

Иммуногистохимические и молекулярно-генетические факторы прогноза при ранних стадиях инвазивного рака мочевого пузыря

И.В. Чернышев¹, Г.Д. Ефремов¹, А.С. Тертычный², Д.В. Перепечин¹

¹ФГУ НИИ урологии Минздравсоцразвития России, Москва; ²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Контакты: Геннадий Дмитриевич Ефремов efremov.gen@yandex.ru

Рак мочевого пузыря (РМП) относится к наиболее часто встречающимся злокачественным новообразованиям. Более 90 % регистрируемых случаев морфологически диагностируются как переходно-клеточный рак, причем более 70 % из них представляют собой ранние стадии заболевания (Ta, Tis, T1). Наиболее сложной группой больных с ранними стадиями РМП считаются пациенты с опухолью, диагностированной как T1. Несмотря на благоприятный в целом прогноз течения этой стадии РМП после проведенного лечения, у большинства больных возникнет рецидив опухоли, а у 15–20 % — прогрессия до более распространенной стадии. В связи с этим продолжается поиск прогностических маркеров, ассоциирующихся с неблагоприятным прогнозом заболевания. Определен ряд морфологических, иммуногистохимических и молекулярных признаков, которые, по данным исследователей, коррелируют с риском развития рецидива и прогрессии РМП. Тем не менее алгоритм диагностических исследований, позволяющий предсказать течение заболевания по данным первичного гистологического исследования, пока до конца не разработан. Необходимо проведение дальнейших исследований, которые позволят разработать информативную панель диагностических и прогностических маркеров, позволяющих патологу правильно определить стадию и прогноз заболевания, а клиницисту — выбрать оптимальную лечебную тактику для каждого пациента.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, стадия T1, иммуногистохимический анализ, флуоресцентная гибридизация *in situ*

Immunohistochemical and molecular genetic prognostic factors for early-stage invasive bladder cancer

I.V. Chernyshev¹, G.D. Efremov¹, A.S. Tertychnyi², D.V. Perepechin¹

¹Research Institute of Urology, Moscow; ²I.M. Sechenov First Moscow Medical University

Bladder cancer (BC) is one of the most common malignancies. More than 90 % of the notified cases are morphologically diagnosed as transitional cell carcinoma; moreover, over 70 % of them are the early stages (Ta, Tis, and T1) of the disease. Patients with diagnosed T1 tumor are deemed to be the most difficult group of patients with early-stage BC. Despite the generally good prognosis of the course of this stage of BC after performed therapy, the tumor recurs in most patients and progresses to a more disseminated stage in 15–20 %. In this connection, there is a continuous search for the prognostic markers associated with the poor prognosis of the disease. A number of morphological, immunohistochemical, and molecular signs that, according to the investigators' data, correlate with the risk for BC recurrence and progression have been identified. Nonetheless, a diagnostic testing algorithm that permits the prediction of the course of the disease from primary histological data remains to be elaborated. There should be further investigations that enable one to develop an informative panel of diagnostic and prognostic markers that allow a pathologist to correctly define the stage and prognosis of the disease and a clinician to choose an optimal treatment policy for each patient.

Key words: bladder cancer, stage T1, immunohistochemical analysis, fluorescence *in situ* hybridization

Морфологическая оценка степени инвазии опухоли мочевого пузыря служит решающим фактором для определения тактики лечения и наблюдения. Если опухоли стадии Ta, T1, как правило, требуют органосохраняющей тактики, то при стадии T2 основной упор делается на органосохраняющее лечение [1]. Стратификация группы мышечно-неинвазивного рака на группы риска на основании прогноза позволяет выработать более точные показания для адъювантной терапии. Данная группа больных разнородна, и на основании традиционных клинических, морфологических факторов прогноза нельзя в полной мере прогнозировать течение опухолевого процесса [2]. Применение комплекса иммуногистохимических (ИГХ) и молекулярно-

генетических факторов прогноза направлены на улучшение морфологической диагностики.

