. Samishina, O. Deriabina, A. Tertichnyy, et al. // *Cancers.* – 2020. – Vol. 12. – P. 1316.
149. Prognostic Role of *FGFR3* Expression Status and Tumor-Related MicroRNAs Level in Association with PD-L1 Expression in Primary Luminal Non-Muscular Invasive Bladder Carcinoma / E. Blinova, A. Buzdin, D. Enikeev, P. Zhdanov [et al.] // *Life.* – 2020. – Vol. – 10. – P.305.
150. Huang, T. The integrative network of gene expression, MicroRNA, methylation and copy number variation in colon and rectal cancer / T. Huang, B.-Q. Li, and Y.-D. Cai, // *Curr. Bioinform.* – 2016. – Vol. 11. – P. 59-65.
151. Liu, G. Identification of miR-200c and miR141-Mediated lncRNA-mRNA Crosstalks in Muscle-Invasive Bladder Cancer Subtypes / G. Liu, Z. Chen, I.G. Danilova, M.A. Bolkov, I.A. Tuzankina, and G. Liu, // *Front. Genet.* – 2018. – Vol. 9. – P. 422.

152. Fang, Z. Circulating miR-205: A promising biomarker for detection and prognosis evaluation of bladder cancer / Z. Fang, W. Dai, X. Wang, Chen, W. C. Shen, G. Ye, L. Li, // *Tumor. Biol.* – 2016. – Vol. 37. – P. 8075-8082.
153. Yun, S.J. Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer / S.J. Yun, P. Jeong, W. Kim, T.H. Kim, Y. Lee, P.H. Song, et al. // *Int. J. Oncol.* – 2012. – Vol. 41. – P. 1871-1878.
154. Borkowska, E.M. MicroRNAs Which Can Prognosticate Aggressiveness of Bladder Cancer / E.M. Borkowska, T. Konecki, M. Pietrusiński, M. Borowiec, Z. Jabłonowski, // *Cancers.* – 2019. – Vol. 11. – P. 1551.
155. Lee, J.Y. Aberrantly expressed microRNAs in the context of bladder tumorigenesis / J.Y. Lee, D.S. Ryu, W.J. Kim, S.J. Kim, // *Investig. Clin. Urol.* – 2016. – Vol. 57. – P. S52-S59.
156. Kang, H.W. Expression levels of FGFR3 as a prognostic marker for the progression of primary pT1 bladder cancer and its association with mutation status / Kang, H.W.; Kim, Y.; Jeong, P.; Park, C.; Kim, W.T.; Ryu, D.H. et al. // *Oncol. Let.* – 2017. – Vol. 14. – P. 3817-3824.
157. Neuzillet, Y. FGFR3 mutations, but not FGFR3 expression and FGFR3 copy-number variations, are associated with favourable non-muscle invasive bladder cancer / Y. Neuzillet, van B.W. Rhijn, N.L. Prigoda, B. Bapat, L. Liu, P.J. Bostrom, et al. // *Virchows Arch.* – 2014. – Vol. 465. – P. 207-213.
158. Said, N. Absence of host-secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) augments peritoneal ovarian carcinomatosis / N. Said, K. Motamed, et al. // *Am J Pathol.* – 2005. – Vol. 167. – P. 1739-1752.
159. Pendleton, C. Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs. bone marrow: In vitro comparison of their tropism towards gliomas / C. Pendleton, Q. Li, D.A. Chesler, K. Yuan, H. Guerrero-Cazares, A. Quinones-Hinojosa, et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – P. e58198.
160. Hodi, F.S. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma / F.S. Hodi, S.J. O'Day, D.F. McDermott, R.W. Weber, J.A. Sosman, J.B. JHaanen, et al. // *N Engl J Med.* – 2010. – Vol. 363. – P. 711-723.

