

ФГБОУ ВО «КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПРОФЕССОРА В.Ф. ВОЙНО-ЯСЕНЕЦКОГО»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

СЕМЁНОВ ЭДУАРД ВАСИЛЬЕВИЧ

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К ДИАГНОСТИКЕ И ОЦЕНКЕ РИСКА
РАЗВИТИЯ РЕЦИДИВА У БОЛЬНЫХ МЫШЕЧНО-НЕИНВАЗИВНЫМ
РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ**

14.01.12 – онкология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
доцент Р.А. Зуков

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор Л.М. Куртасова

Красноярск
2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Современные аспекты представления об эпидемиологии, диагностике и лечении рака мочевого пузыря	15
1.2 Рецидивирующее течение рака мочевого пузыря.....	21
1.3 Современные методы прогнозирования клинического течения рака мочевого пузыря.....	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1 Объект исследования	38
2.2 Методы исследования.....	46
2.2.1 Определение уровня экспрессии поверхностных антигенов CD13, CD15, CD45.....	46
2.2.2 Оценка показателей клеточного цикла	48
2.3 Статистические методы исследования	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	55
3.1. Оценка непосредственных и отдаленных результатов комбинированного лечения у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря	55
3.2. Особенности демографических, антропометрических, клинико-морфологических параметров у больных МНРМП в зависимости от характера течения заболевания.....	57
3.3. Фенотипические характеристики клеток осадка мочи у больных с верифицированным раком мочевого пузыря и при развитии рецидива заболевания.....	68
3.3.1 Экспрессия CD13, CD15, CD45 антигенов и показатели клеточного цикла в контрольной группе и у пациентов с МНРМП	68

3.3.2 Особенности экспрессии CD13, CD15, CD 45 антигенов и фаз клеточного цикла в зависимости от характера течения мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря.....	71
3.3.3 Оценка сопряженности фенотипических характеристик клеток осадка мочи у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря с характером течения заболевания	73
3.4. Математическое моделирование в оценке информативности изучаемых факторов для диагностики первичной опухоли мочевого пузыря и риска развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения.....	76
3.4.1 Информативность изучаемых факторов в диагностике первичной опухоли мочевого пузыря.....	77
3.4.2 Оценка риска развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения	86
3.4.3 Зависимость показателей безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения от клинико-морфологических параметров и фенотипических характеристик клеток осадка мочи	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
ВЫВОДЫ	117
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

БЦЖ(ВGG) – бацилла Кальметта–Герена

ВБП – выживаемость без прогрессирования

ВОЗ / WHO – Всемирная организация здравоохранения

ЗНО – злокачественные новообразования

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИГХ – иммуногистохимия

ИМТ – индекс массы тела

КККОД – КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского»

КО – клеточный осадок

КТ – компьютерная томография

КЦ – клеточный цикл

МНО – международное нормированное отношение

МНРМП – мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря

ОВ – общая выживаемость

ПТВ – протромбиновый индекс

ПТИ – протромбиновое время

РМП – рак мочевого пузыря

СД – сахарный диабет

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

СНМП – симптомы нижних мочевых путей

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

ТУР – трансуретральная резекция

УЗИ – ультразвуковое исследование

ЦИМ – цитологическое исследование мочи

ЦС – цистоскопия

CIS – carcinoma in situ

ECOG-PS – соматический статус по шкале Eastern Cooperative Oncology Group

G0 – фаза покоя

G1 – пресинтетическая фаза

G2 – постсинтетическая фаза

M – митотическая фаза

PBS– фосфатно-солевой буфер

TNM – международная классификация опухолей

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Риск развития злокачественных опухолей мочевого пузыря увеличивается с возрастом и имеет половые особенности: мужчины заболевают в 2,5-10 раз чаще, чем женщины [42, 88]. Пик заболеваемости раком мочевого пузыря (РМП) регистрируется в возрастной категории 50-80 лет (средний возраст - 67 лет) [88]. Показатели общемировой статистики весьма неутешительны: ежегодно регистрируется более 430 тыс. новых случаев РМП, что составляет 3,1% всех злокачественных новообразований и 30-40% опухолей мочеполовой системы [4, 20-22, 39-42, 84-88]. Ежегодно в России РМП заболевают более 16 тыс. человек. За последнее десятилетие в стране отмечается рост заболеваемости на 20,3%.

«Классической триадой» в первичной диагностике РМП считают ультразвуковое исследование (УЗИ) мочевого пузыря, цистоскопию (ЦС) с биопсией и цитологическое исследование мочи (ЦИМ) [3, 13, 46, 52].

Цитологический метод исследования для диагностики РМП рекомендован Европейской ассоциацией онкоурологов, общая специфичность метода составляет 40-44%, чувствительность – 30-35% [Guidelines..., 2016]. ЦИМ наиболее информативен для верификации низкодифференцированных опухолей и рака *in situ*, при которых общая диагностическая точность метода достигает 90%

В 2016 году была опубликована Парижская система цитологии уринарного тракта – это первый документ, приводящий исследования в области уроцитологии в единую систему, в которой выделяется семь диагностических категорий. Основной задачей данной системы является стандартизация трактовки патоморфологической картины, в клиническом приложении – определение риска развития уротелиальной карциномы. Несмотря на неоспоримые достоинства использования данной системы, неоднозначность описания диагностических критериев создает сложности в верификации РМП.

Помимо ЦИМ большой клинический интерес представляет изучение уринарных маркеров, поскольку исследование мочи – это неинвазивная методика, позволяющая получить достаточное количество материала. В нашей стране наиболее широко распространены и доступны к использованию в клинической практике тест-системы: антиген рака UBC, ВТА, NMP-22, CYFRA 21-1, UroVision [7, 32, 47, 80, 104, 159].

Тест UBC обладает низкой чувствительностью – около 54%; тест ВТА, несмотря на довольно высокую диагностическую точность обладает минусом, связанным с уменьшением информативности при воспалительных заболеваниях мочеполовых путей; тест NMP-22 обладает низкой чувствительностью (50%) к неинвазивным опухолям; для теста CYFRA 21-1 специфичность метода составляет 41%, что обуславливают низкую точность диагностики РМП, тест-система UroVision – дорогой и трудоемкий метод.

Отсутствие специфичных маркеров, ассоциированных с МНРМП, определяет актуальность разработки интегративных методов диагностики заболевания и оценки злокачественного потенциала опухоли на начальных этапах развития. Успехи последнего времени в понимании биологии опухолевого роста позволяют использовать в качестве такого метода оценку уровня экспрессии поверхностных маркеров, а также показатели митотического цикла клеток осадка мочи [10, 63, 139].

CD45 или LCA (Leuko cytecommon antigen) является основным лейкоцитарным антигеном. Функционально молекула CD13, или аминоксидоксидаза N – это мембраносвязанная металлопротеаза, экспрессируемая на всех стадиях дифференцировки клеток гранулоцитарного ряда и отсутствующая на агранулоцитах, эритроцитах и тромбоцитах. Кроме того, CD13 фиксируется на поверхности клеток, развивающихся из эктодермального зародышевого листка, в мочевом пузыре его максимальная экспрессия отмечается в подслизистом слое. Ген CD13 идентифицирован на 15 хромосоме человека. Lewis-X-антиген или CD15 – углеводная молекула адгезии (3-фукозил-N-ацетиллактозамин) на поверхности клеток. Ген CD45 идентифицирован на 1 хромосоме человека (локус

1q31—32). Увеличение экспрессии Lewis-X-антиген рассматривается некоторыми авторами как признак переходноклеточного рака [13, 63, 99].

Наличие CD15⁺ клеток может свидетельствовать о злокачественном перерождении тканей органа, а появление CD13⁺ клеток в моче отражать степень агрессивного воздействия опухоли на подслизистый слой мочевого пузыря. В связи с этим, представляет интерес исследование количества клеток, экспрессирующих CD45, а также показатели экспрессии CD13 и CD15 антигенов на клетках осадка мочи при различных вариантах клинического течения мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря (МНРМП).

Таким образом, на основании изучения клинико-морфологических параметров и вышеуказанных характеристик поверхностных маркеров, определяемых на клетках осадка мочи, представляется перспективной разработка новых подходов, дополняющих традиционные цитологические методы и повышающих эффективность диагностики как первичного, так и рецидивного МНРМП.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день существует достаточно большое количество работ как российских, так и зарубежных авторов, посвященных вопросам поиска дополнительных информативных критериев первичной диагностики рака мочевого пузыря, а также разработке схем динамического наблюдения за пациентами после комбинированного лечения.

«Золотым стандартом» лабораторной диагностики рака мочевого пузыря является цитологическое исследование осадка мочи, однако метод обладает довольно низкой диагностической точностью при МНРМП [Guidelines..., 2016]. Проблематике повышения эффективности цитологических методов посвящено большое количество работ, направленных на поиск новых клеточных маркеров, ассоциированных со злокачественной трансформацией уротелия: использование возможностей FISH-анализа, поиск поверхностных клеточных маркеров и т.д. [Троянов А.А., 2012; Майсков И.И. и др., 2013; Леонов М.Г. и др., 2014; Зимичев

А.А. и др., 2015; Zhang Y. et al., 2016]. Несмотря на успехи в данной области, до сих пор не предложено методов, обладающих достаточной чувствительностью и специфичностью.

Основной проблемой в лечении МНРМП является его склонность к рецидивирующему течению, несмотря на использование комбинированного лечения [Старцев В.Ю., Колмаков А.Ю., 2015; Nargund V.H. et al., 2012; Soubra A., Risk M.C., 2015]. Диагностике рецидива заболевания посвящено большое количество работ, направленных на поиск клинико-морфологических, цитологических и молекулярных предикторов течения заболевания. Тем не менее, до сих пор четко не определены критерии риска развития рецидива МНРМП, а также перечень и кратность проведения обследований [Троянов А.А., 2012; Майсков И.И. и др., 2013; Леонов М.Г. и др., 2014; Зимичев А.А. и др., 2015; Zhang Y. et al., 2016].

Цель исследования

Определение значимости клинико-морфологических показателей и фенотипического спектра клеток осадка мочи в качестве дополнительных критериев диагностики первичной опухоли и оценки риска ее рецидива у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря.

Задачи исследования

1. Изучить клинико-морфологические параметры у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря и их связь с характером течения заболевания.
2. Исследовать фенотипические параметры клеток осадка мочи у больных с верифицированным раком мочевого пузыря и оценить их особенности при развитии рецидива заболевания после комбинированного лечения.
3. Оценить информативность изучаемых параметров в диагностике первичной опухоли мочевого пузыря с помощью математического моделирования.

4. Определить наиболее значимые предикторы риска развития рецидива заболевания у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря после комбинированного лечения.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное изучение клинико-морфологических показателей, фаз клеточного цикла и клеток осадка мочи экспрессирующих поверхностные антигены CD13, CD15, CD45 у больных МНРМП в зависимости от характера течения заболевания.

У больных МНРМП по сравнению со здоровыми донорами увеличена экспрессия антигенов CD13, CD15, CD45 в клеточном осадке мочи, а также определяются существенные изменения в клеточном цикле: увеличена доля клеток в митотическую, пресинтетическую (G1) и постсинтетическую фазы (G2), снижена - в синтетическую (S) фазу.

Доказана информативность фенотипических параметров клеток осадка мочи в качестве дополнительных критериев диагностики первичной опухоли мочевого пузыря.

При развитии рецидива заболевания в клеточном осадке мочи обнаружено увеличение доли клеток в синтетическую (S) фазу митотического цикла.

Впервые на основе математического процессинга изучаемых параметров с помощью дискриминантного и логистического моделирования с последующим ROC-анализом разработаны высокоинформативные модели оценки риска развития рецидива МНРМП.

Теоретическая и практическая значимость работы

Доказана целесообразность определения экспрессии поверхностных клеточных антигенов CD13, CD15, CD45 и оценка фаз митотического цикла в клеточном осадке мочи для повышения эффективности диагностики опухоли мочевого пузыря.

Разработаны и внедрены в клиническую практику математические модели, позволяющие провести оценку риска развития рецидива заболевания у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря.

По результатам проведенных исследований получено свидетельство Федеральной службы по интеллектуальной собственности о регистрации программы для ЭВМ №2017661277 «Программа определения вероятности рецидива заболевания у больных поверхностным раком мочевого пузыря на основании исследования клеточного осадка мочи».

Методология и методы исследования

В основу методологии настоящей диссертационной работы положены современные теоретические и практические основы отечественной и зарубежной онкологии и урологии. В работе анализируются результаты обследования 162 больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря, а также непосредственные и отдаленные результаты их лечения. Диссертационное исследование выполнялось в два этапа.

На первом этапе проведен анализ значимости основных клинико-морфологических параметров и фенотипических характеристик клеток осадка мочи в отношении характера течения заболевания.

Второй этап заключался в математическом моделировании полученных данных для выявления наиболее значимых дополнительных информативных критериев диагностики первичной опухоли и оценки риска развития рецидива заболевания после комбинированного лечения.

При этом отмечено, что оптимизация подходов к диагностике первичной опухоли и оценке вероятности рецидива заболевания достигается за счет идентификации дополнительных информативных критериев, а также определения предикторов безрецидивного течения МНРМП после комбинированного лечения.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Характер клинического течения мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря ассоциирован с особенностями клинико-морфологических

факторов (гематурия, размер опухоли, мультицентричность опухолевого роста, степень дифференцировки опухоли, наличие T_{IS}, содержание базофилов периферической крови) и фенотипических характеристик клеток осадка мочи (доля клеток в S фазе митотического цикла).

2. У больных с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря в осадке мочи увеличено количество клеток, экспрессирующих молекулы CD13, CD15, CD45, а также изменено соотношение клеток в синтетической, пресинтетической, постсинтетической фазе клеточного цикла и фазе митоза, что позволяет использовать их в качестве дополнительных информативных критериев диагностики.

3. Предикторами снижения безрецидивной выживаемости у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря являются гематурия, мультицентричный опухолевый рост, а также уменьшение доли клеток в S-фазе и повышение в G₀-фазе клеточного цикла. Разработана информативная регрессионная модель, позволяющая оценить риск развития рецидива заболевания с чувствительностью - 69,4%, специфичностью - 91,2%, общей диагностической точностью - 84,5%.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом клинического материала (162 больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря), высоким методологическим уровнем с использованием современных информативных методик. Обоснованность полученных результатов подтверждается корректной статистической обработкой материала и использованием методов математического моделирования.

Апробация работы

Основные положения и результаты научных исследований доложены и обсуждены на конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (г. Томск, 2016), Всероссийской научно-практической

конференции с международным участием «Современные медицинские технологии в диагностике и лечении онкологических заболеваний» (г. Красноярск, 2016), I Байкальском медицинском молодежном форуме (г. Улан-Удэ, 2016), международной конференции RUSSCO Восток (г. Хабаровск, 2016), международной конференции «ЛОМОНОСОВ» (г. Москва, 2017), XII всероссийской конференции молодых ученых-онкологов (г. Томск, 2017), VI конгрессе урологов Сибири с международным участием (г. Белокуриха, 2017), всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения онкологии в клинической практике» (г. Красноярск, 2017).

Работа отмечена Государственной премией Красноярского края за высокие результаты в научных разработках, направленных на социально-экономическое развитие региона (2016 г.) и дипломом конкурса оригинальных исследований молодых ученых FallingWallsLab (г. Красноярск, 2016 г.).

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «УМНИК» 2015-2017 года (договор №6584 от 08.07.2015).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования использованы при подготовке методических рекомендаций «Оптимизация тактики ведения больных поверхностным раком мочевого пузыря», утвержденных ЦКМС ФГБОУ ВО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (протокол № 4 от 01.03.17г.), предназначенных для подготовки врачей по специальности «онкология».

Полученные данные внедрены в практику в КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер», НУЗ «Дорожная больница на ст. Красноярск».

Результаты исследования включены в рабочие программы по специальности «онкология» для ординаторов, слушателей системы дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Красноярский государственный

медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 4 статьи в журналах перечня ВАК.

Личный вклад автора

Автором лично произведено планирование работы, поиск и анализ литературы по изучаемой проблеме, сбор материала, анализ полученных результатов, подготовка научных публикаций и написание диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 15 рисунками и 45 таблицами. Библиография включает 177 источников, из которых 97 отечественных и 80 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные аспекты представления об эпидемиологии, диагностике и лечении рака мочевого пузыря

По данным общемировой статистики рак мочевого пузыря является достаточно распространенной нозологией, занимающей 9-е место в общей структуре онкологической заболеваемости и имеющий тенденцию к постоянному прогрессивному росту. Рак мочевого пузыря составляет порядка 2-5% всех злокачественных новообразований и 30-40% опухолей мочеполовой системы человека [4, 20-22, 39-42, 84-88].

РМП в 2,5-10 раз чаще встречается у мужчин, чем у женщин той же возрастной категории, что, по-видимому, может быть связано с генетическими, гормональными и анатомическими особенностями человека. Так же одной из причин преобладания злокачественных новообразований мочевого пузыря среди представителей мужского пола является нарушение уродинамики в связи с аденомой предстательной железы, хроническим простатитом и другими заболеваниями, ведущими к застою мочи. В тоже время, низкая степень дифференцировки опухолевых клеток, и высокая степень инвазии более характерны для представительниц женского пола, повышая риск рецидивирования и снижая 5-летнюю выживаемость в сравнении с мужчинами [16, 22-24, 27, 28, 47].

Для РМП характерно нарастание заболеваемости с возрастом – установлено, что у лиц старше 65 лет вероятность возникновения РМП резко возрастает, достигая своего максимума [20-22].

В США и странах западной Европы заболеваемость РМП в 2–3 раза превышает среднемировые показатели [48, 103, 120, 148, 150, 166]. В Египте и других странах Африканского континента, где основной причиной заболеваемости РМП считается шистосоматоз [47, 90, 170], данная опухоль

занимает первое место по распространенности среди ЗНО на протяжении последних 50 лет [27, 29, 112, 114, 120].

Частота РМП в Российской Федерации составляет около 2,7-5% всех опухолей и 45% среди опухолей мочеполовой системы. У 80% больных заболевание диагностируется на ранних стадиях заболевания. Уровень смертности от злокачественных новообразований мочевыделительной системы составляет порядка 6,7% [24, 30, 39-42, 57, 88, 96].

По субъектам Российской Федерации уровень заболеваемости, смертности и 5-летней выживаемости при РМП имеет территориальные особенности [16, 30, 49, 53, 64, 91, 96].

Так, в Красноярском крае стандартизованный показатель заболеваемости РМП у мужчин составляет около 17,07 на 100000 населения, у женщин этот показатель значительно ниже - 4,01 [20-22, 42, 47, 84-88].

Определенный риск развития рака мочевого пузыря связан с профессиональными вредностями, такими как длительный контакт с ароматическими аминами, а также их производными (в среднем 20 лет [39-42, 47, 68, 95]). Подобный риск имеется и у рабочих, задействованных на предприятиях, производящих и применяющих красители и алюминий, у трудящихся на текстильной и резиновой промышленности, химической и нефтяной промышленности, парикмахеров, водителей грузовиков [84-88].

Особенности образа жизни также играют немаловажную роль. Например, такая вредная привычка, как курение, является высоко распространенной причиной развития РМП (курящие люди болеют РМП в 2-3 раза чаще, чем некурящие) [121].

Лучевая терапия на органы малого таза является одним из факторов риска возникновения новообразований мочевого пузыря. В литературе имеются данные, что женщины, больные раком шейки матки, прошедшие лучевую терапию, имеют высокий риск развития РМП [47, 48].

Роль носительства вируса папилломы человека в этиопатогенезе и клиническом течении рака мочевого пузыря изучалась многими специалистами, в

результате чего было установлено, что частота выявления вируса в опухолевой ткани встречалась от 2% до 35%. Также доказано более тяжелое течение РМП в случае наличия генома вируса папилломы человека в ткани опухоли [12, 126].

Повышение риска возникновения РМП наблюдается у пациентов, получавших циклофосфамид. В первую очередь это касается больных, лечение которых осложнилось геморрагическим циститом [47, 98].

По классификации ВОЗ рак мочевого пузыря относится к злокачественным эпителиальным опухолям, наибольшую распространенность из которых имеет переходно-клеточная форма рака, составляя до 90% всех опухолей [28].

Переходно-клеточный РМП клинико-анатомически делят на две группы – мышечно-неинвазивный (Tis, Ta и T1) и инфильтрирующий (T2, T3 и T4). Ранжирование осуществляется в зависимости от глубины инвазии опухоли за пределы слизистой оболочки, что определяет прогноз в большей части [34-36, 102, 103].

Среди опухолей мочевого пузыря наиболее часто встречаются мышечно-неинвазивные формы и регистрируются в 70-80% всех случаев. Вероятность развития рецидива мышечно-неинвазивных опухолей мочевого пузыря низкого риска (категория Ta, низкая степень злокачественности) в первый год после лечения составляет около 15%, через пять лет - 32%. Прогрессирование данного вида опухоли отмечается менее чем в 1% случаев. При возникновении рецидива опухоли мочевого пузыря стадия и степень остается как при первоначальном новообразовании, без влияния на прогноз для жизни пациента [24, 37, 47, 88, 92, 108, 131,132, 152]. К опухолям с высоким риском рецидива относятся МНРМП высокой степени злокачественности (категория T1) и/или сопровождающиеся обширной карциномой *in situ*, а также множественные и обширные опухоли (с вероятностью рецидива в 61% и 78% случаев на первом и пятом году после выявления, соответственно). Кроме этого, для обширных опухолей характерно проникновение в более глубокие слои стенки мочевого пузыря (с вероятностью прогрессирования в 17% и 45% случаев на первом и пятом году после выявления, соответственно). Данные опухоли могут негативно сказываться на

продолжительности жизни пациентов и требуют более агрессивного лечения и динамического наблюдения, поскольку способны к проникновению и распространению на другие органы [47].

Общая 5-летняя выживаемость у пациентов с местно-распространенным РМП зависит от стадии заболевания и колеблется от 80% у пациентов T2N0 и достигает 30% в группе T4N0 [27, 47, 51].

Несмотря на широкий спектр методов диагностики МНРМП, на сегодняшний день проблема раннего выявления данной патологии остается актуальной. «Классической триадой» в первичной диагностике заболевания считают ультразвуковое исследование, цистоскопию (ЦС) с биопсией и цитологическое исследование мочи (ЦИМ) [3, 13, 46, 52].

Трансабдоминальное УЗИ выполняется при наполненном мочевом пузыре и позволяет определить количество, локализацию опухолей, их размеры и структуру, характер роста, выявить дилатацию верхних мочевых путей. Чувствительность исследования зависит от размеров опухоли: при новообразованиях размером более 5 мм - достигает 82%, тогда как при размерах опухоли менее 5 мм - показатель снижается до 38%. Трансректальное и трансвагинальное УЗИ дают возможность лучшего изучения шейки мочевого пузыря и смежных органов [47].

При ЦС определяют количество новообразований, их локализацию, размеры, характер роста, оценивают состояние окружающей слизистой, выполняют биопсию. Расширить возможности ЦС позволяет применение фотодинамической диагностики с 5-аминолевулиновой кислотой. Чувствительность фотодинамической ЦС на 20% превосходит рутинное обследование [46, 50, 52].

Общепризнанным стандартом лабораторной диагностики РМП считается цитологическое исследование мочи. Следует отметить, что данная методика обладает низкой диагностической значимостью: со специфичностью 40-44%, чувствительностью – 30-35%. Описана корреляционная связь чувствительности и степени дифференцировки опухоли: G1 – 13-15%; G2-3136%; G3 – 70-77%; Tis –

92-94%. Малое количество и дегенеративные изменения клеток в препарате, а также различия в терминологии и неоднозначность интерпретации результатов – ограничивают применение цитологического исследования мочи в ранней диагностике РМП [11, 13, 46, 49, 52, 69, 75-77].

КТ и МРТ используют для выявления экстравезикального распространения опухоли и уточнения состояния регионарных лимфатических узлов [47].

Основной метод лечения поверхностного РМП – трансуретральная резекция (ТУР). Существенный недостаток метода – высокая частота рецидивов, достигающая 85%. Использование флуоресцентного контроля во время ТУР мочевого пузыря, а также применение однократной ранней инстилляции химиопрепарата способствует повышению радикальности операции за счет снижения частоты рецидивов опухоли [17, 47, 136, 167, 170].

Для определения тактики наблюдения и лечения у пациентов после проведенной ТУР, пациенты согласно шкале EORTC разделяются на три клинические группы исходя из: количества, размера опухолей, частоты рецидивов в анамнезе, категория Т, наличия сопутствующего рака *in situ* (CIS), степени злокачественности опухоли. У пациентов с низкой вероятностью рецидива после проведенной ТУР дополнительное лечение не проводится. В группе промежуточного риска: показана внутривезикулярная химиотерапия продолжительностью не более 1 года или адъювантная внутривезикулярная иммунотерапия вакциной БЦЖ. В группе высокого риска показана внутривезикулярная иммунотерапия с использованием препаратов БЦЖ [47, 78, 147, 165, 177].

Для улучшения результатов лечения мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря широко применяется адъювантная внутривезикулярная химиотерапия эпирубидином, доксирубидином, адриамицином, морубидином но наибольшее применение в практике нашел митомицином С, который при высокой местной эффективности позволяет избежать многих побочных эффектов терапии [33, 47].

Наряду с использованием внутривезикулярной химиотерапии существуют методы иммунотерапии с использованием препаратов противотуберкулезной

вакцины Кальметге-Герена (БЦЖ). У больных группы высокого риска применение БЦЖ-терапии с поддерживающим курсом позволяет значимо снизить частоту рецидивов по сравнению с внутривезикулярной химиотерапией. Проведение поддерживающей БЦЖ-терапии играет важнейшую роль в предотвращении рецидивов и прогрессировании МНРМП [47, 48].

