

Молекулярные подтипы уротелиальных карцином мочевого пузыря у пациентов молодого возраста

Мещеряков И.А.¹, Крюков К.А.¹, Митин Н.П.¹, Пономарёва Е.В.², Шелехова К.В.^{1,3}

¹ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»

²ГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер» (Санкт-Петербург)

³ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт»

Molecular subtypes of urothelial carcinomas of the bladder in young patients

Meshcheryakov I.A.¹, Kryukov K.A.¹, Mitin N.P.¹, Ponomareva E.V.², Shelekhova K.V.^{1,3}

¹St. Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncologic)

²City Clinical Oncological Health Center (St. Petersburg)

³St. Petersburg Medico-Social Institute

АННОТАЦИЯ

Уротелиальные карциномы у молодых пациентов характеризуются специфическими клинико-морфологическими и генетическими особенностями в отличие от их аналогов у пожилых пациентов. Проведено молекулярное профилирование опухолей 56 пациентов моложе 45 лет с использованием метода шведских исследователей из университета Lund, впервые адаптирована молекулярная классификация группы исследователей Lund с применением иммунофенотипирования к когорте молодых пациентов и продемонстрирована четкая воспроизводимость молекулярных подтипов уротелиальных карцином, встречающихся в пожилой группе пациентов.

Выявлено, что у молодых пациентов достоверно преобладает уротелиоподобный А подтип рака мочевого пузыря (78 %, $p = 0.005$), который ассоциируется с ранней патологической стадией, благоприятным прогнозом и наилучшей выживаемостью. Внутри уротелиоподобного подтипа выделен специфический вариант опухоли (так называемый СК5/6+/p16+) (7 %), отличающийся по иммунофенотипическим и клиническим признакам, имеющий тенденцию к более агрессивному биологическому поведению и, вероятно, отражающий другой путь прогрессии части уротелиальных карцином в отличие от пожилых пациентов. Частота неблагоприятных подтипов (уротелиоподобный В, геномно-нестабильный, базальный/плоскоклеточно-подобный, мезенхимально-подобный) в молодой группе составила не более 6 %; отмечено их появление у пациентов старше 30 лет с зависимостью, пропорциональной возрасту.

Выполненное молекулярное профилирование рака мочевого пузыря у молодых пациентов показало диагностическую значимость, возможность прогностической стратификационной оценки и, следовательно, практическую целесообразность.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, молекулярные подтипы, иммуногистохимия, молодые пациенты.

ABSTRACT

Urothelial carcinomas in young patients are characterized by specific clinical and morphological and genetic features in contrast to their counterparts in elderly patients. Molecular profiling of tumors in 56 patients under 45 years has been performed using the method of Swedish researchers from the Lund University, the molecular classification of the Lund

Поступила 14.03.2021
Принята 18.04.2021

Автор, ответственный за переписку
Мещеряков Игорь Александрович: ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)». 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68А, лит. А.
E-mail: psychoangel23@mail.ru

Received 14.03.2021
Accepted 18.04.2021

Corresponding author
Meshcheryakov Igor Aleksandrovich: St. Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncologic), 68A, A, Pesochny, Leningradskaya str., St. Petersburg, 197758, Russia.
E-mail: psychoangel23@mail.ru

group of researchers using immunophenotyping has been adapted to the cohort of young patients for the first time and clear reproducibility of urothelial carcinoma molecular subtypes occurring in the elderly group of patients has been demonstrated.

The urothelial-like A subtype of bladder cancer (78%, $p = 0.005$), which is associated with an early pathological stage, a favorable prognosis, and the best survival rate, was found to significantly predominate in young patients. Within the urothelial-like subtype, a specific tumor variant (so-called CK5/6+/p16+) (7%) was identified, differing in immunophenotypic and clinical features, tending to a more aggressive biological behavior and probably reflecting a different progression pathway of some urothelial carcinomas in contrast to the elderly patients. The frequency of adverse subtypes (urothelial-like B, genomically unstable, basal/squamous cell-like, mesenchymal-like) in the young group was not more than 6%; their occurrence in patients over 30 years of age with an age-proportional dependence was noted.

The performed molecular profiling of bladder cancer in young patients showed its diagnostic significance, possibility of prognostic stratification and, therefore, reasonable practicality.

Keywords: bladder cancer, molecular subtypes, immunohistochemistry, young patients.

ВВЕДЕНИЕ

Уротелиальные карциномы мочевого пузыря (УКМП) — это гетерогенное заболевание, в основе которого лежат различные молекулярные пути канцерогенеза, что позволяет дифференцировать молекулярные подтипы этих опухолей со специфическими клинико-морфологическими и прогностическими характеристиками [1–5]. Несмотря на то, что возрастная гипотеза и клиническое поведение рака мочевого пузыря все еще обсуждается, опухоли у молодых пациентов имеют генетические особенности по сравнению с их аналогами у пожилых пациентов, что отражается в их биологическом поведении. По данным некоторых авторов опухоли у молодых пациентов характеризуются низкой частотой мутаций генов *FGFR3*, *TP53*, достаточной геномной стабильностью, пациенты с УКМП имеют благоприятный прогноз выживаемости, низкую частоту рецидивов, эти опухоли чаще всего поверхностные и низкой степени злокачественности [6–8]. Другие авторы сообщают, что поверхностные карциномы у молодых пациентов чаще рецидивируют [9].

В последнее десятилетие накоплена информация относительно молекулярного профилирования уротелиальных карцином и предложены различные классификационные системы, охватывающие в первую очередь мышечно-инвазивные опухоли [1–3, 10–14]. В мировой научной литературе существует 4 системы классификаций молекулярных подтипов рака мочевого пузыря [15]: TCGA — Атлас генома рака, Lund — Университета Лунда, UNC — Университета Северной Каролины и MD Anderson — Ракового центра Андерсона (рис. 1) [2, 3, 10, 11, 16]. Ученые пришли к соглашению о существовании 2 основных молекулярных категорий карцином: базальной и люминальной, в зависимости от преобладающей экспрессии дифференцировочных ге-

INTRODUCTION

Urothelial carcinomas of the bladder (UCB) are a heterogeneous disease based on different molecular pathways of carcinogenesis, which allows differentiating molecular subtypes of these tumors with specific clinical and morphological and prognostic characteristics [1–5]. Although the age hypothesis and clinical behavior of bladder cancer is still under debate, tumors in young patients have genetic features compared to their counterparts in older patients, which are reflected in their biological behavior. According to some authors, tumors in young patients are characterized by low frequency of *FGFR3*, *TR53* genes mutations, sufficient genomically stable, patients with UCB have a favorable survival rate, low recurrence rate, these tumors are often superficial and low degree of malignancy [6–8]. Other authors report that superficial carcinomas recur more frequently in young patients [9].

In the last decade, information regarding molecular profiling of urothelial carcinomas has been accumulated and various classification systems have been proposed, covering primarily muscle-invasive tumors [1–3, 10–14]. In the world scientific literature, there are 4 systems of classification of molecular subtypes of bladder cancer [15]: TCGA — Cancer Genome Atlas, Lund — the Lund University, UNC — the University of North Carolina and MD Anderson — the Anderson Cancer Center (Fig. 1) [2, 3, 10, 11, 16]. Scientists have agreed on the existence of 2 main molecular categories of carcinomas: basal and luminal, depending on the predominant expression of differentiation genes. The MD Anderson system additionally distinguishes an intermediate “p53-like” subtype containing both basal and luminal features. In TCGA, a neuronal subtype is distinguished. A group of researchers from the Lund University have subclassified a group of luminal tumors based on differences in expression levels

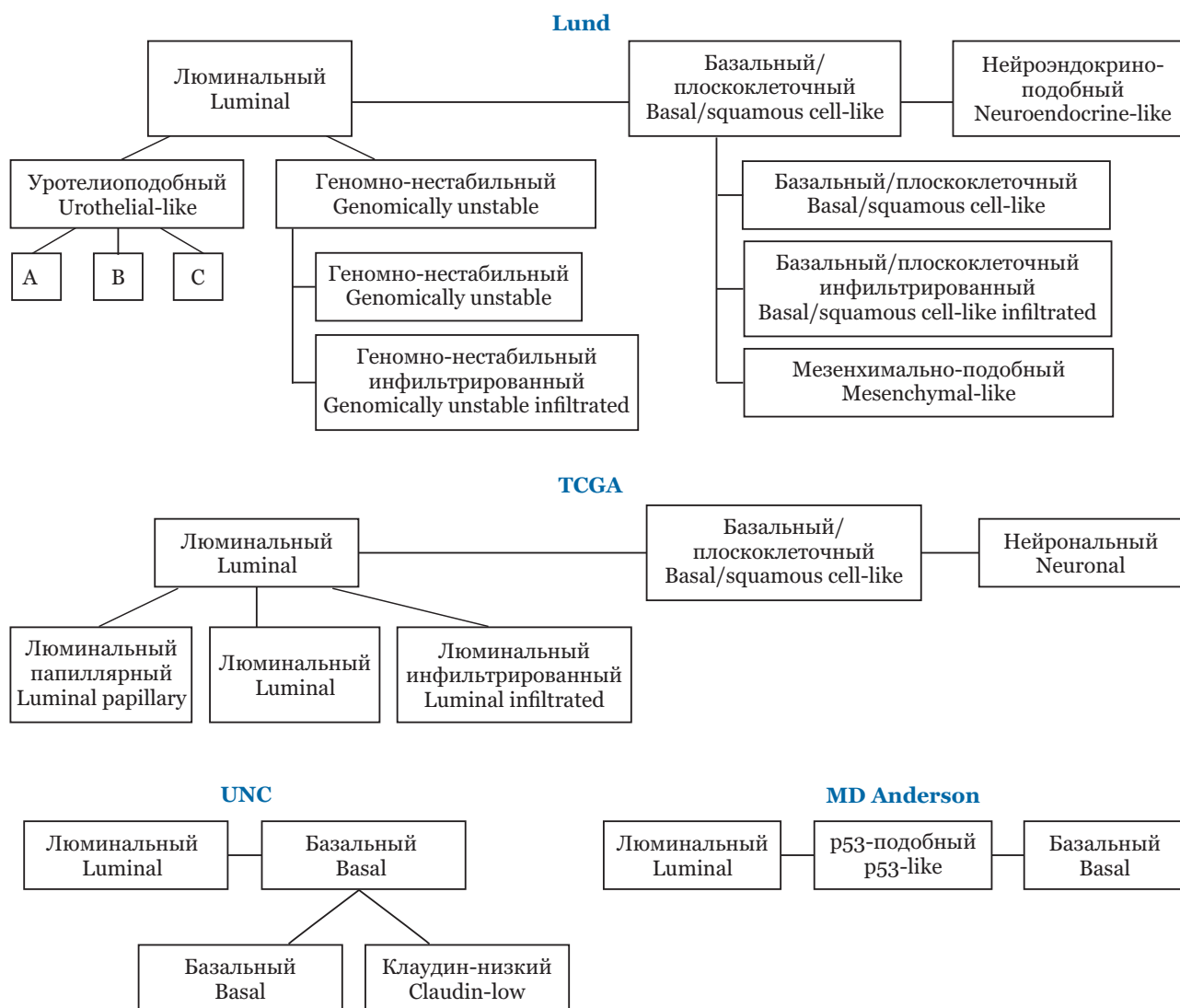


Рис. 1. Схема молекулярной таксономии рака мочевого пузыря (Lund — Lund Research group, Университет Лунда (Швеция); TCGA — Атлас генома рака; UNC — Университет Северной Каролины; MD Anderson — Раковый центр Андерсона [17])
Fig. 1. Diagram of molecular taxonomy of bladder cancer (Lund — the Lund Research group, the Lund University (Sweden); TCGA — the Cancer Genome Atlas; UNC — the University of North Carolina; MD Anderson — the Anderson Cancer Center [17])

нов. Система MD Anderson дополнительно выделяет промежуточный «p53-подобный» подтип, содержащий и базальные, и люминальные признаки. В TCGA выделяется нейрональный подтип. Группа исследователей из Университета Лунда субклассифицировала группу люминальных опухолей на основании различий уровней экспрессии генов, регулирующих клеточный цикл, на 2 подтипа: уротелиоподобный (Uro) и геномно-нестабильный. В более поздних работах они подразделили первый из них на УроА, УроАп (прогрессия УроА), УроВ, отличающий более выраженной базально-плоскоклеточной дифференцировкой, и УроС, имеющий некоторое сход-

of genes regulating the cell cycle into 2 subtypes: urothelial-like (Uro) and genomically unstable. In later works, they subdivided the former into UroA, UroAp (UroA progression), UroB, distinguished by more pronounced basal-squamous cell differentiation, and UroC, which has some similarity to the genomically unstable in gene expression. A group of Lund scientists also proposed a technique for subclassifying molecular subtypes of bladder cancer using immunohistochemical methods, showing sufficiently high concordance between mRNA expression and surrogate immunohistochemical markers to determine major subtypes. It should be noted that this classification has been worked out on a co-

ство с геномно-нестабильным по экспрессии генов. Также группа ученых Лунда предложила методику субклассификации молекулярных подтипов рака мочевого пузыря с помощью иммуногистохимического метода, показав достаточно высокую конкордантность между экспрессией мРНК и суррогатными иммуногистохимическими маркерами для установления основных подтипов. Следует отметить, что данная классификация отработывалась на когорте пожилых пациентов. Среди базально-плоскоклеточной группы опухолей также выделены специфические молекулярные подтипы разными группами исследователей. Так, ученые Университета Северной Каролины выделяют так называемый клаудин-низкий подтип на основании низкой экспрессии клаудинов, сравнительно высокой экспрессии иммунных маркеров и амплификации гена *EGFR*. Система Лунда выделяет среди базально-плоскоклеточного кластера базальные/плоскоклеточные инфильтрированные опухоли, отличающиеся значительной экспрессией иммунных маркеров. Также эта система отвела место для мезенхимально-подобного подтипа, характеризующегося высокой экспрессией маркеров эпителиально-мезенхимального перехода.

