

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-102-113>

Роль иммуногистохимического исследования в определении молекулярного подтипа рака мочевого пузыря

М.В. Беркут¹, А.С. Артемьева¹, А.В. Хохлова¹, А.Э. Саад², А.К. Носов¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

²ООО «Многопрофильная клиника Сестрорецкая»; Россия, 197706 Санкт-Петербург, Сестрорецк, ул. Пограничников, 2, стр. 1

Контакты: Мария Владимировна Беркут berkutv91@gmail.com

Введение. Результаты геномного профилирования мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (РМП) на основе выделения матричной РНК (мРНК) продемонстрировали значительное молекулярное разнообразие опухолей, объясняющее широкий спектр клинических проявлений и различные ответы на традиционные методы лечения. Однако, несмотря на ценность молекулярного профилирования мРНК для понимания биологического поведения опухоли, его внедрение в рутинную клиническую практику затруднено из-за технологической сложности и высокой стоимости методики геномного секвенирования. Поэтому определение молекулярного подтипа РМП на основе иммуногистохимического исследования может рассматриваться как альтернатива мРНК-профилированию, однако необходима апробация метода на клиническом материале.

Цель исследования – оценка прогностической значимости иммуногистохимического метода при определении молекулярного подтипа уротелиального рака с использованием суррогатной панели из 13 маркеров с помощью метода полуколичественного расчета гистохимического индекса.

Материалы и методы. В ретроспективное когортное исследование вошли 49 пациентов с РМП, которым с 2013 по 2016 г. после предшествующей трансуретральной резекции (ТУРМП) в условиях одного центра выполнена радикальная цистэктомия (РЦЭ). Критериями включения в исследование были возраст больных от 18 до 75 лет, гистологически верифицированный РМП и наличие в научной лаборатории морфологии опухолей на момент проведения иммуногистохимического исследования фиксированных в формалине и залитых в парафин блоков после ТУРМП и РЦЭ. Критерии исключения: редкие гистологические варианты РМП, осложнения хирургического лечения IV–V степени по классификации Clavien–Dindo в период госпитализации, проведение ранее ТУРМП в других медицинских учреждениях. Определение молекулярных подтипов выполнено с помощью иммуногистохимического метода на иммуноштейнере Ventana BenchMark XT (Roche, США) по классической методике на депарафинизированных срезах с использованием подтип-специфической панели из 13 антител, рекомендованной таксономией Лунда (LundTax). В зависимости от степени гиперэкспрессии базальных и/или люминальных антител выделены 4 подтипа уротелиального рака: люминальный А (UroA), люминальный В (UroB), базальный (Basal) и геномно нестабильный (GU). Первичной конечной точкой исследования были показатели 5-летней безрецидивной выживаемости на материале после ТУРМП и РЦЭ, вторичной конечной точкой – 5-летней общей выживаемости на этом же материале.

Результаты. С помощью иммуногистохимического анализа с использованием суррогатной панели маркеров на сохраненном гистологическом материале после ТУРМП удалось определить подтип уротелиального рака у 38 (77,6 %) пациентов, после РЦЭ – у 39 (79,5 %). Доли подтипов UroA, UroB и GU после ТУРМП и РЦЭ были практически равными; реже всего выявлялся подтип Basal – 4 (8,2 %) и 5 (10,2 %) случаев соответственно. При оценке первичной конечной точки 5-летняя безрецидивная выживаемость после ТУРМП (*log-rank*-тест; $p = 0,85$) и РЦЭ (*log-rank*-тест; $p = 0,95$) не различалась между выявленными подтипами уротелиального рака. При оценке вторичной конечной точки статистической разницы в 5-летней ОВ₁ (*log-rank*-тест; $p = 0,94$) и ОВ₂ также не установлено (*log-rank*-тест; $p = 0,92$). Результаты многофакторного регрессионного анализа продемонстрировали, что наиболее значимыми предикторами рецидива уротелиального рака после радикального лечения являются клиническая стадия IIIA ($p = 0,017$) и патоморфологическая стадия II ($p = 0,021$), а на показатели ОВ существенное влияние оказывали патоморфологические стадии IIIA ($p = 0,003$) и IVA ($p = 0,019$).

Заключение. Определение молекулярного подтипа уротелиального рака с использованием суррогатной панели из 13 маркеров методом полуколичественного расчета гистохимического индекса не продемонстрировало эффективности и прогностической значимости: выделенные нами 4 подтипа уротелиального рака не оказали значимого влияния на отдаленные онкологические показатели.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, молекулярный подтип рака мочевого пузыря, лечение рака мочевого пузыря, иммуногистохимическое исследование

Для цитирования: Беркут М.В., Артемьева А.С., Хохлова А.В. и др. Роль иммуногистохимического исследования в определении молекулярного подтипа рака мочевого пузыря. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):102–13. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-102-113>

The role of immunohistochemical analysis in determining the molecular subtypes of bladder cancer

M.V. Berkut¹, A.S. Artemyeva¹, A.V. Khokhlova¹, A.I. Saad², A.K. Nosov¹

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochny Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

²Multidisciplinary Clinic Sestroretskaya; Bld. 1, 2 Pogramichnikov St., Sestroretsk, Saint Petersburg 197706, Russia

Contacts: Mariya Vladimirovna Berkut berkutv91@gmail.com

Introduction. The results of genomic profiling of muscle-invasive bladder cancer (BC) based on messenger RNA (mRNA) extraction showed significant molecular variety of the tumors underlying the wide spectrum of clinical manifestations and responses to traditional treatment methods. However, despite the valuableness of molecular mRNA profiling for understanding biological behavior of the tumor, its implementation in routine clinical practice is complicated due to technological complexity and high cost of genomic sequencing. Therefore, determination of BC molecular subtype based on immunohistochemical examination can be considered an alternative to mRNA profiling. However, the method should be validated using clinical material.

Aim. To evaluate prognostic significance of immunohistochemical method in determination of urothelial cancer molecular subtype using a surrogate panel consisting of 13 markers and semiquantitative calculation of the histochemical index.

Materials and methods. The retrospective cohort study included 49 patients with BC who underwent radical cystectomy (RC) after previous transurethral resection (TURBT) between 2013 and 2016 at the center. The inclusion criteria were patient age between 18 and 75 years, histologically verified BC, and availability of formalin-fixed paraffin embedded blocks after TURBT and RC at the Clinical Laboratory of Morphology. The exclusion criteria were rare histological types of BC, grade IV–V surgical complications per the Clavien–Dindo classification during hospitalization, TURBT performed at other medical facilities. Molecular subtypes were determined using the immunohistochemical method on the Ventana BenchMark XT (Roche, USA) immunostainer per the traditional technique for deparaffinized sections with subtype-specific panel consisting of 13 antibodies recommended by the Lund taxonomy (LundTax). Depending on the hyperexpression level of basal and/or luminal antibodies, 4 urothelial cancer subtypes were identified: luminal A (UroA), luminal B (UroB), basal and genomically unstable (GU). The first endpoint of the study was 5-year recurrence-free survival on TURBT and RC material, secondary endpoint was 5-year overall survival on the same material.

