

Молекулярные детерминанты рецидива уротелиальной опухоли человека

В.Ю. Старцев^{1,2}, А.Е. Балашов², А.С. Мерзляков³, С.Л. Воробьев⁴, Е.С. Козорезова⁴

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России; Россия, 194100 Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2;

²ООО «Многопрофильная клиника «Медси Санкт-Петербург»; Россия, 191125 Санкт-Петербург, ул. Марата, 6;

³Консультативно-диагностический центр СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 112»; Россия, 195427 Санкт-Петербург, ул. Тимуровская, 17, корп. 3;

⁴ООО «Национальный центр морфологической диагностики»; Россия, 192283, Санкт-Петербург, ул. Олеко Дундича, 8, корп. 2

Контакты: Андрей Евгеньевич Балашов hakas.05@mail.ru

Введение. Уротелиальная карцинома (УТК) – агрессивное заболевание со склонностью к частому рецидивированию. Прогноз развития рецидивов УТК с помощью современных средств клинической диагностики затруднен, поэтому особую актуальность приобретает развитие возможностей патоморфологического исследования опухолевых тканей.

Материалы и методы. Изучены материалы публикаций (PubMed, CrossRef) за 1990–2021 гг., посвященных вопросам выбора биомаркеров для диагностики УТК, анализу молекулярных путей прогрессирования и метастазирования. Поиск проводили по ключевым фразам «уротелиальная карцинома», «рецидив уротелиальной карциномы», «стволовые клетки», «биомаркеры рака мочевого пузыря», «генетические изменения уротелия», «циркулирующая опухлевая ДНК».

Результаты. Раковые стволовые клетки служат источником рецидива УТК после удаления первичного очага, локализуясь в любых участках уротелия, а также вне основного очага опухоли, и характеризуются общим генотипом, но различными фенотипическими проявлениями. Для прогноза рецидива УТК целесообразно использование экспрессионных сигнатур генов, поскольку для подтипов УТК характерны четкие профили экспрессии генов. Для подтверждения клинического значения полученных данных необходимы большая выборка и независимый набор данных. Комбинированные биомаркеры обеспечивают прогнозирование поведения УТК, а мутации *FGFR3* и *TP53* могут служить компонентами для панели прогноза рецидива УТК. Использование метода жидкостной биопсии с определением уровня циркулирующей опухолевой ДНК – перспективный метод диагностики, нуждающийся в оценке результатов инициированного рандомизированного исследования.

Заключение. Накопление знаний о молекулярных паттернах УТК позволит преодолеть разрыв между результатами молекулярно-генетической и клинической диагностики. Молекулярные изменения УТК демонстрируют высокий потенциал для определения сроков рецидива опухоли, оценки безрецидивной выживаемости пациентов и планирования ресурсной базы системы здравоохранения.

Ключевые слова: уротелиальная карцинома, рецидив рака мочевого пузыря, биомаркер, мутация, жидкостная биопсия, циркулирующая опухолевая ДНК

Для цитирования: Старцев В.Ю., Балашов А.Е., Мерзляков А.С. и др. Молекулярные детерминанты рецидива уротелиальной опухоли человека. Онкоурология 2021;17(3):130–9. DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-3-130-139.

Molecular determinants of recurrences of the human urothelial tumor

V.Yu. Startsev^{1,2}, A.E. Balashov², A.S. Merzlyakov³, S.L. Vorobiov⁴, E.S. Kozorezova⁴

¹Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Litovskaya St., Saint-Petersburg 194100, Russia;

²Multidisciplinary Clinic “Medsi Saint-Petersburg”; 6 Marata St., Saint-Petersburg 191125, Russia;

³Consulting and Diagnostic Center, City Polyclinic No. 112; Build. 3, 17 Timurovskaya St., Saint-Petersburg 195427, Russia;

⁴National Center for Clinical Morphological Diagnostics; Build. 2, 8 Oleko Dundicha St., Saint-Petersburg 192283, Russia

Contacts: Andrey Evgen'evich Balashov hakas.05@mail.ru

Background. Urothelial carcinoma (UTC) is an aggressive disease with a known propensity for frequent recurrence. It is difficult to predict the velocity of the development of UTC recur using modern means of clinical diagnostics. Therefore, the development of the capabilities of histo-morphological study of tumor tissues is of particular relevance.

Materials and methods. The materials of publications (PubMed, CrossRef) for 1990–2021, devoted to the choice of biomarkers for the diagnosis of UTC, the analysis of molecular pathways, progression and metastasis, were studied. The search was carried out for the key phrases “urothelial carcinoma”, “recurrent UTK”, “stem cells”, “biomarkers of bladder cancer”, “genetic changes in urothelium”, “circulating tumor DNA”.

Results. Cancer stem cells serve as a source of UTC recurrence after removal from the primary focus, localizing in any areas of the urothelium, as well as outside the main tumor focus and are characterized by a common genotype, but different phenotypic manifestations. To predict the recurrence of the tumour is advisable to use gene expression signatures, since the subtypes of UTC are characterized by clear gene expression profiles. A larger sample and independent dataset is needed to confirm the clinical significance of the findings. Combined biomarkers predict UTC behavior, and *FGFR3* and *TP53* mutations can be components for a panel for predicting UTC recurrence. The use of the liquid biopsy method with the determination of the level of circulating tumor DNA is a promising diagnostic method that needs to evaluate the results of an initiated randomized trial.

Conclusion. The accumulation of knowledge base about the molecular patterns of UTC will help bridge the gap between the results of molecular genetic and clinical diagnostics. Molecular changes in the transitional cell UTC demonstrates a high potential for determining the timing of tumor recurrence, assessing disease-free survival of patients and for planning the resource base of the healthcare system.

Key words: urothelial carcinoma, recurrent bladder cancer, biomarker, mutation, fluid biopsy, circulating tumor DNA

For citation: Startsev V.Yu., Balashov A.E., Merzlyakov A.S. et al. Molecular determinants of recurrences of the human urothelial tumor. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2021;17(3):130–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-3-130-139.

Введение

Уротелиальная карцинома (УТК) – гетерогенное заболевание с различными морфологическими и клиническими проявлениями, частота развития рецидива которого в течение 12–24 мес составляет 50–90 % [1]. При этом вероятность прогрессии УТК в мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (МИРМП) оценивается на уровне 25 %, и половина таких пациентов умирают от осложнений метастатического процесса [2, 3].

Несмотря на активное развитие методов диагностики и лечения пациентов с этим агрессивным заболеванием, прогноз поведения опухоли до сих пор неясен. Кроме этого, расходы на обеспечение пациентов с УТК в системе здравоохранения преобладающего большинства стран остаются высокими, что позволяет говорить о медико-социальной значимости этой патологии. Изучение молекулярных основ рецидива УТК как прогностического критерия управления темпами роста этой опухоли представляется актуальным.