Урологический Консенсус 2019 г., суммировав данные анализа разных групп исследователей, принял шесть молекулярных подтипов среди мышечно-инвазивных уротелиальных карцином — люминальный папиллярный, люминальный неспецифичный, люминальный нестабильный, «с преобладанием стромы», базальный/плоскоклеточный и нейроэндокрино-подобный [15, 17]. Было отмечено, что данная классификация коррелирует с каждым молекулярным подтипом исходных классификационных систем. Опухоли люминального кластера, включающие три подтипа (люминальный папиллярный, люминальный неспецифичный и люминальный нестабильный), сверхэкспрессируют сигнатуры уротелиальной дифференцировки, что согласуется с таксономией уротелиоподобного подтипа Lund. Напротив, опухоли базального/плоскоклеточного и нейроэндокрино-подобного подтипов сверхэкспрессируют базальные и нейроэндокринные маркеры соответственно. Помимо дифференцировки уротелия, опухоли люминального кластера различаются по другим молекулярными признаками: опухоли люминального папиллярного подтипа, чаще неинвазивные, ассоциированы с транскрипционной активностью *FGFR3*; в люминальном неспецифицированном подтипе преобладает инфильтрация стромы, в основном фибробластами; люминаль-

hort of elderly patients. Among the basal/squamous cell group of tumors, specific molecular subtypes have also been identified by different groups of researchers. For example, scientists at the University of North Carolina distinguish the so-called claudin-low subtype on the basis of low claudin expression, relatively high expression of immune markers, and *EGFR* gene amplification. The Lund's system distinguishes basal and squamous cell infiltrated tumors, which are characterized by significant expression of immune markers, among the basal/squamous cell cluster. Furthermore, this system has reserved a place for the mesenchymal-like subtype characterized by high expression of epithelial-mesenchymal transition markers.

The 2019 Urology Consensus, summarizing data from analyses by different groups of researchers, adopted six molecular subtypes among muscle-invasive urothelial carcinomas — a luminal papillary one, a luminal nonspecified one, a luminal unstable one, a stroma-rich one, a basal/squamous-cell one, and a neuroendocrine-like one [15, 17]. It was noted that this classification correlated with each molecular subtype of the original classification systems. Luminal cluster tumors including three subtypes (luminal papillary, luminal nonspecified, and luminal unstable) overexpress urothelial differentiation signatures, which is consistent with the taxonomy of the urothelial-like Lund subtype. In contrast, tumors of the basal/squamous cell and neuroendocrine-like subtypes overexpress basal and neuroendocrine markers respectively. In addition to urothelial differentiation, luminal cluster tumors differ in other molecular features: luminal papillary subtype tumors, more often noninvasive, are associated with *FGFR3* transcriptional activity; the luminal nonspecified subtype is dominated by stromal infiltration, mainly by fibroblasts; the luminal unstable subtype is characterized by increased expression of cell cycle genes. Stroma-rich tumors demonstrate an intermediate level of urothelial differentiation and mainly overexpression of smooth muscle, endothelial, and myofibroblastic markers.

Now, despite the obvious informativeness for oncology, the implementation of molecular classifications into routine use has been being hampered due to the complexity and high cost of the mRNA expression evaluation. Nevertheless, several researchers have attempted to adapt surrogate immunohistochemical markers for molecular profiling of bladder cancer.

ный нестабильный подтип характеризуется повышенной экспрессией генов клеточного цикла. Опухоли с преобладанием стромы (stroma-rich) демонстрируют промежуточный уровень уротелиальной дифференцировки и, в основном, сверхэкспрессию гладкомышечных, эндотелиальных и миофибробластических маркеров.

В настоящее время, несмотря на очевидную информативность для онкологии, внедрение молекулярных классификаций в рутинную практику тормозится из-за сложности и дороговизны методики оценки экспрессии мРНК. Тем не менее рядом исследователей предприняты попытки адаптации суррогатных иммуногистохимических маркеров для молекулярного профилирования рака мочевого пузыря.

Принимая во внимание результаты проведенных исследований пожилых пациентов и возрастную гипотезу рака мочевого пузыря, в нашем исследовании мы применили метод молекулярного профилирования Lund рака мочевого пузыря с использованием суррогатных иммуногистохимических маркеров и предприняли попытку адаптировать его к молодой группе пациентов.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-морфологическое обоснование молекулярного профилирования рака мочевого пузыря у молодых пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общая характеристика пациентов и клинико-морфологические данные. Проведено ретроспективное (2010–2019 гг.) исследование операционного материала, полученного при трансуретральной резекции и радикальной цистэктомии у 56 пациентов моложе 45 лет с уротелиальными карциномами мочевого пузыря из трех профильных лечебных учреждений (Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический), городской онкологический диспансер г. Санкт-Петербурга, городской онкологический диспансер г. Иваново) (табл. 1).

Исследуемую группу было решено разделить на три возрастные подгруппы для статистического анализа: подгруппа 20–29 лет (среднее значение 27.1 года) включала 10 пациентов (18 %); подгруппа 30–39 лет (среднее значение 34.6 года) включала 30 пациентов (53 %); подгруппа 40–44 года (среднее значение 42.0 года) включала 16 пациентов (29 %). Среднее возрастное значение в исследуемой группе 35.5 года. Соотношение мужчин и женщин 3 : 1. В каждом опухолевом об-

Taking into account the results of the conducted studies of elderly patients and the age hypothesis of bladder cancer, in our study we applied the Lund method of molecular profiling of bladder cancer using surrogate immunohistochemical markers and made an attempt to adapt it to a young group of patients.

AIM OF THE RESEARCH

A clinical and morphological rationale for molecular profiling of bladder cancer in young patients.

MATERIALS AND METHODS

General characteristics of patients and clinical and morphological data. A retrospective (2010–2019) study of the operative material obtained during transurethral resection and radical cystectomy in 56 patients under 45 years of age with urothelial carcinomas of the bladder from three specialized medical institutions (the St. Petersburg Clinical Scientific and Practical Center for Specialized Types of Medical Care (Oncologic), the City Clinical Oncological Health Center (St. Petersburg), the City Oncological Health Center (Ivanovo)) has been performed (Table 1).

It has been decided to divide the study group into three age subgroups for statistical analysis: the 20–29 years subgroup (average value 27.1 years) included 10 patients (18%); the 30–39 years subgroup (average value 34.6 years) included 30 patients (53%); the 40–44 years subgroup (average value 42.0 years) has included 16 patients (29%). The average age in the study group was 35.5 years. Male to female ratio is 3 : 1. The following morphological features have been assessed in each tumor specimen: histological pattern, invasion pattern, degree of malignancy, *in situ* component, and pathological stage. The distribution of patients according to tumor stage and degree of malignancy is shown in Fig. 2. Most of the cases of low-grade non-muscle invasive carcinomas had urothelial morphology, and in the 20–29 years old subgroup, all tumors had this morphology and were non-muscle invasive. Invasive tumors were detected in subgroups of age 30–39 years (7 cases) and 40–44 years (7 cases); in these subgroups, tumors showed different histological differentiation (urothelial with squamous cell differentiation, with signet ring cells, glandular structures, and low-differentiated and undifferentiated types, including rhabdoid, chondroid differentiation). A catamnesis was available in 49 patients and has included a period of 5 to 84 months, a median of 36 months (average value 37.6 ± 2.9 months). In the 20–29 years subgroup, local relapse occurred in 1 case (2%) 24 months after

Таблица 1. Характеристика пациентов и клинико-морфологические данные опухолей
Table 1. Characteristics of patients and clinical and morphological data of tumors

Возрастные подгруппы (среднее значение) Age subgroups (average value)	Кол-во случаев (%) Number of cases (%)	Пол: мужской/женский (%) Gender: male/female (%)	pT стадия – кол-во (%) pT stage – quantity (%)	Степень злокачественности (Grade) – кол-во (%) Grade – quantity (%)	Гистологический паттерн опухоли – кол-во (%) Tumor histological pattern – quantity (%)	Наличие <i>in situ</i> компонента <i>In situ</i> component	Рецидив Relapse	Мета-стазы Meta-stases
20–29 лет (27.1 года) Age 20–29 (27.1 years old)	10 (18)	7/3 (13/5)	pTa – 8 (15) pT1 – 2 (4)	Low – 7 (13) High – 3 (5)	Уротелиальный – 9 (16) Urothelial – 9 (16) Уротелиальный со сквамозной дифференцировкой – 1 (2) Urothelial with squamous cell differentiation – 1 (2)	Нет – 6 No – 6 Неизвестно – 4 Unknown – 4	1/10	0/10
30–39 лет (34.6 года) Age 30–39 (34.6 years old)	30 (53)	21/9 (36/16)	pTa – 23 (40) pT1 – 6 (11) pT2 – 1 (2)	Low – 21 (38) High – 9 (15)	Уротелиальный – 26 (45) Urothelial – 26 (45) Уротелиальный со сквамозной дифференцировкой – 2 (4) Urothelial with squamous cell differentiation – 2 (4) Уротелиальный с перстневидными клетками – 1 (2) Urothelial with signet ring cells – 1 (2) Неуротелиальный – 1 (2) Non-urothelial – 1 (2)	Нет – 16 No – 16 Да – 1 Yes – 1 Неизвестно – 13 Unknown – 13	5/30	1/30
40–44 года (42.0 года) Age 40–44 (42.0 years old)	16 (29)	14/2 (25/4)	pTa – 9 (16) pT1 – 3 (5) pT2 – 2 (4) pT3 – 1 (2) pT4 – 1 (2)	Low – 6 (11) High – 9 (16) Mixed – 1 (2)	Уротелиальный – 9 (16) Urothelial – 9 (16) Уротелиальный со сквамозной дифференцировкой – 3 (5) Urothelial with squamous cell differentiation – 3 (5) Неуротелиальный (в том числе гетерогенный) – 4 (7) Non-urothelial (including heterogeneous) – 4 (7)	Нет – 4 No – 4 Yes – 1 Да – 1 Неизвестно – 11 Unknown – 11	5/16	2/16
Всего (средний возраст – 35.5 года) Total (average age – 35.5 years old)	56 (100)	42/14 (75/25)	pTa – 40 (70) pT1 – 11 (20) pT2 – 3 (6) pT3 – 1 (2) pT4 – 1 (2)	Low – 34 (62) High – 21 (36) Mixed – 1 (2)	Уротелиальный – 44 (78) Urothelial – 44 (78) Уротелиальный со сквамозной дифференцировкой – 6 (11) Urothelial with squamous cell differentiation – 6 (11) Уротелиальный с перстневидными клетками – 1 (2) Urothelial with signet ring cells – 1 (2) Неуротелиальный – 5 (9) Non-urothelial – 5 (9)	Нет – 26 No – 26 Да – 2 Yes – 2 Неизвестно – 28 Unknown – 28	11/56	3/56

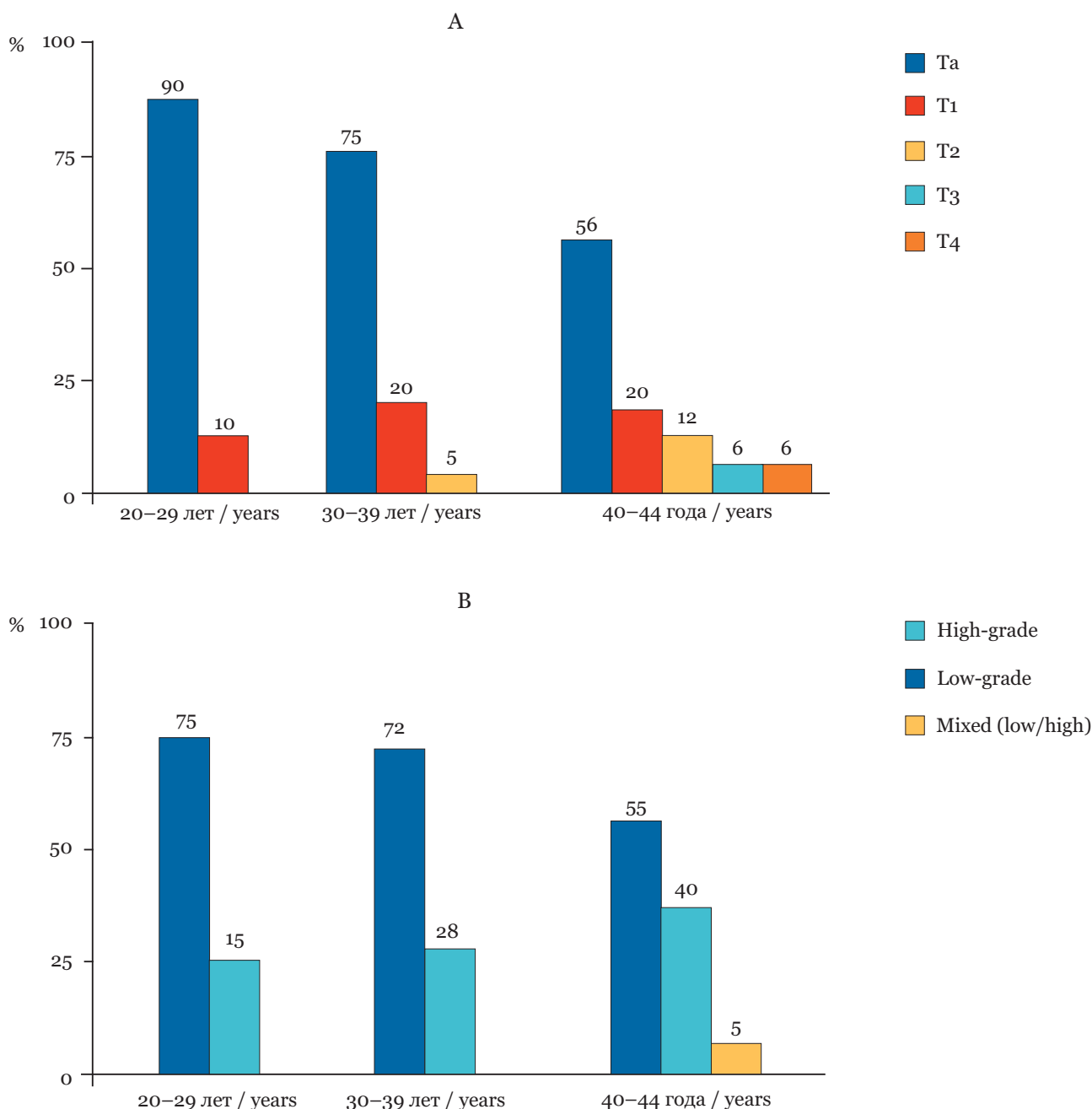


Рис. 2. Распределение опухолей по стадии (А) и степени злокачественности (В)
Fig. 2. Distribution of tumors by stage (A) and degree of malignancy (B)