Ввиду восприимчивости опухоли к иммунотерапии в последнее время появляются разработки противоопухолевых вакцин при РМП на основе раковотестикулярного антигена (NY-ESO-1) [47]; синтетического пептида (Сурвивина). Однако исследования с применением данной категории вакцин, находятся на стадии разработки и не имеют широкого клинического применения.

В других клинических исследованиях проводится испытание сочетания БЦЖ с различными предстателями семейства TOLL-подобных рецепторов (TLRs) (TLR7 и TLR9) И TRAIL, однако полученные данные спорны и не говорят о достоверной эффективности данной группы препаратов.

Одним из наиболее перспективных направлений является таргетная терапия РМП, направленная на основные патогенетические механизмы развития опухолевого процесса. На современном этапе учеными показана значимость таргетной терапии с использованием: AdCMV-TP53, rVV-Tk-53, ONYX-015, PRIMA-1, Ad-Rb94, Flavopirido.

Стандартным методом лечения распространенных форм РМП является цистэктомия с применением различных способов деривации мочи от двухсторонней уретерокутанеостомии до энтеропластики. Метод выбора деривации мочи определяется клинико-морфологическими особенностями опухоли, а также индивидуальными особенностями пациента [47, 69, 71, 109, 135, 167].

Сохраняющийся рост заболеваемости и агрессивное рецидивирующее течение заболевания обуславливают высокую актуальность оптимизации диагностических и лечебных подходов при раке мочевого пузыря. Особый интерес представляет разработка новых неинвазивных методов диагностики заболевания на основании исследования клеточного осадка мочи, которые могут

быть использованы как для раннего выявления злокачественных новообразований (в т.ч. при массовых осмотрах), так и динамического наблюдения за больными МНРМП, получившими специальное лечение.

1.2 Рецидивирующее течение рака мочевого пузыря

Своевременное прогнозирование и диагностика рецидивов имеет не только медицинскую, но и социально-экономическую составляющие. В настоящее время выделено несколько ключевых молекул и путей, которые вовлечены в регуляцию важнейших клеточных процессов, а также в онкогенез и прогрессирование РМП. К таковым относятся регуляция клеточного цикла, апоптоз, опухолевый ангиогенез и инвазия [1, 38, 54, 72-74, 100, 110, 122, 155].

К настоящему моменту проведенный ряд исследований позволил накопить достаточно информации, чтобы рассматривать молекулярно-генетические повреждения опухолевых клеток, выявляемые при раке мочевого пузыря, в качестве нескольких последовательных этапов онкогенеза [113].

Так, на первом этапе развития неинвазивного поверхностного рака мочевого пузыря активизируется мутация в генах FGFR3 и HRAS [134], тогда как при инвазивном раке мочевого пузыря чаще выявляется повреждение генов-супрессоров опухолевого роста, TP53, RB1 и PTEN [134]. Следствием нарушения функции данных регуляторов клеточного цикла является развитие нестабильности генома, что ведет клетку к накоплению большого количества молекулярно-генетических aberrаций с приобретением антиапоптотического фенотипа [58, 59, 83, 122]. При развитии мышечно-инвазивных опухолей мочевого пузыря отмечается роль активации пути PTEN/PI3K/AKT/mTOR в [158].

Вид повреждения в геноме опухолевых клеток различных форм рака мочевого пузыря (инвазивный и неинвазивный) определяет различия не только в клинической картине, но и в молекулярном патогенезе. Пролиферация и

дифференцировка клеток контролируются протоонкогенами и генами-супрессорами [10].

Значительный опыт в изучении патогенеза развития рака мочевого пузыря не дает доказательств общности предшественника для поверхностного и инвазивного типов РМП [175]. Анализ работ, посвященных изучению рака мочевого пузыря показывает существование многих типов субпопуляции стволовых клеток опухоли, которые могут дать начало субклонам опухолевых клеток [132].

Две независимые исследовательские группы сумели выделить и дать характеристику стволовым клеткам рака мочевого пузыря, сходным с базальными уротелиальными клетками по профилю экспрессии CK5, CK17, CD44, а также цепей ламинина [47, 144]. Учитывая теорию моноклонального происхождения, отметим, что потомки одной трансформированной клетки в ходе процесса пролиферации могут распространиться в уротелии и дать начало как рецидивным, так и множественным опухолям.

Известна теория олигоклонального происхождения РМП, согласно которой возможно развитие мультифокальных и рецидивных опухолей через наличие в слизистой мочевого т.н.«полей канцеризации» [11, 63, 78]. Данные поля представляют собой феномен, который свойственен исключительно эпителиальным опухолям. Наличие полей канцеризации обусловлено барьерной (защитной) функцией клеток эпителия. Влияние экологически вредных веществ, включая канцерогены, на пласт клеток эпителия предполагает, что имеет место наличие защитной функции, заключающейся в способности эпителиальной клетки к саморегенерации, что влечет аномальную пролиферацию и появление сначала гиперпластических, а потом диспластических процессов. Совокупность означенных патологических процессов вместе с генетическими повреждениями приводит к изменению клеток и зарождению их злокачественных клонов [11, 63].

Среди научного сообщества продолжаются дискуссии относительно моноклонального или олигоклонального происхождения мультифокального уротелиального рака. Также существуют теории патогенеза развития

множественных и рецидивных опухолей РМП: по моноклональному пути посредством интралюминального расселения опухолевых клеток и по олигоклональному посредством полей канцеризации [116, 139].

Вне зависимости от формы рака прогрессирующий рост опухоли сопряжен с нарастанием сдвигов клеточно-опосредованного и гуморального иммунитета с превалированием иммунодепрессивных механизмов. Многие исследователи выделяют три фазы взаимоотношений опухоли и иммунной системы: иммунологического надзора, равновесия и ускользания. Каждая из них характеризуется определенными иммунологическими сдвигами и в большинстве случаев коррелирует со стадией заболевания [112, 177].

Появление единичных опухолевых клеток, которые распознаются и элиминируются компонентами врожденного и адаптивного иммунитета – характерно для фазы иммунологического надзора. Иммунокомплементные клетки, участвующие в элиминации опухолевого роста в фазе иммунологического надзора - натуральные киллеры (NK), натуральные киллеры с Т-клеточным рецептором (NKT), гамма-дельта-Т-клетки ($\gamma\delta$ -Т), макрофаги и гранулоциты. NK-клетки играют ключевую роль в неспецифической элиминации опухолевых клеток. Регуляция их функций осуществляется за счет цитокинов (IL-2, IL-15), ко-стимулирующих молекул (CD40, CD70, CD80, CD86, ICOS), ингибирующих и активирующих рецепторов. Ингибирующие рецепторы предотвращают аутоагрессию натуральных киллеров. Наибольшее значение среди них имеют иммуноглобулиноподобный рецептор (KIR) и лектиноподобный рецептор (CD94). Активирующие рецепторы (NKP30, NKP44, NKP46, NKP80), наряду с продукцией IFN- γ и перфоринов, реализуют эффекторные функции натуральных киллеров [78]. NKT-клетки представляют собой высокоспециализированный тип клеток, несущих одновременно альфа-цепь Т-клеточного рецептора и рецепторы натуральных киллеров (CD161, NKR-P1). Функции их сходны с таковыми у натуральных киллеров. Однако, в отличие от последних, они экспрессируют цитокины, свойственные Т-хелперам 1-го и 2-го типов, и для реализации эффекторных функций требуют присутствия GM-CSF и IL-12 [78].

Опухолевый рост характеризуется несколькими фазами: фаза равновесия – это интенсивный рост опухоли с активацией процессов ангиогенеза; фаза ускользания – иммуносупрессия со сдвигом цитокиновой регуляции и дисбалансом иммунокомпетентных клеток (эффекторных и супрессорных), с развитием молекулярного дефекта на этапах распознавания и презентации антигена, а также трансдукции сигнала внутрь клетки [6, 18, 110].

В фазе ускользания отмечается увеличение доли незрелых дендритных клеток и супрессорных Т-регуляторов в общей популяции. Зрелые дендритные клетки экспрессируют на своей поверхности CD40, CD80, CD83, CD86 и характеризуются высоким уровнем продукции. Под действием VEGF, IL-6, TGF- β , 10, COX-2, PGE2, ганглиозидов, находящихся в микроокружении опухоли, блокируются дифференцировка и созревание дендритных клеток, что делает невозможным формирование адекватного иммунного ответа [6]. Регуляторные Т-клетки относятся к системе адаптивного иммунитета и созревают из незрелых Т-клеток. Они подавляют иммунный ответ путем регуляции функций эффекторных клеток. В настоящее время выделяют 3 типа регуляторных клеток: CD4⁺CD25⁺+Treg, Tr3, Tr1 [6, 156].

Таким образом, сам процесс канцерогенеза при раке мочевого пузыря является уникальным, многокомпонентным, малоизученным механизмом, обуславливающим особенности развития, возможность рецидивирования опухолевого роста [6, 31, 63, 78].

Основными факторами высокой частоты рецидива и прогрессирования РМП являются: наличие тяжелых дисплазий и *carcinoma in situ*, пропущенные опухоли при трансуретральной резекции. По данным статистики, после первичного вмешательства (ТУР) при обследовании пациентов через 2-6 недель, в 38%-63% случаев обнаруживаются остаточные опухоли (при повторных резекциях). В случае обнаружения при первичной резекции только солидной папиллярной опухоли - в 25% случаев выявляются другие злокачественные образования при повторных резекциях. Логичным является утверждение, что рак

мочевого пузыря – это заболевание всей слизистой оболочки [65-67, 92, 94, 102, 108, 152].

При длительном наблюдении больных, прооперированных по поводу МНРМП - после трансуретральной резекции, наиболее частой проблемой является рецидив опухоли и ее прогрессирование, что влечет за собой инвазию опухолевого роста и переход ее из поверхностной в глубокую с последующим метастазированием [10, 60, 117, 166, 167]. При папиллярной форме переходноклеточного рака частота рецидивов составляет до 60-85%, а прогрессирование - до 20%; при раке *in situ* – до 30%. Причиной этого являются наличие очагов рака *in situ*, пропущенных при первой ТУР, возможность имплантации клеток при первой операции, и не устраненные этиологические факторы [47, 141-143].

Безусловно, специфика роста опухоли серьезно зависит от уровня дифференцировки самих опухолевых клеток. Так, высокая степень дифференцировки характеризуется папиллярным (экзофитным) ростом, низкая дифференцировка – инфильтрирующим (эндофитным) ростом без наличия папиллярного компонента. При этом риск прогрессии развития инвазии не высок, хотя возможность инфильтративного роста при опухолях T1G3, которые составляют 10% поверхностных опухолей, возрастает до 50% [127].

Зрелость и стадия опухоли детерминируют прогноз заболевания и клиническое течение, определяя и выбор методов лечения. Мышечно-неинвазивные опухоли обычно неплохо дифференцируются по уровню клеточной анаплазии (G) [44, 81]. Высокодифференцированный переходноклеточный рак (G1) имеет высокую степень клинического излечения, которая достигается в 80% случаев. Вероятно, молекулярно-генетические нарушения обуславливают наличие рецидивов переходноклеточных видов рака G1 [34, 35].

Самые значимые факторы, которые определяют вероятность рецидивов и прогресса заболевания при наличии мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, это размер опухоли, количество, категория T, частота рецидивов в анамнезе, наличие/отсутствие сопутствующего рака *in situ* (CIS), а также степень злокачественности выявленной опухоли [19, 51, 94, 108, 118].

Как правило, после проведенных операций (обычно в течение двух лет) у 50% пациентов, больных раком, развивается рецидив заболевания. Рецидив заключается в образовании опухолей в малом тазе (15-20%), характеризуется метастазами в регионарных лимфатических узлах (10-15% случаев), а также появлением отдаленных метастазов. Высоким является риск прогресса опухолевого процесса в уретре (5-13% случаев) и более низким — в верхних мочевых путях (1-3%).

После проведения радикальной цистэктомии возможность прогрессирования процесса появления опухолей соотносится со стадией болезни. К примеру, частота местных рецидивов после проведения цистэктомии — это 6% при стадии T2a, 18% — при T2b и 51% — при T3. Пятилетняя выживаемость после проведенной цистэктомии — порядка 40-60% больных. Среди независимых факторов, которые также влияют на прогноз, можно назвать стадию T и регионарные метастазы [47, 105, 108, 109, 117, 140].

Риск рецидива опухоли в верхних отделах мочевыделительной системы зависит от стадии и степени исходной опухоли и ее ответа на БЦЖ. У пациентов с рецидивирующими опухолями высокой степени злокачественности данный риск составляет около 20%, в связи, с этим существует необходимость регулярного тщательного обследования [84-88].

Учитывая особенности рецидивирующего течения рака мочевого пузыря, связанного как с особенностями патогенеза, так и нерадикальностью современных методов лечения МНРМП, исследование путей и закономерностей рецидивирования является актуальной проблемой и требует дальнейшего изучения.

1.3 Современные методы прогнозирования клинического течения рака мочевого пузыря

На сегодняшний день актуальными являются разработка и внедрение новых малоинвазивных и лабораторных методов диагностики (иммуногистохимические,

иммуноферментные и молекулярно-биологические), поскольку существующие диагностические алгоритмы и методики расчета прогноза вероятности прогрессирования и рецидива РМП не вполне эффективны. Современные возможности новых технологий и методик исследования опухолевых маркеров на клеточном и молекулярно-генетическом уровнях, лишь подкрепляют развитие научного интереса в этом направлении [1, 5, 31, 61, 67, 79, 99].

Опухолевые маркеры классифицируются на несколько групп. Исходя из задач исследования маркеры РМП можно разделить на используемые в первичной диагностике, а также маркеры для прогноза рецидива, прогрессии и метастазирования. По виду исследуемого материала маркеры можно отнести к уринарным, сывороточным и тканевым [1, 7, 18, 55, 80, 107].

Наибольший клинический интерес представляет исследование уринарных маркеров, поскольку исследование мочи – это неинвазивная методика, позволяющая получить достаточное количество материала. По мере понимания патогенетических процессов в «поломке» системы функционирования опухолевой клетки, большую важность приобрела классификация опухолевых маркеров по их биологической роли [14, 15, 25, 55, 58, 69, 108, 118].

В нашей стране наиболее широкое распространение и доступность к использованию в клинической практике получили тест-системы: антиген рака UBC, ВТА, NMP-22, CYFRA 21-1, SCC, ImmunoCyt [7, 32, 47, 80, 104, 159].

Много работ посвящено анализу результатов применения биологических маркеров РМП в экспериментальных и клинических исследованиях, описаны этапы цитогенетических нарушений в клетке, показан уровень экспрессии онкогенов, генов опухолевой супрессии, факторов роста (FGF, FGFR, VEGF) [18, 54, 58, 62, 134, 138, 151, 160, 162].

Наиболее изученными маркерами являются p53, Ki-67, затем больший интерес привлекли - pRb, p21, mdm2. Развитие молекулярной биологии открывает новые возможности для первичной и уточняющей диагностики РМП, динамического наблюдения [8, 97, 100, 122, 123, 128, 145, 147, 154, 171].

Современным и довольно распространенным автоматизированным методом диагностики опухолей в настоящее время является проточная цитофлуорометрия (цитометрия) [47, 49, 101, 115]. Плюсом данной методики является возможность сопоставить показатели, имеющие прямое отношение к агрессивности опухолевого роста (тип плоидности опухоли и степень пролиферативных процессов) с другими клиничко-морфологическими критериями прогноза и взаимно дополнить их. Это дает возможность, в совокупности с клиническими параметрами, высказать предположение о прогностической значимости показателей плоидности и пролиферативной активности клеток злокачественных новообразований [115].

В исследовании Frank I. et al. показано, что при поверхностном раке мочевого пузыря, при опухолях T_a-T₁ выраженная экспрессия p53 и p16, что повышает риск развития рецидива в 15,5 раза [46, 47]. При изучении процессов пролиферации и апоптоза группой ученых было установлено, что индекс апоптоза имеет связь со степенью дифференцировки опухоли. Снижение степени дифференцировки и повышение частоты локальных рецидивов при поверхностном раке связаны с гиперэкспрессией p53 и Ki-67 [100, 123, 145, 171]. В целом мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря представляет порядка 80% всех случаев и характеризуется относительно благоприятным прогнозом и тенденцией к локальным рецидивам [51]. Гистологическая оценка опухоли, в том числе и с помощью иммуногистохимических методов, позволяет определить не только факт наличия опухоли, но и вероятность рецидива.

Прогностическим фактором для пациентов, имеющих МНРМП, особенно если он характеризуется отсутствием метастазов в лимфатических узлах (T₁-2bN₀), можно назвать ядерную иммунореактивность p53. Хотя стандартная химиотерапия применяется ограниченно, больные РМП, которые являются носителями скрытых мутаций в гене белка p53, довольно чувствительны к адьювантной терапии, включающей ДНК-повреждающие агенты, к примеру, цисплатин. Вероятно, ситуация объясняется повреждением ДНК в клетках уротелия с мутациями в гене белка p53, вследствие чего разобщаются

синтетическая и митотическая фазы клеточного цикла, что влечет апоптоз [100, 123, 128].

При наличии мышечно-инвазивного рака имеется прямая связь между уровнем экспрессии p53 разной степени, стадией развития опухолевого процесса и метастазами, тяготением опухоли к прогрессу [46, 110]. Подтверждено, что коэкспрессия bcl-2 и p53 находится в связи со слабым результатом лучевой терапии [100, 128, 137]. Безрецидивная средняя выживаемость больных, имеющих p53-позитивные опухоли, составляет 30 месяцев, больных, имеющих p53-негативные опухоли — 82 месяца [27]. Хотя имеет место повышение экспрессии p53, связанное с плохим прогнозом, некоторые исследования подтверждают, что мутантный ген p53 не является самостоятельным прогностическим фактором, поскольку определяющая роль принадлежит стадии процесса. Другими словами, требуется выявление уровня экспрессии самых значимых клинических маркеров (p53, p16, EGFR), а также учет данных эндоскопических и лучевых методов исследования [100, 147, 161, 171].

P21 — это продукт экспрессии гена *waf1/cip1*, формирование которого индуцирует P53. При этом P21 и p27 — это циклин-зависимые ингибиторы перехода клетки из G1-фазы в S-фазу клеточного цикла. Степень экспрессии p21 — независимый предиктор выживаемости и рецидивирования. Больные с дефектом p53, а также отсутствием p21 характеризуются более высокой степенью риска ранних рецидивов с негативным прогнозом, отличаясь этим от больных с монодефектом p21 [100].

Белок p27 тоже несет функции ингибитора перехода клеток из G1-фазы в S-фазу. Японские исследователи указывают, что повышение уровня p27 представляет собой неблагоприятный прогностический фактор прогрессирования опухоли, в том числе и в отношении рака мочевого пузыря. Обследовано 145 пациентов с поверхностным раком мочевого пузыря, с помощью иммуногистохимического метода проведен корреляционный анализ уровней p27, циклина E и Ki-67. Так, при сниженной концентрации p27 выявлена прямая

корреляционная связь с циклином E – достоверно концентрация также была низкой. Аналогичные результаты получены для p16 [46]

Мутация в гене p53 с превращением его из индуктора в ингибитор апоптоза определяет онкогенную трансформацию клетки [100]. Неблагоприятный прогноз при мутациях TP53 связан с меньшей эффективностью проводимой терапии для данного конкретного пациента [128, 145, 158, 171]. При возникновении мутаций в гене p53 происходит накопление этого белка в клеточном ядре и превращение его из белка-активатора в белок-ингибитор апоптоза [46].

В S и G2 фазах клеточного цикла вырабатывается белок Ki67, который достигает пика во время митотического деления и затем деградирует. Ассоциация высокого уровня Ki-67 отмечена с низкой дифференцировкой опухоли, инвазией в мышечную оболочку и с метастазами в лимфатические узлы. Экспрессия Ki-67 характеризует с одной стороны меру интенсивности клеточного роста и с другой - агрессивность опухоли. При мышечно-инвазивном раке высокий риск образования регионарных и отдаленных метастазов, быстрое прогрессирование опухоли, высокий риск раннего рецидивирования – ассоциированы с гиперэкспрессией Ki-67. Также, доказана прогностическая роль p27 и Ki-67, которая ассоциирована с неблагоприятным прогнозом течения РМП, при условии одновременного нарушения экспрессии этих двух маркеров. Показана обратно пропорциональная связь между уровнем циклина E и Ki-67, а именно: низкая концентрация циклина E и высокая концентрация Ki-67 ассоциированы с меньшей выживаемостью. Доказана роль циклина E и Ki-67, которые являются независимыми предикторами неблагоприятного прогноза поверхностного рака мочевого пузыря [46].

В биоптатах опухолевой ткани пациентов с МНРМП отмечается статистически достоверное повышение маркеров p53, Ki67 и снижение CD95, VAX, E-кадгерина, β -катенина по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о снижении активности апоптоза, повышении пролиферации и снижении адгезивных свойств уротелия [61, 62].

Семейство белков bcl-2, состоящее более чем из двух десятков протеинов: bcl-2, mcl-1, Bcl-X, BAX, Bad, BAK и другие – относятся к факторам, регулирующим апоптоз [100, 128, 137]. Апоптотическими маркерами, контролирующим локализацию цитохрома С и уровень экспрессии каспаз, являются Bcl-2, каспаза-3 и p53 [100, 128]. Отмечена корреляция гиперэкспрессии Bcl-2 с неблагоприятным прогнозом у пациентов, прошедших курсы радиотерапии или одновременно химио- и радиотерапии. Иммунореактивность Bcl-2 связана со снижением выживаемости при T1G3 и в сочетании с p53 может быть фактором неблагоприятного прогноза при МНРМП. Независимым показателем благоприятного прогноза при МНРМП является BAX. Пониженная экспрессия каспазы-3 ассоциируется с повышенной вероятностью рецидива у больных после цистэктомии [100, 128, 137].

Многие исследования посвящены изучению вырабатываемых межклеточным веществом маркеров. Матриксные металлопротеиназы (ММП) способны разрушать и повышать проницаемость клеточного матрикса через расщепление его элементов - протеогликанов, коллагенов, эластина, фибронектина, ламининов. Опухолевыми клетками выделяются металлопротеиназы, расщепляющие элементы клеточного матрикса, обеспечивая таким образом его проницаемость при метастазировании рака или инвазиях [25, 118, 125, 168].

Сегодня выделяется 4 группы металлопротеиназ: 1. К первой группе относят специфические коллагеназы: ММП-1, ММП-8, ММП-13; 2. Вторую группу составляют желатиназы: ММП-2 и ММП-9; 3. Третья группа включает стромелизины: ММП-3, ММП-10, ММП11; 4. И, наконец, в четвертую входят металлопротеиназы мембранного типа - ММП-14, ММП-15, ММП-16, ММП-17 [25].

Все ММП имеют соответствующие характерные ингибиторы — тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМР). Информация и клинические данные по клиническому значению и экспрессии ММП и их ингибиторов при изучении РМП противоречивы и немногочисленны.

В первичных уротелиальных карциномах разной степени и стадии при наличии положительной экспрессии MMP-2 пятилетняя выживаемость больных ниже, чем у больных с отрицательной экспрессией (соответственно 53% и 77,5%); Десятилетняя выживаемость без наличия рецидивов — соответственно 32% и 68%.

Выявляется корреляция со стадией опухолевого процесса, однако не выявлено связи с дифференцировкой опухоли [25]. Другие исследования устанавливают связь экспрессии MMP-2 и MMP-9 как со стадией, так и со степенью дифференцировки, тем не менее отмечая, что их роль в метастатическом потенциале опухолей требует дальнейшего изучения [168]. В ряде случаев показано изучение уровня металлопротеиназ в моче. При наличии рака мочевого пузыря уровень MMP-2 и MMP-9 повышался в сравнении с контрольной группой [118]. При наличии инвазивного РМП в значительной степени увеличивался уровень MMP-2 и MMP-9 по сравнению не только с контрольной группой, но и при наличии поверхностного рака. При низкодифференцированном РМП выявлено существенное увеличение в моче уровня MMP-2 и MMP-9 сравнительно с контрольной группой. Полученный результат говорит о том, что активность опухолевого процесса МП напрямую воздействует на повышение в моче концентрации MMP-2 и MMP-9 [125].

Bryan R.T. et al.. был изучен уровень еще особого протеина, который значительно повышается при поражении мочевого пузыря онкопроцессом. Белок ЕрСAM служит специфическим биологическим индикатором наличия опухолевого образования. Причем учеными была установлена прямая зависимость между степенью злокачественности онкопроцесса и уровнем этого протеина: самые высокие показатели белка ЕрСAM в моче считаются однозначным доказательством присутствия агрессивной формы карциномы мочевого пузыря. ЕрСAM мочи является сильным показателем выживаемости при раке мочевого пузыря [111].

Другим, наиболее изученным биомаркером РМП является представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста – EGFR (WII HER1). EGFR

экспрессируется на поверхности как нормальных, так и трансформированных эпителиальных клеток и участвует в регуляции клеточного роста и дифференцировки. В роли лигандов выступают ростовые факторы EGF и TGF- α , которые регулируют активность рецептора эпидермального фактора роста. На этапе взаимодействия с факторами роста существует возможность гетеродимеризации EGFR с рецептором Her2/neu. Избыточная экспрессия этого белка на мембране клетки возникает в результате амплификации гена, кодирующего синтез белка HER-2/neu. Это сопровождается резким снижением интенсивности апоптоза, усилением пролиферации клеток, снижением эффективности химиотерапии [160, 161].

Есть данные об отсутствии связи экспрессия HER-2/neu с прогнозом рака мочевого пузыря [46]. Однако во многих современных исследованиях отмечено, что коэкспрессия HER-2/neu и белка p53 встречалась в опухолях с метастазами и была связана со снижением безрецидивной выживаемости, а в низкодифференцированных опухолях гиперэкспрессия HER-2/neu наблюдается в большинстве случаев. В исследовании по изучению семейства ростовых факторов в нормальной эпителии мочевыводящих путей и инвазивном раке с метастазами и без метастазов было выявлено увеличение экспрессии HER-2/neu в малигнизированном уротелии по сравнению с нормой, в то время как экспрессия *serb-B4* снижалась по мере нарастания малигнизации [46].