Материалы и методы

Изучены материалы публикаций отечественной и зарубежной медицинской литературы (PubMed, CrossRef) за 1990–2021 гг., посвященных вопросам выбора биомаркеров для диагностики УТК, анализу молекулярных путей, прогрессирования и метастазирования. Поиск проводили по ключевым фразам «уротелиальная карцинома», «рецидив уротелиальной карциномы», «стволовые клетки», «биомаркеры рака мочевого пузыря», «генетические изменения уротелия», «циркулирующая опухолевая ДНК».

Результаты

Существует утверждение, что свойства УТК как злокачественной опухоли обусловлены клональной экспансией раковых стволовых клеток (РСК) [4], которые размножаются путем асимметричной дифференцировки, перерождаясь в гетерогенные линии раковых клеток. Разная дифференцировка опухолевых клонов приводит к тому, что одна дочерняя клетка сохраняет способность к делению, а другая склонна к генетической пластичности. РСК обладают уникальным набором генетических и эпигенетических признаков. Так, в уротелиальных РСК могут встречаться мутации генов *FGFR3* или *TP53* (см. таблицу).

Карциномы мочевого пузыря развиваются по 2 патогенетическим путям, различаясь фено- и генотипом, а также характеристиками биологического поведения и клинического исхода: неинвазивные УТК low grade (LG) с активирующими мутациями в *FGFR3* (папиллярные карциномы с ограниченной генетической нестабильностью); УТК high grade (HG) с генетическими или эпигенетическими изменениями в *TP53* или в *p16*, регулирующем ген *TP53* [5, 6].

Мутации генов *FGFR3* и *TP53* характеризуются 2 путями развития в папиллярном немусечно-инвазивном раке мочевого пузыря (НМИРМП) и МИРМП (см. таблицу) [7, 8]. D. Lindgren и соавт. считали, что в 5 % случаев в УТК встречаются мутации обоих типов (*FGFR3* и *TP53*), предполагая 3-й путь, приводящий к УТК HG [6]. В свою очередь, A. Lopez-Beltran и соавт., S. Lacy и соавт. прогнозировали вероятность прогрессии УТК LG на основе мутации *TP53* [9, 10].

Пути канцерогенеза при уротелиальной карциноме с современных позиций [4]

Ways of carcinogenesis in urothelial carcinoma from modern positions [4]

Характеристика Characteristic	<i>FGFR3</i>	<i>TP53</i>
Уротелиальная карцинома Urothelial carcinoma	Низкая степень, немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря Low grade, non-muscle invasive bladder cancer	Высокая степень, мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря High grade, muscle invasive bladder cancer
Молекулярный механизм Molecular mechanism	Активация киназ Kinase activation	Регуляция клеточного цикла, репарация ДНК и апоптоз Cell cycle regulation, DNA repair and apoptosis
Задействованные геномные пути Genomic pathways involved	<i>Ras</i> , <i>STAT1</i> , <i>циклин D1</i> <i>Ras</i> , <i>STAT1</i> , <i>cyclin D1</i>	<i>Rb</i> , <i>p21</i> , <i>Bax</i> , <i>Bcl2</i> , <i>TSP1</i>
Влияние обнаружения мутации Impact of mutation detection		
Прогноз Prognosis	Благоприятный Favorable	Плохой Bad
Степень злокачественности Grade	Низкая Low	Высокая High
Стадия опухоли Stage	Низкая Low	Высокая High

Позже L. Wang и соавт. подтвердили значение *TP53* в качестве гена-супрессора опухолей для поддержания стабильности генома, реакции на генотоксический стресс и активации клеточного апоптоза, показав, что экспрессия *TP53* значительно выше в НМИРМП НГ по сравнению с таковой в папиллярных опухолях с низким злокачественным потенциалом (PUNLMP) и неинвазивной УТК LG [11].

На сегодня известно, что УТК развиваются в результате изменения «опухолевого поля» [12] и клональной экспансии РСК с набором генетических, эпигенетических и фенотипических биологических особенностей [13]. Теория «опухолевого поля» доказывает воздействие трансформирующих факторов на большую площадь уротелия, которые индуцируют выработку РСК, занимающих все поле слизистой оболочки [14].

В подтверждение этой теории Т.Д. Jones и соавт. исследовали 58 опухолей у 21 пациента после эндоскопического удаления мультифокальных УТК: у всех пациентов выявлено 2–4 отдельных очага рака [15].

А.В. Armstrong и соавт. изучили 17 образцов УТК с использованием секвенирования ДНК и иммуногистохимического исследования *p53*: 5 из 17 опухолей содержали точковые мутации *TP53* в экзонах 5 и 8 [16]. Мутации были идентичны в обоих (эпителиальном и саркоматоидном) компонентах. Это послужило основанием для теории развития элементов УТК из общей клетки-предшественника, что приблизило исследователей к пониманию сущности рецидива УТК.

Раковые стволовые клетки мочевого пузыря распознаются по свойствам образования колоний, самообновлению, высокой скорости пролиферации и экспрессии генов, связанных со стволовыми клетками [17]. Y. Atashi и соавт. исследовали экспрессию OCT4, маркера клеток-предшественников: в 97 % случаев УТК с высокой степенью экспрессии OCT4 подтверждено существование трансформированных клеток-предшественников опухолей [18]. Другие исследователи показали, что РСК способны самообновляться и дифференцироваться с образованием колоний и опухолей [19].

Большинство случаев МИРМП возникает из карциномы *in situ* (CIS), плоского поверхностного поражения уротелия с мутациями *TP53*, составляя 10 % от числа всех диагностированных УТК [20]. CIS считается облигатным предраком, а сопутствующие CIS ассоциированы с худшим прогнозом [21]. В большинстве случаев при эндоскопическом лечении происходит удаление дифференцированных клеток, наиболее чувствительных к терапии, чем РСК [22, 23], но пролиферация и клональная экспансия в том числе «ускользнувших» РСК приводят к повторным злокачественным новообразованиям.

Таким образом, роль РСК в развитии рецидива УТК: 1) источник рецидива опухоли после удаления первичного очага; 2) локализованы в участках уротелия, вне основного очага опухоли; 3) общий генотип РСК с различными фенотипическими проявлениями (общий генотип РСК и УТК).