разце оценивались следующие морфологические признаки: гистологический паттерн, паттерн инвазии, степень злокачественности, наличие *in situ* компонента, патологическая стадия. Распределение пациентов по стадии опухоли и степени злокачественности приведено на рис. 2. Большинство случаев мышечно-неинвазивных карцином низкой степени злокачественности имели уротелиальную морфологию, причем в подгруппе 20–29 лет все опухоли имели такую морфологию и были мышечно-неинвазивными. Инвазивные

diagnosis without evidence of metastasis (follow-up period amounted 5 to 48 months, the average value was 25.2 ± 5.3 months, the median was 24 months). In the subgroup of age 30–39 years, 5 patients have had local relapse (follow-up period 8–49 months), one of them registered progression in the form of lung metastasis (follow-up period 5–49 months). In the 40–44 years subgroup, local relapses have occurred in 5 patients (follow-up period 5–60 months); two patients from this subgroup have been diagnosed with metastases (follow-up period 24–60

опухоли выявляли в подгруппах 30–39 лет (7 случаев) и 40–44 года (7 случаев); в этих подгруппах опухоли демонстрировали различную гистологическую дифференцировку (уротелиальную со сквамозной дифференцировкой, с перстневидными клетками, glandулярными структурами, а также низкодифференцированные и недифференцированные типы, включающие рабдоидную, хондроидную дифференцировку). Катамнез был доступен у 49 пациентов и включал период от 5 до 84 мес, медиана 36 мес (среднее значение 37.6 ± 2.9 мес). В подгруппе 20–29 лет местный рецидив имел место в 1 случае (2 %) через 24 мес после постановки диагноза без признаков метастазирования (период наблюдения 5–48 мес, среднее значение 25.2 ± 5.3 мес, медиана 24 мес). В подгруппе 30–39 лет у 5 пациентов случился местный рецидив (период наблюдения 8–49 мес), у одного из них зарегистрировано прогрессирование в виде метастаза в легком (период наблюдения 5–49 мес). В подгруппе 40–44 года местные рецидивы имели место у 5 пациентов (период наблюдения 5–60 мес); у двоих пациентов из этой подгруппы диагностированы метастазы (период наблюдения 24–60 мес, среднее значение 42 ± 18 мес, медиана 42 мес), у одного из них — с летальным исходом.

Все микропрепараты, окрашенные гематоксилином и эозином, были просмотрены и соответствующим образом оценены. Степень злокачественности и патологическая стадия определялись в соответствии с классификацией TNM 8-го пересмотра [18].

Иммунофенотипирование и дополнительные методы исследования. Иммуногистохимическое исследование проводилось на иммуноштейнере Ventana BenchMark XT по общепринятой методике на депарафинизированных срезах толщиной 3–5 мкм, расположенных на положительно заряженных стеклах, согласно протоколам фирм-производителей. Применена подтип-специфическая панель антител, рекомендованная исследователями Lund Bladder Cancer Research Group, которая включала 22 антитела: CCNB1 (Y106; 1 : 400, Abcam, Cambridge, England), CCND1 (SP4; 1 : 200, Cell Marque, Rocklin, CA), CDKN2A/p16 (E6H4; RTU, Ventana, Oro Valley, AZ), E2F3 (PG30; 1 : 200, Abcam), HER2/neu (4B5; RTU, Ventana), EPCAM (Moc-31; 1 : 150, Cell Marque), FGFR3 (B9; 1 : 125, Santa Cruz Biotechnology), FOXA1 (2F83; 1 : 200, Cell Marque), GATA3 (L50-823; 1 : 200, Cell Marque), KRT5/6 (D5/16B4; 1 : 200, Cell Marque), KRT14 (LL002; 1 : 150, Innovative Diagnostik-System), KRT20 (Ks20.8; 1 : 200, Cell Marque), RB1 (4H1; 1 : 800, Cell Signalling Technology), SYP (MRQ40; 1 : 200, Cell Marque), TP63 (DAK-p63; 1 : 200, Dako),

months, with average value 42 ± 18 months, median 42 months), one of them with a fatal outcome.

All hematoxylin and eosin stained microslides have been reviewed and evaluated accordingly. The degree of malignancy and pathological stage have been determined according to the 8th edition of the TNM classification [18].

Immunophenotyping and additional research methods. Immunohistochemistry has been performed on a Ventana BenchMark XT immunostainer according to the standard technique on deparaffinized sections 3–5 μ m thick placed on positively charged glasses, according to the protocols of manufacturing companies. A specific antibody panel recommended by the Lund Bladder Cancer Research Group has been used, which included 22 antibodies: CCNB1 (Y106; 1 : 400, Abcam, Cambridge, England), CCND1 (SP4; 1 : 200, Cell Marque, Rocklin, CA), CDKN2A/p16 (E6H4; RTU, Ventana, Oro Valley, AZ), E2F3 (PG30; 1 : 200, Abcam), HER2/neu (4B5; RTU, Ventana), EPCAM (Moc-31; 1 : 150, Cell Marque), FGFR3 (B9; 1 : 125, Santa Cruz Biotechnology), FOXA1 (2F83; 1 : 200, Cell Marque), GATA3 (L50-823; 1 : 200, Cell Marque), KRT5/6 (D5/16B4; 1 : 200, Cell Marque), KRT14 (LL002; 1 : 150, Innovative Diagnostik-System), KRT20 (Ks20.8; 1 : 200, Cell Marque), RB1 (4H1; 1 : 800, Cell Signalling Technology), SYP (MRQ40; 1 : 200, Cell Marque), TP63 (DAK-p63; 1 : 200, Dako), UPK3 (AU-1; 1 : 50, Cell Marque), Ki67 (SP6; 1 : 200, Spring), EGFR (5B7; RTU, Ventana), E-cadherin (GM016; 1 : 200, Cell Marque), ZEB2 (E-11; 1 : 50, Santa Cruz Biotechnology), CD44 (MRQ13; 1 : 300, Cell Marque), VIM (V9; 1 : 200, GeneMed). The evaluation of positive and negative controls has met the requirements.

The method of immunohistochemical evaluation of tumors was used according to the Lund Group researchers with the assessment of each tumor specimen according to two criteria: staining intensity and percentage of positive cells. Tumor cell score (TCS) and percentage of positive cells (frac.) have been calculated for each marker.

To assess HER2 status, the dual *in situ* hybridization method has been used — chromogenic (Ventana Dual ISH Her2 DNP, CHR17 DIG probes on the BenchMark XT platform) and fluorescent using the ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (ZytoVision GmbH) in the ThermoBrite System (Abbott) automated hybridizer.

Statistical methods. Statistical tests have been performed in the SigmaPlot 12.5 statistical calcula-

UPK3 (AU-1; 1 : 50, Cell Marque), Ki67 (SP6; 1 : 200, Spring), EGFR (5B7; RTU, Ventana), E-cadherin (GMO16; 1 : 200, Cell Marque), ZEB2 (E-11; 1 : 50, Santa Cruz Biotechnology), CD44 (MRQ13; 1 : 300, Cell Marque), VIM (V9; 1 : 200, GeneMed). Оценка положительного и отрицательного контролей соответствовала требованиям.

Методика иммуногистохимической оценки опухолей использована согласно данным исследователей группы Lund с оценкой каждого опухолевого образца по двум критериям: интенсивность окрашивания и процент положительных клеток. Для каждого маркера производился подсчет балла опухолевых клеток (TCS) и процента положительных клеток (frac.).

Для оценки HER2-статуса применялся двойной метод гибридизации *in situ* — хромогенный (Ventana Dual ISH Her2 DNP, CHR17 DIG probes на платформе BenchMark XT) и флуоресцентный с использованием зонда ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (ZytoVision GmbH) в автоматическом гибридализере ThermoBrite System (Abbott).

Статистические методы. Статистические тесты были выполнены в программе для статистических вычислений SigmaPlot 12.5. Качественные признаки анализировались с вычислением точного критерия Фишера, который был использован для проверки различий в категориальных данных с критическим уровнем значимости $p < 0.05$. Статистическая значимость различий по значениям TCS и frac. оценивалась непараметрическим методом с использованием Mann-Whitney U-test. Для оценки клинического исхода проводился анализ Kaplan-Meier и анализ пропорциональных рисков — регрессия Cox с логарифмическим ранговым критерием (Logrank test). Все значения были даны как средние $\pm$ стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено раздельное (для каждой из трех возрастных подгрупп) иммунофенотипирование 56 случаев уротелиальных карцином у пациентов моложе 45 лет в соответствии с описанной методикой Lund и классифицированы молекулярные подтипы опухолей.

Уротелиоподобный подтип

Морфологически опухоли характеризовались классической уротелиальной морфологией, чаще папиллярного строения низкой степени злокачественности. Иммуногистохимически они экспрессировали маркеры уротелиальной дифференцировки. Клинически опухоли этого типа имели благоприятный прогноз, а пациенты демонстрировали наилучшую выживаемость с небольшими раз-

тионами. Качественные признаки были проанализированы с помощью точного критерия Фишера, который был использован для проверки различий в категориальных данных с критическим уровнем значимости $p < 0.05$. Статистическая значимость различий в TCS и frac. значениях была оценена непараметрическим методом с использованием Mann-Whitney U-test. Анализ выживаемости и пропорциональных рисков — регрессия Cox с логарифмическим ранговым критерием (Logrank test) были выполнены для оценки клинического исхода. Все значения были даны как средние $\pm$ стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отдельно (для каждой из трех возрастных подгрупп) иммунофенотипирование 56 случаев уротелиальных карцином у пациентов моложе 45 лет было выполнено в соответствии с описанной методикой Lund, а молекулярные подтипы опухолей были классифицированы.

Уротелиоподобный подтип

Морфологически, опухоли были характеризовались классической уротелиальной морфологией, чаще с папиллярной структурой низкой степени злокачественности. Иммуногистохимически они экспрессировали некоторые маркеры уротелиальной дифференциации. Клинически, опухоли этого типа имели благоприятный прогноз, а пациенты продемонстрировали наилучшую выживаемость с небольшими различиями.

Уротелиоподобный подтип A. В 44 случаях (78%), опухоли продемонстрировали классическую папиллярную уротелиальную морфологию, большинство из них были немускульной инвазивными (84%), с низкой степенью злокачественности (77%). История болезни была доступна в 38 случаях, с периодом наблюдения 5–84 месяца. Повторные рецидивы произошли в 5 случаях (12%) в течение периода наблюдения 8–60 месяцев, один из которых закончился летальным исходом, который не был связан с прогрессированием заболевания. Опухоли продемонстрировали слабую экспрессию CCB1 (TCS 0.04) с сильной до умеренной экспрессией CCD1 (TCS 2.4), FOXA1 (TCS 2), p63 (TCS 0.9), RB1 (frac. 0.9) в сочетании с низкими уровнями E2F3 (frac. 0.05), p16 (TCS 0.3). Кроме того, экспрессия маркеров, характерных для нормальной уротелиальной дифференциации, была замечена: CK5/6 (TCS 0.3) в клетках опухоли.

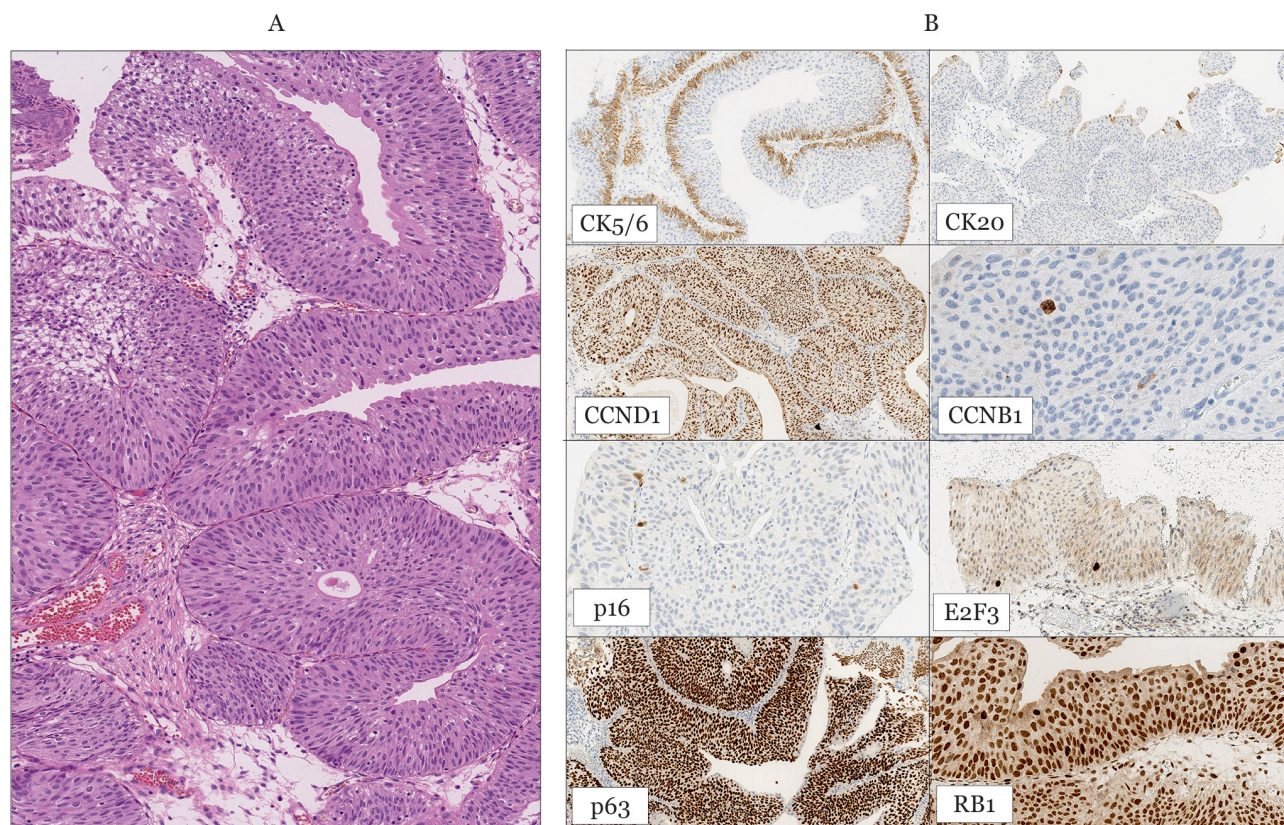


Рис. 3. Папиллярная уротелиальная карцинома low-grade (A) (окраска гематоксилином и эозином, увеличение (ув.) $\times 10$) и иммунопрофиль уротелиоподобного A подтипа (B)

Fig. 3. A low-grade papillary urothelial carcinoma (A) (hematoxylin and eosin staining, magnification (mag.) $\times 10$) and an immunoprofile of the urothelial-like A subtype (B)

личиями среди дополнительно выделенных подтипов внутри уротелиального кластера [19]. Последняя редакция молекулярной классификации Lund подразделяет уротелиоподобный подтип на четыре дополнительных (УроА, УроАп, УроВ, УроС) с некоторыми молекулярно-генетическими и иммуногистохимическими отличиями.