Оценка истинной глубины инвазии порой сопровождается рядом сложностей в связи с наличием рядом артефактов в гистологических препаратах, таких как тангенциальный срез блока, неправильная ориентация препарата, термические повреждения материала при трансуретральной резекции (ТУР), воспалительная реакция. При проникновении опухоли в толщу подлежащей стромальной ткани единичными клетками или образовании мелких гнезд опухолевых клеток возможен феномен парадоксальной дифференцировки, что приводит к ложноотрицательному результату. При распространении карциномы *in situ* на гнезда фон

Брунна может создаться впечатление о проникновении опухоли в lamina propria. Реакция стромы на инвазию, особенно воспалительная, может так же маскировать наличие инвазии. Более того, реакция стромы определяется не во всех случаях инвазивной карциномы, особенно при микроинвазии [3]. Этим объясняется несовпадение оценки разными патологами одного и того же материала. Например, 35 % случаев с T1 при пересмотре морфологической комиссией оценены как Ta, 3 % — как T2–4 [4]. При просмотре препаратов стадии T1 несколькими специалистами мнения патологов совпадают лишь в 80 % случаев [5].

Опухоли, охарактеризованные как T1 по бесспорным критериям, существенно отличаются друг от друга по клиническому течению, частоте рецидивирования и прогрессии. В течение последних лет предпринимаются попытки разработать достоверную, простую в применении, воспроизводимую систему внутреннего стадирования опухолей T1, основанную главным образом на глубине опухолевой инвазии в собственную пластинку слизистой оболочки, что привело к субклассификации стадии T1. Стадия T1a определялась как инвазия, не выходящая за пределы muscularis mucosae, стадия T1b — как опухоль, проникающая в мышечную пластинку. Выделение стадии T1c (полное разрушение мышечной пластинки) в последующем было признано не оправданным. Пятилетняя общая выживаемость (ОВ) больных с РМП стадии T1a составляла 75 % по сравнению с 11 % со стадией T1b [6, 7]. При мультивариантном анализе факторов неблагоприятного прогноза обнаружено, что глубина инвазии опухолью собственной мышечной пластинки слизистой оболочки мочевого пузыря оказалась единственным статистически достоверным признаком, определяющим риск рецидива и прогрессирования заболевания [8]. Однако в связи со сложностью визуализации слоя muscularis mucosae, сложностью рутинного практического применения и неоднозначностью опубликованных результатов прогностическое значение субклассификации РМП стадии T1, базирующейся на поражении muscularis mucosae, признается не всеми патологами [9].

Были предложены другие методы субстадирования опухоли. Выявлено, что 5-летняя выживаемость без прогрессирования у больных с опухолью, инвазирующей собственную пластинку более чем на 1,5 мм, по данным микрометрических измерений, составила 67 %, если менее чем на 1,5, то 93 % [10]. Отмечено, что эндифитный (солидный) рост опухоли и выраженная лимфоваскулярная инвазия оказались единственными признаками, статистически достоверно коррелировавшими с риском прогрессии и безрецидивной выживаемостью [11, 12]. Проводилось оценка типа инвазии опухоли как фактора неблагоприятного прогноза: инфильтрирующий рост сопровождается высоким риском развития рецидива (относительный риск (ОР)

1,86, доверительный интервал (ДИ) 1,14–3,05) и прогрессирования заболевания (ОР 3,01; ДИ 1,38–6,57) [13]. Для определения истинного значения выявленных закономерностей необходимо проведение дополнительных крупных проспективных исследований.