Мутация *FGFR3* и низкий риск рецидивирования уротелиальной карциномы

Более 70 % случаев НМИРМП LG содержат мутации *FGFR3*, что является ключевой находкой для патогенеза УТК LG [10]. *FGFR3* — ген семейства рецепторов фактора роста фибробластов в хромосоме 4p16.3, состоит из 19 экзонов, кодирующий белок из 806 аминокислот. Кодируемый белок включает внеклеточную зону с 3 иммуноглобулиноподобными доменами, гидрофобный трансмембранный сегмент, цитоплазматический домен тирозинкиназы, оказывающий влияние на рост, миграцию, дифференцировку и ангиогенез клеток [8, 24].

Путь передачи сигнала для рецепторов *FGFR3* общий для всех тирозинкиназ. Активация *FGFR3* запускает клеточный цикл RAS, индуцирующий митогенные сигналы, с влиянием на пролиферацию и обновление эпителиальных клеток, а также запускает фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3-K) [25, 26].

В 2002 г. В. W. van Rhijn и соавт. исследовали биоптаты 72 пациентов с УТК, выявив мутацию *FGFR3* в 64,2 % случаев УТК pTaG₁₋₂ и ни у одного из 19 пациентов с опухолями более высокой стадии [27]. Те же авторы через 2 года сообщили, что мутации *FGFR3* способствуют росту опухолевых клеток, но механизм регуляции клеточного цикла и апоптоза остается неизменным, в отличие от УТК с мутациями *TP53*, нарушающими механизм апоптоза [28]. В ходе дальнейших исследований (2006–2007) показано, что частота мутаций *FGFR3* в опухолях pTa составила 70–80 % и эти мутации ассоциированы с УТК LG и низкой частотой рецидивов [29–31].

В исследовании S. Hernandez и соавт. обнаружена наибольшая распространенность мутаций *FGFR3* среди УТК LG (77 %) стадий pTaG₁ и TaG₂ (61 и 58 % соответственно) по сравнению с УТК стадий pTaG₃ и pT1G₃ (34 и 17 % соответственно) [30].

F. Barbisan и соавт. выявили повышенную экспрессию *FGFR3* в 81 % случаев PUNLMP, сделав вывод о взаимной корреляции [32], а С. Lott и соавт. и ряд других авторов — в инвертированных папилломах мочевого пузыря [33].

Мутация *TP53* как риск высокой вероятности рецидива уротелиальной карциномы

Ген-супрессор *TP53* на хромосоме 17 (17p13.1) состоит из 11 экзонов и кодирует белок из 393 аминокислот (p53). N-конец p53 содержит функциональные домены, активирующие транскрипцию факторов, ответственных за регуляцию апоптоза, а ДНК-связывающий домен активирует трансактивацию других генов. При злокачественных новообразованиях мутации с потерей функции *TP53* локализируются в ДНК-связывающем домене, ухудшая связывание p53 с ДНК-мишенью, влияя на активацию транскрипции генов.

Мутации *TP53* связаны с УТК HG, ее способностью к инвазии, риском рецидива и неблагоприятным исходом, взаимно исключая мутации *FGFR3* [34]. В НМИРМП HG наличие мутаций *FGFR3* и *TP53* не является взаимоисключающим: УТК pT1G₃ представляют собой прогрессию папиллярных опухолей путем приобретения мутаций *TP53* [35]. Первичная опухоль и метастатические рецидивы содержат одну и ту же мутацию *TP53*, что указывает на общее клональное происхождение, поэтому данную мутацию рассматривают в качестве предиктора УТК.

Для оценки прогноза мутаций *TP53* и *FGFR3* для риска развития рецидива УТК учитывают: 1) эти мутации — различные пути патогенеза УТК; 2) мутация *FGFR3* ассоциирована с LG и благоприятным исходом, *TP53* — с неблагоприятным клиническим исходом; 3) около 5 % образцов УТК содержат обе мутации, что потенциально ведет к HG.

Профиль генной экспрессии дает представление о функциональных изменениях ДНК, что позволяет прогнозировать риск рецидива УТК. Подтипы УТК имеют четкие профили экспрессии генов. В 2003 г. L. Dyrskjot и соавт. сообщили об идентификации клинически значимых подклассов УТК, на основании которых создан молекулярный классификатор, позволяющий дифференцировать доброкачественные опухоли и МИРМП [35].

М. Ito и соавт. для выявления УТК HG ретроспективно изучили образцы УТК: идентифицированы 25 генов, связанных с рецидивом, включая P21-активированную киназу (экспрессия коррелирует с трехкратным риском развития рецидива в течение 24 мес) [36]. В другом исследовании массива матричных ДНК при оценке 40 образцов НМИРМП LG сделан вывод о возможности предсказания рецидива УТК при оценке суперэкспрессии матричных металлопротеиназ 1 и 12, трансформирующего фактора роста β1 и фактора роста эндотелия сосудов [37].

Таким образом, для прогноза рецидива УТК можно использовать экспрессионные сигнатуры генов: 1) генная экспрессия способна предсказать ранний рецидив УТК; 2) для подтипов УТК характерны четкие профили экспрессии генов; 3) для подтверждения диагностических профилей и их клинического значения необходимы большая выборка и независимый набор данных.

Комбинированные биомаркеры как предикторы рецидива опухоли

Эволюция исследования маркеров рецидива УТК способствует глобальной оценке прогнозирования клинического поведения опухоли. Такие маркеры, как Ki-67, характеризуются высокой пролиферативной активностью и связью с рецидивом опухоли, однако не могут быть использованы для оценки индивидуального риска [38].

По мнению В. Неллар и соавт., повышенная экспрессия *VEGF* в сочетании с увеличением плотности микрососудов уротелия может быть связана с ранним рецидивом НМИРМП [39]. При исследовании образцов УТК 286 пациентов мутации *FGFR3* обнаружены в 60 % случаев (при G_1 – в 88 %, при G_3 – в 16 %), экспрессия *MIB-1*, *p53* и *p27kip1* – при G_1 в 5, 2 и 3 %, при G_3 – в 85, 60 и 56 % соответственно [40]. Вероятно, характеристики мутаций *FGFR3 + MIB-1, p53* и *p27kip1* могут стать важным инструментом для принятия решений [41], а изменения *p21* и *pRb* при УТК НГ связаны с длительностью безрецидивного периода и общей выживаемостью пациентов [42].

I. Barth и соавт. изучили молекулярные подтипы УТК в образцах CIS на основе экспрессии люминального и базального маркеров с помощью панели суррогатной иммуногистохимии (использованы люминальные маркеры CK20, GATA3, рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа (Her2) и *p53*) [20]. Экспрессия сигнатурного гена CIS, а также *TP53* и *RBI* обнаружена в подгруппе базального МИРМП. Положительные уровни ER β , Her2 наблюдались в 91 % случаев CIS, а нормальный уротелий демонстрировал более низкую экспрессию маркеров, что подчеркивает их потенциал для клинического применения. Дополнительно выявление GATA3 позволило стратифицировать риск у пациентов с МИРМП после радикальной цистэктомии.