Results. Using immunohistochemical analysis with a surrogate marker panel of preserved histological material after TURBT, urothelial cancer subtype was determined in 38 (77.6 %) patients, after RC – in 39 (79.5 %) patients. Percentages of UroA, UroB and GU subtypes after TURBT and RC were almost identical; the rarest type was Basal with 4 (8.2 %) and 5 (10.2 %) cases, respectively. Evaluation of the primary endpoint showed that 5-year recurrence-free survival after TURBT (*log-rank* test; $p = 0.85$) and RC (*log-rank* test; $p = 0.95$) did not differ in various urothelial cancer subtypes. Evaluation of the secondary endpoint did not show significant statistical difference in 5-year OS₁ (*log-rank* test; $p = 0.94$) and OS₂ (*log-rank* test; $p = 0.92$). Multivariate regression analysis showed that the most significant predictors of BC recurrence after radical treatment were clinical stage IIIA ($p = 0.017$) and pathomorphological stage II ($p = 0.021$), while OS rates were significantly affected by pathomorphological stages IIIA ($p = 0.003$) and IVA ($p = 0.019$).

Conclusion. Determination of urothelial cancer molecular subtype using a surrogate panel of 13 markers and semiquantitative calculation of the histochemical index did not show effectiveness and prognostic significance: the identified 4 subtypes of urothelial cancer did not significantly affect long-term oncological outcomes.

Keywords: bladder cancer, urothelial cancer molecular subtype, bladder cancer treatment, immunohistochemical examination

For citation: Berkut M.V., Artemyeva A.S., Khokhlova A.V. et al. The role of immunohistochemical analysis in determining the molecular subtypes of bladder cancer. *Uspexhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2024;11(4):102–13. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-102-113>

ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) является одним из распространенных злокачественных заболеваний: в 2020 г. в мире зарегистрированы 573 278 новых случаев данной патологии, что составляет 3 % всех случаев рака у человека, при этом при первичном обращении мышечно-инвазивная форма заболевания наблюдается примерно в 1/4 случаев [1]. В ряде современных исследований геномный профиль мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (МИРМП) проанализирован с использованием нескольких молекулярных платформ, включая соматические мутации ДНК, вариации числа копий, метилирование ДНК, экспрессию матричной РНК (мРНК), экспрессию микроРНК, микробный и протеомный анализы [2, 3]. Такой комплексный подход продемонстрировал значительное молекулярное разнообразие МИРМП, что может объяснить широкий спектр клинических проявлений и различные ответы на традиционные методы лечения при этом заболевании. Кроме того, за последние годы классификация РМП претерпела изменения, что позволило включить новые молекулярные и геномные данные в обновленную классификацию Всемирной организации здравоохранения 2022 г. [4]. Это, возможно, улучшит диагностику, лечение и прогноз заболевания.

На сегодняшний день предложены несколько систем молекулярной классификации МИРМП, основанных на геномном профилировании, согласно которым выделяют 2 основных молекулярных подтипа данной опухоли: базальный и люминальный [5]. Люминальные опухоли обычно имеют папиллярную конфигурацию и экспрессируют маркеры уротелиальной дифференцировки, такие как уроплакины, цитokerатин (СК) 20 (СК20), GATA3, фактор роста фибробластов 3 (FGFR3), E-кадгерин и гены раннего клеточного цикла. В отличие от них базальные опухоли экспрессируют маркеры базального слоя уротелия, включая кластер дифференцировки 44 (CD44), СК5/6 и СК14, при этом зачастую дополнительно выявляется плоскоклеточная дифференцировка опухоли [5].

В 2019 г. предпринята попытка достижения международного консенсуса по молекулярной классификации МИРМП на основе анализа 1750 образцов опухолей с мышечной инвазией из 16 наборов данных и 2 дополнительных когорт с целью сравнения 6 схем молекулярной классификации [2]. А. Катопи и соавт. выделили 6 молекулярных подтипов этой опухоли: люминальный папиллярный, люминальный неуточненный, люминальный нестабильный, богатый стромой, базальный/плоскоклеточный и нейроэндокринный [2]. Установлено, что молекулярные подтипы РМП различаются ответом на варианты лекарственной терапии, а также показателями онкологической выживаемости. Наихудший прогноз выявлен для опухолей нейроэндокринного и базального/плоскоклеточного подтипов. Среди остальных 4 молекулярных подтипов МИРМП наиболее благоприятный прогноз отмечен для люминального

нестабильного подтипа. Подтипы папиллярный, люминальный неуточненный и богатый стромой продемонстрировали схожие показатели выживаемости. Что касается ответа на системное лечение, не обнаружено корреляции между неoadьювантной химиотерапией или терапией ингибиторами контрольных точек и молекулярными подтипами.

Молекулярная классификация РМП, основанная на профилировании экспрессии геномной мРНК, предоставляет ценную информацию о биологическом поведении опухоли. Однако ее внедрение в рутинную клиническую практику затруднено из-за технологической сложности и ресурсозатратности аналитического метода. Результаты недавних исследований показали, что иммуногистохимический (ИГХ) метод может служить альтернативой для идентификации молекулярных подтипов уротелиального рака (УР) [6]. Использование небольшого набора маркеров – люминальных (GATA3, СК20 и уроплакин II) и базальных (СК5/6 и СК14) – позволяет эффективно классифицировать РМП на люминальные и базальные подтипы.

Так, в ходе исследования С.С. Guo и соавт. удалось идентифицировать молекулярные подтипы РМП с чувствительностью 80 % на основе только ИГХ-исследования экспрессии белков GATA3 и СК5/6, проведенного в центрах первичной медико-санитарной помощи [7]. И.А. Мещерякова и соавт. выполнили молекулярное профилирование 56 образцов УР, полученных от пациентов моложе 45 лет с использованием ИГХ-метода, основанного на общих принципах таксономии, разработанной шведскими учеными из Лундского университета (Швеция) (LundTax) [8]. Результаты исследования показали, что классификация LundTax, проведенная на основе ИГХ-анализа, универсальна; также продемонстрирована высокая воспроизводимость молекулярных подтипов, встречающихся у пожилых пациентов. Кроме того, выявлено, что преобладает уротелиоподобный А подтип УР, ассоциированный с более благоприятным прогнозом и наилучшими показателями выживаемости (78 % случаев). По мнению авторов, подобная адаптация ИГХ-типирования УР может обладать довольно высокой диагностической значимостью и высокой воспроизводимостью и использоваться в специализированных клиниках онкологического профиля [8].