Применение ИГХ-методик открывает новые возможности для точной оценки глубины инвазии. Экспрессия панцитокератина позволяет дифференцировать T1 и Ta. Реакция с десмином дает возможность выявить слой muscularis mucosae и провести субклассификацию T1 на T1a и T1b. Использование этих 2 маркеров в исследовании Mhawech и соавт. позволило провести правильную субклассификацию в 11 случаях из 93 по гистологическим препаратам, окрашенным гематоксилином и эозином. В 7 случаях, квалифицированных как T1b, после проведения ИГХ-анализа была установлена стадия T1a, в 4 случаях, диагностированных как T1a, определена стадия T1b. Тем не менее в 3 случаях уточнить диагноз с помощью ИГХ-исследования вследствие особенности технологии обработки готовых препаратов было невозможно [14]. Окрашивание на цитокератины не всегда идентифицирует исключительно клетки уротелиального происхождения. Аберрантная экспрессия цитокератинов встречается у миофибробластов, часто определяющихся в зонах хронического воспаления, особенно после ранее проведенной ТУР.

В работе Tamas и соавт. было проведено исследование 3 цитокератиновых маркеров AE1/AE3, CAM5.2, высокомолекулярного цитокератина, а также SMA и десмина в 29 повторных биопсиях после ТУР для выявления резидуальных опухолевых клеток. В 6 случаях в препаратах выявлялись клетки, положительные хотя бы по 2 цитокератинам, в 8 случаях — только по цитокератину СК AE1/AE3. Из этих 8 случаев в 6 клетки имели веретенноклеточную морфологию и экспрессировали маркер SMA при отсутствии экспрессии десмина, что позволило авторам отнести эти клетки к популяции миофибробластов [15]. Таким образом, для исключения неправильной интерпретации данных при проведении ИГХ-анализа патологу необходимо учитывать морфологические характеристики клетки, в сложных случаях рекомендуется определение экспрессии дополнительных маркеров.

Для дифференциального диагноза стадий T1 и T2 предложено определение экспрессии смутелина — протеина, относящегося к белкам цитоскелета и экспрессирующегося только на полностью дифференцированных гладкомышечных клетках. Использование этого маркера позволяет успешно различать собственную мышечную пластинку слизистой оболочки и непосредственно мышечный слой мочевого пузыря, в том числе при просмотре образцов, полученных при ТУР. Чувствительность в определении инвазии собственного мышечного слоя мочевого пузыря состав-

ляет 97% [16]. Процент использования смутелина в комбинации с десмином и виментином на миоцитах и миофибробластах в дифференциальной диагностике изучаемых клеток приближается к 100 [17]. Отмечается наибольшее значение ИГХ-маркеров как факторов прогноза рецидива и прогрессирования мышечно-инвазивного РМП. Прежде всего это относится к протеинам, участвующим в регуляции клеточного цикла, апоптоза и пролиферации. Первоначально изучалась роль мутаций гена *TP53* — одного из основных опухолевых супрессоров. Мутации гена *TP53*, как правило, приводят к aberrантной нуклеарной экспрессии белка p53. Мутантный протеин обладает повышенной устойчивостью к разрушению в сравнении с нормальным p53.

При метаанализе 26 исследований, включавших 3241 пациента, 68% из которых имели стадии Ta, T1, Tis, была обнаружена значительная корреляция между положительным окрашиванием клеток опухоли на p53 и прогрессией опухоли для пациентов со стадией T1 и более распространенными стадиями заболевания ($p = 0,0001$). Для стадии Ta подобной закономерности выявлено не было. Результаты требуют определенной осторожности в трактовке, так как анализируемые исследования существенно различались по методологии и размеру выборки [18].

Для изучения прогностического значения экспрессии различных анаплазий при различных РМП Mhawech и соавт. провели исследование протеинов регуляторов клеточного цикла p16, p27, p21, p53, циклина D1 и Ki-67 как маркера пролиферации. Была обнаружена корреляция экспрессии циклина D1 и p27 со стадией и степенью злокачественности опухоли, однако корреляции с развитием рецидива и прогрессированием заболевания выявлено не было. Сочетанная экспрессия 2 маркеров — p16 и p21 ассоциировалась со стадией T1b, но малый размер выборки не позволяет экстраполировать результаты на всю генеральную