В некоторых работах есть данные о важности определения HER-2/neu — статуса рака мочевого пузыря для планирования химиотерапии герцептином, однако имеет значение наличие амплификации этого гена, а не только гиперэкспрессия белка, что в совокупности может быть показанием к применению этого препарата.

В карциномах различных локализаций обнаруживается избыточная экспрессия EGFR, что может являться причиной повышенной пролиферативной активности опухолевых клеток [160]. Гиперэкспрессия EGFR выявляется, как правило, в новообразованиях поздних стадий с наличием метастазов и коррелирует с плохим прогнозом. Значение EGFR для карцином мочевого пузыря

изучено мало. Данные, имеющиеся в литературе, весьма противоречивы, хотя показано, что изучение ростовых факторов целесообразно в сочетании с другими белками — регуляторами апоптоза. Эпидермальный фактор роста является фактором пролиферации, ангиогенеза, а также обладает антиапоптотическими свойствами. Однако до сих пор нет исследований, показывающих, каким образом EGFR влияет на рост РМП. Увеличение экспрессии EGFR приводит к гиперпролиферации опухолевых клеток, индуцированию ангиогенеза и ингибированию апоптоза [161].

В исследовании Hussein было показано, что увеличение экспрессии EGFR ассоциировано с поздними стадиями рака мочевого пузыря и ранними рецидивами [137]. Однако Porove et al. в своем исследовании не выявили никакой закономерности между экспрессией EGFR и интенсивностью клеточной пролиферацией, поздней стадией заболевания и степенью дифференцировки [46]. Исследование Memon et al. Ставило перед собой задачу объяснить противоречивые результаты относительно корреляции экспрессии EGFR и неблагоприятным прогнозом развития опухоли [146]. По результатам исследования было обнаружено, что при изолированной экспрессии EGFR не было обнаружено корреляции между экспрессией и прогнозом опухоли. Однако при сочетанной гиперэкспрессии EGFR и Her3, а также Her4, была выявлена закономерность между гиперэкспрессией EGFR и более благоприятным прогнозом. При экспрессии EGFR одновременно с гипоэкспрессией Her3 и Her4 прогноз развития заболевания оказался неблагоприятным [46].

В литературе все чаще упоминаются молекулярно-генетические маркеры рака мочевого пузыря, экспрессируемые клетками базальной мембраны слизистой оболочки органа [10, 44, 80, 81, 95]. Нормальная слизистая оболочка мочевого пузыря представлена переходно-клеточным эпителием толщиной в 3-7 клеточных рядов, которые организованы по степени дифференцировки.

Базальный слой находится на базальной мембране собственной пластинки слизистой. Он покрыт слоями промежуточных клеток, в то время как неинвазивный слой составляют плоские «зонтичные» клетки. Степень клеточной

дифференцировки возрастает при удалении от базальной мембраны, вместе с тем меняется профиль экспрессии клеточных рецепторов, цитокератинови цепей ламинина. Базальные клетки в норме экспрессируют цитокератины СК5 и СК17, β -интегрины, составные цепи молекулы ламинина и гиалуроновую кислоту (CD44). Базальные клетки делятся, составляя таким образом самоподдерживающуюся популяцию. Промежуточные клетки теряют способность экспрессировать ламинины и прочие компоненты межклеточного матрикса, экспрессируя цитокератины СК5 и СК18. Пролиферативный потенциал данных клеток ограничен. Зонтичные клетки поверхностного уротелиального слоя представляют собой высоко дифференцированные клетки, неспособные к делению, однако экспрессирующие СК20 и уроплакины. Две независимые исследовательские группы сумели выделить и дать характеристику стволовым клеткам рака мочевого пузыря, сходным с базальными уротелиальными клетками по профилю экспрессии СК5, СК17, CD44, а также цепей ламинина. Большая часть изолированных клеток демонстрировала экспрессию Gli1, который является мишенью сигнального пути Hedgehog, работающего при эмбриональном развитии. Клеточная популяция опухолевых стволовых клеток РМП является достаточно гетерогенной [63, 130, 131]. То есть на сегодняшний день общепризнанным считается, что различие между инвазивным и поверхностным раком мочевого пузыря выявляется при проявлении определенного события: наличия мутаций FGFR3 или инактивации пути p53/Rb/PTEN. Тем не менее пока нет значимых достоверных свидетельств, которые определяли бы, происходят данные события в одной клетке (скорее всего — базальной), или они имеют место в разных клетках, являющихся предшественниками уротелия [58, 134, 138, 151, 162].

По данным Ю.Ю. Андреевой установлено, что в низкодифференцированных карциномах мочевого пузыря выявляется не только значительное увеличение экспрессии CD44, но и перераспределение белка из клеток в строму опухоли (коэффициент корреляции 0,39). Выявлено также

значительное увеличение стромальной экспрессии CD44 в опухолях с наличием сосудистой инвазии (61,6%) и метастазами в лимфоузлах (75%) [4, 5].

В исследовании Terada T. (2013) случая светлоклеточной аденокарциномы мочевого пузыря у женщины 73 лет на аутопсийном материале установлено, что иммуногистохимически опухолевые клетки были положительными для карциноэмбрионального антигена, CA19-9, CA125, CD10, панцитокератина (AE1 / 3, CAM5.2), цитокератина (СК) 34 β E12, СК7, СК8, СК18, СК19, ЕМА, MUC1, p53, и Ki-67. Они были отрицательными для СК5/6, СК14, СК20, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, α -метилацил-СоА-рацемазы, p63, CDX2, MUC2, MUC5AC, MUC6, CD45, CD34, виментина, нейронспецифической энтолазы, белка S100, Desmin, HMB45, AFP, α -гладкомышечного актина, MDM2, HER2/neu, синаптофизина и CD56 [122, 169].

Другая группа ученых [148] исследовали в качестве марке рака мочевого пузыря протеин LEWIS X (CD15). LEWIS X является антигеном группы крови, который обычно отсутствует в клетках уротелия у взрослых, но экспрессируется в опухолях переходных клеток независимо от статуса, степени или стадии опухоли. Диапазоны чувствительности и специфичности этого теста в различных опубликованных исследованиях составляют от 79,8 до 85% и от 80 до 86,4% соответственно. Исследования образцов барботажа мочевого пузыря продемонстрировали общую чувствительность 85% по сравнению с только 61% при цитологическом исследовании мочи. Комбинируя оба метода, чувствительность увеличивается до 93%.

Также в других источниках имеются упоминания о высокой чувствительности у пациентов с раком мочевого пузыря и множественной лимфаденопатией маркеров CD20, CD22, CD24, CD45 и HLA-DR [106, 119].

В заключение необходимо отметить, что на сегодняшний день существует множество молекулярно-генетических маркеров первичного заболевания и рецидива рака мочевого только, однако, только комплексный подход к изучению факторов прогноза поможет в выборе адекватной тактики лечения больных раком мочевого пузыря. Приведенные данные свидетельствуют о необходимости поиска

новых методов диагностики ранних форм МНРМП и маркеров прогноза, и рецидива заболевания. При этом наиболее перспективным методом на сегодняшний день является исследование осадка мочи методом проточной цитофлуометрии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Работа выполнена на кафедре онкологии и лучевой терапии с курсом ПО (заведующий кафедрой д.м.н., доцент Р.А.Зуков). Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (ректор д.м.н., профессор И.П.Артюхов), а также на базе КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» (главный врач к.м.н. А.А. Модестов).

Исследование проводилось на базе КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» (КККОД) в период 2012-2017 гг.

В соответствии с целью и задачами работы объектом исследования явились:

- *группа исследования* – пациенты с МНРМП, получавшие комбинированное лечение в КККОД (n=162);
- *группа контроля* – практически здоровые доноры (n=69), у которых отсутствие опухоли мочевого пузыря подтверждено лабораторно-инструментальными методами диагностики.

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Возраст 40-79 лет;
2. Морфологически верифицированный рак мочевого пузыря;
3. Мышечно-неинвазивные формы рака мочевого пузыря (T_a, T_{is}, T₁);
4. Отсутствие атипических клеток в моче при цитологическом исследовании;
5. Подписанное пациентом информированное добровольное согласие.

Критерии исключения пациентов из исследования:

1. Наличие тяжелой сопутствующей патологии, печеночной и почечной недостаточности;
2. Статус пациента по шкале EGOC > 2;

3. Предшествующее химио- или лучевое лечение;
4. ЗНО другой локализации;
5. Отказ пациента участвовать в исследовании.

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

В настоящей работе проводилась оценка показателей, оказывающих возможное влияние на течение рака мочевого пузыря: демографических, антропометрических, клинико-морфологических параметров [12,17,27,35,36,47,51].



Рис. 1. - Дизайн исследования

Средний возраст наблюдаемых пациентов составил $63,7 \pm 10,3$ лет, среди них мужчин – 105 (64,8%), женщин – 57 (35,2%). Половозрастное распределение больных МНРМП представлено в таблице 1. Средний возраст пациентов в группе контроля составил $58,7 \pm 8,2$ лет.

Среди наблюдаемых пациентов жителей города – 116 (71,6%), села – 46 (28,4%).

Таблица 1 - Половозрастной состав наблюдаемых больных с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря

Возрастной промежуток	Мужчины		Женщины	
	n	%	n	%
40-44	5	4,80	4	7,00
45-49	4	3,80	0	0,00
50-54	12	11,40	4	7,00
55-59	21	20,00	7	12,30
60-64	17	16,20	9	15,80
65-69	23	21,90	10	17,50
70-74	9	8,60	6	10,50
75-79	14	13,30	17	29,90
Всего	105	100,00	57	100,00

Оценка массы тела проводилась с помощью индекса массы тела (ИМТ), разработанного А. Quetelet и рассчитываемого по формуле:

$$I = \frac{m}{h^2}$$

где: m— масса тела в килограммах

h— рост в метрах, измеряется в $\text{кг}/\text{м}^2$.

Интерпретация полученных значений ИМТ проводилась в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Дефицит массы тела определялся у 1(0,6%) пациента,

47(29,1%) в пределах нормы, у 114(70,3%) отмечалось увеличение массы тела либо ожирение.

Из сопутствующей патологии у наблюдаемых больных МНРМП наиболее часто встречались заболевания сердечно-сосудистой системы – 138 (85,2%), дыхательных путей – 46 (28,4%), желудочно-кишечного тракта – 91 (56,2%), мочеполовой системы – 9 (5,6%), костно-суставной системы – 37 (22,8%), поражения других систем и органов – 43 (26,5%).

Бессимптомное течение заболевания отмечалось у 51 (31,5%) пациента. Клинические проявления у 111 (68,5%) больных МНРМП распределились следующим образом: гематурию отмечал 91(56,2%) пациент –62(38,3%) мужчины и 29(17,9%) женщин, жалобы на дизурические расстройства определялись у 71(48,3%) больного, 39(24,1%) мужчин и 32(19,7%) женщины соответственно; болезненность при акте мочеиспускания – у 46(28,4) пациентов: 31(19,1%) мужчина и 15(9,3%) женщин; жалобы на слабость, недомогание и общее нарушение самочувствия отмечалась у 13(8,0%) человек - 10(6,2%) мужчин и 3(1,8%) женщины.

Среди лабораторных изменений в анализах крови наиболее часто регистрировалось повышенная СОЭ, анемия, лейкопения (табл. 2).

Таблица 2 - Изменение лабораторных показателей крови у наблюдаемых больных

Симптом / лабораторный показатель	Количество пациентов	
	п	%
Нарушение функции печени (повышение активности АлАТ, АсАт, гипербилирубинемия)	35	21,60
Анемия	45	27,80
Эритроцитоз	45	27,80
Лейкоцитоз	29	17,90
Лейкопения	2	1,20

Продолжение таблицы 2

Повышенная СОЭ	78	48,10
Тромбоцитоз	5	3,10
Гипопротеинемия	7	4,30

Оценка скорости клубочковой фильтрации проводилась по формуле СКД-ЕРІ (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration).

Снижение скорости клубочковой фильтрации отмечалось у 110 (67,90%) пациентов: незначительное снижение определялось у 88(80%) случаев, умеренное в 22(20,00%).

По результатам общеклинического исследования мочи выявлены следующие изменения физико-химических свойств: глюкозурия отмечалась у 2 (1,9%) мужчин, женщин с глюкозурией не отмечалось, протеинурия у 53 (50,50%) мужчин и 30 (52,60%) женщин, билирубин определялся у 1 женщины (1,8%), увеличение Р_{нмочи} определялось у 1 (0,95%) мужчины, кетонурия у 6 (5,70%) мужчин и 7 (12,30%) женщин. Реакция на скрытую кровь у мужчин: «+» – 22 (20,90%), «++» – 14 (13,30%), «+++» – 10 (9,52%), у женщин: «+» – 12 (21%), «++» – 11 (19,30%), «+++» – 12 (21,00%). Нитриты определялись у 14 (13,30%) мужчин и 7 женщин (12,30%), лейкоцитурия у 35 (33,30%) мужчин и 30 (52,60%) женщин. Понижение относительной плотности мочи у мужчин отмечалось в 7 (6,70%) случаях, у женщин - в 8 (14,00%), в тоже время повышение удельного веса мочи наблюдалось в 5 (4,80%) случаях у мужчин и в 2 (3,50%) случаях у женщин, уробилиноген был обнаружен у 1(0,95%) мужчины. У 30 (28,60%) мужчин отмечалась слабо-мутная моча и у 13 (12,40%) мутная, нормальный светло-желтый цвет мочи определялся у 61 (58,10%) мужчины, у оставшейся группы изученных цвет мочи был от желтого до геморрагического окрашивания(табл. 3).

При проведении цитологического исследования мочи атипичных клеток у всех пациентов, включенных в исследование, обнаружено не было.

При микроскопии осадка мочи на анализаторе полученные показатели представлены в таблице 3.

Увеличение числа эритроцитов определялось у 46 (43,81%) мужчин и 35 женщин (61,40%), лейкоциты увеличены у 69 (65,70%) мужчин и 43 (75,40%) женщин, увеличение количества плоского эпителия определялось у 25 мужчин (23,80%) и 22 (38,60%) женщин, цилиндрурия наблюдалась у 19 (18,00%) мужчин и 10 (17,50%) женщин, бактериурия отмечалась у 73 (69,50%) мужчин и 49 (85,90%) женщин соответственно, кристаллы в моче определялись у 15 (14,3%) мужчин, и 8 (14,00%) женщин, грибы у 18 (17,10%) и 10 (17,50%) женщин, переходный эпителий у мужчин 30 (9,52%) и у 14 (24,60%) женщин, патологические цилиндры у 23 (21,90%) мужчины и у 16 (28,00%) женщин, слизь у 24 (22,90%) мужчины и 8 (14,00%) женщин (табл. 3).

Таблица 3 - Изменения физико-химических свойствах мочи у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря

Показатель	Количество мужчин		Количество женщин	
	n (105)	%	n (57)	%
Глюкоза	2	1,80	0	0,00
Белок	53	50,50	30	52,60
Уробилиноген	1	0,95	0	0,00
Билирубин	0	0,00	1	1,80
pH-реакция	1	0,95	0	0,00
Кетоновые тела	6	5,70	7	12,30
Реакция на скрытую кровь (в «+»):				
«+»	22	20,90	12	21,00
«++»	14	13,30	11	19,30
«+++»	10	9,52	12	21,00
Нитриты	14	13,30	7	12,30
Лейкоциты	35	33,30	30	52,60
Относительная плотность	12	11,40	9	15,80
Прозрачность	62	59,10	30	52,60
Цветовой фон	44	41,90	21	36,80

Продолжение таблицы 3

Эритроциты (RBC)	66	62,90	35	61,40
Лейкоциты (WBC)	69	65,70	43	75,40
Эпителиальные клетки (EC)	25	23,80	22	38,60
Цилиндры (CAST)	19	18,00	10	17,50
Бактерии (BACT)	73	69,50	49	85,90
Кристаллы (X TAL)	15	14,30	8	140
Грибы (YLC)	18	17,10	10	17,50
Переходный эпителий (SRC)	30	28,60	14	24,60
Патологические цилиндры	23	21,90	16	28,00
Слизь (MUCUS)	24	22,90	8	14,00

Все 162 пациента были прооперированы в объеме трансуретральной резекции мочевого пузыря (ТУР). При выполнении ТУР использовалась биполярная трансуретральная резекция и вапоризация в 0,9% растворе хлорида натрия.

По локализации опухоли было следующее распределение: в верхушке мочевого пузыря образование определялось у 1 (0,95%) мужчины, по боковым стенкам - у 42 мужчин (40,00%) и 17 (29,80%) женщин, по передней стенке - у 2 (1,80%) мужчин, по задней стенке - у 25 (23,80%) мужчин и 19 (33,3%) женщин, в шейке мочевого пузыря - у 5 (4,80%) мужчин, в дне мочевого пузыря - у 3 (2,90%) мужчин и у 2 (3,50%) женщин. В остальных случаях определялся мультицентричный рост опухоли - у 27 (25,75%) мужчин и у 19 (33,30%) женщин.

По количеству опухолей в мочевом пузыре: единичные образования отмечались у 64 (60,90%) мужчин и 34 (59,60%) женщин, в остальных случаях определялось 2 и более образования.

У большинства пациентов размер образования был от 1,0 до 4,0 см (табл. 4).

В зависимости от гистологического варианта опухоли у 157 (95,70%) наблюдаемых пациентов определялся переходно-клеточный вариант опухоли, у 6 (3,70%) пациентов отмечалась плоскоклеточная метаплазия, в 1 (0,60%) случае

метаплазия по железистому типу. У 5 (3,10%) пациентов по линии среза обнаружены опухолевые клетки, что потребовало расширения области резекции.

Таблица 4 - Размеры опухоли мочевого пузыря у наблюдаемых больных с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря

Размеры опухоли, см	Количество больных	
	п	%
менее 1,0	39	24,07
1,1-2,0	42	25,93
2,1-3,0	43	26,54
3,1- 4,0	26	16,05
4,1 и более	12	7,41
Всего	162	100

По степени дифференцировки выявлены следующие показатели: высокая степень (G1) отмечалась у 42(25,9%) пациентов, умеренная (G2) у 100 (61,7%) и низкая (G3) у 20 (12,4%) пациентов.

По стадии заболевания все пациенты разделены следующим образом: Та- 48 (29,60%) пациентов, Tis- 10 (6,20%) и T1 - 104 (64,20%) пациента. В случае наличия МНРМП с низкой степень дифференцировки (G3) или участков CIS контрольный осмотр, включающий в себя цитологическое исследование клеток осадка мочи, лучевые методы диагностики и ЦС с биопсией проводился через 1 месяц.

Гладкое течение послеоперационного периода было у 157 (96,90%) больных, осложненное - у 5 (3,10%).

В послеоперационном периоде все пациенты получали внутривезикулярную химиотерапию митомицином С 40 мг внутривезикулярно, еженедельно, экспозиция 1-2 часа, курс 8 инстилляций.

После окончания комбинированного лечения за всеми пациентами осуществлялось динамическое наблюдение в течение 36 месяцев с использованием стандартных методов обследования.

В зависимости от клинического течения заболевания больные МНРМП, включенные в исследование, были разделены на две группы. Первую группу составили 113 (70,40%) больных МНРМП без рецидива заболевания, вторую – 49 (29,6%) пациентов с рецидивом.

Материалом для клинического раздела настоящей работы явилась следующая документация:

- Медицинская карта стационарного больного (ф. № 003/У);
- Медицинская карта амбулаторного больного (форма № 025/У);
- Протоколы морфологического исследования операционного материала.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Определение уровня экспрессии поверхностных антигенов CD13, CD15, CD45

Для выделения клеточных элементов осадка исследуемую порцию мочи пациента центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин. После этого супернатант сливали, к осадку добавляли 2 мл PBS, проводили ресуспендирование путем пипетирования на протяжении 1-2 мин и снова центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Описанную процедуру отмывки клеточного осадка проводили дважды. Далее супернатант сливали, к осадку добавляли 0,5 мл PBS, проводили ресуспендирование путем пипетирования на протяжении 1-2 мин.

Затем проводили гипотоничный лизис эритроцитов с целью минимизации их влияния на результат анализа. Для этого к клеточной суспензии добавляли 450 мкл однократного раствора для лизиса эритроцитов BD MultitestIMK

KitLysingSolution (BectonDickinson, США) и перемешивали на персональном вортексе в течение 20 сек.

После этого полученную клеточную взвесь разливали в 2 пробирки (по 250 мкл в каждую) и осуществляли подготовку к флуоресцентному окрашиванию.

Изучение поверхностного антигенного профиля клеточных элементов осадка мочи проводили методом флуоресцентного окрашивания соответствующими антителами. Для этого брали пробирку №1. К полученной в результате выделения и отмывки клеточной взвеси добавляли моноклональные антитела к CD13, меченные фикоэритрином (PE - максимум поглощения на 565 нм, максимум флуоресценции на 578 нм, производитель BD Biosciences, США) в объеме 20 мкл. Перемешивали на персональном вортексе в течение 20 сек. Далее добавляли моноклональные антитела к CD15, меченные аллофикоцианином (APC - максимум поглощения на 652 нм, максимум флуоресценции на 657,5 нм, производитель BD Biosciences, США) в объеме 20 мкл. Перемешивали на персональном вортексе в течение 20 сек. После этого добавляли моноклональные антитела к CD45, меченные PE-Cy7 (конъюгат фикоэритрина и цианина-7 - максимум поглощения на 480 нм, 565 нм и 650 нм, максимум флуоресценции на 767 нм, производитель BD Biosciences, США) в объеме 20 мкл. Перемешивали на персональном вортексе в течение 20 сек и убирали в темное место. Инкубацию клеточной взвеси проводили при комнатной температуре на протяжении 15 минут.

После инкубации проводили измерение флуоресценции на проточном цитофлуорометре BD FACSCanto II (BectonDickinson, США). В каждом образце проводили анализ не менее, чем 10 000 событий. Для оценки результатов исследования использовали пакет прикладных программ для многопараметровых исследований в проточной цитометрии BD FACSDivaSoftware (BectonDickinson, США). Результат измерения выражали в долях (%) клеток, экспрессирующих изучаемый поверхностный антиген от общего количества проанализированных событий.

Для того, чтобы исключить влияние на результаты анализа уровня экспрессии антигенов CD13 и CD15 на клетках иммунной системы, в работе использовались только клетки, экспрессирующие эти антигены на своей поверхности и не экспрессирующие антиген CD45 (т.е. CD13⁺CD45⁻ и CD15⁺CD45⁻, соответственно).

2.2.2 Оценка показателей клеточного цикла

Для изучения соотношения в осадке мочи клеточных элементов, находящихся в различных фазах клеточного цикла, брали пробирку №2, полученную после выделения и отмывки, описанных выше. Изучение клеточного цикла осуществляли с использованием метода флуоресцентного окрашивания ki-67 и йодидом пропидия. К выделенным клеточным элементам из осадка мочи добавляли 3 мл 96% этилового спирта. После этого клеточную взвесь инкубировали на холоде в течении 30 минут, затем дважды отмывали в PBS. В дальнейшем проводили окрашивание моноклональными антителами к ki-67 меченными флуоресцеинизотиоционатом (ФИТЦ - максимум поглощения на 492 нм, максимум флуоресценции на 518 нм, производитель BD Biosciences, США) в объеме 20 мкл. Также добавляли йодид пропидия (фенантридин-3,8-диамино-5-[3-(диэтилметиламмоний)пропил]-6-фенил-дийодид) в концентрации 2 мг/мл (максимум поглощения на 488 нм, максимум флуоресценции на 610 нм, Sigma-Aldrich, США) в объеме 20 мкл, после чего взвесь перемешивали и инкубировали в темноте 15 минут.

Измерения флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoII (BectonDickinson, США). Для работы использовали только CD45-негативные клетки, в каждом образце проводили оценку не менее, чем 10000 событий. Точное разделение полученных данных на фазы клеточного цикла и их анализ осуществляли с помощью специализированной программы ModFit LTSoftware (BectonDickinson, США). Результат измерения выражали в долях (%) клеток, находящихся в той или иной фазе митотического цикла.

2.3 Статистические методы исследования

Для статистической обработки данных использовались компьютерные программы «Microsoft Office Excel 2013», «IBMSPSS 20.0».

Оценка нормальности распределения количественных признаков опиралась на критерий Шапиро-Уилка. Если распределение признаков находилось в нормальных границах, для описания использовалось стандартное отклонение ($M \pm \sigma$) и среднее арифметическое, сравнение проводилось при помощи параметрического метода статистики (критерий Стьюдента), перед этим проводя оценку равенства дисперсии посредством критерия Левена. Если распределение совокупностей было отлично от нормального, для описания использовались медиана и квартили Me (C_{25} - C_{75}). В данном случае для межгрупповых сравнений использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. По качественным признакам сравнение групп проводили, используя критерий χ^2 Пирсона. Уровень отвержения статистической гипотезы относительно не значимости различий между переменными взят $p < 0,05$.

Корреляционные связи между исследуемыми переменными выявлялись через применение коэффициента корреляции Пирсона (для нормально распределенных количественных переменных), а также коэффициента Спирмена (в прочих случаях).

Количественную оценку статистических связей между клинико-морфологическими факторами и фенотипическими особенностями клеток осадка проводили через расчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена оценки направленности, значимости и силы корреляционной связи. При этом направленность корреляции характеризовалась обратной и прямой связью; сила оценивалась через означенные показатели: до 0,2 - очень слабая; 0,2 до 0,49 – слабая; 0,5 - 0,69 – средняя; в интервале 0,7-0,9 – высокая; свыше данных значений: 0,9 – как очень высокая; с допустимой значимостью $p = 0,05$.

Сила связей между категориальными переменными оценивалась через применение критериев ϕ и V Крамера, значения которого находятся в рамках от 0 до 1. Названные значения критерия V Крамера интерпретировались согласно рекомендациям Rea&Parker (табл. 5).