161. Topalian, S.L. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer / S.L. Topalian, F.S. Hodi, J.R. Brahmer, S.N. Gettinger, D.S. Smith, D.F. McDermott, et al. // *N Engl J Med.* – 2012. – Vol. 366. – P. 2443-2454.
162. Vandeveer, A.J. Systemic immunotherapy of non-muscle invasive mouse bladder cancer with avelumab, an anti-PD-L1 immune checkpoint inhibitor / A.J. Vandeveer, J.K. Fallon, R. Tighe, H. Sabzevari, J. Schlom, Greiner, J.W et al. // *Cancer Immunol Res.* – 2015. – Vol. 4. – P. 1-12.
163. Bellmunt, J. Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma / J. Bellmunt, S.A. Mullane, L. Werner, A.B. Fay, M. Callea, J.J. Leow, et al. // *Ann Oncol.* – 2015. – Vol. 26. – P. 812-817.
164. Carosella, E.D. A systematic review of immunotherapy in urologic cancer: Evolving roles for targeting of CTLA-4, PD-1/PD-L1, and HLA-G / E.D. Carosella, G. Ploussard, J. LeMaout, F. Desgrandchamps, et al. // *Eur Urol.* – 2015. – Vol. 68. – P. 267-279.
165. Fuge, O. Immunotherapy for bladder cancer / O. Fuge, N. Vasdev, P. Allchorne, J.S. Green, et al. // *Res Rep Urol.* – 2015. – Vol. 7. – P. 65-79.
166. Jovanovic, D. Membrane PD-L1 expression and soluble PD- L1 plasma levels in idiopathic pulmonary fibrosis—a pilot study / D. Jovanovic, M. Roksandic Milenkovic, J. Kotur Stevuljevic, J. Markovic, V. Ceriman, M. Kontic, V. Skodric Trifunovic, et al. // *J Thorac Dis.* – 2018. – Vol. 12. – P. 6660-6669.
167. Davick, J.J. PD-L1 expression in tumor cells and the immunologic milieu of bladder carcinomas: a pathologic review of 165 cases / J.J. Davick, H.F. Frierson, M. Smolkin, A.A. Gru, et al. // *Hum Pathol.* – 2018. – Vol. 81. – P. 184-191.
168. Wankowicz, S.A.M. Differential expression of PD-L1 in high grade T1 vs muscle invasive bladder carcinoma and its prognostic implications / S.A.M. Wankowicz, L. Werner, A. Orsola, J. Novak, M. Bowden, T.K. Choueiri, et al. // *J Urol.* – 2017. – Vol. 198. – P. 817-823.
169. Kang, H.W. Expression levels of FGFR3 as a prognostic marker for the progression of primary pT1 bladder cancer and its association with mutation status /

H.W. Kang, Y. Kim, P. Jeong, C. Park, W.T. Kim, D.H. Ryu, et al. // *Oncol. Let.* – 2017. – Vol. 14. – P. 3817-3824.

170. Neuzillet, Y. FGFR3 mutations, but not FGFR3 expression and FGFR3 copy-number variations, are associated with favourable non-muscle invasive bladder cancer / Y. Neuzillet, B.W. van Rhijn, N.L. Prigoda, B. Bapat, L. Liu, P.J. Bostrom, et al. // *Virchows Arch.* – 2014. – Vol. 465. – P. 207-213.

171. Yun, S.J. Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer / S.J. Yun, P. Jeong, W. Kim, T.H. Kim, Y. Lee, P.H. Song, et al. // *Int. J. Oncol.* – 2012. – Vol. 41. – P. 1871-1878.

172. Zhu, J. Feedback Loop Formed by ATG7/Autophagy, FOXO3a/miR-145 and PD-L1 Regulates Stem-Like Properties and Invasion in Human Bladder Cancer / J. Zhu, Y. Li, Y. Luo, J. Xu, H. Liufu, Z. Tian, C. Huang, J. Li, C. Huang, et al. // *Cancers.* – 2019. – Vol. 11. – P. 349