совокупность больных [19]. Отмечены ассоциация гиперэкспрессии Aurora-A/STK15 и снижение или отсутствие экспрессии E-Cadherin с рецидивами и прогрессией опухолей стадии T1. Высокая экспрессия Raf-1 коррелировала со степенью злокачественности опухоли, однако не имела прогностического значения [20]. Изучалось значение экспрессии протеинов FGFR3, 14-3-3σ, Aurora-A, E-Cadherin, Hamartin [21]. Ни один из исследуемых маркеров не оказался достаточно информативным для проведения субстадирования T1 на T1a и T1b, хотя сочетание экспрессии FGFR3 и E-Cadherin коррелировало с развитием рецидива заболевания как при T1a, так и при T1b. Ни один из протеинов не был статистически достоверным прогностическим признаком прогрессии [22]. Была выявлена корреляция между aberrантной экспрессией p53, p27 и Ki-67 и риском рецидива и специфической смертностью от РМП. Добавление данных маркеров к стандартным гистологическим критериям неблагоприятного прогноза увеличило прогностические индексы сочетания признаков с 54,7 до 71,7% для риска прогрессирования и с 64,3 до 77,5% для риска гибели от заболевания [23].

В настоящее время проводится проспективное исследование, посвященное изучению роли экспрессии 7 протеинов (FGFR3, EGFR, Rb1, p53, Ki-67, VEGF и CK20, p21, Her-2/neu, Bax/bcl-2, CD-40), в которое включено 1070 пациентов с различными стадиями РМП; планируемый срок наблюдения составляет 5 лет. Возможно, результаты этой работы позволят разработать алгоритм ИГХ-исследований при уротелиальном раке [24]. В таблице представлены ИГХ-маркеры, наиболее часто исследуемые при ранних стадиях инвазивного РМП.

Применение молекулярно-генетических методов открывает новые горизонты для диагностики РМП. Опухоли стадии Ta характеризуются делецией 9-й хромосомы и активирующими мутациями гена *FGFR3*

ИГХ-маркеры, наиболее часто исследуемые при ранних стадиях инвазивного РМП

Авторы	Год изда- ния	Исследуемые маркеры													
		p53	Ki-67	p21	pRB	p16	p27	Cyclin D1	E-Cadherin	Aurora-A/STK15	FGFR3	Hamartin	Survivin	EGFR	
Dybowski et al.	2003		+				+								
P. Mhawech et al.	2004	+	+	+		+	+	+							
Hitchings et al.	2004	+			+	+									
P. Mhawech- Fauceglia et al.	2006								+	+					
P. Mhawech- Fauceglia et al.	2007								+	+	+	+			
S. Shariat et al.	2009	+	+	+			+						+		
R. Bryan et al.	2009	+	+		+						+			+	

(3 рецептора фактора роста фибробластов), *N-RAS*, реже — *PI3K*. Хромосомный набор этих опухолей, как правило, диплоидный, с делецией длинного плеча или моносомией 9-й хромосомы как единственным нарушением, свидетельствующим о потере гетерозиготности [25]. В опухолях стадии T1 определяются другие признаки потери гетерозиготности, чаще за счет делеции короткого плеча 11-й хромосомы, где находятся гены *CCND1* и *CDKN1C* [26]. Иногда в клетках определяются увеличение копийности генов на длинных плечах 1, 17 и 20-й хромосом, амплификация длинного плеча 11-й хромосомы (в том числе в локусе гена циклина D1) и делеция длинного плеча 10-й хромосомы. Дальнейшее прогрессирование опухоли до стадии T2 и выше приводит к нарастанию генетической нестабильности, выражающейся в выраженной анеуплоидии и структурных нарушениях: при кариотипировании обнаруживаются потери коротких плеч 5, 6, 16 и 18-й хромосом, а также длинных плеч 3-й и 11-й хромосом [27]. Достаточно часто нарушается экспрессия ряда генов, принадлежащих к семейству эпидермальных факторов роста: *ERBB2* (гиперэкспрессия — в 10–50 %, амплификация — в 10–20 % случаев), *EGFR* (гиперэкспрессия в 30–50 % случаев) [28]. По мере прогрессирования опухоли возникают мутации основных генов-супрессоров: *TP53*, *RB1*, *CDKN2A/ARF*, *PTEN* [29].