На сегодняшний день известно, что выявление молекулярного подтипа УР является эффективным инструментом для определения исходов заболевания и ответа на лекарственную терапию. Тем не менее профилирование опухолей на основе геномного секвенирования довольно затруднительно, ресурсозатратно и требует много времени для внедрения в клиническую практику, поэтому типирование РМП на основе более доступного ИГХ-анализа является перспективным направлением. Данные литературы показывают, что отдельные панели антител могут иметь диагностическую и прогностическую значимость [9]. В сложившейся

ситуации для дальнейшей проверки результатов многоцентровых исследований необходимы глубокие знания биологических особенностей каждого маркера в условиях канцерогенеза УР, внутри- и межопухлевой гетерогенности МИРМП, а также обязательна стандартизация панели ИГХ-маркеров для идентификации молекулярных подтипов РМП, что обуславливает актуальность настоящей работы.

Цель исследования — оценка прогностической значимости ИГХ-метода при определении молекулярного подтипа УР с использованием суррогатной панели из 13 маркеров методом полуколичественного расчета гистохимического индекса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для данного ретроспективного наблюдательного исследования рандомно отобраны данные медицинских карт 49 пациентов, с 2013 по 2016 г. получавших хирургическое лечение по поводу РМП на базе отделения онкоурологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Петрова.

Критерии включения в исследование: возраст пациентов от 18 до 75 лет, гистологически верифицированный УР, наличие в научной лаборатории морфологии опухолей на момент проведения ИГХ-исследования фиксированных в формалине и залитых в парафин блоков после трансуретральной резекции стенки мочевого пузыря (ТУРМП) и радикальной цистэктомии (РЦЭ).

Критерии исключения: возраст пациентов старше 75 лет, редкие гистологические варианты опухоли, отличные от УР (саркоматоидный, плазмочитоидный, нейроэндокринный), осложнения лечения IV–V степени по классификации Clavien–Dindo после ТУРМП или РЦЭ, проведение ранее ТУРМП в других медицинских учреждениях.

Определение молекулярных подтипов УР выполнено с помощью ИГХ-метода на иммуноштейнере Ventana BenchMark XT (Roche, США) по классической методике на депарафинизированных срезах толщиной 5 мкм, расположенных на положительно заряженных стеклах, согласно протоколам производителей. Применена подтип-специфическая панель из 13 антител, рекомендованная исследователями LundTax [2]: антител к СК44, СК14, СК5/6, СК7, рецептору эпидермального фактора роста (EGFR), p53, p63, СК20, СК7, CyclinD1, GATA3, рецептору эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2), sp73. В зависимости от степени гиперэкспрессии базальных и/или люминальных антител выделены 4 молекулярных подтипа РМП: люминальный А (UroA), люминальный В (UroB), базальный (Basal) и геномно нестабильный (GU). Для подтипа UroA характерны минимальная реакция на СК20 и СК5/6 (только мембранное окрашивание клеток) и положительная реакция на GATA3 и sp73; для подтипа UroB — более выраженное окрашивание СК14, диффузное окрашивание СК5/6 и СК20 и положительное окрашивание GATA3 и sp73; для подтипа Basal — более вы-

сокая интенсивность окрашивания СК5/6, СК14, а также положительное окрашивание EGFR и p63, при этом окрашивание GATA3, sp73 было отрицательным во всех клетках; остальные комбинации реакций антител (преимущественно отрицательно — цитокератины СК5/6, СК20 и положительно — HER2) расценивались как подтип GU.

Интенсивность реакций с антигенами оценивалась полуколичественно по выраженности окрашивания цитоплазмы или базальной мембраны. Для каждого из применяемых биомаркеров рассчитывали гистохимический индекс (Histochemical score, H-score) по формуле:

$$H\text{-score} = \sum (P_i \times i),$$

где i — интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3; P_i — процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

Первичной конечной точкой была 5-летняя безрецидивная выживаемость (БРВ) для каждого молекулярного подтипа, которая оценивалась как период времени (мес) от момента проведения радикального лечения до возникновения рецидива или контакта с пациентом. Вторичной конечной точкой была 5-летняя общая выживаемость (ОВ), которая оценивалась как период времени (мес) от момента радикального лечения до летального исхода от любой причины или контакта с пациентом.

Статистический анализ проводили с использованием программы StatTech v. 4.2.6 (ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. Те их них, которые имели нормальное распределение, описывали с использованием средних арифметических величин (M), стандартных отклонений (SD) и 95 % доверительного интервала ($ДИ$). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные оценивали с помощью медианы (Me) и нижнего (Q_1) и верхнего (Q_3) квартилей.

Анализ функции выживаемости пациентов проводили по методу Каплана–Майера. График ее оценки представляет собой убывающую ступенчатую линию, значения между точками наблюдений считаются константными.

Анализ выживаемости пациентов проводили по методу регрессии Кокса, подразумевающему прогнозирование риска наступления события для исследуемого объекта и оценку влияния заранее определенных независимых переменных (предикторов) на этот риск. Риск рассматривается как функция, зависящая от времени. Базовые предположения, лежащие в основе метода, состоят в том, что все объясняющие переменные независимы, линейно влияют на риск наступления события, а также что риски наступления события для любых двух объектов в любой отрезок времени пропорциональны. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средний возраст пациентов исследуемой группы составил $63,39 \pm 8,09$ года (95 % ДИ 61,06–65,71), что свидетельствует о преобладании пожилых больных. Подавляющее большинство пациентов составили мужчины (43/49; 87,8 %). Индекс массы тела больных в среднем оказался равен $26,77 \pm 5,19$ (95 % ДИ 25,28–28,15). Неoadъювантную терапию получили только 6 (12,2 %) пациентов, адъювантную терапию после РЦЭ – 5 (10,2 %).

Характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в табл. 1.

В ходе анализа патоморфологических периоперационных показателей дискордантности между степенью дифференцировки после ТУРМП и РЦЭ не установлено ($p > 0,05$); показатель наличия карциномы *in situ* не различался между этапами хирургического лечения ($p = 0,120$): после ТУРМП она обнаружена у 5 (10,2 %) пациентов, после РЦЭ – у 3 (6,1 %). У 11 (22,4 %) больных выявлен УР I стадии, у 12 (24,5 %) – II, у 23 (46,9 %) – IIIA, у 2 (4,1 %) – IIIB, у 1 (2 %) – IVA. После РЦЭ отмечено выраженное увеличение случаев местно-распространенного УР IIIB стадии: 13 (26,5 %) случаев ($p = 0,045$), при этом влияния неoadъювантной

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование ($n = 49$)

Table 1. Characteristics of the patients included in the study ($n = 49$)