Для оценки показателей безрецидивной выживаемости больных МНРМП применялся метод анализа дожития больных по Каплану-Мейеру. Цензурированными при проведении означенного анализа полагались случаи дожития людей до конца трехлетнего (36-месячного) срока наблюдения в случае отсутствия признаков рецидива.

Таблица 5 - Интерпретация значений критериев ϕ и V Крамера

Значения критериев ϕ и V Крамера	Сила взаимосвязи
<0,1	Несущественная
0,1 – <0,2	Слабая
0,2 – <0,4	Средняя
0,4 – <0,6	Относительно сильная
0,6 – <0,8	Сильная
0,8 – 1,0	Очень сильная

Оценка статистической важности различий выживаемости при делении наблюдаемой группы по различным категориальным признакам опиралась на такие критерии как критерий Бреслау и лог-ранговый критерий Мантела-Кокса.

Предикторы, оказывающие значимое статистически воздействие на показатель выживаемости, определялись методом регрессионного анализа Кокса с пошаговым включением предикторных переменных.

Означенная модель Кокса – это зависимость функций риска на момент времени t представленная двумя сомножителями:

- 1) базовой функцией интенсивности, которая отражает естественный уровень рисков, не зависящий от независимых переменных;
- 2) значения функции риска, которая объясняется предикторами.

Формулу названной выше регрессионной модели Кокса можно представить, как уравнение:

$$h(t|x_1, x_2, \dots, x_p) = h_0(t) \cdot e^{\beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_p x_p}$$

где $h_0(t)$ является базовой функцией интенсивности; t – исследуемым моментом времени; e – основанием натурального логарифма; x – предикторной переменной; β – коэффициентом регрессии предикторной переменной, указывающей, как в среднем трансформируется натуральный логарифм функций риска при трансформации фактора на ед. своего измерения.

Статистическая значимость полученных моделей определялась посредством критерия χ^2 Пирсона. Специфика влияния значимых переменных оценивалась по экспоненциальным коэффициентам $\text{Exp}(\beta)$, показывающим, как в среднем меняется натуральный логарифм функции риска вследствие изменения фактора на ед. своего измерения. При $\text{Exp}(\beta) < 1$ - риск понижается, при $\text{Exp}(\beta) > 1$ - возрастает.

Исход заболевания по результатам наблюдения больных раком мочевого пузыря прогнозировался посредством применения метода множественного регрессионного логистического анализа.

Откликом в моделях полагалась бинарная переменная, в которой 0 – положительный исход (отсутствие к концу срока наблюдения у больного признаков рецидива рака мочевого пузыря), 1 – негативный исход (рецидив заболевания).

Математически можно представить модель логистической регрессии как зависимость логарифма возможности прогнозируемого события (т.н. «логита») от некой линейной комбинации переменных. С учетом сказанного, шанс прогнозируемого события можно представить уравнением:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1 x_1 + \dots + b_n x_n)}},$$

где

p – шанс прогнозируемого события,

e – математическая константа 2,72,

b_0 – константа модели,

b_1 – коэффициент при предикторной переменной x_1 , который указывает на изменение логарифмических вероятностей вследствие единичного изменения независимых переменных,

n – порядковый номер включенного в данное уравнение предиктора.

Логистическая регрессионная модель строилась методом принудительного включения. Также использовался пошаговый алгоритм отбора прогностических факторов с выявлением минимума предикторов по оценке квадрата Нейджелкерка (значения коэффициент детерминации R^2 , который отражает долю воздействия всех предикторов, участвующих в модели, на дисперсию зависимой переменной).

Статистическая значимость проверялась через критерий χ^2 Пирсона. Так, если значение $p < 0,05$, модель считалась значимой.

Соответствие модели и примененных данных опиралось на критерий согласия Хосмера-Лемешева. Если $p > 0,05$, была принята гипотеза относительно ее согласованности.

Параметры логистической регрессии интерпретировались на основе величины $\exp(b)$: если коэффициент b был положителен, $\exp(b)$ больше единицы и шанс прогнозируемого события выше; если коэффициент отрицателен – шанс понижается. Для полученных значений отношения шансов (OR) были рассчитаны доверительные интервалы (ДИ), засчитанные в качестве значимых статистически, если оба полученных значения ДИ были меньше или больше 1.

Определение классификационных переменных, которые позволяли бы распределить больных раком мочевого пузыря по исходу трехлетнего наблюдения, производилось на основе дискриминантного анализа. Применялся пошаговый отбор признаков на обучающей выборке. Был получен набор правил в виде линейных классификационных и канонических дискриминантных функций. Значимость и качество означенных правил были оценены посредством сравнения результатов классификации выборки и исходной классификацией в обучающей матрице.

Гипотеза однородности ковариационных матриц сравниваемых групп опиралась на многомерный М-критерий Бокса. Уровень связей между группами наблюдения и дискриминирующей функцией оценивался с опорой на значения коэффициентов канонической корреляции (от 0 до 1). Статистический вес мощности дискриминантной функции оценивался посредством критерия Лямбда Уилкса, отражающего, насколько полно дискриминантные функции относят наблюдения к группам: от 0 (абсолютная дискриминация) до 1 (ее отсутствие).

Была произведена оценка значимости каждой дискриминантной функции, оценивалась роль, составляющих посредством сопоставления матриц общих дисперсий и ковариаций с применением F-критерия.

Для анализируемых групп вычислялись классифицирующие функции Фишера, которые представляют собой линейные комбинации дискриминантных переменных.

Линейную модель дискриминантного анализа можно представить в виде следующей формулы:

$$D_j = a_{j0} + b_{ji}x_i + \dots + b_{jp}x_p(1),$$

где:

D_j – линейная дискриминантная функция;

j – индикатор группы, $j = 1 \dots, k$, k – число групп;

x_i – дискриминантные переменные;

i – индикатор переменной, $i = 1 \dots, p$;

p – число дискриминантных переменных;

a_{j0} – константа;

b_{ji} – коэффициент i -ой дискриминантной переменной для j -ой группы.

Чтобы классифицировать единицы наблюдения, по признакам каждого наблюдаемого рассчитывались линейные дискриминантные функции с коэффициентами каждой из групп наблюдения. Прогнозируемый случай относили к группе, в которой рассчитанная дискриминантная функция приобретает самое высокое значение.

Специфичность и чувствительность полученных логистических регрессионных и дискриминантных моделей оценивалась через ROC-анализ. Количественную интерпретацию результатов означенного анализа проводили по ROC-кривым, оценивая показатель AUC (Area under ROC curve – площадь под ROC-кривой).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оценка непосредственных и отдаленных результатов комбинированного лечения у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря

162 больных МНРМП были прооперированы на базе урологического отделения КККОД в объеме ТУР мочевого пузыря. У 5 (3,1%) пациентов по линии среза обнаружены опухолевые клетки по данным срочного гистологического исследования во время операции, что потребовало расширения области резекции.

При оценке послеоперационных осложнений у пациентов с МНРМП гладкое течение послеоперационного периода отмечалось в 157 (96,9%) случаях, осложненное - в 5 (3,1%). Осложнения распределились следующим образом: цистит - у 3 (1,86%) пациентов, парацистит - у 1(0,62%), паравезикальный затек - у 1 (0,62%).

В 12 (7,4%) случаях после первичной ТУР через 5-6 недель произведена резекция *secondlook*. Повторная операция выполнялась у пациентов с низкой (G3) степенью клеточной дифференцировки, имеющих цистоскопические признаки, подозрительные в отношении нерадикальности первичного вмешательства. При плановом гистологическом исследовании в 1(0,62%) случае обнаружены опухолевые клетки. Послеоперационных осложнений после повторных ТУР не отмечалось.

В дальнейшем все пациенты получали внутрипузырную химиотерапию митомицином С 40 мг, еженедельно, экспозиция 1-2 часа, курс - 8 инстилляций. Среди нежелательных явлений: химический цистит (n=20, 12,35%), гематологические осложнения- лейкопения и тромбоцитопения I степени (n=2, 1,2%), аллергические реакции в виде кожных высыпаний (n=13, 8,00%). Лечение прекращено у 13 (8,00%) пациентов с непереносимостью препарата.

После окончания комбинированного лечения за всеми пациентами осуществлялось динамическое наблюдение в течение 36 месяцев с использованием стандартных методов обследования (анализы крови и мочи, УЗИ мочевого пузыря и почек, цистоскопия, КТ/МРТ малого таза по показаниям). В течение первого года осуществлялось ежеквартальное наблюдение, в последующие два года - 1 раз в 6 месяцев.

Общая опухолеспецифическая 3-летняя выживаемость у пациентов, включенных в исследование, составила 100%. При оценке безрецидивной выживаемости у больных МНРМП доля цензурированных случаев составила 69,8%. Среднее время безрецидивной выживаемости пациентов составило $27,50 \pm 1,07$ месяцев (ДИ 95% 25,40 - 29,60) (рис. 2).

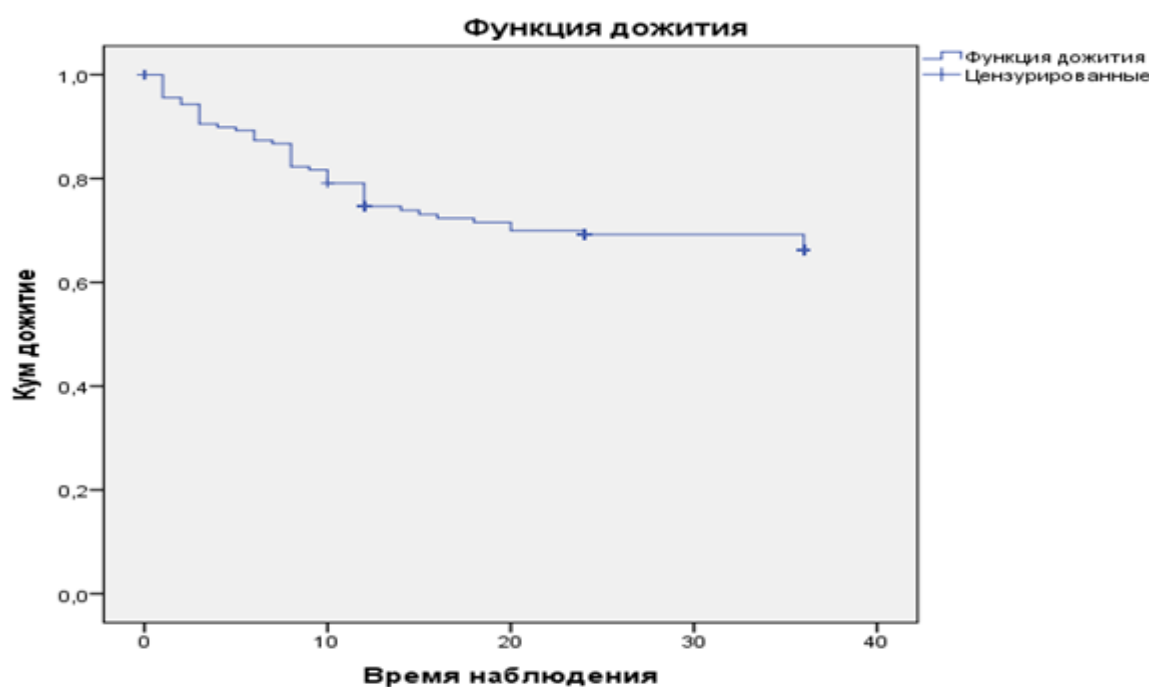


Рис. 2 - Кривая 3-летней безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения.

Среднее время до возникновения рецидива составило $10,2 \pm 0,84$ мес. Один рецидив за весь период динамического наблюдения (36 месяцев) отмечался у 44(89,8%) пациентов, два - у 3(6,12%), три - у 2(4,08%) пациентов.

При оценке сроков возникновения рецидива у пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря установлено, что в 81,60% случаев он развивается в первый год после проведенного комбинированного лечения (табл. 6).

Таблица 6 - Распределение больных МНРМП по сроку развития рецидива заболевания

Время до рецидива (мес.)	Количество пациентов, n=49(%)
от 6 до 12	40(81,60%)
от 12 до 18	4(8,20%)
от 18 до 24	3(6,10%)
от 24 до 30	1(2,05%)
от 30 до 36	1(2,05%)

Таким образом, гладкое течение послеоперационного периода отмечалось у 96,90% пациентов, осложненное – у 3,10% (цистит, парацистит, паравезикальный затек). Внутрипузырная химиотерапия выполнялась у всех наблюдаемых больных МНРМП после ТУР, у 13 пациентов (8,00%) лечение прекращено в различные сроки в связи с лекарственной непереносимостью. Показатели 3-летней общей опухолеспецифической и безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения составили 100% и 69,80% соответственно.

3.2. Особенности демографических, антропометрических, клинико-морфологических параметров у больных МНРМП в зависимости от характера течения заболевания

Проведен сравнительный анализ в двух группах пациентов с гистологически верифицированным МНРМП (1 группа – больные без рецидива МНРМП, n=113; 2 группа – больные с подтвержденным рецидивом заболевания, n=49). В сравниваемых группах соотношение мужчин и женщин было

сопоставимым: в 1 группе – 34,5% составили женщины и 65,5% – мужчины; во 2 группе – 36,7% и 63,3% ($p=0,91$; $p=0,84$ соответственно).

Средний возраст пациентов первой группы составил $63,02 \pm 1,01$ лет (для мужчин – $61,64 \pm 1,17$, для женщин – $65,64 \pm 1,85$), второй группы – $63,63 \pm 1,52$ лет (для мужчин – $63,35 \pm 2,05$, для женщин – $64,17 \pm 2,26$). Значимых различий по половозрастным критериям в исследуемых группах выявлено не было.

При оценке показателей, связанных с курением у пациентов с МНРМП, в сравниваемых группах статистически значимых различий по исследуемым параметрам не выявлено (табл. 7).

Таблица 7 - Оценка показателей курения у пациентов сравниваемых групп

Показатель	Группа 1 (n=113)	Группа 2 (n=49)	p
Курит всего человек	66 (58,40%)	27 (55,10%)	0,133
Стаж курения	$18,16 \pm 1,74$	$17,86 \pm 2,77$	0,806
Сигарет в день	$14,74 \pm 0,80$	$16,07 \pm 1,42$	0,588
Индекс пачко-лет	$14,54 \pm 17,47$	$16,17 \pm 23,36$	0,858

Примечание: p – статистическая значимость различий

По данным ВОЗ, ожирением обусловлены 44% случаев развития сахарного диабета, 23% – ИБС и 7–41% – определенных видов рака, в том числе и РМП[174].

С целью оценки физического развития пациентов, страдающих МНРМП, проводилась антропометрия с расчетом индекса массы тела. В сравниваемых группах статистически значимых различий по исследуемому параметру не выявлено (табл. 8).

Таблица 8 - Распределение пациентов по индексу массы тела

Группа	С нормальным весом (n=101)		С избыточным весом (n=61)	
	Женщины (n=27)	Мужчины (n=74)	Женщины (n=30)	Мужчины (n=31)
Группа 1 (n=113)	17 (63,00%)	53 (71,60%)	22 (73,30%)	21 (67,70%)
Группа 2 (n=49)	10 (37,00%)	21 (28,40%)	8 (26,70%)	10 (32,30%)
p	0,48	0,77	0,69	0,82

Примечание: p – статистическая значимость различий

Анализ места жительства пациентов с МНРМП показал, что проживание в городе или сельской местности не влияет на течение заболевания (табл. 9).

Таблица 9 - Распределение пациентов по месту жительства

Место жительства	Группа 1 (n=113)	Группа 2 (n=49)
Город (n=116)	81 (71,70%)	35 (71,40%)
Село (n=46)	32 (28,30%)	14 (28,60%)
p	0,989	0,981

Примечание: p – статистическая значимость различий

Анализ распределения пациентов с МНРМП по районам города Красноярск, не выявил статистически значимых различий в течении заболевания у наблюдаемых больных в зависимости от района проживания (табл. 10).

Таблица 10 - Распределение городских пациентов исследуемых групп по районам города Красноярск

Район города	Группа 1 (n=42)	Группа 2 (n=18)	p
Советский	10 (8,80%)	4 (8,20%)	0,896

Продолжение таблицы 10

Ленинский	8 (7,10%)	5 (10,20%)	0,537
Центральный	1 (0,90%)	2 (4,10%)	0,176
Кировский	7 (6,20%)	1 (2,00%)	0,282
Свердловский	6 (5,30%)	2 (4,10%)	0,752
Октябрьский	5 (4,40%)	3 (6,10%)	0,664
Железнодорожный	5 (4,40%)	1 (2,00%)	0,475

Примечание: р – статистическая значимость различий

При оценке длительности госпитализации больных с МНРМП статистически значимых различий в сравниваемых группах не обнаружено(табл. 11).

Таблица 11 - Количество дней стационарного лечения больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря

Количество дней	Группа 1 (n=113)	Группа 2 (n=49)	р
До операции	3,81±2,11	3,90±2,44	0,912
После операции	6,72±1,95	6,35±2,27	0,105
Всего дней	10,52±2,97	10,27±3,90	0,278

Примечание: р – статистическая значимость различий

Проведенный анализ сопутствующей патологии у пациентов с МНРМП, не обнаружил статистически значимых различий между целевыми группами(табл. 12).

Таблица 12 - Сопутствующая патология у больных сравниваемых групп

Наличие соматической патологии	Группа 1 (n=113)	Группа 2 (n=49)	р
Сердечнососудистая система	96 (85,00%)	42 (85,70%)	0,972

Продолжение таблицы 12

Дыхательная система	34 (30,10%)	12 (24,50%)	0,584
ЖКТ	67 (59,30%)	24 (49,00%)	0,514
Мочеполовая система	7 (6,20%)	2 (4,10%)	0,608
Костно-суставная система	27 (23,90%)	10 (20,40%)	0,699
Другое	28 (24,80%)	15 (30,60%)	0,560

Примечание: р – статистическая значимость различий

Изучение клинической симптоматики у пациентов с МНРМП при поступлении в стационар, показало, что у пациентов 2 группы гематурия встречалась в 2,2 раза чаще ($p < 0,05$), чем у больных без рецидива заболевания. При этом дизурия, болевой синдром и другие клинические проявления заболевания не имели статистически значимых различий в сравниваемых группах (табл. 13).

Таблица 13 - Симптомы при поступлении у больных сравниваемых групп

Симптомы	Группа 1 (n=113)	Группа 2 (n=49)	р
Гематурия	35 (30,60%)	33 (67,30%)	0,016*
Дизурия	48 (42,50%)	16 (32,70%)	0,432
Болевой синдром	32 (28,30%)	14 (28,60%)	0,980
Другое	7 (6,20%)	6 (12,20%)	0,235

Примечание: р – статистическая значимость различий

При оценке демографических, антропометрических показателей, а также параметров социального статуса у пациентов сравниваемых групп статистически значимых различий не выявлено.

Исследование показателя СКФ в исследуемых группах больных не установило статистически значимых различий (табл. 14).

Таблица 14 - Анализ скорости клубочковой фильтрации у пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря

Группа	Скорость клубочковой фильтрации	
	Me	C ₂₅ – C ₇₅
Группа 1 (n=113)	79,19	68,50 - 92,00
Группа 2 (n=49)	80,71	67,00 - 92,50
p	0,870	-

Примечание: p – статистическая значимость различий

При сравнительном анализе показателей общего анализа мочи у больных с МНРМП, статистически значимых различий в исследуемых группах выявлено не было (табл. 15).

Таблица 15 - Показатели общего анализа мочи у пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря

Показатель	Группа 1 (n=113)		Группа 2 (n=49)		p
	Me	C ₂₅ – C ₇₅	Me	C ₂₅ – C ₇₅	
Белок	38,98	0,00 - 50,00	28,57	0,00 - 30,00	0,212
pH	5,55	5,00 - 6,00	5,74	5,50 - 6,00	0,055
Относительная плотность	1025,92	1012,00 - 1021,00	1015,02	1012,00 - 1018,50	0,006
Скрытая кровь	1,31	1,00 - 3,00	1,27	1,00 – 2,500	0,827
Лейкоциты	94,91	0,00 - 75,00	112,76	0,00 - 250,00	0,613
L	354,40	6,20 - 180,95	261,60	5,45 - 141,60	0,632
Eg	653,50	5,95 - 139,00	1323,50	4,10 - 137,90	0,765
Эпителий плоский	6,30	1,10 - 6,60	8,44	1,10 - 7,80	0,437
Эпителий переходный.	4,26	0,30 - 4,05	6,48	0,50 - 5,00	0,557

Продолжение таблицы 15

Цилиндры	2,74	0,12 - 2,13	0,76	0,06 - 0,90	0,261
Патологические цилиндры	1,11	0,00 - 0,77	117,17	0,00 - 0,38	0,541
Бактерии	5216,00	11,60 - 427,20	2045,90	13,00 - 1387,90	0,806
Кристаллы	1,31	0,00 - 0,20	1,03	0,00 - 0,20	0,902
Слизь	5,41	0,38 - 4,95	6,26	0,12 - 3,72	0,265

Примечание: p – статистическая значимость различий

Анализ показателей клинического анализа крови у больных с МНРМП, обнаружил повышение содержания базофилов ($0,64 \pm 0,37$) у пациентов с рецидивирующим течением заболевания, в сравнении с группой без рецидива ($p < 0,05$) (табл. 16). Выявленные изменения у пациентов 2-ой группы могут быть обусловлены особенностями лечения, рецидивирующего МНРМП.

Таблица 16 - Показатели клинического анализа крови у пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря

Показатель	Группа 1 (n=113)		Группа 2 (n=49)		p
	Me	C ₂₅ – C ₇₅	Me	C ₂₅ – C ₇₅	
Лейкоциты	7,22	5,72 - 8,49	7,27	5,51 - 8,39	0,850
Эритроциты	4,68	4,40 - 5,04	4,66	4,19 - 5,07	0,873
Гемоглобин	137,47	127,0 - 151,5	136,80	128,5 - 152,0	0,730
Гематокрит	41,04	37,90 - 44,25	42,95	38,45 - 44,60	0,841
Тромбоциты	252,34	202,0 - 289,0	230,90	197,5 - 262,5	0,294
Нейтрофилы	56,93	51,25 - 63,70	59,81	52,90 - 66,30	0,166
Лимфоциты	30,85	24,65 - 35,20	27,87	24,10 - 32,65	0,081
Моноциты	8,76	7,30 - 10,10	8,85	7,60 - 10,15	0,969
Эозинофилы	2,87	1,45 - 3,85	2,62	1,40 - 3,25	0,568

Продолжение таблицы 16

Базофилы	0,56	0,30 - 0,70	0,64	0,40 - 0,90	0,044*
----------	------	-------------	------	-------------	---------------

Примечание: p – статистическая значимость различий

При анализе основных биохимических показателей крови статистически значимых различий в исследуемых группах выявлено не было (табл. 17).

Таблица 17 - Показатели биохимического анализа крови в сравниваемых группах

Показатель	Группа 1 (n=113)		Группа 2 (n=49)		p
	Me	C ₂₅ – C ₇₅	Me	C ₂₅ – C ₇₅	
Общий белок	74,18	71,30 – 77,80	74,25	71,30 – 77,20	0,977
Мочевина	6,56	4,45 – 7,10	5,64	4,20 – 6,55	0,369
Креатинин	85,36	71,00 - 97,0	82,71	68,00 - 94,00	0,569
Общий билирубин	15,08	9,00 - 16,95	12,17	9,75 - 14,70	0,457
Глюкоза	6,14	5,06 - 6,51	5,92	5,08 - 6,18	0,632
АСТ	23,17	15,45 - 23,25	20,96	15,40 - 22,35	0,282
АЛТ	22,92	13,05 - 26,20	20,03	11,95 - 21,95	0,207
Щелочная фосфатаза	81,12	67,50 - 93,50	84,57	72,00 - 99,50	0,274
Кальций	2,43	2,36 - 2,52	2,45	2,36 - 2,54	0,743
Калий	4,42	4,26 - 4,61	4,39	4,22 - 4,63	0,845
Натрий	142,92	142,0 - 144,0	142,78	141,0 – 144,5	0,890
Хлориды	104,68	103,0 - 106,5	104,73	102,5 – 107,0	0,787

Примечание: p - статистическая значимость различий

Анализ параметров коагулограммы показал отсутствие статистически значимых различий у пациентов с МНРМП в исследуемых группах (табл. 18).

Таблица 18 - Показатели коагулограммы у больных сравниваемых групп

Показатель	Группа 1 (n=113)		Группа 2 (n=49)		p
	Me	C ₂₅ – C ₇₅	Me	C ₂₅ – C ₇₅	
ПТВ	13,40	12,90 - 13,70	13,16	12,60 - 13,40	0,055
ПТИ	97,51	90,50 - 103,0	99,51	96,50 - 102,0	0,411
МНО	1,03	0,98 - 1,06	1,01	0,98 - 1,03	0,284
Фибриноген	4,22	3,48 - 4,81	4,44	3,55 – 4,98	0,401
АЧТВ	31,13	29,20 - 33,00	30,40	28,30 - 33,25	0,242

Примечание: p – статистическая значимость различий между группами

Результаты проведенного анализа свидетельствуют, что большинство рутинных общеклинических исследований у больных МНРМП не обладают достаточной специфичностью и чувствительностью в отношении прогноза развития рецидива заболевания.

При анализе размеров опухоли у пациентов с МНРМП, выявлено, что размер опухоли 0,5-1 см в 2,2 раза ($p < 0,05$) чаще регистрировался у пациентов 2-ой группы, в сравнении с 1-ой группой больных (табл. 19).

При этом размеры опухоли более 1,0 см не имели статистически значимых различий в сравниваемых группах (табл. 19).

Таблица 19 - Размер опухоли у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря

Размер опухоли	Группа 1 (n=113)	Группа 2 (n=49)	p
0,5-1 см	20 (17,70%)	19 (38,80%)	0,029*
до 2 см	31 (27,40%)	11 (22,40%)	0,607
до 3 см	33 (29,20%)	10 (20,40%)	0,368
до 4 см	21 (18,60%)	5 (10,20%)	0,249
Более 4 см	8 (7,10%)	4 (8,20%)	0,823

Примечание: p – статистическая значимость различий

Изучение количества опухолей у пациентов с МНРМП установило, что одно образование чаще регистрировалось у пациентов без рецидива заболевания в сравнении с рецидивирующим течением ($p < 0,05$). В свою очередь, мультицентричный рост опухоли в 3,1 раза ($p < 0,01$) чаще регистрировались у пациентов во 2-ой группе (табл. 20).