Самыми частыми первичными нарушениями в опухоли *in situ* являются мутации гена *TP53*, а также *RB* и реже *PTEN* [30]. Дальнейшее прогрессирование заболевания ведет к развитию генетической нестабильности и выражается в виде количественных и структурных аномалий кариотипа.

Для определения генетической нестабильности используют флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), сравнительную геномную гибридизацию, гибридизацию на ДНК-чипах. При FISH применяют флуоресцентные центромерные ДНК-зонды, позволяющие выявлять анеуплоидию 3, 7 и 17-й хромосом, а также локус-специфический зонд, выявляющий нарушения в локусе 9p21 в клетках мочевого осадка. В 2006 г. Mian и соавт. опубликовали работу, в которой оценивали значение хромосомных нарушений для течения ранних стадий РМП (Ta, T1 и Tcis). Авторами были сформированы 2 группы по генетическому риску, основанные на данных проведенного исследования. В группу низкого риска вошли пациенты, у которых либо выявлялся нормальный диплоидный хромосомный набор, либо определялось нарушение ploидности по 3-й хромосоме или потеря гетерозиготности по короткому плечу 9-й хромосомы, поскольку эти генетические находки характерны для неинвазивного РМП. В группу высокого риска были включены больные, у которых определялась анеуплоидия по 7-й и 17-й хромосоме. При проведении анализа установлено, что у больных группы высокого риска рецидив

и прогрессирование заболевания возникали чаще, чем у больных группы низкого риска (23,5 и 11,1 % для группы низкого риска и 50 и 54,5 % для группы высокого риска соответственно; $p < 0,001$) [31]. Прогностическое значение нарушений ploидности 17-й хромосомы выявлено в дальнейшем. Амплификация гена *ERBB-2* (Her-2/neu) является достаточно редким событием при уротелиальной карциноме и не превышает 10 %, в то время как гиперэкспрессия протеина встречается достаточно часто (60,3 % случаев). В 58,7 % случаев определялась полисомия 17-й хромосомы, на которой расположен ген *ERBB-2*. Корреляция между амплификацией гена, полисомией и уровнем экспрессии протеина отсутствовала, что было расценено как влияние механизмов эпигенетической регуляции транскрипции и трансляции на aberrантную экспрессию белка. Выявлена корреляция между полисомией 17-й хромосомы и степенью злокачественности опухоли ($p < 0,001$), что в целом укладывается в представления о неблагоприятной роли нарастания генетической нестабильности при РМП [32]. В дальнейшем было установлено, что амплификация гена циклина D1 нередко сопровождается амплификацией центромерного региона и формированием двойных ацентрических мини-хромосом (double minute chromosomes), представляющих собой свободно плавающие в цитоплазме копии многократно амплифицированного региона короткого плеча 11-й хромосомы, способные к самостоятельной репликации. Оказалось, что РМП стадии T1, сопровождающийся развитием данной хромосомной аномалии, приводит к существенному сокращению безрецидивной и ОБ пациентов ($p < 0,001$) [33].

Следующим этапом стало сочетание молекулярно-генетических исследований с ИГХ. Опубликованная в 2009 г. работа Bollman и соавт. была проведена с целью определения прогностической роли так называемого молекулярного индекса, значение которого формировалось с учетом ИГХ-исследований, выявляющих экспрессию p53 и Ki-67, анализа ploидности ДНК и результатов FISH на указанные ранее маркеры генетической нестабильности. Оценка результатов FISH проводилась следующим образом: в благоприятную группу включались больные без нарушений кариотипа, с делецией короткого плеча 9-й хромосомы в качестве единственной аномалии или полисомией по любой из исследуемых хромосом, определяющейся менее чем в 10 % клеток. В неблагоприятную группу вошли пациенты, с делецией 9p21 и с любым видом анеуплоидии по одной или нескольким хромосомам, встречающимся более чем в 10 % клеток. Была обнаружена корреляция между молекулярным индексом и безрецидивной выживаемостью ($p = 0,02$). Благоприятная и неблагоприятная группы по результатам FISH также коррелировали со стадией и степенью злокачественности опухоли [34].