Показатель Parameter	Значение Value	95 % ДИ (Q_1-Q_3) 95 % CI (Q_1-Q_3)
Возраст ($M \pm SD$), лет Age ($M \pm SD$), years	$63,39 \pm 8,09$	61,06–65,71
Индекс массы тела, $M \pm SD$ Body mass index, $M \pm SD$	$26,77 \pm 5,19$	25,28–28,26
Пол, n (%): Sex, n (%):		
мужской male	43 (87,8)	75,2–95,4
женский female	6 (12,2)	4,6–24,8
Неoadъювантная терапия, n (%) Neoadjuvant therapy, n (%)	6 (12,2)	4,6–24,8
Адъювантная терапия, n (%) Adjuvant therapy, n (%)	5 (10,2)	3,4–22,2
Степень дифференцировки опухоли на момент выполнения ТУРМП, n (%): Tumor differentiation grade at the time of TURBT, n (%):		
G ₁	5 (10,2)	3,4–22,2
G ₂	5 (10,2)	3,4–22,2
G ₃	39 (79,6)	61,4–85,4
Степень дифференцировки опухоли на момент выполнения РЦЭ, n (%): Tumor differentiation grade at the time of RC, n (%):		
G ₁	5 (10,2)	3,4–22,2
G ₂	6 (12,2)	4,6–24,8
G ₃	38 (77,6)	63,4–88,2
Рак <i>in situ</i> , n (%): In situ carcinoma, n (%):		
на момент выполнения ТУРМП at the time of TURBT	2 (4,1)	0,5–14,0
на момент выполнения РЦЭ at the time of RC	3 (6,1)	0,5–14,0
Число удаленных лимфатических узлов (Me), n Number of resected lymph nodes (Me), n	18	13–22
Поражение регионарных лимфатических узлов, n (%) Affected regional lymph nodes, n (%)	13 (26,5)	14,9–41,1
Положительный хирургический край, n (%) Positive surgical margin, n (%)	1 (2)	0,1–10,9

Окончание табл. 1

End of table 1

Показатель Parameter	Значение Value	95 % ДИ (Q ₁ –Q ₃) 95 % CI (Q ₁ –Q ₃)
Клиническая стадия по классификации American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8-го издания на момент выполнения ТУРМП, n (%): Clinical stage per the American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification, 8 th edition, at the time of TURBT, n (%):		
I	11 (22,4)	11,8–36,6
II	12 (24,5)	13,3–38,9
IIIА	23 (46,9)	32,5–61,7
IIIВ	2 (4,1)	0,5–14,0
IVА	1 (2)	0,1–10,9
Патоморфологическая стадия по классификации AJCC 8-го издания на момент выполнения РЦЭ, n (%): Pathomorphological stage per the AJCC classification, 8 th edition, at the time of RC, n (%):		
I	15 (30,6)	18,3–45,4
II	9 (18,4)	8,8–32,0
IIIА	11 (22,4)	11,8–36,6
IIIВ	13 (26,5)	14,9–41,1
IVА	1(2)	0,1–10,9
Молекулярный подтип опухоли на момент выполнения ТУРМП, n (%): Tumor molecular subtype at the time of TURBT, n (%):		
не определен undetermined	11 (22,4)	11,8–36,6
UroA	10 (20,4)	10,2–34,3
UroB	10 (20,4)	10,2–34,3
Basal	4 (8,2)	2,3–19,6
GU	14 (28,6)	16,6–43,3
Молекулярный подтип на момент выполнения РЦЭ, n (%): Tumor molecular subtype at the time of RC, n (%):		
не определен undetermined	10 (20,4)	10,2–34,3
UroA	7 (14,3)	5,9–27,2
UroB	11 (22,4)	11,8–36,6
Basal	5 (10,2)	3,4–22,2
GU	16 (32,7)	19,9–47,5

Примечание. ТУРМП – трансуретральная резекция стенки мочевого пузыря; РЦЭ – радикальная цистэктомия; ДИ – доверительный интервал; M – среднее значение; SD – стандартное отклонение; Me – медиана; Q₁ – нижний квартиль; Q₃ – верхний квартиль; UroA – люминальный А подтип; UroB – люминальный В подтип; Basal – базальный подтип; GU – геномно нестабильный подтип.

Note. TURBT – transurethral resection of bladder tumor; RC – radical cystectomy; CI – confidence interval; M – mean; SD – standard deviation; Me – median; Q₁ – lower quartile; Q₃ – higher quartile; UroA – luminal A subtype; UroB – luminal B subtype; Basal – basal subtype; GU – genomically unstable subtype.

терапии на частоту снижения стадии заболевания (<pT2N0N0 (I стадия)) обнаружено не было.

Идентифицировать молекулярный подтип УР ИГХ-методом на сохраненном гистологическом материале после ТУРМП удалось у 38 (77,6 %) из 49 пациентов, после РЦЭ – у 39 (79,5 %). Реже всего выявлялся базальный подтип УР: 4 (8,2 %) и 5 (10,2 %) случаев соответственно. В ходе корреляционного анализа связи между изучаемыми факторами и молекулярными подтипами УР установлено не было (см. табл. 1).

В данной статье представлена оценка первичной конечной точки в зависимости от молекулярного подтипа УР, определенного после ТУРМП (БРВ₁) и РЦЭ (БРВ₂). Результаты анализа продемонстрировали, что 5-летняя БРВ₁ между выявленными подтипами УР не различалась (*log-rank*-тест; *p* = 0,85). При подтипе UroA этот показатель составил 56,3 % (95 % ДИ 14,7–84,2), при UroB – 55,6 % (95 % ДИ 20,4–80,5), при Basal – 66,7 % (95 % ДИ 5,4–94,5), при GU – 63,5 % (95 % ДИ 28,4–84,8). При этом медиана БРВ₁

для подтипов Basal, UroA и UroB (рис. 1, а) достигнута не была. Также 5-летняя БРВ₂ не различалась между подтипами УР (*log-rank*-тест; $p = 0,95$). В группе UroA этот показатель составил 45,7 % (95 % ДИ 6,9–79,5), в группе UroB – 66,7 % (95 % ДИ 28,2–87,8), в группе Basal – 50 % (95 % ДИ 0,6–91,0), в группе GU – 55,4 % (95 % ДИ 21,3–79,8) (рис. 1, б).

Аналогично после ТУРМП (ОВ₁) и РЦЭ (ОВ₂) определена ОВ. Результаты исследования продемонстрировали, что 5-летняя ОВ₁ не различалась между подтипами УР (*log-rank*-тест; $p = 0,94$). При подтипе UroA этот показатель составил 60 % (95 % ДИ 12,6–88,2), при Basal – 50 % (95 % ДИ 0,6–91,0), при GU – 56,4 % (95 % ДИ 24,4–79,3); при UroB отмечена 100 % ле-