J. Calvete и соавт. уделили внимание коэкспрессии белка активации фибробластов (FAP) и маркеров базального типа (CK5/6 и CD44) при МИРМП [43]. Клинические и патологические параметры иммуногистохимической экспрессии FAP, маркеров базального (CK5/6, CD44), люминального (CK20, GATA3) фенотипов исследованы L. Wang и соавт. на образцах 121 пациента с УТК после радикальной цистэктомии. Цитоплазматическое иммуноокрашивание FAP указывало на меньшие показатели выживаемости (отношение рисков (ОР) 1,68; $p = 0,048$), было связано со стадированием УТК (pT2a/pT2b) и отрицательной экспрессией маркеров люминального фенотипа CK20 ($p < 0,0001$) и GATA3 ($p = 0,005$). Одновременная экспрессия FAP, CK5/6 и CD44 признана значимым фактором прогноза специфической выживаемости (ОР 2,3; $p = 0,001$) вместе с лимфогенной инвазией (ОР 3,47; $p < 0,0001$) и инфильтрацией глубокого мышечного слоя мочевого пузыря (ОР 2,47; $p = 0,02$) [11].

Биомаркеры комбинированного апоптоза были исследованы на их способность прогнозировать рецидив УТК. По результатам исследования J.A. Kaam и соавт. при оценке маркеров апоптоза Bcl2, каспазы 3, p53 и сурвивина установлено, что изменение маркеров независимо связано с повышенным риском рецидива. Измененная экспрессия в 32–64 % случаев ассоциирована с повышением риска рецидива УТК в 1,7–2,7 раза

и раковоспецифической смертностью в 2,0–3,2 раза (за 37 мес наблюдения) [44].

Сурвивин экспрессируется в ядре и цитозоле клеток, участвует в клеточном делении. Несмотря на то что молекулярные механизмы сурвивина до сих пор четко не установлены, считается что его регуляция связана с белком p53. Установлена взаимосвязь между гиперэкспрессией β -катенина, поздней стадией УТК ($\geq T2$) и НГ ($p < 0,01$) [45].

Q. Li и соавт. опубликовали научное исследование «МикроРНК: ключевые игроки при раке мочевого пузыря». По их данным, miR-126 часто подавляется в линиях раковых клеток человеческой УТК и идентифицируется как матричная РНК, подавляющая метастазирование. Исследование проводилось на лабораторных мышах после внутривенного введения miR-145 в ортотопическую модель ксенотрансплантата УТК человека. В 76 % случаев наблюдались ингибирование роста опухоли и увеличение выживаемости. В эксперименте *in vitro* обнаружено снижение уровней кластеров miR-183, -96, -182 и -210, что вызвало ингибирование роста, увеличение апоптоза и снижение подвижности клеток УТК [46].

Таким образом, оценка маркеров апоптоза дает прогностическую информацию для идентификации пациентов с высоким риском развития рецидива УТК. Комбинированные биомаркеры имеют связь с рецидивом УТК: 1) несколько маркеров обеспечивают общую оценку для прогнозирования клинического поведения опухоли; 2) мутации *FGFR3* и *TP53* в комбинации с информацией об изменениях путей апоптоза, модификациях молекул клеточной адгезии, изменениях эпигенетических опухолевых регуляторов-супрессоров и структуры хромосом предложены в качестве компонентов для панели прогноза рецидива УТК.

Целесообразность использования эпигенетических изменений в качестве предикторов рецидива УТК видится следующим образом: 1) aberrантное промоторное гиперметилирование – важный механизм инактивации генов-супрессоров опухолей, их регуляторов и остальных факторов; 2) различные модификации гистонов, связанные с рецидивом УТК; 3) наличие взаимосвязи между эпигенетическими изменениями и рецидивом УТК.

Другие геномные альтерации как предикторы рецидива уротелиальной карциномы

Микросателлитные маркеры и хромосомные делеции перспективны для скрининга и диагностики УТК, а также для возможного прогнозирования рецидива. Необратимые изменения структуры ДНК обозначены как «геномные подписи» (genomic signatures).

Рядом исследователей показано, что микросателлитный анализ эффективен для скрининга УТК [47, 48]. Однако результаты микросателлитного анализа,

позволяющие прогнозировать риск рецидива УТК, прогрессию опухоли и выживаемость пациентов, противоречивы и окончательно не решены. При МИРМП обнаруживается потеря хромосом 2q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 18q и Y, а потеря хромосомы 9p21, в частности, значительно коррелирует с сокращением безрецидивного периода [49, 50]. Численные и структурные изменения хромосом распространены при УТК, но сложно установить связь аберрации с причиной или следствием прогрессии опухоли.

Y. Feng и соавт. выявляли прогностические маркеры МИРМП с использованием метода взвешенной генной коэкспрессии. Эпителиально-мезенхимальный переход индуцирует выработку РСК, играя важную роль в метастазировании, лекарственной устойчивости и избегании апоптоза. Процесс эпителиально-мезенхимального перехода связан с плохим прогнозом при МИРМП: корреляция уровня экспрессии *DDR2*, *MSRB3*, *PDLIM3* и *ZNF521* вместе с положительным статусом эпителиально-мезенхимального перехода свидетельствует о высокой экспрессии 4 идентифицированных прогностических маркерных генов [51].

В исследовании G. Santoni и соавт. в моче у пациентов с УТК выявлено гиперметилование *GSTP1* и *RARβ2* и *APC*. Отмечено, что метилирование генов *NID2*, *TWIST1* или *CFTR*, *SALL3*, *TWIST1* в клетках мочи повышает чувствительность и отрицательную прогностическую ценность у пациентов с УТК (чувствительность 90 %, специфичность 94 %), а метилирование генов-супрессоров опухолей *p14ARF*, *p16INK4A*, *RASSF1A*, *DAPK* и *APC* коррелирует с уровнем и стадией опухоли. Мутации промотора *TERT* в моче, возникающие на ранних стадиях УТК, мутации *FGFR3* и длина теломер соотносятся с рецидивом HG (G_3) [52].

Y. Yamada и соавт. описали корреляцию прогрессирования УТК с экспрессией микроРНК. При анализе микроРНК показано, что miR-140-5p действует как противоопухолевая микроРНК [53].

Применение мультифокусной флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH, UroVysion) позволяет обнаружить изменения хромосом 3, 7 и 17 и делецию 9p21 [54]. В 2008 г. O.N. Gofrit и соавт. продемонстрировали чувствительность метода 86 % [55], а в 2009 г. С.Т. Nguyen и соавт. успешно проводили данный тест у большинства пациентов с рецидивирующей УТК в течение 12 мес наблюдения после лечения [56].