Опубликован ряд работ, посвященных исследованию профилей генной экспрессии при РМП, позволяющих проводить молекулярную субклассификацию ранних стадий уротелиальных опухолей. Достаточно количества данных, подтверждающих прогностическую значимость обнаруженных нарушений, в настоящее время еще нет [35].

Заключение. Диагностика и определение прогноза течения ранних стадий инвазивного РМП по-прежнему остается сложной задачей для патолога. Стало очевидным, что использование какого-либо одного биологи-

ческого маркера не может обеспечить адекватной оценки как глубины инвазии, так и рисков дальнейшего прогрессирования и рецидивирования заболевания. Выбор адекватной панели маркеров, включающей морфологические, ИГХ и молекулярно-генетические, является наиболее актуальной задачей в настоящее время. Разработка подобной диагностической и прогностической панели сможет помочь патологу в формировании алгоритма исследования образца опухоли и окажет несомненную помощь клиницисту в определении тактики лечения каждого больного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чернышев И.В. Оптимизация подходов диагностики и лечения рака мочевого пузыря: дис. ... д-ра мед. наук. М., 2004. 369 с.
2. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю. Уточняющая диагностика рака с использованием иммуногистохимического определения маркеров. Медицинская технология. М., 2009.
3. Cheng L., Montironi R., Davidson D., Lopez-Beltran A. Staging and reporting of urotelial carcinoma of the urinary bladder. *Modern Pathol* 2009;22:70–95.
4. Tosoni I., Wagner U., Sauter G. et al. Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer. *BJU Int* 2000;85:48–53.
5. Bol M.G., Baak J.P., Buhr-Wildhagen S. et al. Reproducibility and prognostic variability of grade and lamina propria invasion in stages Ta, T1 urothelial carcinoma of the bladder. *J Urol* 2003;169:1291–4.
6. Angulo J.C., Lopez J.I., Grignon D.J., Sanchez-Chapado M. Muscularis mucosa differentiates two populations with different prognosis in stage PT1 bladder cancer. *Urology* 1995;45:47–53.
7. Holmang S., Hedelin H., Anderstrom C. et al. The importance of the depth of invasion in stage T1 bladder carcinoma: a prospective cohort study. *J Urol* 1997;157:800–4.
8. Hermann G.G., Horn T., Steven K. The influence of the level of lamina propria invasion and the prevalence of p53 nuclear accumulation on survival in stage PT1 transitional cell bladder cancer. *J Urol* 1998;159:91–4.
9. Epstein J.I., Amin M.B., Reuter V.R. et al. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Bladder Consensus Conference Committee. Am J Surg Pathol* 1998;22:1435–48.
10. Cheng L., Neumann R.M., Weaver A.L. et al. Predicting cancer progression in patients with stage T1 bladder carcinoma. *J Clin Oncol* 1999;17:3182–7.
11. Andius P., Johansson S.L., Holmang S. Prognostic factors in stage T1 bladder cancer: tumor pattern (solid or papillary) and vascular invasion more important than depth of invasion. *Urology* 2007;70:758–62.
12. Cho K.S., Seo H.K., Joung J.Y. et al. Lymphovascular invasion in transurethral resection specimens as predictor of progression and metastasis in patients with newly diagnosed T1 bladder urothelial cancer. *J Urol* (2009);182(6):2625–30.
13. Lopez J.I., Angulo J.A. Growth pattern in superficial urothelial bladder carcinomas. *Histological review and clinical relevance. Int Urol Nephrol* (2009) 41:847–54.
14. Mhawech P., Iselin C., Pelte M.F. Value of immunohistochemistry in staging T1 urothelial bladder carcinoma. *Eur Urol* 2002;42:459–63.