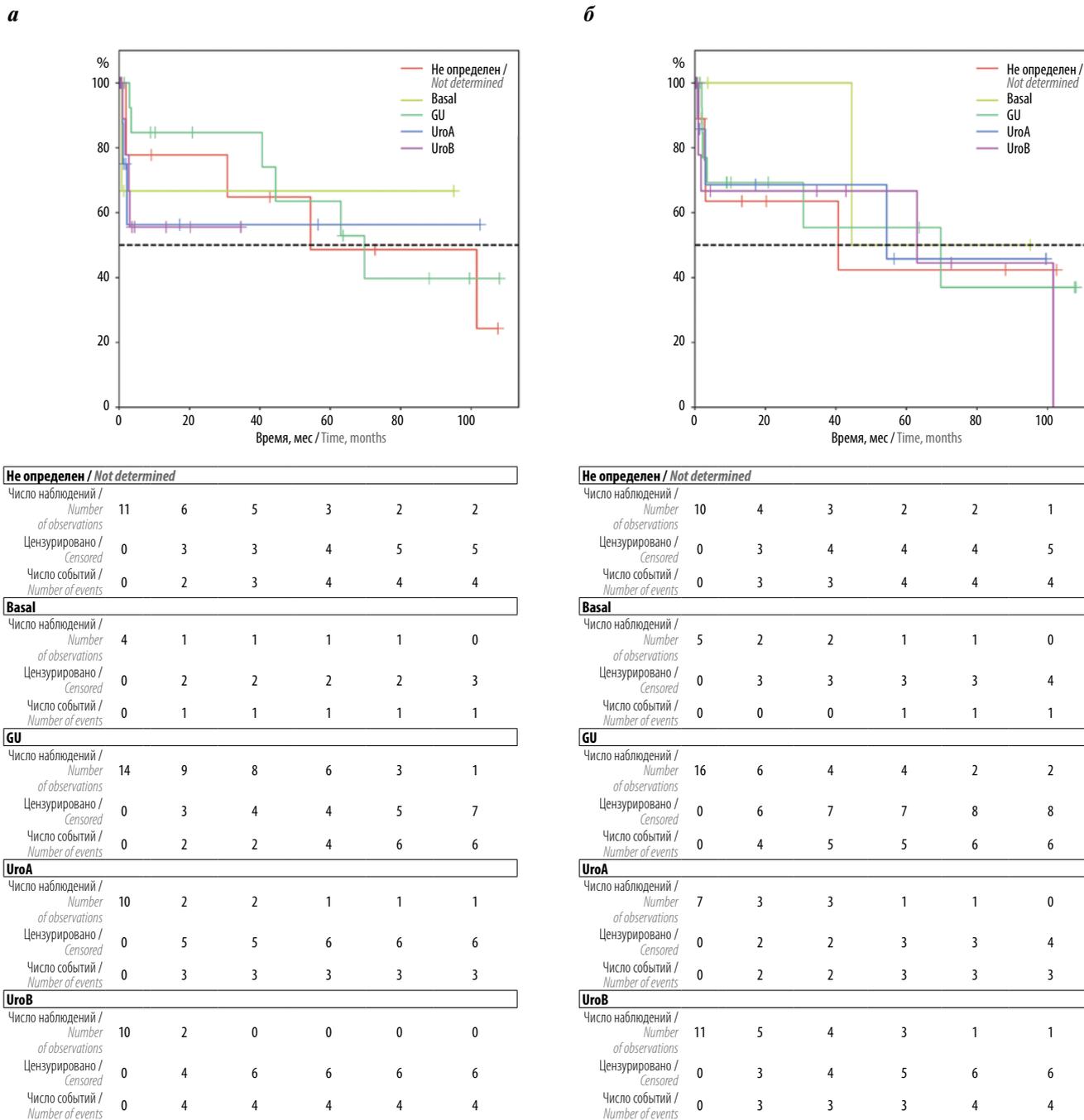


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость в зависимости от варианта молекулярного подтипа уротелиального рака, определенного после трансуретральной резекции стенки мочевого пузыря (а) и радикальной цистэктомии (б). UroA – люминальный А подтип; UroB – люминальный В подтип; Basal – базальный подтип; GU – геномно нестабильный подтип

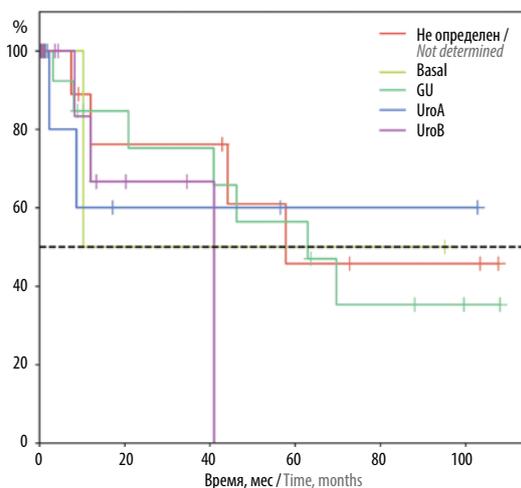
Fig. 1. Recurrence-free survival depending on urothelial carcinoma subtype determined using material after transurethral resection of bladder tumor (a) and after radical cystectomy (b). UroA – luminal A subtype; UroB – luminal B subtype; Basal – basal subtype; GU – genomically unstable subtype

тальность (рис. 2, а). В ходе анализа 5-летней ОВ₂ не выявлено достоверных различий между подтипами УР (*log-rank*-тест; $p = 0,92$). Наибольшая 5-летняя ОВ₂ установлена в группе UroB (71,4 %; 95 % ДИ 25,8–92,0), наименьшая – в группе UroA (33,3 %; 95 % ДИ 1,4–75,5) (рис. 2, б).

Результаты многофакторного регрессионного анализа показали, что наиболее значимыми предикторами

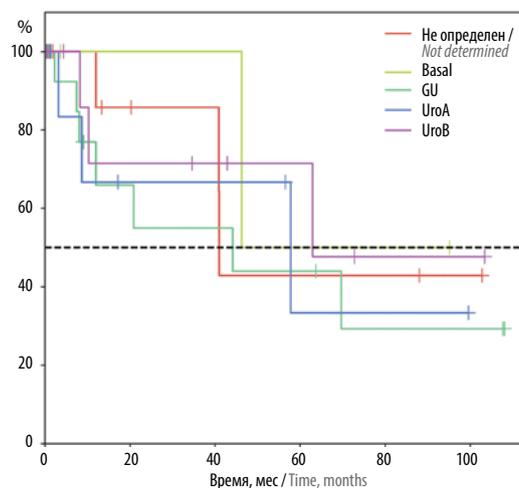
рецидива УР после радикального лечения являются клиническая стадия ПИА ($p = 0,017$) и патоморфологическая стадия II ($p = 0,021$) (рис. 3). Существенное влияние на показатели ОВ оказывали патоморфологические стадии ПИА ($p = 0,003$) и IVA ($p = 0,019$) (рис. 4). Важно отметить, что ни один из молекулярных подтипов УР, определенных ИГХ-методом, не влиял на БРВ и ОВ (табл. 2).