Таблица 20 - Количество опухолей у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря

Количество опухолей	Группа 1 (n=113)	Группа 2 (n=49)	p
Одна	82 (72,60%)	16 (32,70%)	0,012*
Две	6 (5,30%)	4 (8,20%)	0,517
Три	5 (4,40%)	2 (4,10%)	0,925
Множественные	20 (17,70%)	27 (55,10%)	0,0006*

Примечание: p – статистическая значимость различий

При анализе стадии заболевания у пациентов с МНРМП было выявлено значимое увеличение в 5,3 раза ($p < 0,05$) числа пациентов с CIS по сравнению с пациентами без рецидива заболевания (табл. 21).

Таблица 21 - Распределение пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря по стадиям заболевания

Стадия	Группа 1 (n=113)	Группа 2 (n=49)	p
T1	76 (67,20%)	29 (59,20%)	0,761
Ta	35 (30,10%)	13 (26,50%)	0,976
Tis (CIS)	3 (2,70%)	7 (14,30%)	0,035*

Примечание: p – статистическая значимость различий

При анализе локализации опухоли в мочевом пузыре у пациентов с МНРМП, выявлено, что опухоль боковой стенки мочевого пузыря в 2,4 ($p < 0,05$) раза чаще регистрировалась у пациентов 1-ой группы в сравнении со 2-ой

группой больных. При этом мультицентричный рост опухоли был более характерен для пациентов с рецидивирующим течением заболевания ($p < 0,05$) (табл. 22).

Таблица 22 - Локализация опухоли в мочевом пузыре у больных сравниваемых групп

Локализация	Группа 1 (n=113)	Группа 2 (n=49)	p
Задняя стенка	33 (29,20%)	11 (22,40%)	0,497
Боковая стенка	50 (44,20%)	9 (18,40%)	0,025*
Верхушка	1 (0,90%)	0	-
Дно	2 (1,80%)	3 (6,10%)	0,157
Шейка	2 (1,80%)	3 (6,10%)	0,157
Передняя стенка	2 (1,80%)	0	-
Множественные опухоли	23 (20,40%)	23 (46,90%)	0,013*

Примечание: p – статистическая значимость различий

При гистологическом исследовании переходно-клеточный вариант МНРМП определялся в большинстве случаев, значимых различий у пациентов исследуемых групп не выявлено (табл. 23).

Таблица 23 - Гистотип опухоли мочевого пузыря у наблюдаемых больных

Гистотип	Группа 1 (n=113)	Группа 2 (n=49)	p
Переходно-клеточный	108 (95,60%)	47 (95,90%)	0,988
Плоскоклеточная метаплазия	5 (4,40%)	1 (2,00%)	0,475
Железистая метаплазия	0	1 (2,00%)	-

Примечание: p – статистическая значимость различий

Анализ степени дифференцировки опухоли мочевого пузыря у пациентов с МНРМП показал статистически значимые различия только при 3-й степени

клеточной анаплазии (G3), которая чаще отмечалась у пациентов 2й группы ($p < 0,05$) (табл. 24).

Таблица 24 - Степень дифференцировки опухоли у больных с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря

Степень дифференцировки	Группа 1 (n=113)	Группа 2 (n=49)	p
Высокая (G1)	25 (17,70%)	17 (34,70%)	0,290
Умеренная (G2)	77 (63,60%)	23 (46,90%)	0,400
Низкая (G3)	11 (9,70%)	9 (18,40%)	0,034*

Примечание: p – статистическая значимость различий

Таким образом, анализ клинико-морфологических параметров у больных МНРМП исследуемых групп показал наличие ряда показателей, ассоциированных с рецидивирующим течением заболевания: небольшой размер опухоли, мультицентричность опухолевого роста, наличие CIS, локализация опухолевого поражения на боковых стенках, низкая степень дифференцировки опухоли.

3.3. Фенотипические характеристики клеток осадка мочи у больных с верифицированным раком мочевого пузыря и при развитии рецидива заболевания.

3.3.1 Экспрессия CD13, CD15, CD45 антигенов и показатели клеточного цикла в контрольной группе и у пациентов с МНРМП

Для поиска возможных маркеров первичной диагностики заболевания проведен сравнительный анализ показателей клеточного цикла, а также экспрессии CD13, CD15, CD45 антигенов на клетках осадка мочи в контрольной группе (здоровые доноры) и у больных МНРМП (табл. 25).

При сравнительном анализе установлено увеличение экспрессии CD13 ($p < 0,0001$), CD15 ($p < 0,0001$), CD45 ($p < 0,0001$) антигенов на клетках осадка мочи у пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря по сравнению с контрольной группой (табл. 25).

Таблица 25 - Показатели экспрессии поверхностных антигенов CD13, CD15, CD45 у больных МНРМП и здоровых доноров

Показатель	Контрольная группа (n=69)		Больные МНРМП (n=162)		p
	Me	C ₂₅ – C ₇₅	Me	C ₂₅ – C ₇₅	
CD13 ⁺	2,60	1,15 - 3,30	5,51	2,60 - 7,82	0,0001
CD15 ⁺	3,85	1,00 - 4,00	9,82	4,57 - 13,75	0,0001
CD45 ⁺	2,04	0,50 - 2,45	5,44	2,07 - 7,50	0,0001

Примечание: p – статистическая значимость различий

Поскольку уровень экспрессии антигена CD13 максимален в подслизистом слое, то повышение содержащих его элементов в клеточном осадке мочи может свидетельствовать о патологическом процессе, затрагивающем все анатомические слои мочевого пузыря. Увеличение экспрессии Lewis-X (CD15) расценивается некоторыми авторами как признак злокачественного перерождения тканей органа. Рост количества в моче клеток, экспрессирующих антиген CD45⁺ в определенной мере может отражать реакцию иммунной системы на растущую опухоль.

Количество клеток во всех фазах клеточного цикла статистически значимо отличается у пациентов с МНРМП по сравнению с группой контроля (табл. 26). Исключением является только фаза покоя (G₀), где количество клеток остается неизменным (табл. 26).

Таблица 26 - Показатели клеточного цикла у больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря и в группе контроля

Показатель	Контрольная группа (n=69)		Больные МНРМП(n=162)		p
	Me	C ₂₅ – C ₇₅	Me	C ₂₅ – C ₇₅	
G1-фаза	7,30	3,90 - 9,60	9,24	6,27 - 11,40	0,0001
S-фаза	76,32	69,50 - 79,85	68,48	62,77 - 73,75	0,0001
G2-фаза	14,70	11,50 –18,10	20,95	14,15 - 25,10	0,0001
Митоз	1,69	0,80 - 1,65	1,83	1,00 - 2,62	0,016
G0-фаза	14,61	8,80–20,10	12,77	8,15 - 16,02	0,123

Примечание: p – статистическая значимость различий

Увеличение доли клеток, находящихся в процессе деления может отражать интенсивные пролиферативные процессы, связанные с развитием злокачественного новообразования. Данное предположение также подтверждается различиями в фазах клеточного цикла до и после митоза. В свою очередь, снижение доли клеток осадка мочи, находящихся в синтетической фазе, отражает перераспределение всего клеточного пула в сторону активной пролиферации.

Таким образом, выявленные изменения в уровне экспрессии поверхностных маркеров клеток осадка мочи, а также изменение соотношения клеточных элементов в разные фазы митотического цикла, могут отражать особенности взаимодействия растущей карциномы на ткани органа. Стандартное цитологическое исследование осадка мочи не выявило наличия атипичных клеток в моче у всех больных, включенных в исследование. Однако, преобладание доли клеток в фазах митоза, а также пре- и постмитотических фазах, свидетельствует об увеличении пролиферативной активности, что является признаком злокачественной трансформации. С другой стороны, увеличение в осадке мочи количества клеток, экспрессирующих на своей поверхности адгезионные молекулы, ассоциировано с нарушением клеточных контактов, что в случае

изучения неопластических образований, отражает повышение вероятности распространения опухоли. Клеточные элементы, у которых нарушено межклеточное взаимодействие, не способны формировать ткани, кроме того, если такие нарушения фиксируются в процессе канцерогенеза, то такие опухоли активнее метастазируют и имеют более агрессивное течение. Воздействие растущей уротелиальной карциномы на окружающие ткани мочевого пузыря приводит к увеличению количества нетрансформированных клеток в жидкой фазе мочи. Данное явление может усиливаться за счет усиления экспрессии как матриксных, так и мембраносвязанных металлопротеаз. В норме эти ферменты принимают участие в деградации межклеточного матрикса при восстановлении поврежденных тканей, ангиогенезе и дифференцировке клеток.

3.3.2 Особенности экспрессии CD13, CD15, CD 45 антигенов и фаз клеточного цикла в зависимости от характера течения мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря

Проведен сравнительный анализ показателей клеточного цикла и экспрессии CD13, CD15, CD45 антигенов в клеточном осадке мочи в зависимости от характера клинического течения МНРМП в двух группах пациентов с гистологически верифицированным заболеванием (1 группа – больные без рецидива МНРМП, n=113; 2 группа – больные с подтвержденным рецидивом МНРМП, n=49).

При сравнительном анализе показателей экспрессии антигенов CD13, CD15, CD45 в клеточном осадке мочи у больных с МНРМП, статистически значимых различий в сравниваемых группах не было выявлено (табл. 27).

Таблица 27 - Показатели экспрессии поверхностных антигенов на клетках осадка мочи в зависимости от характера течения заболевания

Показатель	Группа 1 (n=113)		Группа 2 (n=49)		p
	Me	C ₂₅ – C ₇₅	Me	C ₂₅ – C ₇₅	
CD13 ⁺	5,77	2,95 - 7,95	4,90	2,05 - 7,10	0,103
CD15 ⁺	9,50	4,85 - 12,70	10,60	3,80 - 16,05	0,333
CD45 ⁺	5,65	2,05 - 7,90	4,97	2,15 - 7,05	0,680

Примечание: p – статистическая значимость различий

При сравнительном анализе показателей клеточного цикла у больных с различным течением МНРМП, обнаружено увеличение количества клеток в S–фазе (70,15±6,58) у пациентов с рецидивирующим течением заболевания, в сравнении с 1-й группой больных (p<0,05) (табл. 28).

Таблица 28 - Показатели митотического цикла клеток осадка мочи в зависимости от характера течения заболевания

Показатель	Группа 1 (n=113)		Группа 2 (n=49)		p
	Me	C ₂₅ – C ₇₅	Me	C ₂₅ – C ₇₅	
G1-фаза	9,51	6,30 - 12,05	8,62	5,95 - 10,90	0,395
S-фаза	67,76	62,20 - 72,90	70,15	66,35 - 74,50	0,029*
G2-фаза	20,19	14,20 – 24,85	22,69	12,60 – 25,50	0,972
Митоз	1,84	1,00 - 2,65	1,78	1,00 - 2,65	0,744
G0-фаза	13,35	7,95 - 17,25	11,43	8,65 - 3,200	0,099

Примечание: p – статистическая значимость различий

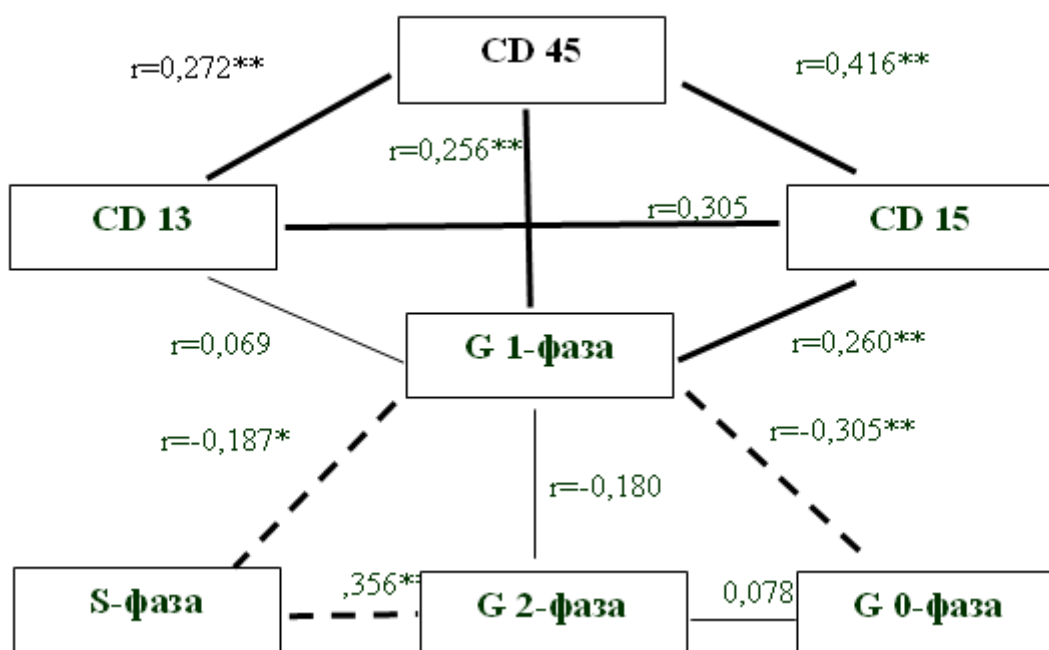
Обнаруженные изменения согласуются с существующими теориями канцерогенеза в тканях мочевого пузыря. То, что в группе с рецидивирующим течением МНРМП доля клеток осадка мочи, находящихся в синтетической фазе больше, чем в 1 группе, может быть объяснено более активными

пролиферативными процессами в уротелии. В свою очередь, данное наблюдение может являться предпосылкой для развития рецидива заболевания.

Таким образом, отсутствие достоверных различий в уровне экспрессии поверхностных маркеров клеток осадка мочи в двух группах больных МНРМП отражает степень воздействия растущей опухоли на окружающие ткани органа. Полученные данные подтверждают неинвазивный характер роста, при котором новообразование не проникает за пределы мочевого пузыря. С другой стороны, в группе пациентов с рецидивирующим течением заболевания, интенсивность внутриклеточных синтетических процессов может характеризовать изменения в большем количестве клеток эпителия. Такие «поля канцеризации», или обширные клеточные зоны, подвергнувшиеся злокачественной трансформации, не имеют внешних отличий от нормальной ткани уротелия и соответственно, могут быть пропущены хирургом при проведении оперативного лечения. При дальнейшем развитии оставшиеся клетки опухоли могут выступать источником рецидива МНРМП.

3.3.3 Оценка сопряженности фенотипических характеристик клеток осадка мочи у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря с характером течения заболевания

При оценке результатов корреляционного анализа в группе пациентов без рецидива МНРМП между показателями, отражающими экспрессию CD13, CD15 и CD45 антигенов на клетках осадка мочи выявлены достоверные положительные слабой силы корреляционные связи. В то время как корреляционная взаимосвязь между фазами клеточного цикла характеризовалась только отрицательными достоверными корреляционными связями слабой силы (рис. 3). Следует отметить прямую корреляционную взаимосвязь между экспрессией CD15 антигена и G1 фазой клеточного цикла ($r=0,260$; $p<0,01$) у пациентов с безрецидивным течением МНРМП.



Примечание: * - $p=0,05$; ** $p=0,01$. Прямая (—) и обратная (---) корреляционная связь.

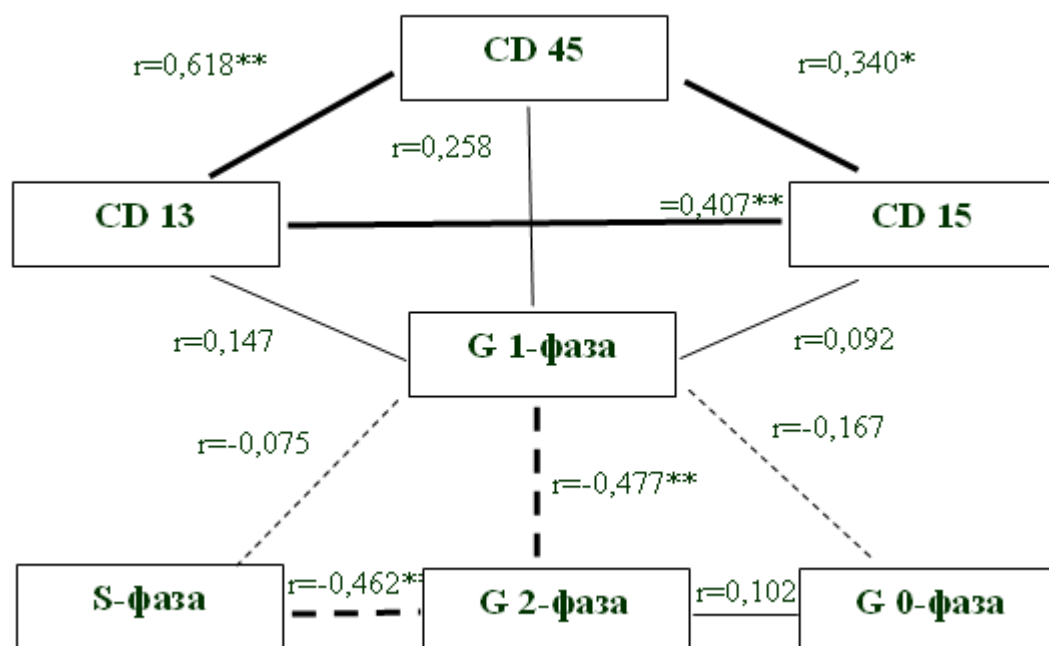
Рис. 3 - Схема корреляции фенотипического спектра клеток осадка мочи у больных без рецидива МНРМП.

По своему качественному составу установленные корреляционные связи в группе пациентов с рецидивирующим течением МНРМП повторяют характер связей, обнаруженных в группе пациентов с течением МНРМП без рецидивов (рис. 4). При этом в данной группе наблюдаемых пациентов выявленные корреляционные связи значительно по силе превосходят корреляционные взаимосвязи в группе пациентов с безрецидивным течением заболевания (рис. 4).

Кроме того, количество корреляционных связей между фазами клеточного цикла, а также их взаимосвязей с показателями, характеризующими экспрессию поверхностных клеточных антигенов (CD13, CD15, CD45) было 2 раза меньше, чем в группе пациентов с безрецидивным течением МНРМП (рис. 3; рис. 4).

Необходимо отметить, что в группе пациентов с рецидивирующим течением МНРМП по сравнению с группой больных без рецидивирования заболевания не установлено достоверных корреляционных связей между

экспрессией поверхностных антигенов (CD13, CD15, CD45) и фазами клеточного цикла (рис. 3; рис. 4).



Примечание: * - $p=0,05$; ** $p=0,01$. Прямая (—) и обратная (---) корреляционная связь.

Рис.4 - Схема корреляции фенотипического спектра клеток у больных с рецидивом МНРМП.

Стоит отметить, что любая корреляционная связь является статистической, анефункциональной, поэтому все наблюдаемые изменения ассоциированы между собой.

Для каждой клетки смена фаз митотического цикла является взаимосвязанным непрерывным процессом. Описанные корреляционные взаимосвязи подтверждают цикличность этого явления. Так, при увеличении доли клеток в одной фазе должна уменьшаться доля клеток в другой и наоборот. С другой стороны, наличие корреляций с экспрессией поверхностных антигенов в осадке мочи позволяет сделать вывод о роли каждой клеточной популяции в этих изменениях. Прямые взаимосвязи количества лейкоцитов (CD 45⁺клеток) с экспрессией остальных изученных маркеров, а также с долей клеток в пресинтетическую фазу свидетельствуют об активном состоянии выявленных

клеток иммунной системы. В группе больных с безрецидивным течением заболевания наблюдается слабая положительная взаимосвязь доли клеток в G1-фазе с количеством CD15⁺клеток. Данное наблюдение соответствует биологическим закономерностям – в пресинтетической фазе клеточного цикла осуществляется интенсивный рост клетки с наработкой всех внутриклеточных компонентов. Однако, в группе пациентов с верифицированным рецидивом МНРМП отсутствие значимых зависимостей экспрессии поверхностных маркеров от фаз клеточного цикла в осадке мочи отражает то, что уровень экспрессии каждого из рассматриваемых антигенов не зависит от того, в какой фазе митотического цикла находится клетка.

Уменьшение общего количества и силы корреляционных взаимосвязей в группе пациентов с рецидивом МНРМП может быть связано с дезадаптационными процессами, вызванными особенностями опухолевого роста, что создает предпосылки для дальнейшей прогрессии заболевания. С другой стороны, только в группе больных с рецидивирующим течением заболевания наблюдаются корреляционные связи средней силы, что ассоциировано с большим изменением показателей экспрессии CD13 и CD45 на клетках осадка мочи. Это может характеризовать зависимость между распространённостью трансформированных уротелиальных клеток и степенью вовлеченности в развитие патологического процесса иммунного ответа.

Таким образом, учитывая особенности корреляционной картины при рецидиве МНРМП можно предположить наличие закономерностей в характере течения заболевания, что может быть использовано в оценке вероятности возникновения рецидива заболевания после комбинированного лечения.

3.4. Математическое моделирование в оценке информативности изучаемых факторов для диагностики первичной опухоли мочевого пузыря и риска развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения

3.4.1 Информативность изучаемых факторов в диагностике первичной опухоли мочевого пузыря

Для оценки информативности показателей экспрессии поверхностных антигенов CD13, CD15, CD45 на клетках осадка мочи, а также показателей митотического цикла G1 фаза, S фаза, G2 фаза, митоз, G0 фаза были использованы методы дискриминантного и множественного логистического регрессионного анализа.

В анализ включена 231 единица наблюдения 162 (70,1%) пациента, у которых был диагностирован мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря и 69 (29,9%) – лица группы контроля.

Использовался метод принудительного включения информативных признаков.

При проведении процедуры дискриминантного анализа экспрессия антигенов CD13, CD15, CD45 на клетках осадка мочи и количество клеток в фазах митотического цикла рассматривались как классификационные на основании корреляции с канонической дискриминантной функцией. Вклад каждого признака в результат классификации и структурная корреляционная матрица представлены в таблице 29.

Таблица 29 - Нормированные коэффициенты канонических дискриминантных функций модели, классифицирующей пациентов по признаку наличия опухоли мочевого пузыря

№	Признак	Функция	Структурная матрица
1.	S-фаза	-0,51	-0,68
2.	CD15	0,42	0,66
3.	CD13	0,32	0,62
4.	CD45	0,13	0,52
5.	G2-фаза	0,26	0,38

Продолжение таблицы 29

6.	G1-фаза	-0,01	0,32
7.	G0-фаза	-0,11	-0,19
8.	Митоз	-0,18	0,07

Из таблицы 29 следует, что наибольший вклад в результаты классификации вносят показатели: доля клеток в S-фазе и количество клеток осадка мочи, экспрессирующих CD15 и CD13. Эти же показатели имеют наибольшую корреляцию с канонической дискриминантной функцией.

Мера связи между дискриминирующей функцией и группами наблюдений, описываемая канонической корреляцией, составляет 0,56, что объясняет 56,0% дисперсии исходных переменных. Лямбда Уилкса при оценке канонической дискриминантной функции является статистически значимой и составляет 0,687 ($\chi^2=84,60$; $p<0,001$).

При этом по критерию М Бокса имеют место статистически значимые отличия матриц дисперсий в группах наблюдения ($p<0,001$), что показывает обоснованность применения дискриминантного анализа в данном случае.

Были сформированы линейные дискриминантные модели, позволяющие на основании классификационных признаков, распределить пациентов на группы по наличию ли отсутствию у них злокачественного новообразования мочевого пузыря (табл. 30).

Таблица 30 - Линейные модели дискриминантной функции, характеризующие наличие опухоли мочевого пузыря

№	Признак	Наличие опухоли	
		Нет	Есть
1.	CD13	1,29	1,14
2.	CD15	0,28	0,18
3.	CD45	-0,27	-0,32

Продолжение таблицы 30

4.	G1-фаза	2,31	2,32
5.	S-фаза	2,20	2,29
6.	G2-фаза	0,72	0,69
7.	Митоз	1,95	2,16
8.	G0-фаза	0,56	0,59
9.	Константа	-103,72	-109,29

Исходя из таблицы 30, линейная дискриминантная функция при отсутствии опухоли мочевого пузыря выглядит следующим образом:

$$D_1 = -103,725 + 1,298x_1 + 0,284x_2 - 0,274x_3 + 2,312x_4 + 2,197x_5 + 0,720x_6 + 1,946x_7 + 0,562x_8$$

Линейная дискриминантная функция, моделирующая наличие злокачественного новообразования мочевого пузыря:

$$D_2 = -109,288 + 1,141x_1 + 0,182x_2 - 0,318x_3 + 2,316x_4 + 2,292x_5 + 0,686x_6 + 2,156x_7 + 0,587x_8$$

где, D_1 и D_2 – линейные дискриминантные функции,

x_1 – экспрессия CD13 на клетках осадка мочи,

x_2 – экспрессия CD14 на клетках осадка мочи,

x_3 – экспрессия CD45 на клетках осадка мочи,

x_4 – доля клеток осадка мочи в G1-фазе клеточного цикла,

x_5 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_6 – доля клеток осадка мочи в G2-фазе клеточного цикла,

x_7 – доля клеток осадка мочи в митотической фазе клеточного цикла,

x_8 – доля клеток осадка мочи в G0-фазе клеточного цикла

При $D_1 > D_2$ – низкая вероятность наличия опухоли, при $D_1 < D_2$ – высокая вероятность наличия МНРМП.

На основании полученных дискриминантных функций произведена итоговая классификация наблюдений, результаты которой представлены в таблице 31.