Уротелиоподобный А подтип. В 44 случаях (78 %) опухоли демонстрировали классическую папиллярную уротелиальную морфологию, в большинстве своем были мышечно-неинвазивными (84 %), низкой степени злокачественности (77 %). Катамнез был доступен в 38 случаях, период наблюдения 5–84 мес. Рецидивы имели место в 5 случаях (12 %) за период наблюдения 8–60 мес, один из которых закончился летально, что не связано с прогрессированием заболевания. Опухоли демонстрировали слабую экспрессию CCB1 (TCS 0.04) при выраженной и умеренной экспрессии CCD1 (TCS 2.4), FOXA1 (TCS 2), p63 (TCS 0.9), RB1 (frac. 0.9) в сочетании с низким уровнем E2F3 (frac. 0.05), p16 (TCS 0.3). Кроме того, наблюдалась экспрессия маркеров, характерных для дифференцировки нормального уро-

basal and suprabasal urothelial layers, CK20 (TCS 0.1) in the cells of the surface urothelial layers (Fig. 3). According to the Lund classification, this group has been categorized as the *urothelial-like A* subtype, which was fully consistent with a similar subtype in elderly patients. It is noteworthy that all tumors in patients under 30 years of age have belonged to this subtype. From a clinical point of view, the tumors of the urothelial-like A subtype have proceeded favorably, and patients have showed the best survival rate (5-year survival rate amounted to 60%).

The Urothelial-like B subtype. A small cluster of tumors (2; 4%) with typical urothelial morphology and urothelial phenotype (FOXA1+, GATA3+), characterized by more pronounced expression of basal markers CK14 in cells of basal and parabasal urothelial layers, heterogeneous or diffuse CK5/6 expression in cells of basal, parabasal and intermediate urothelial layers, diffuse pronounced expression of CK20 and FGFR3 (Fig. 4).

This subtype has had a less favorable prognosis compared to the urothelial-like A subtype (5-year survival rate has been about 20%). The catamnesis

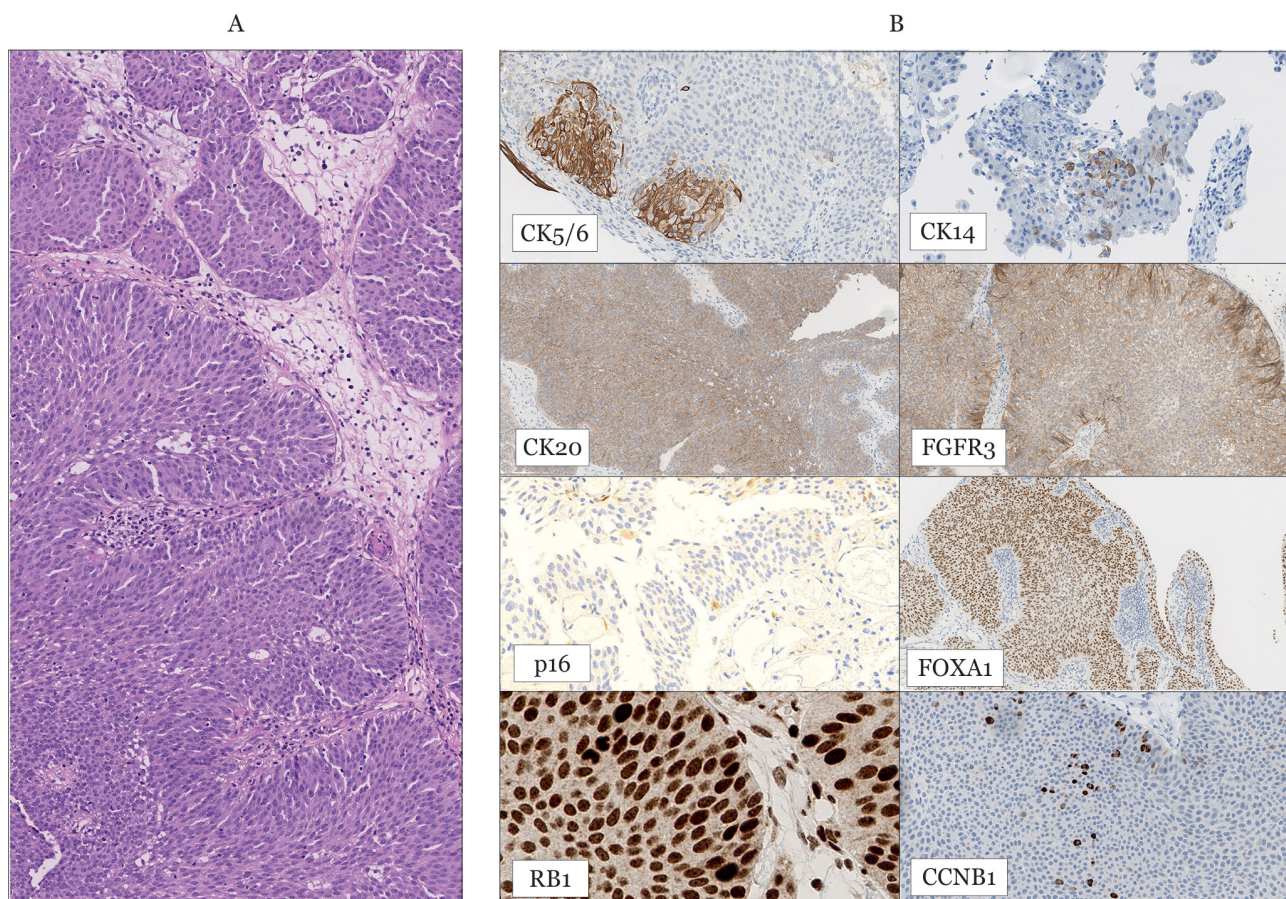


Рис. 4. Папиллярная уротелиальная карцинома high-grade (A) (окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 10$) и иммунопрофиль уротелиоподобного B подтипа (B)

Fig. 4. A high-grade papillary urothelial carcinoma (A) (hematoxylin and eosin staining, mag. $\times 10$) and an immunoprofile of urothelial-like B subtype (B)

теля: CK5/6 (TCS 0.3) в клетках базального и супрабазального слоев уротелия, CK20 (TCS 0.1) в клетках поверхностных слоев уротелия (рис. 3). По классификации Lund эту группу отнесли к *уротелиоподобному A* подтипу, что полностью соответствовало аналогичному подтипу у пожилых пациентов. Примечательно, что все опухоли у пациентов до 30 лет относились к данному подтипу. Клинически опухоли уротелиоподобного A подтипа протекали благоприятно, а пациенты показывали наилучшую выживаемость (5-летняя выживаемость составила 60 %).

Уротелиоподобный B подтип. Небольшой кластер опухолей (2; 4 %) с типичной уротелиальной морфологией и уротелиальным фенотипом (FOXA1+, GATA3+), отличающийся более выраженной экспрессией базальных маркеров CK14 в клетках базального и парабазального слоев уротелия, гетерогенной или диффузной экспрессией CK5/6 в клетках базального, парабазального и промежуточного слоев уротелия, диффузной выраженной экспрессией CK20 и FGFR3 (рис. 4).

data has showed multiple relapses in one case (follow-up period of 60 months), in the second case no relapses have been registered (follow-up period of 36 months).

SK5/6+/p16+ subtype. A small group of tumors (4; 7%) with a statistically significant level of squamous differentiation has been identified within the urothelial subtype. In most of the tumors, the CK5/6 expression has been revealed not only in basal but also in intermediate urothelial layers (TCS 0.8), and there has been also CK14 expression in single cells of basal layer (TCS 0.03) (Fig. 5), which has been absent in the tumors of the urothelial-like A subtype. In contrast to the urothelial-like A subtype, the expression level of p16 has been significantly higher (TCS 2.0). In addition, a rather high level of E2F3 overexpression has been detected (frac. 0.15). High-grade malignancy tumors have prevailed (3; 75%), non-muscle invasive — 2 (50%), muscle-invasive — 2 (50%). Duration of catamnesis for all patients was 7–36 months. It should be noted that there have been frequent relapses (3; 75%) between 7 and 24

Данный подтип отличался менее благоприятным прогнозом в сравнении с уротелиоподобным А подтипом (5-летняя выживаемость составила около 20 %). Данные катмнеза показали в одном случае множественные рецидивы (период наблюдения 60 мес), во втором случае рецидивы не зарегистрированы (период наблюдения 36 мес).

CK5/6+ p16+ подтип. Внутри уротелиального подтипа выделена небольшая группа опухолей (4; 7 %) со статистически значимым уровнем плоскоклеточной дифференцировки. В большинстве опухолей экспрессия CK5/6 определялась не только в базальных, но и промежуточных слоях уротелия (TCS 0.8), а также отмечалась экспрессия CK14 в единичных клетках базального слоя (TCS 0.03) (рис. 5), что отсутствовало в опухолях уротелиоподобного А подтипа. В отличие от уротелиоподобного А подтипа, уровень экспрессии p16 был существенно выше (TCS 2.0). Кроме того, выявлен достаточно высокий уровень сверхэкспрессии E2F3 (frac. 0.15). Преобладали опухоли высокой степени злокачественности (3; 75 %), мышечно-неинвазивные — 2 (50 %), мышечно-инвазивные — 2 (50 %). Катмнестически охвачены все пациенты с доступным периодом наблюдения 7–36 мес. Отмечены частые рецидивы (3; 75 %) в период 7–24 мес. Подобные иммунофено-

months. Similar immunophenotypic features have been not found in any of the molecular subtypes of the tumors in elderly patients. For this reason, this group has been identified conventionally for statistical analysis and named by the immunophenotype CK5/6+/p16+.

Genomically unstable subtype

In the subgroup of age 40–44, there has been one (2%) high-grade muscle-invasive tumor with an immunoprofile other than the urothelial subtype. The tumor did not have classical urothelial morphology and was characterized by a heterogeneous structure: there were foci of a squamous and glandular differentiation (Fig. 6). Accordingly, the immunoprofile was also heterogeneous: very low expression of CCD1 (TCS 0.01–0.1), FOXA1 (TCS in the squamous cell component 0, in the glandular component 1.5), FGFR3 (frac. 0.1), p63 (frac. 0.05–1.0), absence of RB1 expression against overexpression of E2F3 (frac. 0.3–0.6), p16 (TCS in the squamous cell component 1.8, in the glandular component 3.0), CK20 (TCS in the glandular component 2.7, in the squamous cell component 0). In addition, molecular genetic testing has revealed amplification of the *HER2/neu* gene. No recurrences or metastases have been detected during the 24-month

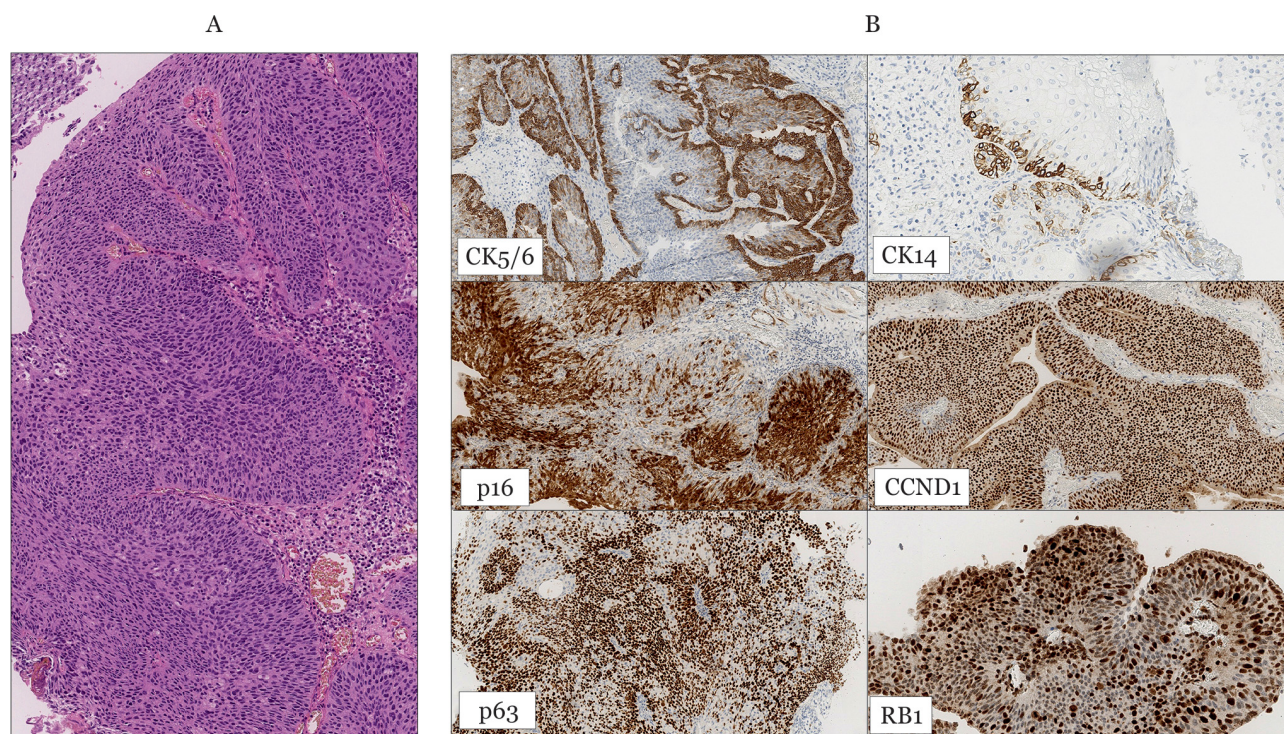


Рис. 5. Папиллярная уротелиальная карцинома high-grade (А) (окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 10$) и иммунопрофиль уротелиоподобного подтипа CK5/6+/p16+ (В)

Fig. 5. A high-grade papillary urothelial carcinoma (А) (hematoxylin and eosin staining, mag. $\times 10$) and an immunoprofile of the CK5/6+/p16+ urothelial-like subtype (В)

типические признаки не обнаружены ни в одном из молекулярных подтипов опухолей у пожилых пациентов. По этой причине для статистического анализа эта группа была выделена условно и названа по иммунофенотипу «CK5/6+/p16+».