15. Tamas E.F., Epstein J.I. Detection of residual tumor cells in bladder biopsy specimens: pitfalls in the interpretation of cytokeratin stains. *Am J Surg Pathol* 2007;31:390–7.
16. Bovia I., Al-Quran S., Rosser C. et al. Smoothelin immunohistochemistry is a useful adjunct for assessing muscularis propria invasion in bladder cancer. *Histopat* 2010;56:951–6.
17. Council L., Hameed O. Differential expression of immunohistochemical markers in bladder smooth muscle and myofibroblasts, and the potential utility of desmin, smoothelin and vimentin in staging of bladder carcinoma. *Mod Path* 2009;22:639–50.
18. Goebel P., Groshen S., Bernd J. et al. p53 immunohistochemistry in bladder cancer — a new approach to an old question. *Urol Oncol* 2010, 28(4):377–88.
19. Mhawech P., Greloz V., Oppikofer C. et al. expression of cell cycle proteins in T1a and T1b urothelial bladder carcinoma and their value in predicting tumor progression. *Cancer* 2004;100:2367–75.
20. Mhawech-Fauceglia P., Fischer G., Becka A. et al. Raf1, Aurora-A/STK15 and E-cadherin biomarkers expression in patients with pTa/pT1 urothelial bladder carcinoma; a retrospective TMA study of 246 patients with long-term follow-up. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32(4):439–44.
21. Mhawech-Fauseglia P., Cheney R., Schwaller J. Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma. *Cancer* 2006;106:1205–16.
22. Mhawech-Fauseglia P., Fisher G., Alvarez V. et al. Predicting outcome in minimally invasive urothelial bladder carcinoma using biomarkers: a high throughput tissue microarray analysis. *BJU* 2007; 100:1182–7.
23. Shariat S., Bolenz C., Godoy G. et al. Predictive value of combined immunohistochemical markers in patients with pT1 urothelial carcinoma at radical cystectomy. *J Urol* 2009;182:78–84.
24. Bryan R., Zeegers M., James N. et al. Biomarkers in bladder cancer. *BJU Int* 2009;105:608–13.
25. Fadl-Elmula I., Gorunova L., Mandahl N. et al. Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29:256–65.
26. Hoffmann M.J., Florl A.R., Seifert H.H., Schulz W.A. Multiple mechanisms downregulate CDKN1C in human bladder cancer. *Int J Cancer* 2005;114:406–13.
27. Knowels M. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis* 2006;27(3):361–73.
28. Chow N.H., Chan S.H., Tzai T.S. et al. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1957–62.
29. Nicholson B.E., Frierson H.F., Conaway M.R. et al. Profiling the evolution of human metastatic bladder cancer. *Cancer Res* 2004; 64:7813–21.
30. Cordon-Cardo C. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. *Scand J Urol Nephrol* 2008; 42 (Suppl 218):154–65.
31. Mian C., Lodde M., Comploj E. et al. Multiprobe fluorescence in situ hybridisation: prognostic perspectives in superficial bladder cancer. *J Clin Pathol* 2006;59:984–7.
32. Simonetti S., Russo R., Ciancia C. et al. Role of polysomy 17 in transitional cell carcinoma of the bladder: immunohistochemical study of HER2/neu expression and FISH analysis of c-erbB-2 gene and chromosome 17. *Int J Surg Pathol* 2009;17(3):198–205.
33. del Rey J., Prat E., Ponsa I. et al. Centrosome clustering and cyclin D1 gene amplification in double minutes are common events in chromosomal unstable bladder tumors. *BMC Cancer* 2010;10:280–91.
34. Bollman D., Bollman M., Bankfalvi A. et al. Quantitative molecular grading of bladder tumours: A tool for objective assessment of the biological potential of urothelial neoplasias. *Oncol Rep* 2009;21:39–47.
35. Lindgren D., Frikvesi A., Guidionsson S. et al. Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome. *Cancer Res* 2010;70(9):3463–72.