Сывороточные маркеры для определения риска рецидива уротелиальной карциномы

H. Zhao и соавт. применили энзимсвязанный иммуносорбентный анализ, оценили уровни ангиогенина в плазме 209 пациентов с УТК и 208 здоровых лиц (контроль), рандомизированных по возрасту, полу и расовой принадлежности. У пациентов с рецидивирующей УТК уровень ангиогенина плазмы был выше

по сравнению с таковым у здоровых лиц [57]. L. Dyrskjot и соавт. обнаружили 88 генов, указывающих на признаки прогрессии УТК независимо от стандартных клинических показателей (при использовании 52 геномных сигнатур правильно установлена стадия УТК), и 68 генов, ответственных за верификацию CIS, которые продемонстрировали высокую точность ее диагностики [58]. Однако, ни профиль РНК, ни комбинация геномных сигнатур не способны были точно предсказать вероятность рецидива УТК.

В 2017–2021 гг. активно изучаются результаты применения методики **жидкостной биопсии** при различных вариантах злокачественных новообразований, включающей определение концентрации сывороточной циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК). Выявление соматических мутаций в свободной циркулирующей ДНК опухоли пациента, по мнению J.F. Marques и соавт., позволяет оценить молекулярно-генетические изменения в клетках на фоне лечения в реальном времени и избежать недостатков, связанных с забором и качеством материала для молекулярно-генетического исследования [59]. В случае локализованных стадий заболевания наличие цоДНК в крови пациентов может свидетельствовать о резидуальной опухоли и, как следствие, являться фактором неблагоприятного прогноза [60–62].

Такой подход особенно важен для случаев МИРМП в связи с низкой эффективностью адьювантной химиотерапии, в связи с чем требуется поиск маркеров эффективности этого метода. В исследовании E. Christensen и соавт. у 68 пациентов с локализованной УТК определяли уровень сывороточной цоДНК с помощью секвенирования на основе соматических мутаций, характерных для опухоли пациента. По результатам исследования наличие цоДНК до начала химиотерапии характеризовали как прогностический фактор (OR 29,1; $p = 0,001$). Определение уровня цоДНК после операции со 100 % чувствительностью и 98 % специфичностью позволяло предсказать прогрессию опухоли, а динамика уровня цоДНК в процессе проведения химиотерапии была достоверно ассоциирована с рецидивом заболевания ($p = 0,023$) [61]. Помимо этого, после выполнения радикальной цистэктомии повышенный уровень цоДНК при рецидиве заболевания определяли гораздо раньше, чем при выполнении стандартного лучевого исследования (мультиспиральной компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии) [61, 63].

Уровень цоДНК также может служить предиктором эффективности проводимой терапии. В рандомизированном исследовании III фазы IMvigor010 были изучены эффективность и безопасность адьювантного применения атезолизумаба при МИРМП. У 581 (72 %) пациента выполнено полноэкзомное секвенирование опухоли и соответствующей нормальной ткани (контроль) для определения 16 опухолеспецифичных мутаций, которые в дальнейшем легли в основу панелей мультиплексной

полимеразной цепной реакции для выявления цоДНК. У 37 % пациентов на момент 1-го курса адьювантной терапии была обнаружена цоДНК. Пациенты с положительным статусом цоДНК после лечения атезолизумабом имели лучшие показатели безрецидивной (5,9 мес против 4,4 мес; ОР 0,58; 95 % доверительный интервал 0,43–0,79) и общей (25,8 мес против 15,8 мес; ОР 0,59; 95 % доверительный интервал 0,41–0,86) выживаемости по сравнению с группой контроля. Различий в показателях общей выживаемости пациентов в группах при отрицательном статусе цоДНК не выявлено [64], что может указывать на необходимость выделения подгруппы пациентов с наибольшей эффективностью адьювантной иммунотерапии.

Дальнейший путь развития диагностики уротелиальной карциномы

Очередной путь развития диагностики УТК связан с маркером, изучение которого только начинается. W. Ding и соавт. в группе УТК pT1G₃ изучили рецептор 2 эпидермального фактора роста человека Her2 и показали, что его экспрессия в образцах УТК HG улучшила прогноз в отношении прогрессии опухоли [65]. Изменения уровня Her2 отмечаются в первичном НМИРМП до его прогрессирования в МИРМП [66]. Следовательно, пациенты с НМИРМП с положительным статусом Her2 могут потенциально получить эффект от лекарственной терапии в случае развития МИРМП. Продолжается изучение и других новых биомаркеров мочи, потенциально способных принести пользу мировому медицинскому сообществу [67, 68].

Перспектива исследований

Накопление знаний о молекулярных паттернах УТК позволит преодолеть разрыв между данными генетических исследований и результатами клинического наблюдения пациентов. Оценка ключевых генетических путей и профилей экспрессии устанавливает набор молекулярных маркеров для предсказания рецидива УТК и прогрессирующей опухолевой трансформации.

Изучение мутаций *FGFR3* и *TP53* в образцах УТК, ассоциированных с разной степенью злокачественности опухоли, играет важную роль в диагностике, прогнозе, а также для потенциального куративного вмешательства. Молекулярные маркеры способны потенциально прогнозировать рецидив опухоли, в том числе при использовании метода жидкостной биопсии и определении уровня цоДНК. Однако необходимо проведение рандомизированных исследований для определения унифицированной методики выявления сывороточной цоДНК, временных точек забора образцов крови, а также прогностической и предиктивной значимости данного маркера.

С учетом изложенных результатов инициировано исследование III фазы IMvig011, в котором рандомизация пациентов в группы иммунотерапии/платцебо

будет осуществляться на основании статуса сывороточной цоДНК после выполнения радикальной цистэктомии (NCT04660344).

Заключение

По результатам мировых наблюдений большинство впервые выявленных уротелиальных опухолей способны рецидивировать в течение первого года наблюдения. Причиной данного процесса выступает не только пресловутое «опухоловое поле» уротелия, как считали в конце XX в. Рутинные клинические и морфологические параметры используются для индивидуального прогнозирования клинического исхода, но для оценки вероятности рецидива опухоли этого набора недостаточно.

Выявленные молекулярные изменения УТК демонстрируют высокий потенциал для определения сроков рецидива опухоли, оценки безрецидивной выживаемости и планирования ресурсной базы системы здравоохранения.