Геномно-нестабильный подтип

В подгруппе 40–44 года имела одна (2 %) мышечно-инвазивная опухоль высокой степени злокачественности с иммунопрофилем, отличным от уротелиального подтипа. Опухоль не имела классическую уротелиальную морфологию и характеризовалась гетерогенностью строения: встречались очаги плоскоклеточной и железистой дифференцировки (рис. 6). Соответственно, иммунопрофиль также был неоднородным:

follow-up. According to the Lund classification, this group has been classified as the *genomically unstable* subtype, fully reproducible in comparison with the group of elderly patients. This prognostically unfavorable group of tumors has been characterized by a high rate of progression and aggressive course.

Basal/squamous cell-like subtype

Three cases (5%) of high-grade, deeply invasive urothelial carcinomas have showed a marked squamous phenotype: high expression level of CK5/6 (TCS 2.7) and CK14 (TCS 2.4) with a low GATA3 (TCS 0.3) level. The FOXA1 (TCS 0) expression has been absent as well. The tumors have been characterized by an aggressive course: two of them have

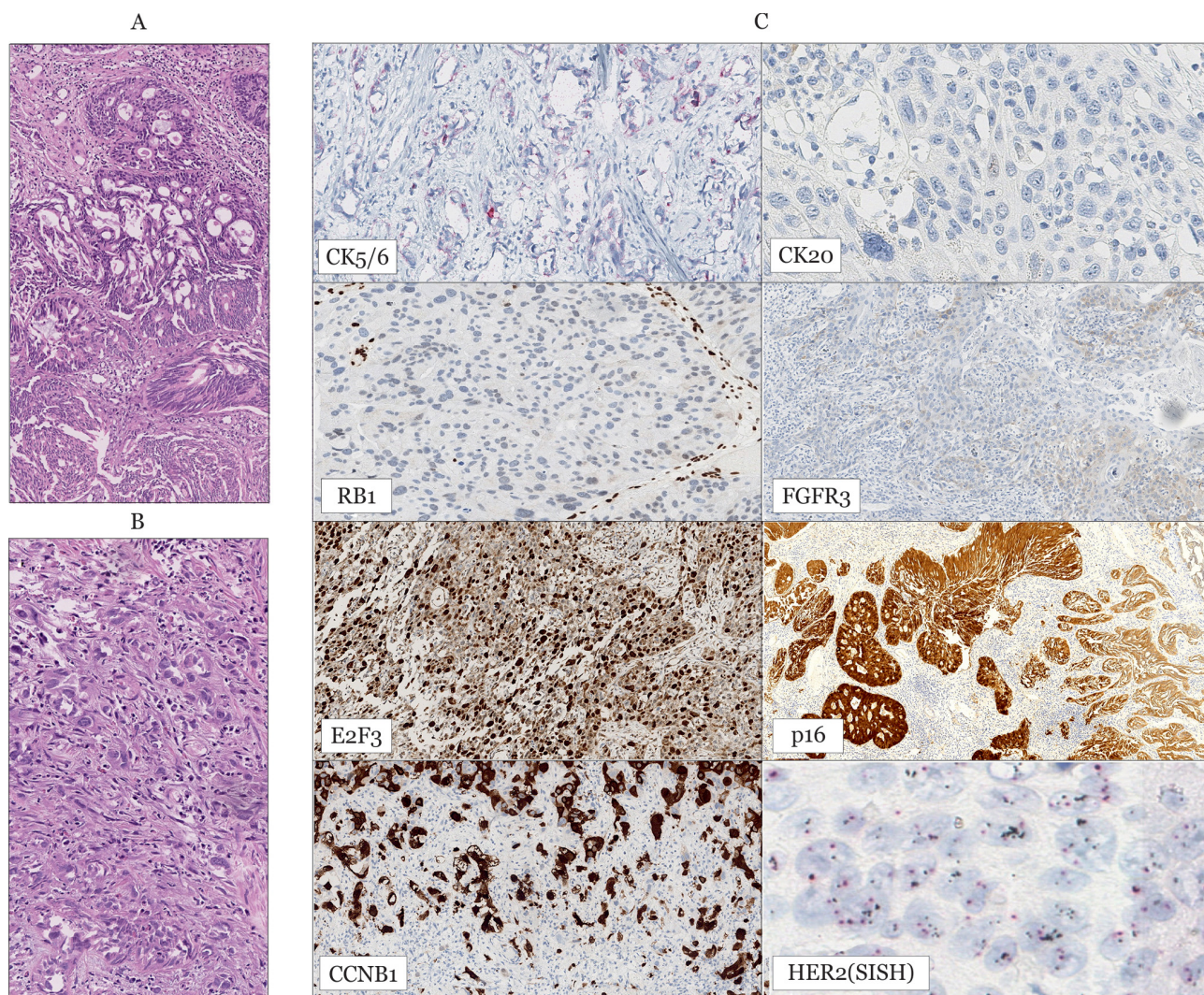


Рис. 6. Уротелиальная карцинома high-grade с участками гетерогенного строения (окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 20$: А — очаги железистой дифференцировки; В — очаги плоскоклеточной дифференцировки) и иммунопрофиль геномно-нестабильного подтипа (С)

Fig. 6. A high-grade urothelial carcinoma with areas of heterogeneous structure (hematoxylin and eosin staining, mag. $\times 20$: А — foci of glandular differentiation; В — foci of squamous differentiation) and an immunoprofile of the genomically unstable subtype (С)

очень низкий уровень экспрессии CCD1 (TCS 0.01–0.1), FOXA1 (TCS в плоскоклеточном компоненте 0, в железистом 1.5), FGFR3 (frac. 0.1), p63 (frac. 0.05–1.0), отсутствие экспрессии RB1 на фоне сверхэкспрессии E2F3 (frac. 0.3–0.6), p16 (TCS в плоскоклеточном компоненте 1.8, в железистом 3.0), CK20 (TCS в железистом компоненте 2.7, в плоскоклеточном 0). В дополнение к этому при молекулярно-генетическом исследовании выявлена амплификация гена *HER2/neu*. В течение 24 мес наблюдения рецидивов и метастазов не обнаружено. По классификации Lund эта группа отнесена к *геномно-нестабильному* подтипу, полностью воспроизводимому в сравнении с пожилой группой. Данная прогностически неблагоприятная группа опухолей отличалась высокой частотой прогрессии и агрессивным течением.

Базальный/плоскоклеточно-подобный подтип

В трех случаях (5 %) глубоко инвазивных уротелиальных карцином высокой степени злокачественности выявлен выраженный сквамозный фенотип: высокий уровень экспрессии CK5/6 (TCS 2.7) и CK14 (TCS 2.4) при низком уровне GATA3 (TCS 0.3). Также отсутствовала экспрессия FOXA1 (TCS 0). Опухоли характеризовались агрессивным течением: две из них были глубоко инвазивными (pT3a, pT4), одна — стадия pT2. Морфологически все опухоли имели характерную плоскоклеточную дифференцировку (рис. 7). Катамнез был известен в двух случаях (период наблюдения 60 мес). Рецидив отмечен в одном слу-

been deeply invasive (pT3a, pT4), one has been in the pT2 stage. Morphologically, all tumors have had a characteristic squamous cell differentiation (Fig. 7). The catamnesis has been known in two cases (with a follow-up period of 60 months). A relapse has been noted in one case. According to the Lund classification, this subtype has correlated completely with a similar, prognostically unfavorable one in elderly patients.

Mesenchymal-like subtype

In one (2%) case of a high-grade muscle-invasive tumor, there was a pronounced morphological polymorphism with a combination of predominant spindle cell, chondroid, glandular, and focal squamous cell histological patterns (Fig. 8). Immunohistochemically, the tumor has showed a pronounced expression of vimentin with a weak expression of the other markers. This case, referred to the mesenchymal-like subtype, has been fully reproducible in a group of young patients and has been characterized by a recurrent course (follow-up period of 5 months) and a poor prognosis.

The distribution of tumors by molecular subtypes in the age subgroups of young patients is shown in Fig. 9. In the subgroup under 30 years of age, the tumors have been of the urothelial A subtype only, in the early pathological stage (pTa, pT1). In the subgroup of age 30–39, the urothelial-like A subtype have also prevailed, but other subtypes have appeared, such as the urothelial-like CK5/6+/p16+ subtype (10%), as well as a small percentage of the urothelial-like B and basal/squamous cell-like

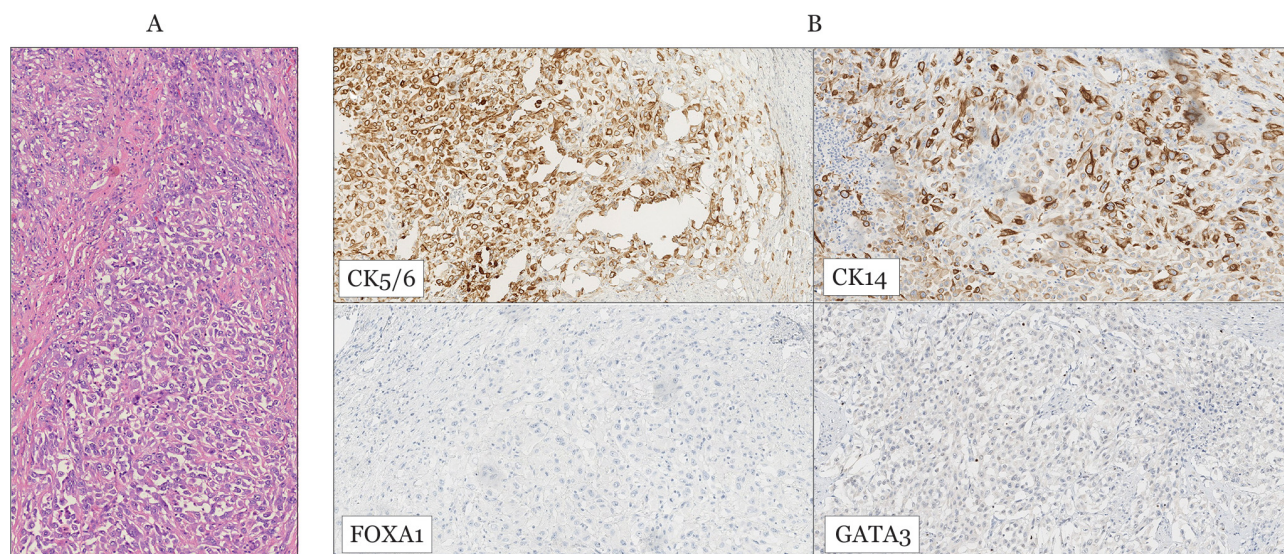


Рис. 7. Уротелиальная карцинома high-grade с выраженной плоскоклеточной дифференцировкой (А) (окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 10$) и иммунопрофиль базального/плоскоклеточно-подобного подтипа (В)
Fig. 7. A high-grade urothelial carcinoma with marked squamous cell differentiation (A) (hematoxylin and eosin staining, mag. $\times 10$) and an immunoprofile of the basal/squamous cell-like subtype (B)

чае. По классификации Lund данный подтип полностью коррелировал с аналогичным, прогностически неблагоприятным у пожилых пациентов.

Мезенхимально-подобный подтип

В одном (2 %) наблюдении мышечно-инвазивной опухоли высокой степени злокачественности установлен выраженный морфологический полиморфизм с сочетанием преобладающего веретенноклеточного, хондроидного, железистого и очагово-плоскоклеточного гистологических паттернов (рис. 8). Иммуногистохимически опухоль продемонстрировала выраженную экспрессию виментина при слабой экспрессии остальных маркеров. Этот случай, отнесенный к *мезенхимально-подобному* подтипу, был полностью воспроизводим в группе молодых пациентов и характеризовался рецидивирующим течением (период наблюдения 5 мес) и худшим прогнозом.

Распределение опухолей по молекулярным подтипам в возрастных подгруппах молодых пациентов показано на рис. 9. В подгруппе до 30 лет опухоли были только уротелиоподобного А подтипа, на ранней патологической стадии (pTa,

subtypes. In patients older than 40 years old, in addition to those already mentioned, genomically unstable and mesenchymal-like subtypes have been detected.

The Kaplan-Meier analysis of the recurrence-free survival

When evaluating the recurrence-free survival rate, the urothelial-like A subtype showed the best prognosis in young patients ($p = 0.022$) compared to the other subtypes, we have analyzed between them because of the small sample of patients. The so-called urothelial-like CK5/6+/p16+ subtype that we had identified, has showed a slightly less favorable prognosis in contrast to the urothelial subtype ($p = 0.057$) (Fig. 10).