а



Не определен / Not determined						
Число наблюдений / Number of observations	11	6	6	3	2	2
Цензурировано / Censored	0	3	3	4	5	5
Число событий / Number of events	0	2	2	4	4	4
Basal						
Число наблюдений / Number of observations	4	1	1	1	1	0
Цензурировано / Censored	0	2	2	2	2	3
Число событий / Number of events	0	1	1	1	1	1
GU						
Число наблюдений / Number of observations	14	9	8	6	3	1
Цензурировано / Censored	0	3	3	3	4	6
Число событий / Number of events	0	2	3	5	7	7
UroA						
Число наблюдений / Number of observations	10	2	2	1	1	1
Цензурировано / Censored	0	6	6	7	7	7
Число событий / Number of events	0	2	2	2	2	2
UroB						
Число наблюдений / Number of observations	10	3	1	0	0	0
Цензурировано / Censored	0	5	7	7	7	7
Число событий / Number of events	0	2	2	3	3	3

б



Не определен / Not determined						
Число наблюдений / Number of observations	10	5	4	2	2	1
Цензурировано / Censored	0	4	5	5	5	6
Число событий / Number of events	0	1	1	3	3	3
Basal						
Число наблюдений / Number of observations	5	2	2	1	1	0
Цензурировано / Censored	0	3	3	3	3	4
Число событий / Number of events	0	0	0	1	1	1
GU						
Число наблюдений / Number of observations	16	6	5	4	2	2
Цензурировано / Censored	0	6	6	6	7	7
Число событий / Number of events	0	2	2	3	3	3
UroA						
Число наблюдений / Number of observations	7	3	3	1	1	0
Цензурировано / Censored	0	2	2	3	3	4
Число событий / Number of events	0	2	2	3	3	3
UroB						
Число наблюдений / Number of observations	11	5	4	3	1	1
Цензурировано / Censored	0	4	5	6	7	7
Число событий / Number of events	0	2	2	2	3	3

Рис. 2. Общая выживаемость в зависимости от варианта молекулярного подтипа уротелиального рака, определенного на материале после трансуретральной резекции стенки мочевого пузыря (а) и радикальной цистэктомии (б). UroA – люминальный А подтип; UroB – люминальный В подтип; Basal – базальный подтип; GU – геномно нестабильный подтип

Fig. 2. Overall survival depending on urothelial carcinoma subtype determined using material after transurethral resection of bladder tumor (a) and after radical cystectomy (b). UroA – luminal A subtype; UroB – luminal B subtype; Basal – basal subtype; GU – genomically unstable subtype

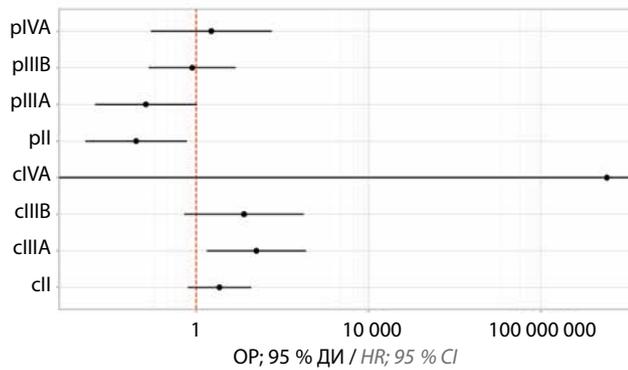


Рис. 3. Влияние клинической (с) и патоморфологической (р) стадий заболевания по классификации American Joint Committee on Cancer 8-го издания на риск развития рецидива рака мочевого пузыря после радикального хирургического вмешательства. ДИ – доверительный интервал; ОР – отношение рисков

Fig. 3. Effect of clinical (c) and pathomorphological (p) disease stages per the American Joint Committee on Cancer classification, 8th edition, on the risk of bladder cancer recurrence after radical surgical intervention. CI – confidence interval; HR – hazard ratio

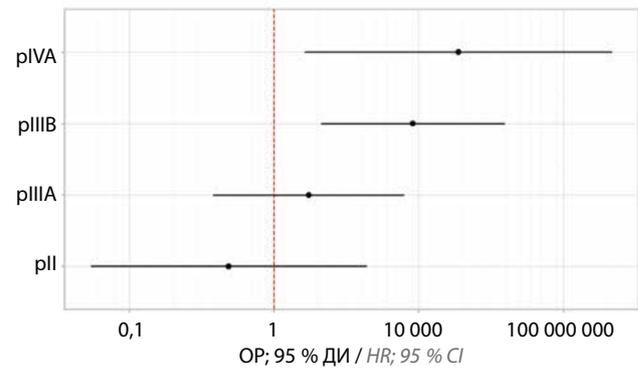


Рис. 4. Влияние патоморфологической стадии заболевания по классификации American Joint Committee on Cancer 8-го издания на риск летального исхода (влияние клинической стадии не установлено). ДИ – доверительный интервал; ОР – отношение рисков

Fig. 4. Effect of pathomorphological disease stage per the American Joint Committee on Cancer classification, 8th edition, on the risk of death (the effect of clinical stage was not observed). CI – confidence interval; HR – hazard ratio

Таблица 2. Результаты факторного анализа влияния стадии заболевания на риск возникновения рецидива и летального исхода

Table 2. Results of factor analysis of the effect of disease stage on the risks of recurrence and death

Фактор риска Risk factor	Однофакторный анализ Univariate analysis		Многофакторный анализ Multivariate analysis	
	ОР; 95 % ДИ HR; 95 % CI	<i>p</i>	ОР; 95 % ДИ HR; 95 % CI	<i>p</i>
Оценка риска рецидива рака мочевого пузыря Evaluation of bladder cancer recurrence risk				
Клиническая стадия IIIA Clinical stage IIIA	2,7; 0,8–10,12	0,123	25,0; 1,80–352,80	0,017*
Патоморфологическая стадия: Pathomorphological stage:				
II	0,53; 0,16–1,81	0,318	0,04; 0–0,60	0,021*
IIIB	3,67; 1,33–10,16	0,012*	0,8; 0,08–8,30	0,860
IVA	10,77; 1,03–112,28	0,047*	2,2; 0,09–56,70	0,625
Оценка риска смертности при раке мочевого пузыря после радикальной цистэктомии Evaluation of the risk of death in bladder cancer after radical cystectomy				
Патоморфологическая стадия: Pathomorphological stage:				
IIIB	9,11; 2,12–39,28	0,003*	9,11; 2,12–39,27	0,003*
IVA	18,79; 1,63–217,26	0,019*	18,79; 1,63–217,26	0,019*

*Влияние предиктора статистически значимо ($p < 0,05$).

Примечание. ОР – относительный риск; ДИ – доверительный интервал.

*Predictor effect is statistically significant ($p < 0.05$).

Note. HR – hazard ratio; CI – confidence interval.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря представляет собой высокогетерогенную опухоль с непостоянной и часто аномальной экспрессией белков – маркеров терминальной дифференцировки, что указывает на псевдодифференцировку [10]. Это может объяснять систематические несоответствия при классификации подтипов РМП с использованием профилирования мРНК и ИГХ-анализа на уровне опухолевых клеток [11]. Тем не менее

постоянно предпринимаются попытки адаптировать определение молекулярного подтипа этой опухоли именно с помощью рутинного ИГХ-исследования [12–14].

В мировой научной литературе представлены 4 основные классификации уротелиальных карцином: Атласа ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA), Лундского университета, Университета Северной Каролины, Онкологического центра им. М.Д. Андерсона.