Злокачественное новообразование уротелия – мультилокулярное заболевание с анатомически разделенными опухолями, возникающими одновременно или последовательно. Результаты молекулярного исследования мультифокальных опухолей мочевого пузыря показывают, что существует «эффект поля» трансформирующих агентов, влияющий на всю поверхность уротелия, и прежде всего РСК. Описаны параллельные пути канцерогенеза УТК: 1) мутации генов *FGFR3* и *TP53* характеризуют 2 различных пути канцерогенеза; 2) канцерогенез НМИРМП связан с мутацией *FGFR3*, обнаруживающейся в экзонах 7, 10 и 15; 3) мутация *FGFR3* может быть связана с низкой частотой рецидивов поверхностной папиллярной УТК LG; 4) мутация *TP53* связана с УТК HG, инвазивным характером ее роста и повышенным риском рецидива.

Генетическая экспрессия УТК может быть использована для прогнозирования рецидива опухоли. В ходе оценки профиля экспрессии генов могут быть идентифицированы и другие маркеры, потенциально полезные для определенных клинических ситуаций. Генетические изменения, обусловленные потерей гетерозиготности, и методика FISH помогают ранжировать пациентов с УТК, обеспечивая персонализированный подход к пациенту в зависимости от вероятности развития рецидива опухоли. Эпигенетические изменения ряда генных промоторов связаны с повышенным/пониженным риском рецидива опухоли. Перспективными направлениями признаны изучение пути канцерогенеза в виде активации мутации Her2 при УТК и верификация сывороточной цоДНК, что поможет индивидуализировать прогноз темпов развития УТК.

В мире прилагаются значительные усилия для поиска молекулярных биомаркеров по предсказанию вероятности рецидива УТК. Обнаружение различных

пути канцерогенеза уротелия используется для управления темпами развития УТК, однако процессы канцерогенеза, прогрессии, рецидива и метастазирования опухоли могут включать ряд других молекулярных изменений, которые предстоит обнаружить. Понимание

механизмов, лежащих в основе трансформации уротелия, может привести к улучшению скрининга и раннего выявления клинически значимых форм УТК и ее рецидивов для персонализированного подхода при лечении пациентов с данным агрессивным заболеванием.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Witjes J.A. Follow-up in non-muscle invasive bladder cancer: facts and future. *World J Urol* 2020. DOI: 10.1007/s00345-020-03569-2.
2. Cheng L., Lopez-Beltran A., MacLennan G.T. et al. Neoplasms of the urinary bladder. In: *Urologic Surgical Pathology*. Eds.: D.G. Bostwick, L. Cheng. Philadelphia, PA, USA: Elsevier/Mosby, 2008. Pp. 259–352.
3. Grossman H.B., Soloway M., Messing E. et al. Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 2006;295(3):299–305. DOI: 10.1001/jama.295.3.299.
4. Black P.C., Brown G.A., Dinney C.P. Molecular markers of urothelial cancer and their use in the monitoring of superficial urothelial cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(35):5528–35. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.0895.
5. Bakkar A.A., Wallerand H., Radvanyi F. et al. *FGFR3* and *TP53* gene mutations define two distinct pathway sin urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 2003;63(23):8108–12.
6. Lindgren D., Liedberg F., Andersson A. et al. Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, *FGFR3* mutation status, and loss of 9q. *Oncogene* 2006;25(18):2685–96. DOI: 10.1038/sj.onc.1209249.
7. Карелин М.И., Пожариский К.М., Тен В. и др. Роль антигена Ki-67, мутированного гена-супрессора *p53* и онкобелка *HER2/neu* в определении прогноза клинического течения рака мочевого пузыря. *Вопросы онкологии* 2006;52(6):643–8. [Karelin M.I., Pozharisskiy K.M., Ten V. et al. Role of Ki-67 antigen, mutated *p53* suppressor gene and oncoprotein *HER2/neu* in the definition predicting the clinical course of cancer Bladder. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2006;52(6):643–8. (In Russ.)].
8. Wu X.R. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nature Rev Cancer* 2005;5(9):713–25. DOI: 10.1038/nrc1697.
9. Lopez-Beltran A., Cheng L.C., Mazzucchelli R. et al. Morphological and molecular profiles and pathways in bladder neoplasms. *Anticancer Res* 2008;28(5B):2893–900.
10. Lacy S., Lopez-Beltran A., Mac Lennan G.T. et al. Molecular pathogenesis of urothelial carcinoma: the clinical utility of emerging new biomarkers and future molecular classification of bladder cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 2009;31(1):5–16.
11. Wang L., Feng C., Ding G. et al. Ki67 and TP53 expressions predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *Tumour Biol* 2014;35(4):2989–95. DOI: 10.1007/s13277-013-1384-9.
12. Davidson D.D., Cheng L. “Field cancerization” in the urothelium of the bladder. *Anal Quant Cytol Histol* 2006;28(6):337–8.
13. Denzinger S., Mohren K., Knuechel R. et al. Improved clonality analysis of multifocal bladder tumors by combination of histopathologic organ mapping, loss of heterozygosity, fluorescence *in situ* hybridization and *p53* analyses. *Hum Pathol* 2006;37(2):143–51. DOI: 10.1016/j.humpath.2005.10.014.
14. Dahse R., Gartner D., Werner W. et al. *p53* mutations as an identification marker for the clonal origin of bladder tumors and its recurrences. *Oncol Rep* 2003;10(6):2033–7.
15. Jones T.D., Wang M., Eble J.N. et al. Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2005;11(18):6512–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0891.
16. Armstrong A.B., Wang M., Eble J.N. et al. *TP53* mutation alanalysis supports monoclonal origin of biphasic sarcomatoid urothelial carcinoma (carcinosarcoma) of the urinary bladder. *Mod Pathol* 2009;22(1):113–8. DOI: 10.1038/modpathol.2008.176.
17. Ben-Porath I., Thomson M.W., Carey V.J. et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 2008;40(5):499–507. DOI: 10.1038/ng.127.
18. Atlasi Y., Mowla S.J., Ziaee S.A., Bahrami A.R. OCT4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* 2007;120(7):1598–602. DOI: 10.1002/ijc.22508.
19. She J.J., Zhang P.G., Wang Z.M. et al. Identification of side population cells from bladder cancer cells by Dye Cycle Violet staining. *Cancer Biol Ther* 2008;7(10):1663–8. DOI: 10.4161/cbt.7.10.6637.
20. Barth I., Schneider U., Grimm T. et al. Progression of urothelial carcinoma *in situ* of the urinary bladder: a switch from luminal to basal phenotype and related therapeutic implications. *Virchows Archiv* 2018;472(5):749–58. DOI: 10.1007/s00428-018-2354-9.
21. Babjuk M., Burger M., Capoun O. et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma *in situ*). *Eur Urol* 2021;S0302–2838(21)01978–3. DOI: 10.1016/j.eururo.2021.08.010.
22. Pan C.X., Zhu W., Cheng L. Implications of cancer stem cells in the treatment of cancer. *Future Oncol* 2006;2(6):723–31. DOI: 10.2217/14796694.2.6.723.
23. Cheng L., Zhang S., Davidson D.D. et al. Implications of cancer stem cells for cancer therapy. In: *Cancer Drug Discovery and Development: Stem Cells and Cancer*. Eds.: R.G. Bagley, B.A. Teicher. NY, USA: Humana Press/Springer, 2009.
24. Jebar A.H., Hurst C.D., Tomlinson D.C. et al. *FGFR3* and *Ras* gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24(33):5218–25. DOI: 10.1038/sj.onc.1208705.
25. Wolff E.M., Liang G., Jones P.A. Mechanisms of disease: genetic and epigenetic alterations that drive bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2005;2(10):502–10. DOI: 10.1038/ncpuro0318.
26. Worst T.S., Weis C.A., Stöhr R. et al. *CDKN2A* as transcriptomic marker for muscle-invasive bladder cancer risk stratification and therapy decision-making. *Sci Rep* 2018;8(1):14383. DOI: 10.1038/s41598-018-32569-x.
27. Van Rhijn B.W., Montironi R., Zwarthoff E.C. et al. Frequent *FGFR3* mutations in urothelial papilloma. *J Pathol* 2002;198(2):245–51. DOI: 10.1002/path.1202.
28. Van Rhijn B.W., van der Kwast T.H., Vis A.N. et al. *FGFR3* and *P53* characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res* 2004;64(6):1911–4. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-2421.