In our study we have applied the Lund molecular profiling method using an immunohistochemical method to a cohort of young patients [20]. Based on the above mentioned methodology, bladder tumors in most cases can be divided into four subtypes: urothelial-like, genomically unstable, basal/squamous cell-like, and mesenchymal-like. As mentioned above, the age-related hypothesis and clinical beha-

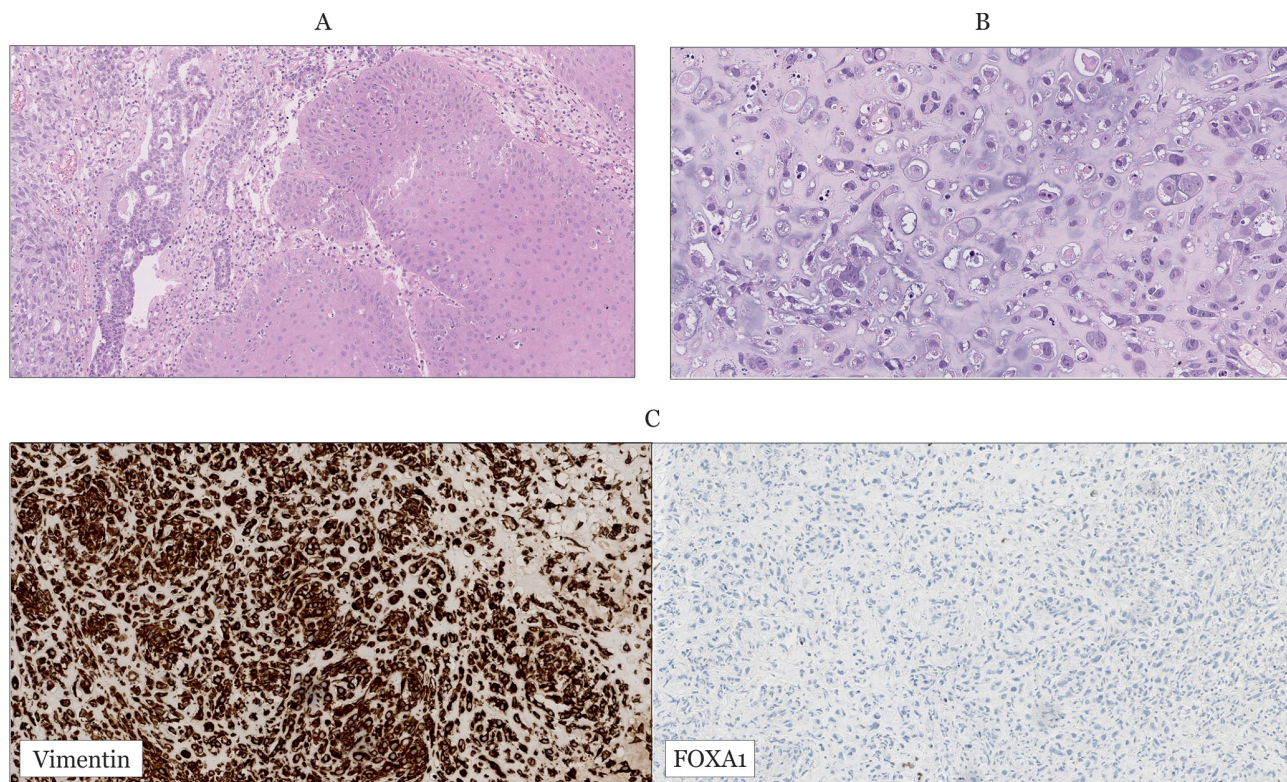


Рис. 8. Карцинома high-grade с участками гетерогенного строения (окраска гематоксилином и эозином:

А — очаги железистой, плоскоклеточной и веретенноклеточной дифференцировки, ув. $\times 10$;
В — очаги хондроидной дифференцировки, ув. $\times 20$) и иммунопрофиль мезенхимально-подобного подтипа (С)

Fig. 8. A high-grade carcinoma with areas of heterogeneous structure (hematoxylin and eosin staining:

А — foci of glandular, squamous cell, and spindle cell differentiation, mag. $\times 10$; В — foci of chondroid differentiation, mag. $\times 20$) and an immunoprofile of mesenchymal-like subtype (С)

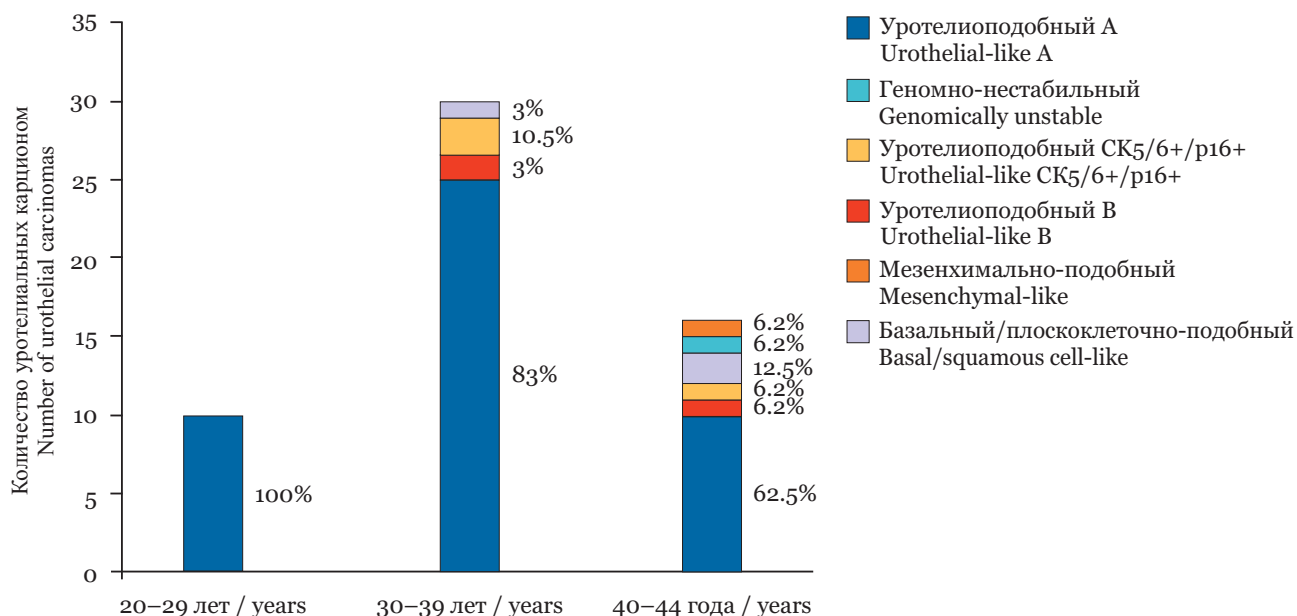


Рис. 9. Распределение молекулярных подтипов уротелиальных карцином в возрастных подгруппах молодых пациентов (цифры справа от молекулярного подтипа — доля этого подтипа)

Fig. 9. A distribution of molecular subtypes of urothelial carcinomas in the age subgroups of young patients (figures to the right of the molecular subtype are the proportion of that subtype)

pT1). В подгруппе 30–39 лет также превалировал уротелиоподобный А подтип, однако появились другие подтипы, такие как уротелиоподобный CK5/6+/p16+ подтип (10 %), а также небольшой процент уротелиоподобного В и базального/плоскоклеточно-подобного подтипа. У пациентов старше 40 лет, помимо уже названных, выявлялись геномно-нестабильный и мезенхимально-подобный подтипы.

Анализ безрецидивной выживаемости Kaplan-Meier

При оценке безрецидивной выживаемости наилучший прогноз у молодых пациентов показал уротелиоподобный А подтип ($p = 0.022$) в сравнении с другими подтипами, которые мы анализировали вместе из-за малой выборки пациентов. Выделенный нами так называемый уротелиоподобный CK5/6+/p16+ подтип показал несколько менее благоприятный прогноз в отличие от уротелиального подтипа ($p = 0.057$) (рис. 10).

В нашем исследовании мы применили метод молекулярного профилирования Lund с использованием иммуногистохимического метода на когорте молодых пациентов [20]. На основе вышеуказанной методики опухоли мочевого пузыря в большинстве случаев можно подразделить на четыре подтипа: уротелиоподобный, геномно-нестабильный, базальный/плоскоклеточно-подобный и мезенхимально-подобный. Как уже

behavior of bladder cancer have still been being under discussion. Some researchers report that the clinical course and prognosis of tumors in young patients is similar to that in older patients, while others report a higher survival rate, a favorable course, but a risk of recurrence of superficial urothelial carcinomas in young patients [19, 21, 22]. In general, the urothelial carcinomas in young patients have genetic features reflected in their biological behavior [23]. A number of authors indicate that these tumors are characterized by genomically stable [6, 7]. Some authors consider the low frequency of the *FGFR3* and *TP53* mutations, which play a crucial role in oncogenesis in the majority of elderly patients, to be a feature [8]. Contradictory data regarding genetic factors, clinical outcome, and prognosis of early urothelial bladder cancer may be due to the lack of consensus on a clear definition of the young group of patients within the group of individuals younger than 20 and 45 years [23–29].

This study has included an analysis of patients from 20 to 45 years of age according to the World Health Organization guidelines. In addition, the sample of young patients has been subdivided into three age subgroups for statistical analysis. Our results show that all Ta stage tumors and the majority of the T1 stage tumors had the phenotype of the urothelial-like A subtype. We have not identified any other molecular subtypes other than urothelial-like

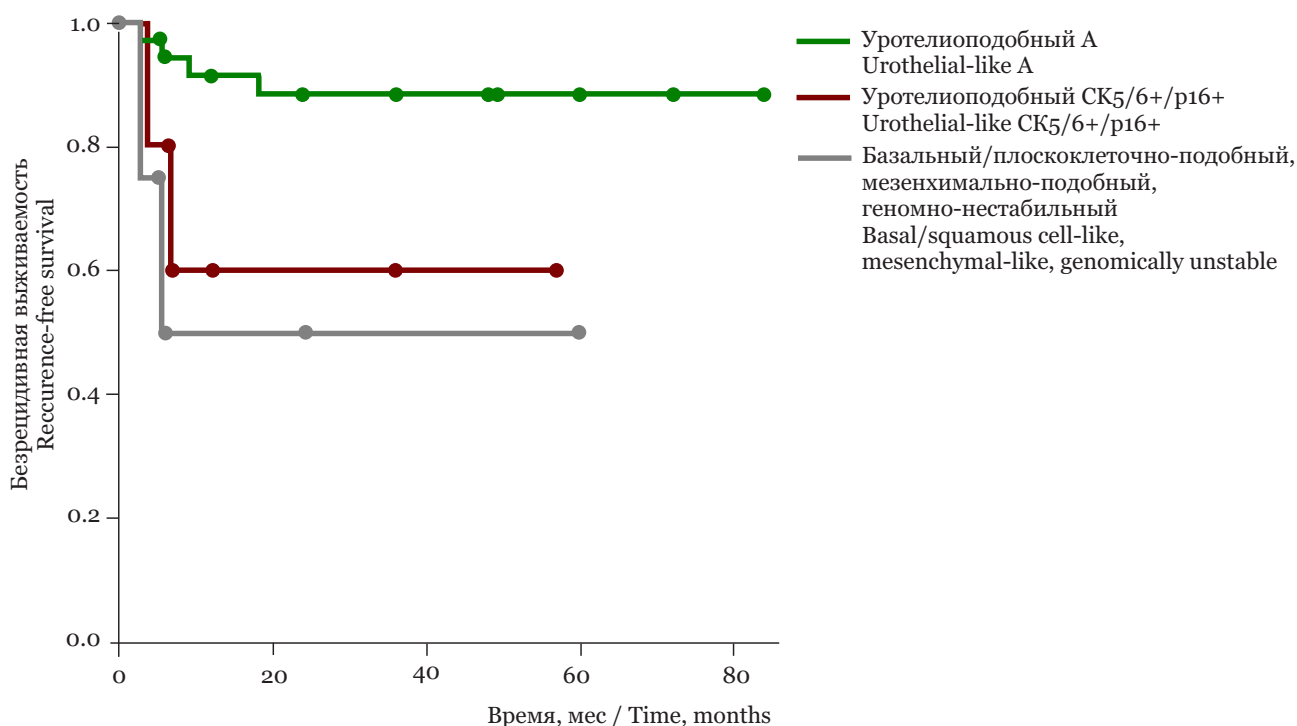


Рис. 10. Анализ безрецидивной выживаемости Kaplan-Meier
Fig. 10. The Kaplan-Meier analysis of the recurrence-free survival

указывалось выше, возрастная гипотеза и клиническое поведение рака мочевого пузыря все еще обсуждается. Некоторые исследователи сообщают, что клиническое течение и прогноз опухолей у молодых пациентов аналогичны таковым у пожилых, тогда как другие говорят о более высокой выживаемости, благоприятном течении, но риске рецидивирования поверхностных уротелиальных карцином у молодых пациентов [19, 21, 22]. В целом уротелиальные карциномы у молодых пациентов имеют генетические особенности, отражающиеся на их биологическом поведении [23]. Ряд авторов указывает, что для данных опухолей характерна геномная стабильность [6, 7]. Некоторые авторы считают особенностью низкую частоту мутаций генов *FGFR3* и *TP53*, которые играют решающую роль в онкогенезе у большинства пожилых пациентов [8]. Противоречивые данные относительно генетических факторов, клинического исхода и прогноза раннего уротелиального рака мочевого пузыря, возможно, объясняются отсутствием единого мнения о четком выделении «молодой группы» пациентов в пределах группы лиц моложе 20 и 45 лет [23–29].