В связи с разнообразием классификаций в 2019 г. принято соглашение (консенсус) относительно подтипов уротелиального РМП: решено использовать термин «базальный/плоскоклеточно-подобный подтип» (basal-squamous-like, BASQ) для обозначения опухолей, проявляющих фенотип $KRT5/6^+KRT14^+FOXA1-GATA3^-$. Это отражает тот факт, что в данной группе имеется экспрессия базальных кератинов, а также опухоль проявляет признаки плоскоклеточной дифференцировки. Дополнительно предложено изменить название ранее определенного подтипа РМП с «уробазального» на «уротелиоподобный» (сокращенно Uro) [2].

Важной клинической задачей молекулярного профилирования является выбор тактики лечения. Согласно консенсусу по УР 2019 г. в 69 % случаев РМП есть потенциально действующие терапевтические мишени, которые ассоциируются с конкретными молекулярными подтипами [2, 15]. Так, например не во всех случаях мышечно-инвазивный РМП одинаково отвечает на неoadъювантное лечение. По результатам исследования R. Seiler и соавт., люминальные опухоли демонстрируют высокие показатели ОВ как при использовании неoadъювантной химиотерапии, так и без нее [16]. В то же время при базальном РМЖ применение неoadъювантной химиотерапии значительно улучшает показатели ОВ по сравнению с только хирургическим вмешательством [16]. В то же время W. Choi и соавт. в ходе исследования различных подтипов РМП выявили, что опухолевые клетки с мутацией p53 (базально-плоскоклеточный, нейроэндокриноподобный и в меньшей степени геномно нестабильный РМП, согласно консенсусу по УР 2019 г., обладают устойчивостью к химиотерапии [2, 17]. Также обнаружено, что при люминальном подтипе отмечается высокая экспрессия лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1), STLA-4 и других иммунных сигналов. В частности, продемонстрирован значимый эффект от лечения ингибиторами контрольных иммунных точек (анти-PD-L1 и анти-PD-1) именно для этой подгруппы пациентов [18]. Таким образом, определение молекулярного подтипа УР в дополнение к гистологическому заключению поможет выбрать оптимальную лекарственную терапию для пациентов с данной патологией.

V. Dadhania и соавт. на основе определения экспрессии двух антител – к CK5/6 и GATA3 – предложили выделять 2 молекулярных подтипа: базальный – с положительной экспрессией CK5/6 и отрицательной экспрессией GATA3, и люминальный – с отрицательной экспрессией CK5/6 и положительной экспрессией GATA3 [6]. A. Hodgson и соавт. выполнили ИГХ-исследование 207 образцов МИРМП с использованием антител к CK5/6 и GATA3 и выделили 85,2 % люминальных ($CK5/6^-/GATA3^+$) и 14,8 % базальных ($CK5/6^+/GATA3^-$) опухолей [19]. Кроме того, удалось установить, что опухоли $CK5/6^+/GATA3^-$ ассоциированы со снижением показателей опухоль-специфической выживаемости

и повышением экспрессии PD-1/PD-L1 [19] (PD-1 – рецептор программируемой гибели 1). По данным T. Vejananda и соавт., удалось выявить значительную связь между выживаемостью и экспрессией GATA3 и CK5/6 [20]. Если опухоли характеризовались только экспрессией GATA3, то они считались люминальными, если только экспрессией CK5/6 – базальными. Также удалось выявить двойной отрицательный подтип, на который указывает отрицательное окрашивание обоих маркеров. В этом случае ожидаются плохие показатели опухоль-специфической выживаемости. Другие комбинации, о которых сообщалось в предыдущих исследованиях (экспрессия CK20 и CK5/6 или CK20 и CK14), не продемонстрировали значимого влияния на выделение молекулярных подтипов [20].

A. Kamoun и соавт. предложили дальнейшую субклассификацию молекулярных подтипов РМП на основе экспрессии p16 и FGFR3 и гистоморфологии опухоли [2]. Авторы выявили, что люминальный папиллярный подтип характеризуется отрицательной экспрессией p16, положительной экспрессией FGFR3 и папиллярной конфигурацией, тогда как люминальный неутонченный подтип – положительной экспрессией p16, отрицательной экспрессией FGFR3 и солидной мышечно-инвазивной формой. Кроме того, ряд исследователей выделили небольшую группу $CK5/6^+p16^+$ -опухолей (до 7 %) с высоким уровнем плоскоклеточной дифференцировки, для которых отмечены частые рецидивы (до 75 % случаев) в период наблюдения до 2 лет. Для данного подтипа характерна экспрессия CK5/6 не только в базальных, но и в промежуточных слоях уротелия, а также экспрессия CK14 в единичных клетках базального слоя, что отсутствует в опухолях уротелиоподобного (люминального папиллярного) подтипа [8]. В отличие от уротелиоподобного подтипа РМЖ уровень экспрессии p16 при базальном подтипе также существенно выше. Подобные дивергенции даже внутри одного подтипа и обширное молекулярное перекрытие опухолей крайне затрудняют внедрение ИГХ-метода и молекулярного профилирования в рутинную практику патологоанатома. Кроме того, вышеуказанные методы сопряжены с высокими затратами.

Для ИГХ-исследования мы использовали расширенную панель из базальных и люминальных антител для выделения 4 молекулярных подтипов РМП: UroA, UroB, Basal и GU. Однако мы не определяли отдельно экспрессию FGFR, и, возможно, именно этот факт не позволил выявить люминальный подтип опухоли у ряда пациентов (после ТУРМП подтип не установлен в 22,4 % случаев, после РЦЭ – в 20,4 %). Результаты анализа показали, что 5-летняя БРВ не различалась между подтипами УР: при UroA она составила 56,3 %, при UroB – 55,6 %, при Basal – 66,7 %, при GU – 63,5 %. Также не было выявлено различий в 5-летней ОВ между подтипами: при UroA она оказалась равной 60 %, при Basal – 50 %, при GU – 56,4 %. При UroB

летальность составила 100 %. Результаты многофакторного регрессионного анализа продемонстрировали, что наиболее значимым предиктором рецидива УР после радикального лечения остается определение клинической или патоморфологической стадии с учетом стадирования по классификации Tumor, Nodus and Metastasis. Таким образом, в данной работе молекулярные подтипы УР, определенные ИГХ-методом с помощью расширенной панели, не влияли на показатели БРВ и ОВ.