Таблица 31 - Классификация результатов при помощи дискриминантных функций

Результаты		Предсказанная принадлежность		Итого
		Нет	Есть	
Нет опухоли мочевого пузыря	Абс.	55	14	69
Наличие опухоли мочевого пузыря		33	129	162
Нет опухоли мочевого пузыря	%	79,70	20,30	100,00
Наличие опухоли мочевого пузыря		20,40	79,60	100,00

На основании тестирования данной модели была построена ROC-кривая (рис.5). По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,689 \pm 0,040$ (ДИ 95% 0,611-0,868; $p < 0,001$), что отражает высокое качество прогностической модели.

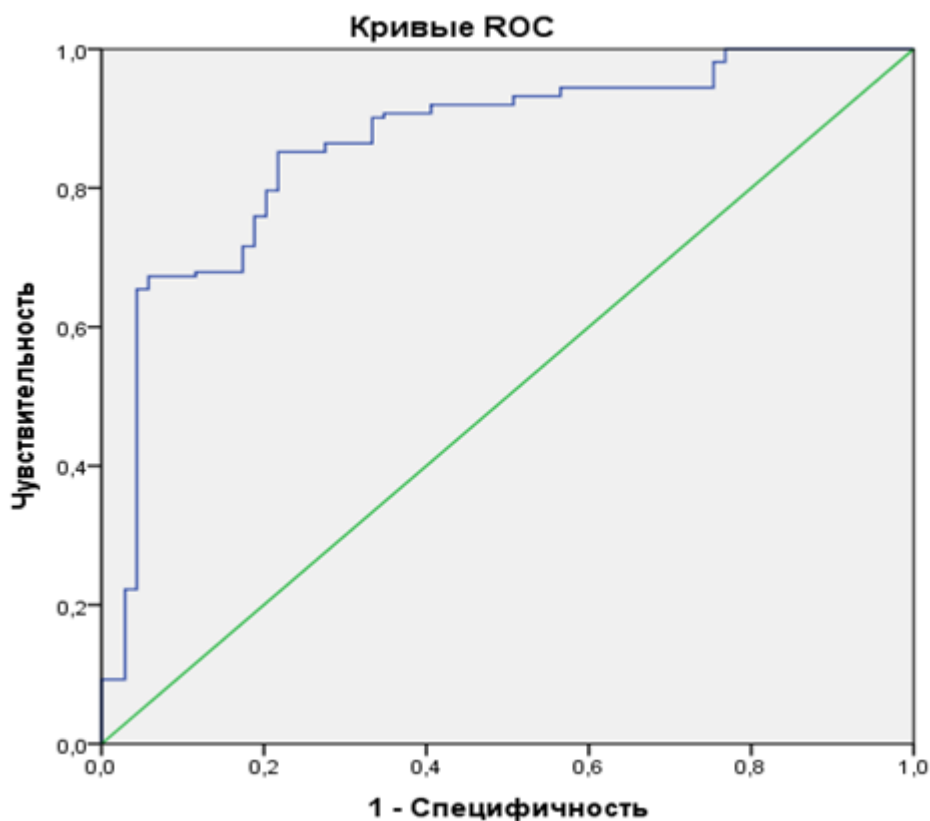


Рис. 5 - ROC-кривая информативности дискриминантной модели

Таким образом, получена статистически значимая математическая модель, позволяющая при помощи дискриминантных функции провести классификацию единиц наблюдения по наличию или отсутствию опухоли мочевого пузыря с высокой чувствительностью – 79,6% и специфичностью - 79,7%. Общая точность модели составила 79,7%.

Следующим этапом явилось построение регрессионной модели оценки информативности фенотипических характеристик клеток осадка мочи в отношении наличия опухоли мочевого пузыря:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(7.857 + 0,113x_1 + 0,254x_2 - 0,111x_3 - 0,296x_4)}}$$

где

p – вероятность наличия МНРМП,

x_1 – экспрессия CD15 на клетках осадка мочи,

x_2 – экспрессия CD45 на клетках осадка мочи,

x_3 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_4 – доля клеток осадка мочи в митотической фазе клеточного цикла

При $p < 0,5$ – низкая вероятность наличия опухоли, при $p \geq 0,5$ – высокая вероятность наличия МНРМП.

Модель является статистически значимой ($\chi^2=96,464$; $p < 0,001$). На втором шаге построения модель характеризуют следующие данные (табл. 32). Показатель $\text{Exp}(b)$ указывает на высокую вероятность наличия рака мочевого пузыря при повышении показателей экспрессии антигенов CD15 и CD45.

Таблица 32 - Сводные данные по регрессионной модели, оценивающей вероятность наличия опухоли мочевого пузыря

Параметры	Кoeff. регрессии (b)	Стд. Ошибки	Статистика Вальда χ^2	Значимость (p)	Exp(b)	95% Доверит. интервал для Exp(b)	
						Нижняя	Верхняя
CD15	0,11	0,04	7,34	<0,01	1,12	1,03	1,22
CD45	0,25	0,09	8,40	<0,01	1,29	1,09	1,53
S фаза	-0,11	0,03	17,97	<0,01	0,89	0,85	0,94
Митоз	-0,30	0,14	4,45	<0,05	0,74	0,56	0,98
Константа	7,86	2,06	14,50	<0,01	2583,04	-	-

Для данной модели коэффициент детерминации (R^2) составил 0,446, что показывает статистически значимое объяснение данными параметрами дисперсии переменной отклика на 44,6%. При этом модель обладает 91,4% чувствительностью, 62,5% специфичностью и имеет общую точность - 83,5%.

По данным построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,880 \pm 0,026$ (ДИ 95% 0,829-0,932; $p < 0,001$), что соответствует хорошему качеству регрессионной модели (рис. 6).

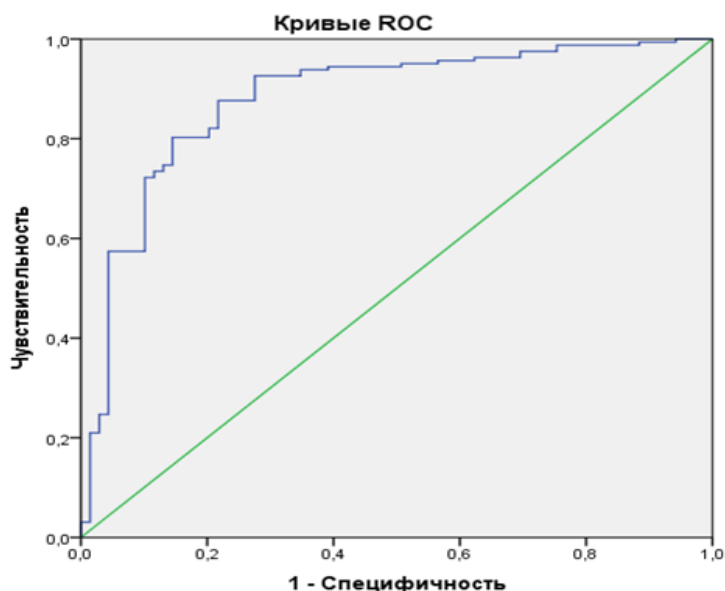


Рис. 6 - ROC-кривая информативности логистической регрессионной модели

По результатам проведенного математического моделирования наибольшую информативность в отношении наличия опухоли мочевого пузыря продемонстрировали параметры экспрессии CD15 и CD45 на клетках осадка мочи, а также доля клеток в синтетической и митотической фазах клеточного цикла.

Для демонстрации возможности использования разработанной математической модели в клинической практике приведем несколько примеров.

Клинический пример №1

Больной Д., обратился в поликлинику КККОД с жалобами на дизурические расстройства. При обследовании в общей лечебной по данным УЗИ мочевого пузыря выявлено увеличение объема остаточной мочи до 40 мл, утолщение стенки мочевого пузыря.

Пациенту было проведено исследование фенотипических характеристик клеток осадка мочи. При использовании регрессионной модели на основании

показателей осадка мочи ($x_1 = 7,4$, $x_2 = 2,4$, $x_3 = 66,9$, $x_4 = 2,3$) получено, $p = 0,716$.

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(7,857 + 0,113x_1 + 0,254x_2 - 0,111x_3 - 0,296x_4)}}$$

где

p – вероятность наличия МНРМП,

x_1 – экспрессия CD15 на клетках осадка мочи,

x_2 – экспрессия CD45 на клетках осадка мочи,

x_3 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_4 – доля клеток осадка мочи в митотической фазе клеточного цикла

e – математическая константа 2,72,

Учитывая, что $p > 0,5$ – определен высокая вероятность наличия рака мочевого пузыря.

При выполнении цистоскопии по левой боковой стенке мочевого пузыря обнаружено утолщение стенки с папилломатозными образованиями до 3 мм. При гистологическом исследовании биопсийного материала: переходо-клеточный рак 1 степени клеточной анаплазии.

Клинический пример №2

Больной З., обратился в поликлинику КККОД. При поступлении жалоб не отмечает, из анамнеза дважды эпизоды гематурии. При обследовании в общей лечебной по данным УЗИ мочевого пузыря выявлено увеличение объема остаточной мочи до 150 мл.

Исследованы показатели клеточного осадка мочи. При использовании регрессионной модели на основании показателей осадка мочи ($x_1 = 0,3$, $x_2 = 0,5$, $x_3 = 75,9$, $x_4 = 1,3$) получено, $p = 0,2568$.

Учитывая, что $p < 0,5$ – определена низкая вероятность опухоли мочевого пузыря.

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(7,857 + 0,113x_1 + 0,254x_2 - 0,111x_3 - 0,296x_4)}}$$

где

p – вероятность наличия МНРМП,

x_1 – экспрессия CD15 на клетках осадка мочи,

x_2 – экспрессия CD45 на клетках осадка мочи,

x_3 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_4 – доля клеток осадка мочи в митотической фазе клеточного цикла

e – математическая константа 2,72,

По результатам дообследования данных за опухолевое поражение мочеполовой системы нет, диагностирована доброкачественная гиперплазия предстательной железы с варикозным расширением вен шейки мочевого пузыря, явившихся источником гематурии. Рекомендовано лечение у уролога общей лечебной сети.

Клинический пример №3

Больная В. направлена в поликлинику КККОД. При обращении жалоб нет. При обследовании в общей лечебной сети по данным УЗИ мочевого пузыря выявлена опухоль по левой боковой стенке до 1 см в диаметре.

Определены необходимые фенотипические показатели клеток осадка мочи. При использовании регрессионной модели на основании показателей осадка мочи ($x_1 = 3,0$, $x_2 = 1,2$, $x_3 = 83,9$, $x_4 = 0,8$) получено, $p = 0,211$.

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(7,857 + 0,113x_1 + 0,254x_2 - 0,111x_3 - 0,296x_4)}}$$

где

p – вероятность наличия МНРМП,

x_1 – экспрессия CD15 на клетках осадка мочи,

x_2 – экспрессия CD45 на клетках осадка мочи,

x_3 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_4 – доля клеток осадка мочи в митотической фазе клеточного цикла

e – математическая константа 2,72,

Учитывая, что $p < 0,5$ – определена низкая вероятность наличия опухоли мочевого пузыря.

Принимая во внимание наличие опухолевидного образования произведена цистоскопия с биопсией опухоли. По результатам гистологического исследования: кистозный цистит. Рекомендовано дальнейшее лечение у уролога общей лечебной сети.

3.4.2 Оценка риска развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения

Для определения переменных, позволяющих прогнозировать развитие рецидива МНРМП, был применен метод дискриминантного анализа. В качестве предикторов использовались показатели экспрессии CD13, CD15, CD45 антигенов на клетках осадка мочи, а также доля клеток в разных фазах митотического цикла.

В анализ включены 162 единицы наблюдения (113 случаев безрецидивного течения заболевания после комбинированного лечения и 49- с рецидивом МНРМП).

При проведении процедуры дискриминантного анализа изучаемые признаки рассматривались как классификационные на основании корреляции с канонической дискриминантной функцией (табл. 33). Вклад каждого признака в результат классификации показывает абсолютное значение нормированного коэффициента дискриминантной функции.

Структурная матрица, представленная в таблице 33, отражает меру корреляции дискриминантных переменных с канонической дискриминантной функцией.

Таблица 33 - Нормированные коэффициенты канонических дискриминантных функций изучаемых фенотипических параметров клеток осадка мочи

№	Признак	Функция	Структурная матрица
1.	S-фаза	-0,49	-0,44
2.	G0-фаза	0,63	0,41
3.	CD13	0,38	0,33
4.	G1-фаза	0,34	0,30
5.	G2-фаза	-0,37	-0,26
6.	CD15	-0,64	-0,21
7.	CD45	0,26	0,18
8.	Митоз	0,14	0,09

Из таблицы 33 видно, что наибольший вклад в результаты классификации вносят показатели: доля клеток в G0-фазе митотического цикла и экспрессия CD15 антигена. Наибольшую корреляцию с канонической дискриминантной функцией имеют доля клеток в S-фазе и G0-фазе.

Каноническая корреляция, описывающая меру связи между дискриминирующей функцией и группами наблюдений, составляет 0,328, что объясняет 32,8% дисперсии исходных переменных. Лямбда Уилкса при оценке

канонической дискриминантной функции является статистически значимой и составляет 0,893 ($\chi^2=17,681$; $p=0,023$).

При этом имеет место статистически значимые отличия матриц ковариаций (дисперсий) в группах наблюдения по критерию М Бокса ($p<0,001$).

Коэффициенты линейных моделей дискриминантной функции, включающих в себя классификационные признаки, которые характеризуют принадлежность обследованных пациентов к группе с наличием или отсутствием рецидива, представлены в таблице 34.

Таблица 34 - Линейные модели дискриминантной функции, прогнозирующие развитие рецидива после комбинированного лечения у больных МНРМП

№	Признак	Наличие рецидива	
		Нет	Есть
1.	CD13	0,99	0,92
2.	CD15	0,22	0,29
3.	CD45	-0,23	-0,27
4.	G1-фаза	1,81	1,74
5.	S-фаза	1,83	1,88
6.	G2-фаза	0,46	0,48
7.	Митоз	2,02	1,91
8.	G0-фаза	0,63	0,55
9.	Константа	-85,25	-87,63

Исходя из таблицы 34, линейная дискриминантная функция, прогнозирующая низкий риск развития рецидива МНРМП выглядит следующим образом:

$$D_1 = -85,254 + 0,997x_1 + 0,221x_2 - 0,229x_3 + 1,806x_4 + 1,830x_5 + 0,458x_6 + 2,020x_7 + 0,528x_8.$$

Линейная дискриминантная функция, прогнозирующая высокий риск рецидива:

$$D_2 = -87,626 + 0,917x_1 + 0,294x_2 - 0,269x_3 + 1,724x_4 + 1,882x_5 + 0,480x_6 + 1,908x_7 + 0,552x_8,$$

где

D_1 и D_2 – линейные дискриминантные функции,

x_1 – экспрессия CD13 на клетках осадка мочи,

x_2 – экспрессия CD14 на клетках осадка мочи,

x_3 – экспрессия CD45 на клетках осадка мочи,

x_4 – доля клеток осадка мочи в G1-фазе клеточного цикла,

x_5 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_6 – доля клеток осадка мочи в G2-фазе клеточного цикла,

x_7 – доля клеток осадка мочи в митотической фазе клеточного цикла,

x_8 – доля клеток осадка мочи в G0-фазе клеточного цикла.

При $D_1 > D_2$ – прогнозируется низкий риск рецидива МНРМП, при $D_1 < D_2$ – высокий риск рецидива заболевания.

На основании полученных дискриминантных функций была произведена итоговая классификация событий, результаты которой представлены в таблице 3.35.

Таблица 3.35 - Классификация результатов при помощи дискриминантных функций

Результаты		Предсказанная принадлежность		Итого
		Нет	Есть	
Отсутствие рецидива	Абс.	74	39	113
Рецидив заболевания		14	35	49
Отсутствие рецидива	%	65,50	34,50	100,00
Рецидив заболевания		28,60	71,40	100,00

На основании применения данной модели была построена ROC-кривая (рис. 7). По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,711 \pm 0,047$ (ДИ 95% $0,619-0,804$; $p < 0,001$), что указывает на удовлетворительное качество прогностической модели.

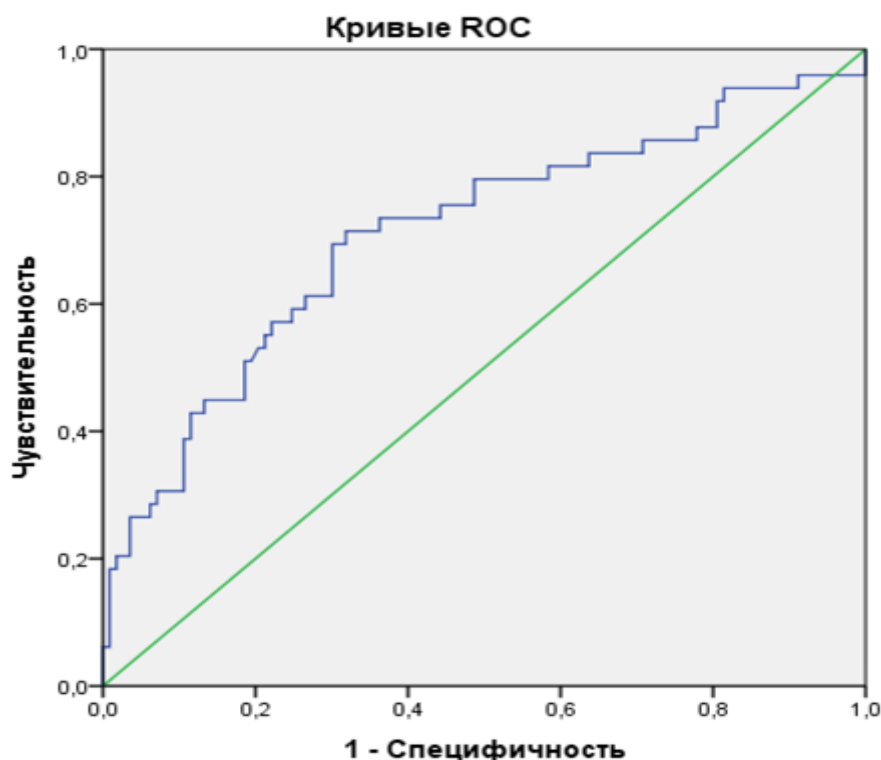


Рис. 7 - ROC-кривая прогностической точности дискриминантной модели

Таким образом, получена статистически значимая математическая модель, позволяющая при помощи дискриминантных функции провести классификацию единиц наблюдения по риску рецидива заболевания с чувствительностью - 71,4%, специфичностью - 65,5%, общей точностью - 67,3%.

Для повышения точности модели в качестве классификационных признаков дополнительно использованы клиничко-морфологические параметры. Методом пошагового отбора были отобраны 4 предиктора развития рецидива МНРМП. Структурная матрица корреляции дискриминантных переменных с канонической дискриминантной функцией, на основании которой были отобраны переменные, представлена в таблице 36.

Таблица 36 - Нормированные коэффициенты канонических дискриминантных функций

№	Параметр	Функция	Структурная матрица
1.	S-фаза	0,31	0,24
2.	G0-фаза	-0,30	-0,23
3.	Мультицентричность роста	0,75	0,67
4.	Наличие гематурия	-0,62	-0,57

Наибольший вклад в результаты классификации из отобранных переменных вносят мультицентричность опухолевого роста и наличие гематурии. Эти же признаки имеют наибольшую корреляцию с канонической дискриминантной функцией.

Каноническая корреляция составила 0,534, что объясняет 53,4% дисперсии исходной бинарной переменной. Лямбда Уилкса при оценке канонической дискриминантной функции составила 0,715 ($\chi^2=52,994$; $p<0,001$).

Коэффициенты линейных функций дискриминантной модели, представлены в таблице 37.

Таблица 37 - Линейные модели дискриминантной функции, оценивающие риск развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения

№	Признак	Наличие рецидива	
		Нет	Есть
1.	S-фаза	1,32	1,38
2.	G0-фаза	0,25	0,18
3.	Мультицентричность роста	1,66	2,49
4.	Наличие гематурии	3,76	1,96
5.	Константа	-49,81	-53,94

Исходя из таблицы 37, линейная дискриминантная функция, прогнозирующая низкий риск развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения представлена следующим уравнением:

$$D_1 = -49,810 + 1,322x_1 + 0,251x_2 + 1,665x_3 + 3,764x_4$$

Линейная дискриминантная функция, прогнозирующая высокий риск рецидива заболевания:

$$D_2 = -53,945 + 1,380x_1 + 0,185x_2 + 2,486x_3 + 1,962x_4,$$

где

D_1 и D_2 – линейные дискриминантные функции;

x_1 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_2 – доля клеток осадка мочи в G0-фазе клеточного цикла,

x_3 – мультицентричность опухолевого роста,

x_4 – гематурия (0 – отсутствие, 1 – наличие).

При $D_1 > D_2$ – прогнозируется низкий риск развития рецидива МНРМП, при $D_1 < D_2$ – высокий риск развития рецидива заболевания.

Итоговая классификация наблюдений на основании полученных дискриминантных функций представлена в таблице 38.

Комплексная оценка клинико-морфологических параметров наряду с фенотипическими характеристиками клеток осадка мочи улучшает качество дискриминантной модели. Чувствительность данной модели составила 79,6%, специфичность – 72,6%, общая точность – 74,6%.

По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,767 \pm 0,041$ (ДИ 95% 0,680-0,842; $p < 0,001$), что указывает в целом на удовлетворительное качество прогностической модели.

Таблица 38 - Классификация результатов наблюдения у больных МНРМП при помощи дискриминантных функций

Результаты	Предсказанная принадлежность		Итого	
	Нет	Есть		
Отсутствие рецидива	Абс.	82	31	113
Рецидив заболевания		10	39	49
Отсутствие рецидива	%	72,60	27,40	100,00
Рецидив заболевания		20,40	79,60	100,00

Данные ROC-анализа также показывают улучшение прогностических качеств модели (рис. 8)

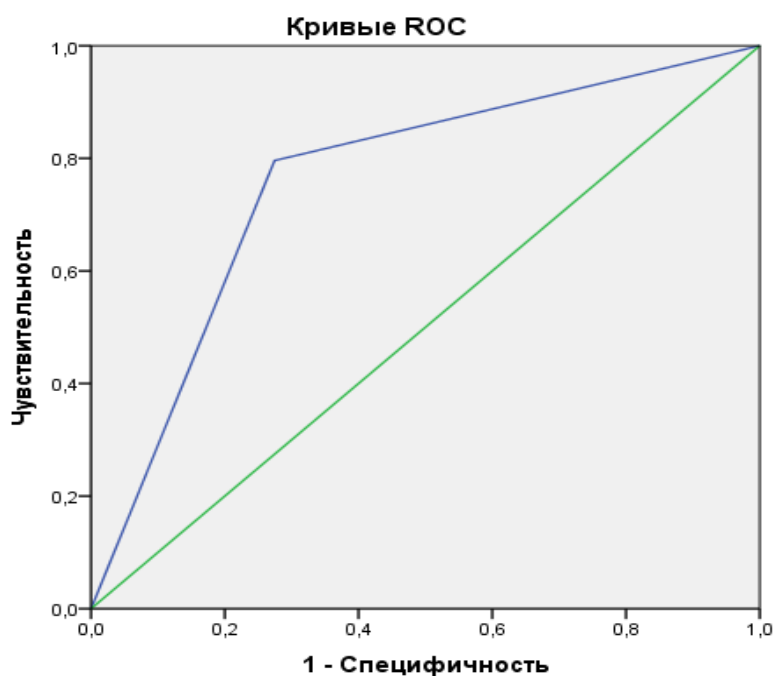


Рис. 8 - ROC-кривая прогностической точности дискриминантной модели

Логистический регрессионный анализ с использованием вышеуказанных предикторов был проведен на 162 больных МНРМП. В качестве метода построения модели был использован алгоритм их принудительного включения, что позволяет оценить статистическую значимость каждого предиктора для итогового прогноза.

Модель является согласованной с исходными данными (по Хосмеру-Лемешеву $p=0,513$) и статистически значимой ($\chi^2=18,575$; $p=0,017$).

Сводные данные по регрессионной модели построения представлены в таблице 39.

Таблица 39 - Сводные данные по регрессионной модели оценки риска развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения

Предикторы	Кoeff. Регрессии (b)	Стд. Ошибка	Статистика Вальда χ^2	Значимость (p)	Exp (b)	95% Доверит. Интервал для Exp (b)	
						Нижняя	Верхняя
CD13	-0,09	0,06	2,20	0,14	0,91	0,81	1,03
CD15	0,07	0,03	4,88	<0,05	1,08	1,01	1,15
CD45	-0,04	0,05	0,67	0,41	0,96	0,87	1,06
G1фаза	-0,07	0,06	1,50	0,22	0,93	0,83	1,04
Sфаза	0,05	0,03	2,94	0,08	1,05	0,99	1,12
G2фаза	0,02	0,02	1,06	0,30	1,02	0,98	1,07
Митоз	-0,07	0,20	0,14	0,71	0,93	0,63	1,37
G0 фаза	-0,08	0,03	5,84	<0,01	0,92	0,86	0,98
Константа	-3,09	2,652	1,36	0,24	0,04		

Из данных, представленных в табл. 39, идентифицированы два статистически значимых предиктора: экспрессия CD15антигена на клетках осадка мочи и доля клеток в G0 фазе митотического цикла. При этом развитие рецидива

ассоциировано со снижением количества клеток, находящихся в фазе покоя и повышением экспрессии CD15 антигена на клетках осадка мочи.

Для данной модели коэффициент детерминации (R^2) составил 0,153, что указывает на статистически значимое объяснение изменений переменной отклика выбранными предикторами на 15,3%. При этом модель имеет высокую специфичность (предсказывает отсутствие рецидива в 95,6% случаев), чувствительность - 24,5% Общая прогностическая точность – 74,1%.

По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,716 \pm 0,047$ (ДИ 95% 0,962-1,000; $p < 0,001$), что указывает на хорошее качество модели для прогнозирования риска развития рецидива МНРМП (рис. 9).