Проведенное исследование включало анализ пациентов от 20 до 45 лет в соответствии с рекомендациями ВОЗ. При этом дополнительно выборка молодых пациентов подразделялась на три возрастные подгруппы для статистического ана-

А in non-invasive tumors, in contrast to the data of G. Sjö Dahl et al. in elderly patients [3, 30]. This aspect seems to reflect the hypothesis that tumors in young patients constitute a more genomically stable group [6, 7, 23]. In the urothelial cluster, we have identified a small group of tumors (7%) with immunophenotypic features atypical for the urothelial-like A subtype: a higher level of the squamous cell differentiation, a marked expression of p16 protein, a higher level of E2F3 and Ki67 expression, and an aberrant expression of CK20. The molecular profile has been similar to the genomically unstable subtype, on the one hand, and to the basal/squamous cell-like subtype, on the other, but it has showed typical features of the urothelial subtype. We have not found a similar expression profile in the Lund's studies in a cohort of elderly patients and, following the Lund's recommendation that molecular subtypes can only be identified based on mRNA expression, we have analyzed this group separately under the notation of the urothelial-like CK5/6+/p16+ subtype. The patients with urothelial-like A subtype carcinomas have showed a more favorable survival prognosis compared to the urothelial-like CK5/6+/p16+ subtype ($p = 0.057$). The p16 protein is known to be an early marker of malignant transformation as it plays an important role in cell cycle regulation and acts as a tumor suppressor. The urothelial carcinomas clas-

лиза. Наши результаты показывают, что все опухоли стадии Та и большинство стадии Т1 имели фенотип уротелиоподобного А подтипа. Мы не выявили в неинвазивных опухолях других молекулярных подтипов, кроме уротелиоподобного А, в отличие от данных G. Sjö Dahl et al. у пожилых пациентов [3, 30]. Этот аспект, по-видимому, отражает гипотезу о том, что опухоли у молодых составляют более геномно-стабильную группу [6, 7, 23]. В уротелиальном кластере мы выявили небольшую группу опухолей (7 %) с нетипичными для уротелиоподобного А подтипа иммунофенотипическими признаками: более высокий уровень плоскоклеточной дифференцировки, выраженная экспрессия белка p16, более высокий уровень экспрессии E2F3, Ki67, а также аберрантная экспрессия СК20. Молекулярный профиль, с одной стороны, схож с геномно-нестабильным подтипом, с другой — с базальным/плоскоклеточно-подобным, но при этом демонстрировал типичные признаки уротелиального подтипа. Мы не обнаружили подобный профиль экспрессии в исследованиях Lund в когорте пожилых пациентов и, согласно рекомендациям Lund о том, что молекулярные подтипы могут быть идентифицированы только на основе экспрессии мРНК, проанализировали эту группу отдельно под условным обозначением «уротелиоподобный СК5/6+/p16+ подтип». Пациенты с карциномами уротелиоподобного А подтипа показали более благоприятный прогноз выживаемости по сравнению с уротелиоподобным СК5/6+/p16+ подтипом ($p = 0.057$). Известно, что белок p16 является ранним маркером злокачественной трансформации, поскольку играет важную роль в регуляции клеточного цикла и действует как супрессор опухоли. Уротелиальные карциномы, классифицируемые как уротелиоподобный подтип, часто теряют экспрессию p16 из-за специфической для подтипа утраты гена. Это было показано G. Sjö Dahl на когорте пожилых пациентов [20]. У пациентов старше 45 лет при молекулярном профилировании уротелиальных карцином мы отмечали аналогичные результаты. Тем не менее S.R. Williamson et al. подтвердили, что альтерация гена *CDKN2A/p16* в опухолях у молодых пациентов встречается редко [8]. В нашей когорте случаев было выявлено увеличение экспрессии белка p16 в сочетании с более высоким уровнем плоскоклеточной дифференцировки, пролиферативной активности и экспрессии E2F3 в случаях мышечно-неинвазивных карцином высокой степени гистологической злокачественности с общими признаками уротелиального кластера.

sified as the urothelial-like subtype often lose p16 expression due to the subtype-specific gene loss. This has been shown by G. Sjö Dahl in a cohort of elderly patients [20]. In patients over 45 years of age, we have determined similar results in molecular profiling of the urothelial carcinomas. However, S.R. Williamson et al. confirmed that the *CDKN2A/p16* gene alteration in tumors in young patients is rare [8]. In our cohort, we have found an increased p16 protein expression in combination with a higher levels of squamous cell differentiation, a proliferative activity, and an E2F3 expression in cases of non-muscle invasive carcinomas of a high histological malignancy with common urothelial cluster features. It can be assumed that there is another pathway of urothelial carcinoma progression in young patients — through an MAPK signal activation, which promotes an epithelial-mesenchymal transition, and this, theoretically, leads to an increase in the p16 expression [31]. Some researchers have reported that an increased p16 expression in tumors, including urothelial muscle-invasive carcinomas, is associated with aggressive subtypes, and in certain clinical situations, an increased p16 expression may be an important prognostic and predictive marker [32–34]. Another explanation for the increase in the p16 expression may be related to a squamous cell differentiation. In the literature, there are indications that about 33% of urothelial carcinomas with the squamous cell differentiation show the p16 expression without any evidence of the human papillomavirus infection [35]. However, a biological significance of this aspect is unclear.

The frequency of, so-called, aggressive subtypes of urothelial carcinomas of the bladder (genomically unstable, basal/squamous cell-like, mesenchymal-like) in our cohort has been low (not more than 6%) in contrast to the cohort of older patients in the Lund's study, in which this frequency had exceeded 50%.

Dividing the young patient group into three age subgroups has revealed some differences in the distribution of molecular subtypes. All tumors in patients younger than 30 years old have been clearly classified in the urothelial-like A subtype, have had papillary urothelial morphology and have been associated with the best prognosis for recurrence-free survival. Statistically more aggressive subtypes (genomically unstable, basal/squamous cell-like, mesenchymal-like) have been detected only in patients older than 40 years. These data suggest that their frequency increases with age and is probably related to the accumulation of mutational burden [36].

Можно предположить, что существует другой путь прогрессирования уротелиальных карцином у молодых пациентов — через активацию МАРК-сигнала, что способствует эпителиально-мезенхимальному переходу, и это, теоретически, приводит к увеличению экспрессии p16 [31]. Некоторые исследователи сообщают, что увеличение экспрессии p16 в опухоли, в том числе в уротелиальных мышечно-неинвазивных карциномах, связано с агрессивными подтипами, и в определенной клинической ситуации повышение экспрессии p16 может быть важным прогностическим и предиктивным маркером [32–34]. Другое объяснение роста экспрессии p16 может быть связано с плоскоклеточной дифференцировкой. В литературе есть указания на то, что около 33 % уротелиальных карцином с плоскоклеточной дифференцировкой демонстрируют экспрессию p16 без признаков поражения вирусом папилломы человека [35]. Однако биологическая значимость этого аспекта неясна.

Частота так называемых агрессивных подтипов уротелиальных карцином мочевого пузыря (геномно-нестабильный, базальный/плоскоклеточно-подобный, мезенхимально-подобный) в нашей когорте была низкой (не более 6 %) в отличие от когорты пожилых пациентов в исследовании Lund, в которой эта частота превышала 50 %.

Разделение молодой группы пациентов на три возрастные подгруппы выявило некоторые различия в распределении молекулярных подтипов. Все опухоли у пациентов моложе 30 лет были четко классифицированы в уротелиоподобный А подтип, имели папиллярную уротелиальную морфологию и ассоциировались с наилучшим прогнозом в отношении безрецидивной выживаемости. Статистически более агрессивные подтипы (геномно-нестабильный, базальный/плоскоклеточно-подобный, мезенхимально-подобный) были выявлены только у пациентов старше 40 лет. Эти данные свидетельствуют о том, что частота их увеличивается с возрастом и, вероятно, связана с накоплением мутационной нагрузки [36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования продемонстрировали достаточно хорошую воспроизводимость основных молекулярных подтипов рака мочевого пузыря, встречающихся у пожилых пациентов. Впервые адаптирована молекулярная патологическая классификация на основе соответствующей панели антител в редакции группы исследователей Lund к когорте молодых пациентов. Установлено, что у пациентов моло-

CONCLUSION

The results of this study have demonstrated a fairly good reproducibility of the main molecular subtypes of bladder cancer occurring in elderly patients. For the first time, the molecular pathological classification based on the corresponding antibody panel by the Lund Research Group has been adapted to the cohort of young patients. The urothelial-like A subtype of bladder cancer has been found to be significantly predominate in young patients (78%, $p = 0.005$). This aspect suggests a high genomic stability of tumors in young patients. Urothelial carcinomas in young patients are at an early pathological stage (pTa, pT1), characterized by a more favorable course, a low stage of malignancy compared to those in the older patient cohort. Among the urothelial carcinomas of young age a specific variant of cancer — urothelial-like CK5/6+/p16+, combining immunohistochemical features of basal/squamous-like and genomically unstable subtypes, tending to a more aggressive course and probably reflecting a different way of progression of some urothelial carcinomas at young age in contrast to bladder cancer of older patients, was revealed for the first time. According to our data, aggressive molecular subtypes, such as urothelial-like B, basal/squamous cell-like, genomically unstable, and mesenchymal-like, appear in patients over 30 years of age, and their frequency increases with age. The performed molecular profiling of bladder cancer in young patients showed its diagnostic significance, possibility of prognostic stratification and, therefore, reasonable practicality.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

дого возраста достоверно преобладает уротелиоподобный А подтип рака мочевого пузыря (78 %, $p = 0.005$). Этот аспект позволяет предположить высокую геномную стабильность опухолей у молодых пациентов. Уротелиальные карциномы у пациентов молодого возраста находятся на ранней патологической стадии (pTa, pT1), характеризуются более благоприятным течением, низкой степенью злокачественности по сравнению с таковыми в возрастной когорте пациентов. Среди уротелиальных карцином у лиц молодого возраста впервые выявлен специфический вариант рака — уротелиоподобный CK5/6+/p16+, сочетающий иммуногистохимические признаки базального/плоскоклеточно-подобного и геномно-нестабильного подтипов, имеющий тенденцию к

более агрессивному течению и, вероятно, отражающий иной путь прогрессии части уротелиальных карцином в молодом возрасте, в отличие от рака мочевого пузыря возрастных пациентов. По нашим данным агрессивные молекулярные подтипы, такие как уротелиоподобный В, базальный/плоскоклеточно-подобный, геномно-нестабильный, мезенхимально-подобный, появляются у пациентов старше 30 лет, а их частота увели-

чивается с возрастом. Выполненное молекулярное профилирование рака мочевого пузыря у молодых пациентов показало диагностическую значимость, возможность прогностической стратификационной оценки и, следовательно, практическую целесообразность.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Audenet F., Attalla K., Sfakianos J.P. The evolution of bladder cancer genomics: what have we learned and how can we use it? // *Urol. Oncol.* 2018. Vol. 36 (7). P. 313–320. doi: 10.1016/j.urolonc.2018.02.017.
2. Robertson A.G., Kim J., Al-Ahmadie H. et al. Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer // *Cell*. 2017. Vol. 171 (3). P. 540–556. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.007.
3. Sjö Dahl G., Lövgren K., Lauss M. et al. Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma // *Am. J. Pathol.* 2013. Vol. 183 (3) P. 681–691. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.013.
4. Moch H., Humphrey P.A., Ulbright T.M., Reuter V.E. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2016. P. 77–112.
5. Eich M.L., Dyrskjot L., Netto G.J. Toward personalized management in bladder cancer: the promise of novel molecular taxonomy // *Virchows Arch.* 2017. Vol. 471 (2). P. 271–280. doi: 10.1007/s00428-017-2119-x.
6. Mongiat-Artus P., Miquel C., van der Aa M. et al. Infrequent microsatellite instability in urothelial cell carcinoma of the bladder in young patients // *Eur. Urol.* 2006. Vol. 49 (4). P. 685–690. doi: 10.1016/j.eururo.2005.11.024.
7. Wild P.J., Giedl J., Stoeck R. et al. Genomic aberrations are rare in urothelial neoplasms of patients 19 years or younger // *J. Pathol.* 2007. Vol. 211 (1). P. 18–25. doi: 10.1002/path.2075.
8. Williamson S.R., Wang M., Montironi R. et al. Molecular characteristics of urothelial neoplasms in children and young adults: a subset of tumors from young patients harbors chromosomal abnormalities but not *FGFR3* or *TP53* gene mutations // *Mod. Pathol.* 2014. Vol. 27. P. 1540–1548. doi: 10.1038/modpathol.2014.48.
9. Telli O., Sarici H., Ozgur B.C. et al. Urothelial cancer of bladder in young versus older adults: clinical and pathological characteristics and outcomes // *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2014. Vol. 30 (9). P. 466–470. doi: 10.1016/j.kjms.2014.02.017.
10. Sjö Dahl G., Eriksson P., Liedberg F., Höglund M. Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification // *J. Pathol.* 2017. Vol. 242 (1). P. 113–125. doi: 10.1002/path.4886.
11. Lerner S.P., McConkey D.J., Hoadley K.A. et al. Bladder cancer molecular taxonomy: summary from a consensus meeting // *Bladder Cancer*. 2016. Vol. 2 (1). P. 37–47. doi: 10.3233/BLC-150037.

REFERENCES

1. Audenet F., Attalla K., Sfakianos J.P. (2018). The evolution of bladder cancer genomics: what have we learned and how can we use it? *Urol. Oncol.*, 36 (7), 313–320. doi: 10.1016/j.urolonc.2018.02.017.
2. Robertson A.G., Kim J., Al-Ahmadie H. et al. (2017). Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer. *Cell*, 171 (3), 540–556. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.007.
3. Sjö Dahl G., Lövgren K., Lauss M. et al. (2013). Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 183 (3), 681–691. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.013.
4. Moch H., Humphrey P.A., Ulbright T.M., Reuter V.E. (2016). *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. P. 77–112.
5. Eich M.L., Dyrskjot L., Netto G.J. (2017). Toward personalized management in bladder cancer: the promise of novel molecular taxonomy. *Virchows Arch.*, 471 (2), 271–280. doi: 10.1007/s00428-017-2119-x.
6. Mongiat-Artus P., Miquel C., van der Aa M. et al. (2006). Infrequent microsatellite instability in urothelial cell carcinoma of the bladder in young patients. *Eur. Urol.*, 49 (4), 685–690. doi: 10.1016/j.eururo.2005.11.024.
7. Wild P.J., Giedl J., Stoeck R. et al. (2007). Genomic aberrations are rare in urothelial neoplasms of patients 19 years or younger. *J. Pathol.*, 211 (1), 18–25. doi: 10.1002/path.2075.
8. Williamson S.R., Wang M., Montironi R. et al. (2014). Molecular characteristics of urothelial neoplasms in children and young adults: a subset of tumors from young patients harbors chromosomal abnormalities but not *FGFR3* or *TP53* gene mutations. *Mod. Pathol.*, 27, 1540–1548. doi: 10.1038/modpathol.2014.48.
9. Telli O., Sarici H., Ozgur B.C. et al. (2014). Urothelial cancer of bladder in young versus older adults: clinical and pathological characteristics and outcomes. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 30 (9), 466–470. doi: 10.1016/j.kjms.2014.02.017.
10. Sjö Dahl G., Eriksson P., Liedberg F., Höglund M. (2017). Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. *J. Pathol.*, 242 (1), 113–125. doi: 10.1002/path.4886.
11. Lerner S.P., McConkey D.J., Hoadley K.A. et al. (2016). Bladder cancer molecular taxonomy: summary from a consensus meeting. *Bladder Cancer*, (1), 37–47. doi: 10.3233/BLC-150037.