29. Pierrot B.I., Brams A., D.C. Dunois-Lardé et al. Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis* 2006;27(4):740–7. DOI: 10.1093/carcin/bgi290.
30. Hernandez S., Lopez-Knowles E., Lloreta J. et al. Prospective study of *FGFR3* mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. *J Clin Oncol* 2006;24(22):3664–71. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.1771.
31. Knowles M.A. Role of *FGFR3* in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J Urol* 2007;25(6):581–93. DOI: 10.1007/s00345-007-0213-4.
32. Barbisan F., Santinelli A., Mazzucchelli R. et al. Strong immuno histochemical expression of fibroblast growth factor receptor 3, superficial staining pattern of cytokeratin 20 and low proliferative activity define those papillary urothelial neoplasms of low malignant potential that do not recur. *Cancer* 2008;112(3):636–44. DOI: 10.1002/cncr.23212.
33. Lott S., Wang M., Zhang S. et al. *FGFR3* and *TP53* mutation analysis in inverted urothelial papilloma: incidence and etiological considerations. *Mod Pathol* 2009;22(5):627–32. DOI: 10.1038/modpathol.2009.28.
34. Shariat S.F., Ashfaq R., Sagalowsky A.I., Lotan Y. Predictive value of cell cycle biomarkers in non-muscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *J Urol* 2007;177(2):481–7. DOI: 10.1016/j.juro.2006.09.038.
35. Dyrskjot L., Thykjaer T., Kruhoffer M. et al. Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat Genet* 2003;33(1):90–6. DOI: 10.1038/ng1061.
36. Ito M., Nishiyama H., Kawanishi H. et al. P21-activated kinase 1, a new molecular marker for intravesical recurrence after transurethral resection of bladder cancer. *J Urol* 2007;178(3 Pt 1):1073–9. DOI: 10.1016/j.juro.2007.05.012.
37. Choi Y.D., Cho N.H., Ahn H.S. et al. Matrix metalloproteinase expression in the recurrence of superficial low grade bladder transitional cell carcinoma. *J Urol* 2007;177(3):1174–8. DOI: 10.1016/j.juro.2006.10.031.
38. Margulis V., Shariat S.F., Ashfaq R. et al. Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease. *Clin Cancer Res* 2006;12(24):7369–73. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1472.
39. Helpap B., Schmitz-Drager B.J., Hamilton P.W. et al. Molecular pathology of non-invasive urothelial carcinomas (part I). *Virchows Arch* 2003;442(4):309–16. DOI: 10.1007/s00428-002-0748-0.
40. Van Rhijn B.W., Lurkin I., Chopin D.K. et al. Combined microsatellite and *FGFR3* mutation analysis enables a highly sensitive detection of urothelial cell carcinoma in voided urine. *Clin Cancer Res* 2003;9(1):257–63.
41. Lyu Q., Lin A., Cao M. et al. Alterations in *TP53* are a potential biomarker of bladder cancer patients who benefit from immune checkpoint inhibition. *Cancer Control* 2020;27(1):1073274820976665. DOI: 10.1177/1073274820976665.
42. Chatterjee S.J., Datar R., Youssefzadeh D. et al. Combined effects of p53, p21 and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22(6):1007–13. DOI: 10.1200/JCO.2004.05.174.
43. Calvete J., Larrinaga G., Errarte P. et al. The coexpression of fibroblast activation protein (FAP) and basal-type markers (CK 5/6 and CD44) predicts prognosis in high-grade invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Hum Pathol* 2019;91:61–8. DOI: 10.1016/j.humpath.2019.07.002.
44. Karam J.A., Lotan Y., Karakiewicz P.I. et al. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. *Lancet Oncol* 2007;8(2):128–36. DOI: 10.1016/S1470-2045(07)70002-5.
45. Senol S., Yildirim A., Ceyran B. et al. Prognostic significance of survivin, β -catenin and p53 expression in urothelial carcinoma. *Bosn J Basic Med Sci* 2015;15(4):7–14. DOI: 10.17305/bjbm.2015.556.
46. Li Q., Wang H., Peng H. et al. MicroRNAs: key players in bladder cancer. *Mol Diagn Ther* 2019;23(5):579–601. DOI: 10.1007/s40291-019-00410-4.
47. Stoehr R., Zietz S., Burger M. et al. Deletions of chromosomes 9 and 8p in histologically normal urothelium of patients with bladder cancer. *Eur Urol* 2005;47(1):58–63. DOI: 10.1016/j.eururo.2004.07.012.
48. Lopez-Beltran A., Alvarez-Kindelan J., Luque R.J. et al. Loss of heterozygosity at 9q32-33 (DBC1 locus) in primary non-invasive papillary urothelial neoplasm of low malignant potential and low-grade urothelial carcinoma of the bladder and their associated normal urothelium. *J Pathol* 2008;215(3):263–72. DOI: 10.1002/path.2353.
49. Edwards J., Duncan P., Going J.J. et al. Loss of heterozygosity on chromosomes 11 and 17 are markers of recurrence in TCC of the bladder. *Br J Cancer* 2001;85(12):1894–9. DOI: 10.1054/bjoc.2001.2159.
50. Fornari D., Steven K., Hansen A.B. et al. Transitional cell bladder tumor: predicting recurrence and progression by analysis of microsatellite loss of heterozygosity in urine sediment and tumor tissue. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;167(1):15–9. DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2005.10.015.
51. Feng Y., Jiang Y., Wen T. et al. Identifying potential prognostic markers for muscle-invasive bladder urothelial carcinoma by weighted gene co-expression network analysis. *Pathol Oncol Res* 2019;26(2):1063–72. DOI: 10.1007/s12253-019-00657-6.
52. Santoni G., Morelli M., Amantini C., Battelli N. Urinary markers in bladder cancer: an update. *Front Oncol* 2018;8:362. DOI: 10.3389/fonc.2018.00362.
53. Yamada Y., Kato C., Arai T. et al. Aberrantly expressed *PLOD1* promotes cancer aggressiveness in bladder cancer: a potential prognostic marker and therapeutic target. *Mol Oncol* 2019;13(9):1898–912. DOI: 10.1002/1878-0261.12532.
54. Kim T.J., Moon H.W., Kang S. et al. UroVysion FISH could be effective and useful method to confirm the identity of cultured circulating tumor cells from bladder Cancer Patients. *J Cancer* 2019;10(14):3259–66. DOI: 10.7150/jca.30079.
55. Gofrit O.N., Zorn K.C., Silvestre J. et al. The predictive value of multi-targeted fluorescent *in-situ* hybridization in patients with history of bladder cancer. *Urol Oncol* 2008;26(3):246–9. DOI: 10.1016/j.urolonc.2007.02.011.
56. Nguyen C.T., Litt D.B., Dolar S.E. et al. Prognostic significance of non diagnostic molecular changes in urine detected by UroVysion fluorescence *in situ* hybridization during surveillance for bladder cancer. *Urology* 2009;73(2):347–50. DOI: 10.1016/j.urology.2008.09.042.
57. Zhao H., Grossman H.B., Delclos G.L. et al. Increased plasma levels of angiogenin and the risk of bladder carcinoma: from initiate onto recurrence. *Cancer* 2005;104(1):30–5. DOI: 10.1002/cncr.21136.
58. Dyrskjot L., Zieger K., Real F.X. et al. Gene expression signatures predict outcome in non-muscle-invasive bladder carcinoma: a multicenter validation study. *Clin Cancer Res* 2007;13(12):3545–51. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2940.
59. Marques J.F., Reis J.P., Fernandes G. et al. Circulating tumor DNA: a step into the future of cancer management. *Acta Cytol* 2019;63(6):456–465. DOI: 10.1159/000492917.
60. Lee J.S., Rhee T.M., Pietrasz D. et al. Circulating tumor DNA as a prognostic indicator in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2019;9(1):16971. DOI: 10.1038/s41598-019-53271-6.
61. Christensen E., Birkenkamp-Demtröder K., Sethi H. et al. Early detection of metastatic relapse and monitoring of therapeutic efficacy by ultra-deep sequencing of plasma cell-free DNA