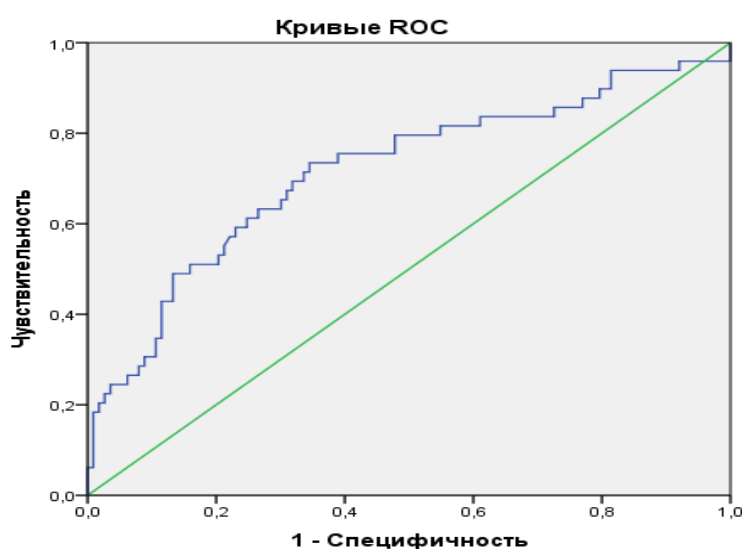


Рис. 9 - ROC-кривая прогностической точности регрессионной логистической модели

Для повышения точности модели, была предпринята попытка наряду с показателями клеточного цикла осадка мочи использовать клинимоρφологические параметры. Методом пошагового отбора была получена логистическая регрессионная модель, представленная следующим уравнением:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-4,957 + 0,061x_1 - 0,070x_2 + 1,743x_3 + 0,729x_4)}}$$

где

p – вероятность развития рецидива МНРМП,

x_1 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_2 – доля клеток осадка мочи в G0-фазе клеточного цикла,

x_3 – наличие гематурии (0 – отсутствие, 1 - наличие),

x_4 – мультицентричность опухолевого роста ($b_4 = 0,729$).

При $p < 0,5$ – низкий риск развития рецидива МНРМП, при $p \geq 0,5$ – высокий риск развития рецидива заболевания.

Модель имеет хорошую согласованность данных (по Хосмеру-Лемешеву $p = 0,820$) и является статистически значимой ($\chi^2 = 51,526$; $p < 0,001$).

Результаты построения регрессионной модели на 4-м шаге представлены в таблице 40.

Таблица 40 - Сводные данные по регрессионной модели оценки риска развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения

Предикторы	Кoeff. регрессии (b)	Стд. ошибка	Статистика Вальда χ^2	Значимость (p)	Exp (b)	95% Доверит. интервал для Exp(b)	
						Нижняя	Верхняя
S фаза	0,06	0,03	4,57	<0,05	1,06	1,01	1,12
G0фаза	-0,07	0,03	3,94	<0,05	0,93	0,87	0,1
Гематурия	1,74	0,43	16,30	<0,01	5,71	13,31	2,45
Мультицентричность роста	0,73	0,15	22,19	<0,01	2,07	1,53	2,81
Константа	-4,96	2,09	5,63	<0,05	0,01		

Статистически значимыми предикторами рецидива МНРМП являются повышение доли клеток осадка мочи в S-фазе, снижение в G0-фазе, наличие гематурии и мультицентричность опухолевого роста.

Для данной модели коэффициент детерминации $R^2=0,386$, что показывает статистически значимое объяснение данными предикторами изменений переменной отклика на 38,65%. Модель с высокой специфичностью предсказывает отсутствие рецидива после комбинированного лечения МНРМП (в 91,2% случаев) при этом доля правильных предсказаний развития рецидива составила 69,4%. Общая прогностическая точность - 84,5%.

По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,832 \pm 0,035$ (ДИ 95% 0,763-0,900; $p < 0,001$), что указывает на высокое качество прогностической модели (рис. 10).

Таким образом, наиболее точной прогностической моделью оценки риска развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения по достигнутому уровню чувствительности и специфичности, является регрессионная логистическая модель, использующая в качестве предикторов сочетание показателей митотического цикла и клинических признаков. Модель обладает высокой специфичностью - 91,2%, чувствительность составила 69,4%, общая прогностическая точность - 84,5%.

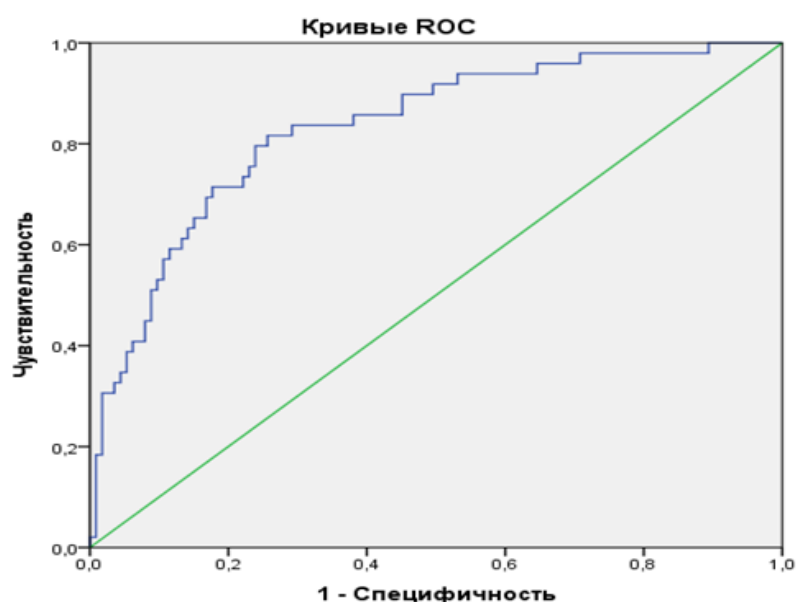


Рис. 10 - ROC-кривая прогностической точности регрессионной логистической модели

Для демонстрации оценки риска развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения с использованием разработанных математических моделей приводим следующие клинические примеры.

Клинический пример №1

Больной Д., направлен в урологическое отделение КККОД с диагнозом Cancer правой боковой стенки мочевого пузыря T1N0M0 (переходно-клеточный рак). При обращении жалоб не было. При цистоскопии по правой боковой стенке мочевого пузыря определяется единичное образование до 1 см в диаметре. Выполнена операция в объеме ТУР опухоли мочевого пузыря, в послеоперационном периоде 8 курсов внутривезикулярной химиотерапии митомицином С.

До операции произведено исследование клеточного осадка мочи. При использовании регрессионной модели на основании показателей осадка мочи ($x_1 = 71,6$, $x_2 = 15,5$, $x_3 = 0$, $x_4 = 1$) получено, $p = 0,279$.

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-4,957 + 0,061x_1 - 0,070x_2 + 1,743x_3 + 0,729x_4)}}$$

где

p – вероятность развития послеоперационного рецидива,

x_1 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_2 – доля клеток осадка мочи в G0-фазе клеточного цикла,

x_3 – наличие гематурии (0 – отсутствие, 1 - наличие),

x_4 – количество опухолей,

e – математическая константа 2,72

Учитывая, что $p < 0,5$ – определен низкий риск рецидива заболевания, рекомендован контрольный осмотр по стандартной схеме: первый год – ежеквартально, второй и третий – раз в 6 месяцев. У пациента в течение 3-х лет не выявлено признаков рецидива заболевания.

Клинический пример №2

Больной К., проходил лечение в урологическом отделении КККОД с диагнозом переходно-клеточный рак правой боковой стенки мочевого пузыря TisN0M0. При поступлении жалобы на гематурию. По результатам ЦС по правой и задней стенкам мочевого пузыря определяются множественные образования до 1 см в диаметре. Выполнена операция в объеме ТУР опухоли мочевого пузыря.

При использовании регрессионной модели на основании показателей осадка мочи ($x_1 = 57,5$, $x_2 = 9,5$, $x_3 = 1,0$, $x_4 = 4,0$) получено, $p = 0,927$. Учитывая, что $p > 0,5$ – определен высокий риск развития рецидива заболевания.

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-4,957 + 0,061x_1 - 0,070x_2 + 1,743x_3 + 0,729x_4)}}$$

где

p – вероятность развития послеоперационного рецидива,

x_1 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_2 – доля клеток осадка мочи в G0-фазе клеточного цикла,

x_3 – наличие гематурии (0 – отсутствие, 1 - наличие),

x_4 – количество опухолей,

e – математическая константа 2,72

Пациенту через 6 недель выполнен ТУР *second look*. Морфологически в одном из участков резецированной слизистой - рост CIS.

Клинический пример №3

Больной К., проходил лечение в урологическом отделении КККОД с диагнозом переходно-клеточный рак левой боковой стенки мочевого пузыря TaN0M0. При поступлении жалобы на гематурию. По результатам ЦС по левой боковой стенке мочевого пузыря определяется единичное образование до 2 см в диаметре по типу «цветной капусты». Выполнена операция в объеме ТУР

опухоли мочевого пузыря, в послеоперационном периоде 8 курсов внутривезикулярной химиотерапии митомицином С.

Определен риск развития рецидива заболевания с использованием разработанной математической модели:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-4,957 + 0,061x_1 - 0,070x_2 + 1,743x_3 + 0,729x_4)}}$$

где

p – вероятность развития послеоперационного рецидива,

x_1 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_2 – доля клеток осадка мочи в G0-фазе клеточного цикла,

x_3 – наличие гематурии (0 – отсутствие, 1 - наличие),

x_4 – количество опухолей,

e – математическая константа 2,72

При использовании регрессионной модели на основании показателей осадка мочи ($x_1 = 57,5$, $x_2 = 9,5$, $x_3 = 1,0$, $x_4 = 1,0$) получено, $p = 0,927$. Учитывая, что $p > 0,5$ – определен высокий риск развития рецидива заболевания.

При динамическом наблюдении через 9 месяцев после окончания комбинированного лечения у пациента диагностирован рецидив заболевания, подтвержденный морфологически.

3.4.3 Зависимость показателей безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения от клинико-морфологических параметров и фенотипических характеристик клеток осадка мочи

Проведена оценка влияния изучаемых факторов на время безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения. В качестве предполагаемых предикторов использовались показатели экспрессии CD13, CD15, CD45 антигенов на клетках осадка мочи, доля клеток в разных фазах

митотического цикла, а также сочетание указанных факторов с клинико-морфологическими параметрами (табл. 41).

Таблица 41 - Переменные регрессионных моделей Кокса при оценке влияния факторов на время безрецидивной выживаемости у больных МНРМП

Предикторы	β	Стд. ошибка	χ^2 Вальда	Знч. (p)	Exp (β)	95% ДИ для Exp (β)	
						Нижняя	Верхняя
Модель 1							
S фаза	0,05	0,02	5,72	<0,05	1,04	1,00	1,08
G0 фаза	0,02	0,01	5,08	<0,05	0,85	0,84	0,99
Модель 2							
S фаза	0,05	0,02	5,70	<0,05	1,05	1,01	1,09
G0 фаза	0,06	0,02	4,78	<0,05	0,94	0,89	0,99
Мультицентричность роста	0,52	0,10	24,21	<0,01	1,67	1,36	2,06
Гематурия	1,41	0,31	20,48	<0,01	4,11	2,23	7,58

В регрессионной модели Кокса 1 с включением показателей клеточного цикла в качестве статистически значимых предикторов, оказывающих влияние на время безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения определены доля клеток осадка мочи в S-фазе ($p=0,04$) и G0-фазе ($p=0,02$).

При включении в модель 2 клинико-морфологических показателей добавляются статистически значимые предикторы безрецидивной выживаемости – мультицентричность опухолевого роста ($p<0,01$) и наличие гематурии ($p<0,01$). Прогностически неблагоприятными факторами, относительно времени безрецидивной выживаемости, являются повышение доли клеток осадка мочи в S-

фазе и G0-фазе митотического цикла. При этом время до развития рецидива уменьшается при наличии гематурии и множественных опухолей.

Функция дожития для средних значений ковариант, включенных в модель представлена на рисунке 11.

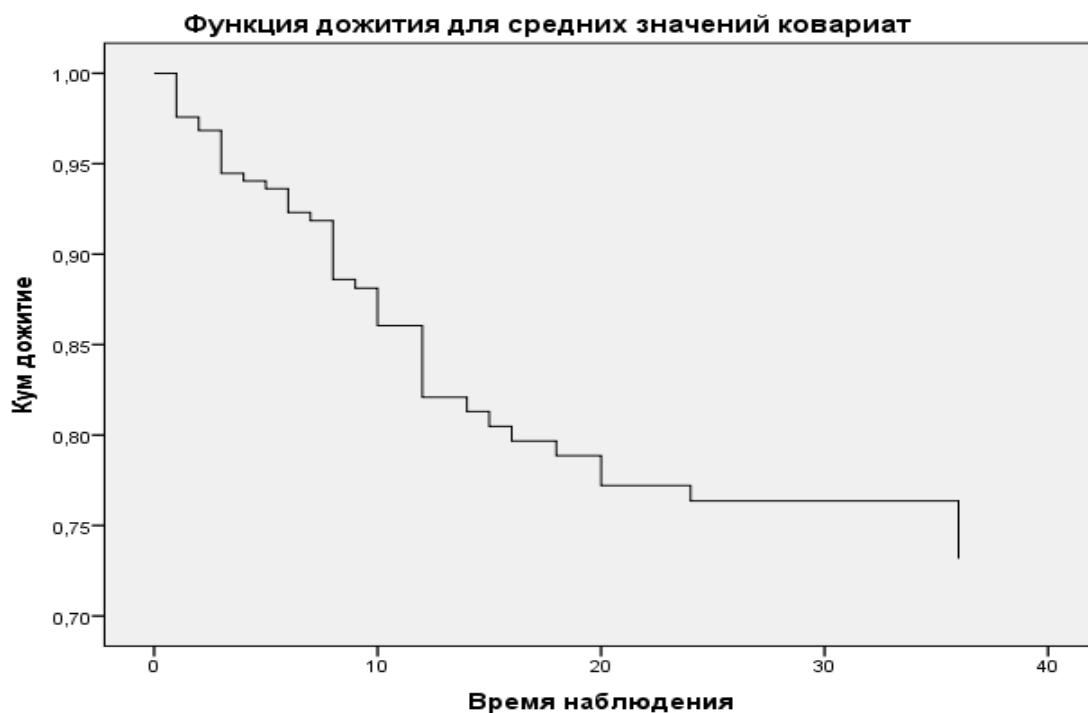


Рис. 11 - Функция дожития для средних значений ковариант регрессионной модели Кокса при оценке влияния фенотипических характеристик клеток осадка мочи и клинико-морфологических показателей на время безрецидивной выживаемости

Для предикторов, отобранных при пошаговом построении регрессионной модели Кокса при прогнозировании времени безрецидивной выживаемости, проведен сравнительный анализ времени дожития при разбиении выборки на подгруппы в рамках выбранных факторов.

Для разбивки на подгруппы были выбраны средние уровни показателей доли клеток осадка мочи в S-фазе и G0-фазе, полученные при исследовании группы контроля.

Средний уровень доли клеток осадка мочи в S-фазе в группе контроля составил 66,8% (56,3 - 76,7), в связи с этим пациенты с МНРМП были разбиты на 2 подгруппы: первая – с уровнем показателя менее 66,8% и вторая - 66,8% и более. При этом доля цензурированных случаев при уровне показателя менее 66,8% составила 79,7%, при 66,8 % и более – 63,3%.

Выявлены статистически значимые различия в показателях безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения в зависимости от доли клеток осадка мочи в S-фазе ($p=0,01$) (табл. 42).

Таблица 42 - Оценка безрецидивной выживаемости больных МНРМП в зависимости от доли клеток в осадка мочив S-фазе

Доля клеток в S-фазе, %	Ср. оценка	Ст. ошибка	Среднее 95% ДИ		рпо Бреслау
			Нижняя граница	Верхняя граница	
<66,8	31,18	1,40	28,43	33,93	<0,01
≥ 66,8	25,12	1,46	22,26	27,98	
Всего	27,50	1,07	25,40	29,60	

Медиана безрецидивной выживаемости в данном случае не достигнута, т.к. к окончанию периода наблюдения количество пациентов, с отсутствием признаков рецидива заболевания превышало 50% (рис. 12).

Вероятность достижения безрецидивной выживаемости на протяжении 36 месяцев при уровне показателя клеток осадка мочи в S-фазе до 66,8% составляет 80%.

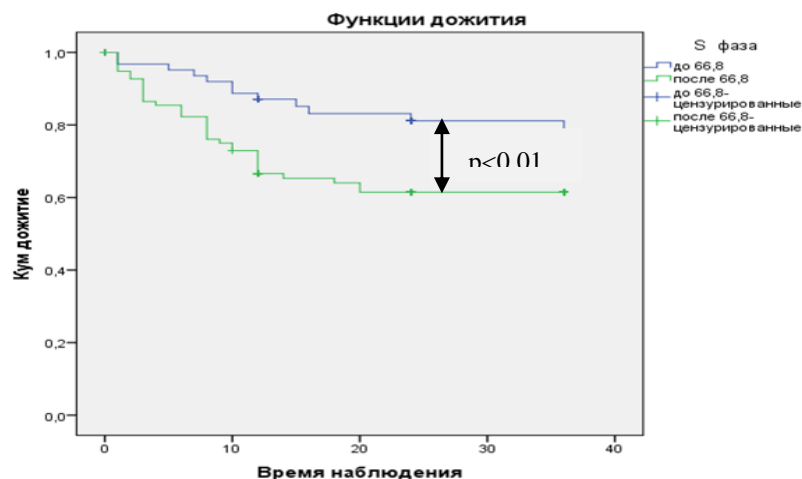


Рис. 12 - Кривые Каплана-Мейера оценки безрецидивной выживаемости больных МНРМП после комбинированного лечения при различной доле клеток осадка мочи в S-фазе

Для показателя доли клеток осадка мочи в G0-фазе в соответствии с его средним уровнем в группе контроля, выборка была разделена на 2 подгруппы – первая со значениями показателя до 11% и вторая - с уровнем показателя 11% и более.

При оценке безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от доли клеток осадка мочи в G0-фазе, доля цензурированных в первой группе составила 62,8%, во второй группе – 76,2%.

Более высокий показатель безрецидивной выживаемости отмечен среди пациентов с долей клеток осадка мочи в G0-фазе более 11% – $29,41 \pm 1,38$ мес. против $25,5 \pm 1,65$ в группе со значениями доли клеток осадка мочи в G0-фазе менее 11% ($p=0,05$) (табл. 43). Таким образом, снижение показателей безрецидивной выживаемости связано со снижением данного показателя.

Таблица 43 - Оценка безрецидивной выживаемости больных МНРМП в зависимости от доли клеток в осадка мочи в G0-фазе

Доля клеток в G0-фазе	Ср. оценка	Ст. ошибка	Среднее95% ДИ		p по Бреслау
			Нижняя граница	Верхняя граница	
< 11%	25,49	1,65	22,26	28,72	<0,05
≥ 11%	29,42	1,38	26,71	32,12	
Всего	27,50	1,07	25,40	29,60	

Медиана безрецидивной выживаемости не была достигнута ни в одной из сравниваемых групп (рис. 13).

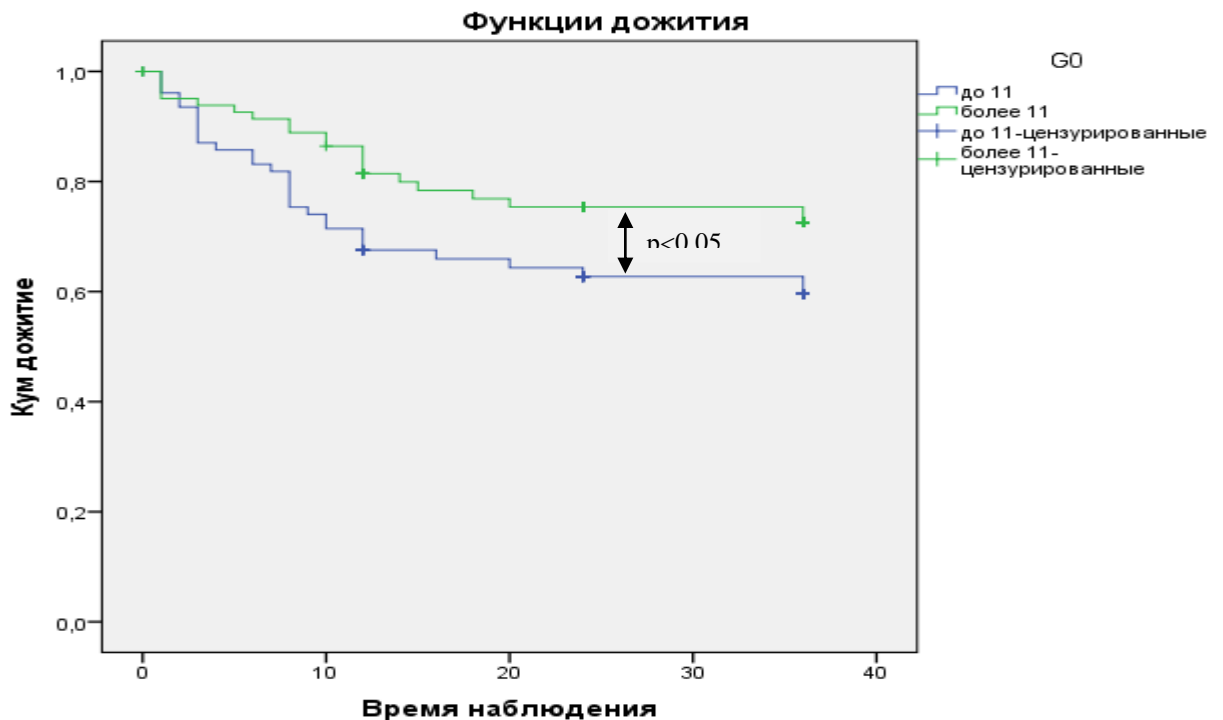


Рис. 13 - Кривые Каплана-Мейера оценки показателей безрецидивной выживаемости у больных МНРМП с разной долей клеток осадка мочи в G0-фазе.

Вероятность достижения 3-летней безрецидивной выживаемости при уровне клеток осадка мочи в G0-фазе более 11% составляет около 78%.

При оценке безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества опухолей, доля цензурированных случаев при наличии одного образования составила 83,7%, при двух опухолях– 60%, при наличии трех и более – на момент окончания периода наблюдения рецидив отсутствовал у 43,3% пациентов.

В таблице 44 представлены показатели безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения в зависимости от количества опухолей. Обращает на себя внимание, что наибольшая точечная оценка среднего времени безрецидивной выживаемости пациентов была отмечена при наличии одной опухоли и составила $31,28 \pm 1,17$ мес. Это значение отличались статистически значимо от других подгрупп, в которые были включены пациенты с двумя опухолями ($p=0,04$) и с тремя и более количеством опухолей ($p<0,01$).

Таблица 44 - Оценка безрецидивной выживаемости у больных МНРМП в зависимости от количества опухолей

Количество опухолей	Среднее			Медиана			p по Бреслау
	Оценка	Ст. ошибка	95% ДИ	Оценка	Ст. ошибка	95% ДИ	
1 опухоль	31,28	1,17	28,98-33,57	-	-	-	$p_{1-2}=0,04$ $p_{1-3}<0,01$ $p_{2-3}=0,55$
2 опухоли	24,42	4,39	15,82-33,02	-	-	-	
3 и более опухолей	21,18	2,01	17,24-25,12	29,00	14,35	3,88-32,12	
Всего	27,50	1,07	34,96-42,21	-	-	-	

При помощи медианы дожития можно охарактеризовать группу пациентов с наличием трех и более опухолей у них она составила $29 \pm 14,35$ месяцев (рис. 14), для других подгрупп она не была достигнута.

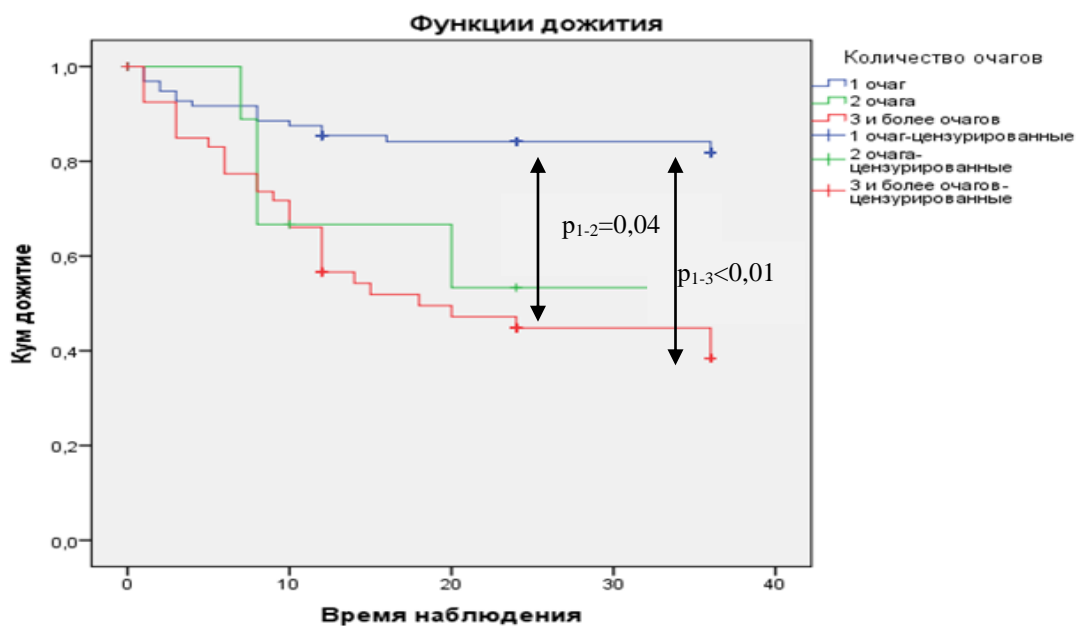


Рис. 14 - Кривые Каплана-Мейера оценки безрецидивной выживаемости у больных МНРМП в зависимости от количества опухолей.