Ограничениями нашего исследования были небольшой размер выборки, ретроспективный характер работы и отсутствие профилирования экспрессии генов для проверки соответствия между молекулярными подтипами и экспрессией маркеров ИГХ. Кроме того, только 5–6 % наших пациентов получали нео- и/или адьювантную лекарственную терапию, что могло существенно повлиять на показатели выживаемости,

поскольку эффективность лечения напрямую зависит от молекулярного подтипа опухоли. Также это исследование проведено только в одном центре, поэтому необходима валидация панели на данных из нескольких центров и разных групп населения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение молекулярного подтипа УР с использованием суррогатной панели из 13 маркеров методом полуколичественного расчета гистохимического индекса не продемонстрировало эффективности и прогностической значимости. Выделенные нами 4 подтипа УР не влияли на продолжительность ОВ и БРВ. Необходимо продолжить исследования в данном направлении для выявления наиболее эффективных антител или их комбинаций, которые пройдут валидацию на более крупных выборках биологических образцов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bladder cancer fact sheet. International Agency for Research on Cancer, 2020. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>.
- Kamoun A., de Reyniès A., Allory Y. et al. A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2020;77(4):420–33. DOI: 10.1016/j.eururo.2019.09.006
- Choi W., Porten S., Kim S. et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014;25(2):152–65. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.009
- Netto G.J., Amin M.B., Berney D.M. et al. The 2022 World Health Organization classification of tumors of the urinary system and male genital organs—part B: Prostate and urinary tract tumors. *Eur Urol* 2022;82(5):469–82. DOI: 10.1016/j.eururo.2022.07.002
- Tan T.Z., Rouanne M., Tan K.T. et al. Molecular subtypes of urothelial bladder cancer: results from a meta-cohort analysis of 2411 tumors. *Eur Urol* 2019;75(3):423–32. DOI: 10.1016/j.eururo.2018.08.027
- Dadhania V., Zhang M., Zhang L. et al. Meta-analysis of the luminal and basal subtypes of bladder cancer and the identification of signature immunohistochemical markers for clinical use. *EBioMedicine* 2016;12:105–17. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.08.036
- Guo C.C., Bondaruk J., Yao H. et al. Assessment of luminal and basal phenotypes in bladder cancer. *Sci Rep* 2020;10(1):9743. DOI: 10.1038/s41598-020-66747-7
- Мещеряков И.А., Крюков К.А., Митин Н.П. и др. Молекулярные подтипы уротелиальных карцином мочевого пузыря у пациентов молодого возраста. *Journal of Siberian Medical Sciences* 2021;3:82–104. Meshcheryakov I.A., Kryukov K.A., Mitin N.P. et al. Molecular subtypes of urothelial carcinomas of the bladder in young patients. *Journal of Siberian Medical Sciences* 2021;3:82–104. (In Russ.).
- Sanguedolce F., Zanelli M., Palicelli A. et al. Are we ready to implement molecular subtyping of bladder cancer in clinical practice? Part 1: general issues and marker expression. *Int J Mol Sci* 2022;23(14):7819. DOI: 10.3390/ijms23147819
- Sjödahl G., Eriksson P., Liedberg F., Höglund M. Molecular classification of urothelial carcinoma: Global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. *J Pathol* 2017; 242(1):113–25. DOI: 10.1002/path.4886
- Goutas D., Palamaris K., Stofas A. et al. Immunohistochemical study of bladder cancer molecular subtypes and their association with PD-L1 expression. *Cancers (Basel)* 2022;15(1):188. DOI: 10.3390/cancers15010188
- Wang C.-C., Tsai Y.-C., Jeng Y.-M. Biological significance of GATA3, cytokeratin 20, cytokeratin 5/6 and p53 expression in muscle-invasive bladder cancer. *PLoS ONE* 2019;14(8):e0221785. DOI: 10.1371/journal.pone.0221785
- Calvete J. 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
- Akhtar M., Rashid S., Gashir M.B. et al. CK20 and CK5/6 immunohistochemical staining of urothelial neoplasms: a perspective. *Adv Urol* 2020;2020:e4920236. DOI: 10.1155/2020/4920236
- Мещеряков И.А., Крюков К.А., Шелехова К.В., Рогачев М.В. Молекулярная классификация уротелиальных карцином мочевого пузыря в патологоанатомической практике: учебное пособие для врачей и обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. СПб.: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2020. 62 с. Meshcheryakov I.A., Kryukov K.A., Shelekhova K.V., Rogachev M.V. Molecular classification of urothelial carcinomas of the bladder in pathoanatomical practice: a textbook for doctors and students in the system of higher and additional professional education. Saint Petersburg: NMIC onkologii im. N.N. Petrova, 2020. 62 p. (In Russ.).
- Seiler R., Ashab H.A.D., Erho N. et al. Impact of molecular subtypes in muscle-invasive bladder cancer on predicting response and survival after neoadjuvant chemotherapy. *Eur Urol* 2017;72(4):544–54. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.03.030
- Choi W., Porten S., Kim S. et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014;25(2):152–65. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.009
- Rosenberg J.E., Hoffman-Censits J., Powles T. et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with

- platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2016;387(10031):1909–20. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00561-4
19. Hodgson A., Liu S.K., Vesprini D. et al. Basal-subtype bladder tumours show a “hot” immunophenotype. *Histopathology* 2018;73(5):748–57. DOI: 10.1111/his.13696
20. Bejrananda T., Kanjanapradit K., Saetang J. et al. Impact of immunohistochemistry-based subtyping of GATA3, CK20, CK5/6, and CK14 expression on survival after radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer. *Sci Rep* 2021;11:21186. DOI: 10.1038/s41598-021-00628-5

Вклад авторов

М.В. Беркут: статистический анализ данных, написание текста статьи, редактирование;
А.С. Артемьева: разработка концепции и дизайна исследования, определение критериев включения в исследование и исключения из него, анализ и обработка результатов иммуногистохимического исследования;
А.В. Хохлова: проведение иммуногистохимического окрашивания, сбор данных, контроль за качеством и валидацией протоколов окрашивания, анализ и интерпретация результатов иммуногистохимического анализа;
А.Э. Саад: отбор медицинских записей и случаев в соответствии с критериями исследования, систематизация данных;
А.К. Носов: разработка общей концепции и дизайна исследования, определение критериев включения и исключения для когорты, научное редактирование.

Authors' contributions

M.V. Berkut: statistical data analysis, manuscript writing, editing;
A.S. Artemyeva: study concept and design, determination of inclusion and exclusion criteria for the study, analysis and processing of the results of immunohistochemical examination;
A.V. Khokhlova: immunohistochemical staining, data accumulation, quality control and validation of staining protocols, analysis and interpretation of the results of immunohistochemical examination;
A.E. Saad: selection of medical records and cases in accordance with the criteria of the study, systematization of data;
A.K. Nosov: development of the general concept and design of the study, determination of inclusion and exclusion criteria for the cohort, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID authors

М.В. Беркут / M.V. Berkut: <https://orcid.org/0000-0002-6276-1716>
А.С. Артемьева / A.S. Artemyeva: <https://orcid.org/0000-0002-2948-397X>
А.В. Хохлова / A.V. Khokhlova: <https://orcid.org/0000-0002-3976-8805>
А.Э. Саад / A.E. Saad: <https://orcid.org/0000-0003-0445-2277>
А.К. Носов / A.K. Nosov: <https://orcid.org/0000-0003-3850-7109>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (протокол № 32/355 от 23.12.2020).

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The protocol of the study was approved by the committee on biomedical ethics of N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 32/355 dated 23.12.2020).