- in patients with urothelial bladder carcinoma. *J Clin Oncol* 2019;37(18):1547–57. DOI: 10.1200/JCO.18.02052.
62. Jones R.P., Pugh S.A., Graham J. et al. Circulating tumour DNA as a biomarker in resectable and irresectable stage IV colorectal cancer; a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2021;144:368–81. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.11.025.
63. Birkenkamp-Demtröder K., Christensen E., Nordentoft I. et al. Monitoring treatment response and metastatic relapse in advanced bladder cancer by liquid biopsy analysis. *Eur Urol* 2018;73(4):535–40. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.09.011.
64. Powles T., Assaf Z.J., Davarpanah N. et al. ctDNA guiding adjuvant immunotherapy in urothelial carcinoma. *Nature* 2021;595(7867):432–7. DOI: 10.1038/s41586-021-03642-9.
65. Ding W., Tong S., Gou Y. et al. Human epidermal growth factor receptor 2: a significant indicator for predicting progression in non-muscle-invasive bladder cancer especially in high-risk groups. *World J Urol* 2015;33(12):1951–7. DOI: 10.1007/s00345-015-1557-9.
66. Moustakas G., Kampantais S., Nikolaidou A. et al. HER-2 overexpression is a negative predictive factor for recurrence in patients with non-muscle-invasive bladder cancer on intravesical therapy. *J Int Med Res* 2020;48(1):300060519895847. DOI: 10.1177/0300060519895847.
67. Kiselyov A., Bunimovich-Mendrazhitsky S., Startsev V. Key signaling pathways in the muscle-invasive bladder carcinoma: clinical markers for disease modeling and optimized treatment. *Int J Cancer* 2016;138(11):2562–9. DOI: 10.1002/ijc.29918.
68. Wolfs J.R.E., Hermans T.J.N., Koldewijn E.L., van de Kerkhof D. Novel urinary biomarkers ADXBLADDER and bladder EpiCheck for diagnostics of bladder cancer: a review. *Urol Oncol* 2021;39(3):161–70. DOI: 10.1016/j.urolonc.2020.11.014.

Вклад авторов

В.Ю. Старцев: генерация идеи исследования, постановка задачи исследования, написание текста статьи;
 А.Е. Балашов: выполнение рутинной работы по систематизации материала, написание текста статьи;
 А.С. Мерзляков: работа с материалом, написание текста статьи;
 С.Л. Воробьев: постановка задачи исследования, работа с материалом;
 Е.С. Козорезова: обработка полученных данных, написание текста статьи.

Authors' contributions

V.Yu. Startsev: generating of research idea, setting a research problem, article writing;
 A.E. Balashov: performing routine work to organize the material, article writing;
 A.S. Merzlyakov: work with material, article writing;
 S.L. Vorobiev: statement of the research problem, work with material;
 E.S. Kozorezova: processing of the received data, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.Ю. Старцев / V.Yu. Startsev: <https://orcid.org/0000-0003-1243-743X>
 А.Е. Балашов / A.E. Balashov: <https://orcid.org/0000-0003-1877-3928>
 А.С. Мерзляков / A.S. Merzlyakov: <https://orcid.org/0000-0003-4169-5462>
 С.Л. Воробьев / S.L. Vorobiev: <https://orcid.org/0000-0002-7817-9069>
 Е.С. Козорезова / E.S. Kozorezova: <https://orcid.org/0000-0002-3659-7510>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 08.08.2021. **Принята к публикации:** 14.09.2021.
Article submitted: 08.08.2021. **Accepted for publication:** 14.09.2021.