12. Hedegaard J., Lamy P., Nordentoft I. et al. Comprehensive transcriptional analysis of early-stage urothelial carcinoma // *Cancer Cell*. 2016. Vol. 30 (1). P. 27–42. doi: 10.1016/j.ccell.2016.05.004.
13. Adam R.M., DeGraff D.J. Molecular mechanisms of squamous differentiation in urothelial cell carcinoma: a paradigm for molecular subtyping of urothelial cell carcinoma of the bladder // *Urol. Oncol.* 2015. Vol. 33. P. 444–450. doi: 10.1016/j.urolonc.2015.06.006.
14. Kim K., Sung C.O., Park B.H. et al. Immunoprofile-based subgrouping of urothelial bladder carcinomas for survival prediction // *Hum. Pathol.* 2015. Vol. 46. P. 1464–1470. doi: 10.1016/j.humpath.2015.06.003.
15. Kamoun A., de Reinies A., Allory Y. et al. A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer // *Eur. Urol.* 2020. Vol. 77 (4). P. 420–433. doi: 10.1016/j.eururo.2019.09.006.
16. McConkey D.J., Choi W. Molecular subtypes of bladder cancer // *Curr. Oncol. Rep.* 2018. Vol. 20 (10). P. 77. doi: 10.1007/s11912-018-0727-5.
17. Warrick I.J., Knowles M.A., Yves A. et al. Report from the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference On Molecular Pathology Of Urogenital Cancers. II. Molecular Pathology of Bladder Cancer. Progress and Challenges // *Am. J. Surg. Pathol.* 2020. Vol. 44 (7). P. e30–e46. doi: 10.1097/PAS.0000000000001453.
18. TNM Classification of Malignant Tumours / ed. by J.D. Brierley, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind. 8th ed. Chichester, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2017. P. 204–207.
19. Caione P., Patruno G., Pagliarulo V. et al. Nonmuscular invasive urothelial carcinoma of the bladder in pediatric and young adult patients: age-related outcomes // *Urology*. 2017. Vol. 99. P. 215–220. doi: 10.1016/j.urolgy.2016.07.009.
20. Sjö Dahl G. Molecular subtype profiling of urothelial carcinoma using a subtype-specific immunohistochemistry panel // *Methods Mol. Biol.* 2018. Vol. 1655. P. 53–64. doi: 10.1007/978-1-4939-7234-0_5.
21. Yossepowitch O., Dalbagni G. Transitional cell carcinoma of the bladder in young adults: presentation, natural history and outcome // *J. Urol.* 2002. Vol. 168 (1). P. 61–66.
22. Nomikos M., Pappas A., Kopaka M.E. et al. Urothelial carcinoma of the urinary bladder in young adults: presentation, clinical behavior and outcome // *Adv. Urol.* 2011. Vol. 2011: 480738. doi: 10.1155/2011/480738.
23. Williamson S.R., Lopez-Beltran A., MacLennan G.T., Montironi R., Cheng L. Unique clinicopathologic and molecular characteristics of urinary bladder tumors in children and young adults // *Urol. Oncol.* 2013. Vol. 31 (14). P. 414–426. doi: 10.1016/j.urolonc.2010.08.003.
24. Saltsman J.A., Malek M.M., Reuter V.E. et al. Urothelial neoplasms in pediatric and young adult patients: a large single-center series // *J. Pediatr. Surg.* 2018. Vol. 53 (2). P. 306–309. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.11.024.
25. Gunlusoy B., Ceylan Y., Degirmenci T. et al. Urothelial bladder cancer in young adults: diagnosis, treatment and clinical behavior // *Can. Urol. Assoc. J.* 2015. Vol. 9 (9–10). P. E727–E730. doi: 10.5489/cuaj.3049.
26. Wang Q.H., Ji Z.G., Li H.Z. et al. Clinicopathologic comparison of urothelial bladder carcinoma in young
12. Hedegaard J., Lamy P., Nordentoft I. et al. (2016). Comprehensive transcriptional analysis of early-stage urothelial carcinoma. *Cancer Cell*, 30 (1), 27–42. doi: 10.1016/j.ccell.2016.05.004.
13. Adam R.M., DeGraff D.J. (2015). Molecular mechanisms of squamous differentiation in urothelial cell carcinoma: a paradigm for molecular subtyping of urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urol. Oncol.*, 33, 444–450. doi: 10.1016/j.urolonc.2015.06.006.
14. Kim K., Sung C.O., Park B.H. et al. (2015). Immunoprofile-based subgrouping of urothelial bladder carcinomas for survival prediction. *Hum. Pathol.*, 46, 1464–1470. doi: 10.1016/j.humpath.2015.06.003.
15. Kamoun A., de Reinies A., Allory Y. et al. (2020). A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *Eur. Urol.*, 77 (4), 420–433. doi: 10.1016/j.eururo.2019.09.006.
16. McConkey D.J., Choi W. (2018). Molecular subtypes of bladder cancer. *Curr. Oncol. Rep.*, 20 (10), 77. doi: 10.1007/s11912-018-0727-5.
17. Warrick I.J., Knowles M.A., Yves A. et al. (2020). Report from the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference On Molecular Pathology Of Urogenital Cancers. II. Molecular Pathology of Bladder Cancer. Progress and Challenges. *Am. J. Surg. Pathol.*, 44 (7), e30–e46. doi: 10.1097/PAS.0000000000001453.
18. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. (eds.) (2017). *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th ed. Chichester, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 204–207.
19. Caione P., Patruno G., Pagliarulo V. et al. (2017). Non-muscular invasive urothelial carcinoma of the bladder in pediatric and young adult patients: age-related outcomes. *Urology*, 99, 215–220. doi: 10.1016/j.urolgy.2016.07.009.
20. Sjö Dahl G. (2018). Molecular subtype profiling of urothelial carcinoma using a subtype-specific immunohistochemistry panel. *Methods Mol. Biol.*, 1655, 53–64. doi: 10.1007/978-1-4939-7234-0_5.
21. Yossepowitch O., Dalbagni G. (2002). Transitional cell carcinoma of the bladder in young adults: presentation, natural history and outcome. *J. Urol.*, 168 (1), 61–66.
22. Nomikos M., Pappas A., Kopaka M.E. et al. (2011). Urothelial carcinoma of the urinary bladder in young adults: presentation, clinical behavior and outcome. *Adv. Urol.*, 2011: 480738. doi: 10.1155/2011/480738.
23. Williamson S.R., Lopez-Beltran A., MacLennan G.T., Montironi R., Cheng L. (2013). Unique clinicopathologic and molecular characteristics of urinary bladder tumors in children and young adults. *Urol. Oncol.*, 31 (14), 414–426. doi: 10.1016/j.urolonc.2010.08.003.
24. Saltsman J.A., Malek M.M., Reuter V.E. et al. (2018). Urothelial neoplasms in pediatric and young adult patients: a large single-center series. *J. Pediatr. Surg.*, 53 (2), 306–309. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.11.024.
25. Gunlusoy B., Ceylan Y., Degirmenci T. et al. (2015). Urothelial bladder cancer in young adults: diagnosis, treatment and clinical behavior. *Can. Urol. Assoc. J.*, 9 (9–10), E727–E730. doi: 10.5489/cuaj.3049.
26. Wang Q.H., Ji Z.G., Li H.Z. et al. (2016). Clinicopathologic comparison of urothelial bladder carcinoma in young and elder patients. *Pathol. Oncol. Res.*, 22 (1), 67–70. doi: 10.1007/s12253-015-9968-x.

- and elder patients // *Pathol. Oncol. Res.* 2016. Vol. 22 (1). P. 67–70. doi: 10.1007/s12253-015-9968-x.
27. Sen V., Bozkurt O., Demir O. et al. Clinical behavior of bladder urothelial carcinoma in young patients: a single center experience // *Scientifica (Cairo)*. 2016. Vol. 2016: 6792484. doi: 10.1155/2016/6792484.
 28. Paner G.P., Zehnder P., Amin A.M., Husain A.N., Desai M.M. Urothelial neoplasms of the urinary bladder occurring in young adult and pediatric patients: a comprehensive review of literature with implications for patient management // *Adv. Anat. Pathol.* 2011. Vol. 18 (1). P. 79–89. doi: 10.1097/PAP.0b013e318204c0cf.
 29. Weyerer V., Schneckenpointner R., Filbeck T. et al. Immunohistochemical and molecular characterizations in urothelial carcinoma of bladder in patients less than 45 years // *J. Cancer*. 2017. Vol. 8 (3). P. 323–331. doi: 10.7150/jca.17482.
 30. Sjö Dahl G., Eriksson P., Lövgren K. et al. Discordant molecular subtype classification in the basal-squamous subtype of bladder tumors and matched lymph-node metastases // *Mod. Pathol.* 2018. Vol. 31 (12). P. 1869–1881. doi: 10.1038/s41379-018-0096-5.
 31. Steinestel J., Cronauer M.V., Muller J. et al. Overexpression of p16^{INK4a} in urothelial carcinoma in situ is a marker for MAPK-mediated epithelial-mesenchymal transition but is not related to human papillomavirus infection // *PLoS One*. 2013. Vol. 8: e65189. doi: 10.1371/journal.pone.0065189.
 32. Rebouissou S., Herault A., Letouze E. et al. CDKN2A homozygous deletion is associated with muscle invasion in FGFR3-mutated urothelial bladder carcinoma // *J. Pathol.* 2012. Vol. 227. P. 315–324. doi: 10.1002/path.4017.
 33. Witkiewicz A.K., Knudsen K.E., Dicker A.P., Knudsen E.S. The meaning of p16^{ink4a} expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments // *Cell. Cycle*. 2011. Vol. 10 (15). P. 2497–2503. doi: 10.4161/cc.10.15.16776.
 34. Breyer J., Wirtz R.M., Erben P. et al. High CDKN2A/p16 and low FGFR3 expression predict progressive potential of stage pT1 urothelial bladder carcinoma // *Clin. Genit. Cancer*. 2018. Vol. 16 (4). P. 248–256. doi: 10.1016/j.clgc.2018.01.009.
 35. Alexander R.E., Hu Y., Kum J.B. et al. p16 expression is not associated with human papillomavirus in urinary bladder squamous cell carcinoma // *Mod. Pathol.* 2012. Vol. 25 (11). P. 1526–1533. doi: 10.1038/modpathol.2012.103.
 36. Wolff E.M., Liang G., Jones P.A. Mechanisms of disease: genetic and epigenetic alterations that drive bladder cancer // *Nat. Clin. Pract. Urol.* 2005. Vol. 2. P. 502–510. doi: 10.1038/ncpuro0318.
 27. Sen V., Bozkurt O., Demir O. et al. (2016). Clinical behavior of bladder urothelial carcinoma in young patients: a single center experience. *Scientifica (Cairo)*, 2016: 6792484. doi: 10.1155/2016/6792484.
 28. Paner G.P., Zehnder P., Amin A.M., Husain A.N., Desai M.M. (2011). Urothelial neoplasms of the urinary bladder occurring in young adult and pediatric patients: a comprehensive review of literature with implications for patient management. *Adv. Anat. Pathol.*, 18 (1), 79–89. doi: 10.1097/PAP.0b013e318204c0cf.
 29. Weyerer V., Schneckenpointner R., Filbeck T. et al. (2017). Immunohistochemical and molecular characterizations in urothelial carcinoma of bladder in patients less than 45 years. *J. Cancer*, 8 (3), 323–331. doi: 10.7150/jca.17482.
 30. Sjö Dahl G., Eriksson P., Lövgren K. et al. (2018). Discordant molecular subtype classification in the basal-squamous subtype of bladder tumors and matched lymph-node metastases. *Mod. Pathol.*, 31 (12), 1869–1881. doi: 10.1038/s41379-018-0096-5.
 31. Steinestel J., Cronauer M.V., Muller J. et al. (2013). Overexpression of p16^{INK4a} in urothelial carcinoma in situ is a marker for MAPK-mediated epithelial-mesenchymal transition but is not related to human papillomavirus infection. *PLoS One*, 8: e65189. doi: 10.1371/journal.pone.0065189.
 32. Rebouissou S., Herault A., Letouze E. et al. (2012). CDKN2A homozygous deletion is associated with muscle invasion in FGFR3-mutated urothelial bladder carcinoma. *J. Pathol.*, 227, 315–324. doi: 10.1002/path.4017.
 33. Witkiewicz A.K., Knudsen K.E., Dicker A.P., Knudsen E.S. (2011). The meaning of p16^{ink4a} expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell. Cycle*, 10 (15), 2497–2503. doi: 10.4161/cc.10.15.16776.
 34. Breyer J., Wirtz R.M., Erben P. et al. (2018). High CDKN2A/p16 and low FGFR3 expression predict progressive potential of stage pT1 urothelial bladder carcinoma. *Clin. Genit. Cancer*, 16 (4), 248–256. doi: 10.1016/j.clgc.2018.01.009.
 35. Alexander R.E., Hu Y., Kum J.B. et al. (2012). p16 expression is not associated with human papillomavirus in urinary bladder squamous cell carcinoma // *Mod. Pathol.* 2012. Vol. 25 (11). P. 1526–1533. doi: 10.1038/modpathol.2012.103.
 36. Wolff E.M., Liang G., Jones P.A. (2005). Mechanisms of disease: genetic and epigenetic alterations that drive bladder cancer. *Nat. Clin. Pract. Urol.*, 2, 502–510. doi: 10.1038/ncpuro0318.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мещеряков Игорь Александрович — врач-патологоанатом ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)».

Крюков Кирилл Андреевич — врач-патологоанатом ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)».

ABOUT THE AUTHORS

Meshcheryakov Igor Aleksandrovich — Pathologist, St. Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncologic).

Kryukov Kirill Andreevich — Pathologist, St. Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncologic).

Mitin Nikolay Pavlovich — Doctor of Clinical and Laboratory Diagnostics, St. Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncologic).

Ponomareva Elena Vasilyevna — Pathologist, City Clinical Oncological Health Center (St. Petersburg).

Митин Николай Павлович — врач клинико-лабораторной диагностики ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)».

Пономарёва Елена Васильевна — врач-патологоанатом ГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер» (Санкт-Петербург).

Шелехова Ксения Владимировна — д-р мед. наук, профессор, заведующий патолого-анатомическим отделением ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»; заведующий кафедрой патологической анатомии ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт».

Образец цитирования: Мещеряков И.А., Крюков К.А., Митин Н.П., Пономарёва Е.В., Шелехова К.В. Молекулярные подтипы уротелиальных карцином мочевого пузыря у пациентов молодого возраста // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2021. № 3. С. 82–104.

Shelekhova Kseniya Vladimirovna — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Pathology Department, St. Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncologic); Head, Department of Pathological Anatomy, St. Petersburg Medico-Social Institute.

Citation example: Meshcheryakov I.A., Kryukov K.A., Mitin N.P., Ponomareva E.V., Shelekhova K.V. (2021). Molecular subtypes of urothelial carcinomas of the bladder in young patients. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 3, 82–104.