Вероятность безрецидивного дожития до окончания 36-месячного периода наблюдения у больных МНРМП после операции при наличии одной опухоли приближается к 85%. В то же время, для пациентов с тремя и более опухолями указанная вероятность составила около 40%.

Также было проведено сравнение безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от наличия гематурии. Доля цензурированных случаев при отсутствии гематурии составила 83,5%, при наличии гематурии – 52,1%.

В таблице 45 представлена оценка безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения в зависимости от наличия гематурии. У пациентов при отсутствии гематурии время безрецидивной выживаемости составило $31,73 \pm 1,02$ месяцев, и было больше времени при отсутствии гематурии, составившей $21,86 \pm 1,88$ мес.

Таблица 45 - Оценка безрецидивной выживаемости у больных МНРМП в зависимости от наличия гематурии

Гематурия	Ср. оценка	Ст. ошибка	Среднее 95% ДИ		p по Бреслау
			Нижняя граница	Верхняя граница	
Есть	21,86	1,88	18,17	25,54	p<0,01
Нет	31,73	1,02	29,74	33,73	
Всего	27,50	1,07	25,40	29,60	

К окончанию срока наблюдения медиана безрецидивной выживаемости в группе пациентов с наличием гематурии составила 36 месяцев (рис. 15).

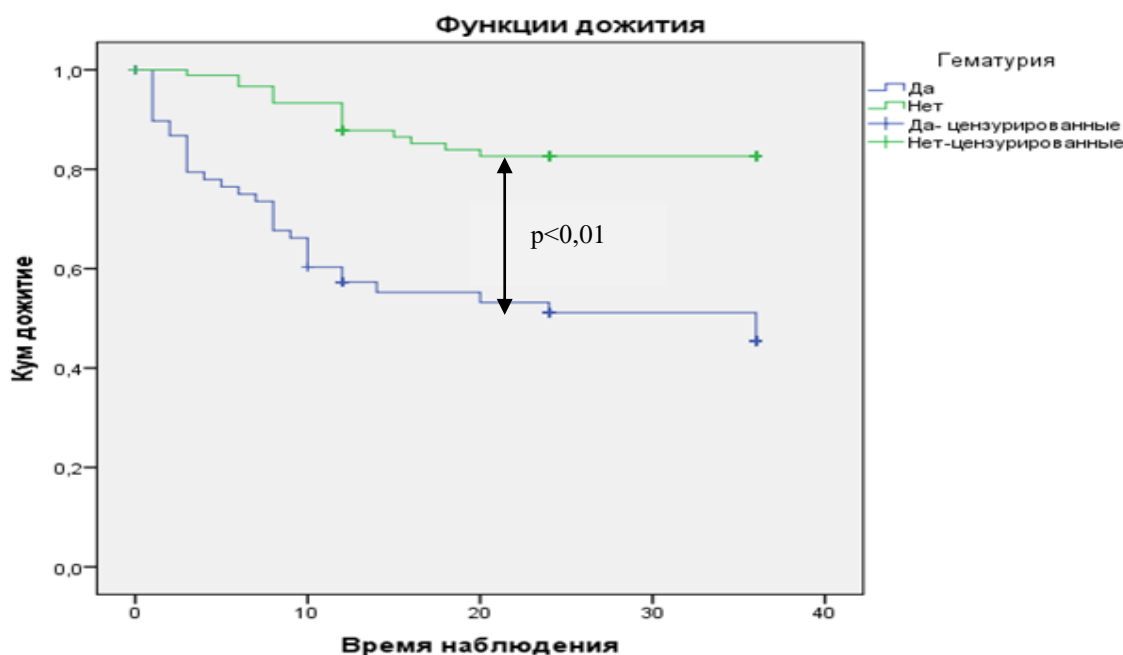


Рис. 15 - Кривые Каплана-Мейера оценки безрецидивной выживаемости у больных МНРМП в зависимости от наличия гематурии.

Вероятность безрецидивного дожития до окончания 36-месячного периода наблюдения у пациентов при отсутствии гематурии составило более 85%. В то же время, для пациентов при наличии гематурии вероятность безрецидивного дожития составила около 50%.

Таким образом, в результате проведенного комплексного математического анализа с использованием регрессии Кокса и метода Каплана-Мейера установлены клинико-морфологические параметры и характеристики митотического цикла, ассоциированные с рецидивом заболевания у больных МНРМП после комбинированного лечения: наличие более одной опухоли, наличие гематурии, доля клеток в синтетической фазе клеточного цикла в осадке мочи свыше 66,8%, а также доля клеток в фазе покоя менее 11%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В структуре заболеваемости рак мочевого пузыря находится на 9-й позиции среди всех злокачественных новообразований. Ежегодно диагностируется свыше 430 тыс. новых случаев заболевания, летальность составляет более 150 тыс. человек в год. РМП в 2,5-10 раз чаще встречается у мужчин, чем у женщин того же возраста. Так же одной из причин преобладания злокачественных новообразований мочевого пузыря среди представителей мужского пола является нарушение уродинамики в связи с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, хроническим простатитом и другими заболеваниями, ведущими к застою мочи. По степени инвазии 70-80% случаев приходится на впервые выявленный МНРМП, а 20-30% – на инвазивный.

Ввиду несовершенства большинства существующих методов ранней диагностики как первичной опухоли, так и рецидива МНРМП наиболее перспективным является исследование уринарных маркеров в силу своей неинвазивности, доступности, непосредственного контакта данной среды с опухолью, высокой чувствительности и специфичности.

Цель работы: оценка значимости клинико-морфологических показателей и фенотипического спектра клеток осадка мочи для диагностики опухоли и ее рецидива после комбинированного лечения у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря.

В исследование включены пациенты с МНРМП, получавшие комбинированное лечение в КККОД (n=162); а также практически здоровые доноры (n=69), у которых отсутствие опухоли мочевого пузыря подтверждено лабораторно-инструментальными методами диагностики. При проведении цитологического исследования мочи атипичных клеток у всех пациентов с МНРМП обнаружено не было.

Все 162 пациента были прооперированы в объеме трансуретральной резекции мочевого пузыря.

По локализации опухоли в мочевом пузыре наибольшая частота установлена по боковым и задней стенке, а также поражение нескольких стенок (мультицентричный рост). Одиночные образования встречались в 60% случаев, множественные в 40%. В большинстве случаев размер опухоли не превышал 4 см.

В 95% случаев у наблюдаемых пациентов определялся переходноклеточный вариант опухоли, по гистологической градации наиболее часто встречалась умеренная степень клеточной дифференцировки (G2), что соответствует данным литературы [51].

По стадии заболевания пациенты распределились следующим образом T_a - 48 (29,6%) пациентов, T_{is}- 10 (6,2%) и T₁ - 104 (64,2%) пациентов.

Гладкое течение послеоперационного периода было у 157 (96,9%) больных, осложненное (циститы, парациститы, паравезикальный затек) - у 5 (3,1%).

В послеоперационном периоде все пациенты получали внутривезикулярную химиотерапию митомицином С 40 мг внутривезикулярно, еженедельно, экспозиция 1-2 часа, курс 8 инстилляций.

После окончания комбинированного лечения за всеми пациентами осуществлялось динамическое наблюдение в течение 36 месяцев с использованием стандартных методов обследования.

В зависимости от клинического течения заболевания больные МНРМП, включенные в исследование, были разделены на две группы. Первую группу составили 113 (70,4%) больных МНРМП без рецидива заболевания, вторую – 49 (29,6%) пациентов с рецидивом.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием компьютерных программ «Microsoft Office Excel 2013», «IBMSPSS 20.0».

Во всех случаях после соответствующей подготовки материала по стандартной методике осуществлялось изучение поверхностных антигенов: CD13, CD15 и CD45 клеточных элементов осадка мочи методом флуоресцентного окрашивания соответствующими антителами CD13, CD15, CD45, а также клеточного цикла на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (BectonDickinson, США).

Общая опухолеспецифическая 3-летняя выживаемость у больных МНРМП составила 100%, безрецидивная выживаемость - 69,8%. Среднее время безрецидивной выживаемости пациентов составило $27,50 \pm 1,07$ месяцев (ДИ 95% 25,40 - 29,60) (рис. 3.1).

Среднее время до возникновения рецидива составило $10,21 \pm 0,84$ мес. Один рецидив за весь период динамического наблюдения (36 месяцев) отмечался у 44(89,8%) пациентов, два - у 3(6,12%), три - у 2(4,08%) пациентов.

При оценке сроков возникновения рецидива у пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря установлено, что практически в 82% случаев он развивается в первый год после комбинированного лечения.

Изучение сопряженности клинической симптоматики с рецидивом заболевания показало, что у пациентов 1 группы (без рецидива) гематурия встречалась в 2,2 раза чаще ($p < 0,05$), чем у больных с рецидивирующим течением МНРМП (2 группа). Другие клинические проявления заболевания не имели статистически значимых различий в сравниваемых группах.

При анализе размеров опухоли у пациентов с МНРМП, выявлено, что размер опухоли 0,5-1 см в 2,2 ($p < 0,05$) раза чаще регистрировался у пациентов с рецидивирующим течением в сравнении с группой больных без рецидива заболевания. Кроме того, опухоль боковой стенки мочевого пузыря в 2,4 ($p < 0,05$) раза чаще диагностировалась у пациентов 1 группы в сравнении со 2 группой больных. Множественные опухоли в 3,1 ($p < 0,01$) раза чаще регистрировались у пациентов с рецидивирующим течением.

При анализе стадии заболевания у пациентов с МНРМП было установлено увеличение в 5,3 ($p < 0,05$) раза числа пациентов CIS по сравнению с пациентами без рецидива заболевания. Изучение степени дифференцировки опухоли мочевого пузыря у пациентов с МНРМП показало статистически значимые различия только при 3-й степени клеточной анаплазии (G3).

Проведен сравнительный анализ показателей клеточного цикла, а также экспрессии CD13, CD15, CD45 антигенов на клетках осадка мочи в группе пациентов с МНРМП и в контрольной группе.

Обнаружено увеличение экспрессии CD13 ($p < 0,0001$), CD15 ($p < 0,0001$), CD45 ($p < 0,0001$) антигенов у пациентов с МНРМП по сравнению с группой контроля. Доля клеток в осадке мочи во всех фазах клеточного цикла статистически значимо отличалась у пациентов с МНРМП по сравнению с группой контроля. Исключением являлась только фаза покоя (G_0), где доля клеток остается неизменной.

Сравнительный анализ показателей клеточного цикла у больных с МНРМП, выявил увеличение доли клеток в S-фазе ($70,15 \pm 6,58$) у пациентов с рецидивирующим течением заболевания, в сравнении с 1 группой ($p < 0,05$).

При оценке результатов корреляционного анализа в группе пациентов без рецидива МНРМП между показателями, отражающими экспрессию CD13, CD15 и CD45 антигенов на клетках осадка мочи выявлены достоверные положительные корреляционные связи слабой силы. В то время как корреляционная взаимосвязь между фазами клеточного цикла характеризовалась только отрицательными достоверными корреляционными связями слабой силы.

По своему качественному составу установленные корреляционные связи в группе пациентов с рецидивирующим течением МНРМП повторяют характер связей, обнаруженных в группе пациентов с течением МНРМП без рецидивов. При этом в данной группе наблюдаемых пациентов обнаруженные корреляционные связи значительно по силе превосходят корреляционные взаимосвязи в группе пациентов с безрецидивным течением заболевания.

Количество корреляционных связей между фазами клеточного цикла, а также их взаимосвязей с показателями, характеризующими экспрессию поверхностных клеточных антигенов (CD13, CD15, CD45) было 2 раза меньше, чем в группе пациентов с безрецидивным течением МНРМП.

Необходимо отметить, что в группе пациентов с рецидивирующим течением МНРМП по сравнению с группой больных без рецидивирования заболевания не установлено достоверных корреляционных связей между экспрессией поверхностных антигенов (CD13, CD15, CD45) и фазами клеточного цикла.

Для определения переменных, позволяющих оценить информативность клинико-морфологических параметров и фенотипических характеристик клеток осадка мочи (показатели экспрессии CD13, CD15, CD45 антигенов, а также клеточного цикла) в отношении наличия опухоли мочевого пузыря, а также риска развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения использованы методы дискриминантного и логистического анализа.

Наибольшую информативность в отношении наличия опухоли мочевого пузыря продемонстрировали параметры экспрессии CD15 и CD45 на клетках осадка мочи, а также доля клеток в синтетической и митотической фазах клеточного цикла. Разработанная логистическая регрессионная модель обладает чувствительностью - 91,4% и специфичностью – 65,2%. Общий процент корректных предсказаний составил 83,5%.

Статистически значимыми предикторами рецидива МНРМП после комбинированного лечения являются повышение доли клеток осадка мочи в S-фазе, снижение в G0-фазе, наличие гематурии и мультицентричность опухолевого роста. Разработанная математическая модель имеет высокую специфичность - 91,2%, чувствительность - 69,4%, общая прогностическая точность - 84,5%.

Проведена оценка влияния изучаемых факторов на время безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения. В регрессионной модели Кокса с включением в качестве возможных предикторов показателей клеточного цикла максимальную информативность продемонстрировали показатели: доля клеток осадка мочи в S-фазе ($p=0,04$) и G0-фазе ($p=0,02$) митотического цикла. При включении в модель клинико-морфологических параметров прогностическую значимость показали: количество опухолей ($p<0,01$) и наличие гематурии ($p<0,01$). Факторами, ассоциированными с неблагоприятным прогнозом относительно длительности периода до развития рецидива заболевания являются повышение доли клеток осадка мочи в S-фазе и G0-фазе митотического цикла. При этом время безрецидивной выживаемости снижается при наличии гематурии и множественных опухолей.

С помощью регрессии Кокса установлены уровни клинко-морфологических параметров и показателей клеточного цикла, ассоциированные с развитием рецидива заболевания у пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря после комбинированного лечения: количество опухолей, наличие гематурии, доля клеток осадка мочи в синтетической фазе клеточного цикла свыше 66,8%, а также доля клеток, находящихся в фазу покоя менее 11,0%.

При оценке безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от количества опухолей, доля цензурированных случаев при наличии одного образования составила 83,7%, при двух опухолях – 60%, при наличии трех и более – на момент окончания периода наблюдения рецидив отсутствовал у 43,3% пациентов. Наибольшая точечная оценка среднего времени безрецидивной выживаемости пациентов была отмечена при наличии одной опухоли и составила $31,28 \pm 1,17$ мес. Вероятность безрецидивного дожития до окончания 36-месячного периода наблюдения у больных МНРМП после комбинированного лечения при наличии одной опухоли приближается к 85%. В то же время, для пациентов с тремя и более опухолями такая вероятность составила около 40%.

У пациентов при отсутствии гематурии время безрецидивной выживаемости составило $31,73 \pm 1,02$ мес, и, было статистически значимо выше показателя при отсутствии гематурии - $21,86 \pm 1,88$ мес. Вероятность безрецидивного дожития до окончания 36-месячного периода наблюдения у пациентов при отсутствии гематурии составило более 85%. В то же время, для пациентов при наличии гематурии вероятность безрецидивного дожития составила около 50%.

Таким образом, проведенное исследование позволило оптимизировать подходы к диагностике первичной опухоли мочевого пузыря, а также оценить риск развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения на основании изучения клинко-морфологических параметров и фенотипических характеристик клеток осадка мочи. Разработаны математические модели, позволившие с высокой точностью определить дополнительные информативные критерии наличия первичной опухоли в мочевом пузыре. Установлены предикторы

рецидивирующего течения МНРМП после комбинированного лечения, что позволяет персонифицировать подходы к динамическому наблюдению данной категории больных.

ВЫВОДЫ

1. Определены клинико-морфологические параметры, ассоциированные с высоким риском развития рецидива МНРМП: наличие гематурии ($p < 0,01$), содержание базофилов периферической крови ($p < 0,05$), размер опухоли 0,5-1 см ($p < 0,05$), мультицентричность роста ($p < 0,01$), низкая степень дифференцировки опухоли (G3) ($p < 0,01$), наличие T_{IS} ($p < 0,05$).

2. Выявлено увеличение экспрессии CD13 ($p < 0,0001$), CD15 ($p < 0,0001$), CD45 ($p < 0,0001$) антигенов клетками осадка мочи, уменьшение доли клеток, находящихся в синтетической фазе клеточного цикла ($p < 0,0001$), а также увеличение доли клеток в пресинтетической ($p < 0,0001$), постсинтетической ($p < 0,0001$) и фазе митоза ($p < 0,05$) у пациентов с МНРМП по сравнению с лицами без опухолевой патологии. У больных с рецидивирующим течением заболевания отмечено увеличение доли клеток в синтетической фазе митотического цикла ($p < 0,05$).

3. У больных МНРМП установлены корреляционные взаимосвязи между фазами митотического цикла и экспрессией поверхностных антигенов CD13, CD15, CD45 на клетках осадка мочи. Количество и сила обнаруженных взаимосвязей зависит от характера течения заболевания: только при безрецидивном течении наблюдается прямая корреляционная взаимосвязь между экспрессией CD15 и G1 фазой клеточного цикла ($r = 0,26$; $p < 0,01$); при рецидиве заболевания количество связей уменьшается, а их сила возрастает.

4. Наибольшую информативность в диагностике опухоли мочевого пузыря продемонстрировала регрессионная модель, построенная на основе оценки экспрессии CD15, CD45 антигенов и доле клеток в синтетическую фазу клеточного цикла и митозе (чувствительность составила 91,4%, специфичность - 65,2%, общая точность - 83,5%).

5. Предикторами уменьшения длительности периода безрецидивной выживаемости больных МНРМП после комбинированного лечения являются: наличие гематурии, мультицентричный характер опухолевого роста, а также увеличение в осадке мочи доли клеток в S-фазе более 66,8% и снижение в G0-фазе менее 11,0%. Данные факторы положены в основу наиболее точной прогностической модели оценки риска развития рецидива заболевания с чувствительностью - 69,4%, специфичностью - 91,2%, общей прогностической точностью - 84,5%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1 Рекомендовано использовать в качестве дополнительных информативных критериев первичной диагностики МНРМП определение в осадке мочи показателей митотического цикла, а также экспрессии CD13, CD15 и CD45 антигенов; при оценке риска развития рецидива МНРМП – показателей митотического цикла.

2. Наличие гематурии, мультицентричный характер опухолевого роста, увеличение в осадке мочи доли клеток в S-фазе митотического цикла более 66,8% и снижение в G0-фазе менее 11,0% свидетельствует о высоком риске развития рецидива МНРМП после проведенного комбинированного лечения.

3. В клинической практике рекомендуется использовать разработанную регрессионную математическую модель для оптимизации схемы динамического наблюдения у больных МНРМП после комбинированного лечения:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-4.957 + 0.061x_1 - 0.070x_2 + 1.743x_3 + 0.729x_4)}}$$

где

p – вероятность развития рецидива МНРМП,

x_1 – доля клеток осадка мочи в S-фазе клеточного цикла,

x_2 – доля клеток осадка мочи в G0-фазе клеточного цикла,

x_3 – наличие гематурии (0 – отсутствие, 1 - наличие),

x_4 – мультицентричность опухолевого роста ($b_4 = 0,729$).

При $p < 0,5$ – низкий риск развития рецидива МНРМП, при $p \geq 0,5$ – высокий риск развития рецидива заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аль-Шукри, С.А. Прогностические молекулярно-генетические маркеры рака мочевого пузыря (обзор литературы) / Аль-Шукри С.А., [и др.] // Онкология. – 2009. – № 2. – С. 78–84.
2. Аль-Шукри, А.С. Возможности молекулярно-генетических исследований для прогнозирования рака мочевого пузыря / А.С. Аль-Шукри, В.Н. Ткачук, М.В. Дубина // Нефрология, 2010. - Т. 14, №2. - С. 67-71.
3. Аль-Шукри, А.С. Пути оптимизации ранней диагностики и прогноза рака мочевого пузыря: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук. - Санкт-Петербург, 2010. – 25 с.
4. Андреева, Ю. Ю., Франк, Г. А. Опухоли мочевыделительной системы и мужских половых органов. Морфологическая диагностика и генетика: Руководство для врачей. – М., 2012. –216 с.
5. Андреева, Ю.Ю. Морфологические и молекулярно-биологические факторы прогноза рака мочевого пузыря: Автореферат на соискание учёной степени доктора медицинских наук, 14.00.14. - Москва, 2009. - 164 с.
6. Антонов, В.Г. Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы. Внеклеточные и клеточные механизмы общей иммунодепрессии и иммунной резистентности / В. Г. Антонов, В. К. Козлов // Цитокины и воспаление, 2004. - Т. 3, №1 - С. 8-19.
7. Аполихин, О.И. Сравнительное исследование ряда коммерческих маркеров рака мочевого пузыря в реальной клинической практике / О.И. Аполихин, [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. 2015. № 1. С. 48-53.
8. Ахмадишина, Л.З. Поиск ассоциации полиморфных локусов *vegf*, *vcam1*, *pcam1*, *icam1* с риском развития рака мочевого пузыря / Ахмадишина, Л.З., [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. 2015. Т. 10. № 3. С. 209-212.
9. Ахмадишина, Л.З. Поиск маркёров риска развития рака мочевого пузыря на основе изучения полиморфных вариантов генов системы АНР-СУР /

Л.З. Ахмадишина, [и др.] // Медицинская генетика. 2013. Т. 12. № 10 (136). С. 29-34.

10. Бабаян, А.Ю. Молекулярно-генетические изменения, определяющие патогенез поверхностного и инвазивного рака мочевого пузыря / А.Ю. Бабаян [и др.] // Молекулярная биология, 2011. - Т. 45, №6. - С. 1012-1016.

11. Бабаян, А.Ю. Подтверждение значения теории полей канцеризации в генезе поверхностного рака мочевого пузыря / А.Ю. Бабаян [и др.] // Молекулярная биология, 2013. - №1. – С. 24-28.

12. Волгарева, Г.М. Вирус папилломы человека как фактор риска при раке мочевого пузыря / Г.М. Волгарева [и др.] // Онкоурология, 2010. - №4. – С. 92-102.

13. Волченко, Н.Н. Диагностика рака мочевого пузыря с использованием цитологического и молекулярно-цитогенетического методов исследования / Н.Н. Волченко, М.В. Савостикова, О.В. Борисова // Справочник заведующего КДЛ, 2011. - №6. - С. 53-57.

14. Воробцова, И.Е. Применение метода флуоресцентной гибридизации *in situ* на клетках осадка мочи для диагностики рака мочевого пузыря и его рецидивов / И.Е. Воробцова [и др.] // Онкоурология, 2011. - №1. - С. 73-78.

15. Воронцова, И.Е. Диагностика рецидивов рака мочевого пузыря с помощью fish-метода, осуществляемого на клетках осадка мочи / И.Е. Воронцова [и др.] // Онкоурология, 2013. - №2. - С. 35-41.

16. Гадаборшев, М.И. Проблемы организации оказания урологической помощи населению (на примере Краснодарского края) / М.И.Гадаборшев, М.М. Левкевич // Сибирская финансовая школа, 2012. - №2. - С. 22-28.

17. Ганцев, Ш.Х. Способ прогнозирования отдаленных результатов лечения рака мочевого пузыря / Ш.Х.Ганцев, А.А. Зимичев, В.Н.Маклаков // Патент на изобретение РФ №2456926 от 05.07.2010.

18. Глыбочко, П.В. Значение маркеров опухолевого роста и ангиогенеза в диагностике рака мочевого / П.В. Глыбочко [и др.] // Онкология. – 2009. – № 2. – С. 56–60.

19. Глыбочко, П.В. Роль активности теломеразы в неинвазивной диагностике рака мочевого пузыря / П.В. Глыбочко, [и др.] // Урология, 2016. - № 4. - С. 76-81.

20. Государственный доклад о состоянии здоровья населения и деятельности здравоохранения Красноярского края в 2012 году. – Красноярск: ККМИАЦ, 2013 – 344 с.

21. Государственный доклад о состоянии здоровья населения и деятельности здравоохранения Красноярского края в 2014 году. – Красноярск, 2015 – 279 с.

22. Государственный доклад о состоянии здоровья населения и деятельности здравоохранения Красноярского края в 2013 году. – Красноярск, 2014 – 278 с.

23. Гришечкина, Л.В. Является ли гидронефроз самостоятельным прогностическим признаком при раке мочевого пузыря? / Л.В. Гришечкина // Бюллетень медицинских интернет-конференций, 2014. - Т. 4, №5. - С. 784.

24. Давыдов, М.И., Максимович Д.И., Заридзе Д.Г. Динамика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в России / М.И. Давыдов, Д.И. Максимович, Д.Г. Заридзе // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина, 2015. Т. 26 (Допол.). – С. 1–57.

25. Данильченко, Д.И. Диагностическая и прогностическая ценность определения матрикс-металлопротеаз в моче у больных раком мочевого пузыря / НЕФРОЛОГИЯ: Северо-западная ассоциация нефрологов и врачей диализа. Научно-практический журнал. — 2009. — Том 13, № 1. — С. 87—89.

26. Двойственная роль толлподобных рецепторов в регуляции противоопухолевого иммунитета / И. Ю. Чикилева, А. В. Караулов, Н. Ю. Анисимова [и др.] // Иммунология. – 2010. – №1. – С. 52–55.

27. Державец, Л.А. Лабораторные показатели и выживаемость пациентов, страдающих раком мочевого пузыря / Л.А. Державец // Сибирский онкологический журнал, 2013. - №4(58). - С. 12-16.

28. Ебле, Й.Н. Классификация опухолей Всемирной организации здравоохранения / Й.Н. Ебле [и др.] // Патологическая анатомия и генетика опухолей мочевыделительной системы и мужских половых органов. – 2004. – № 7. – С. 90–157.
29. Жилиева, А.Л. Состояние здоровья населения и загрязнение окружающей среды от объектов экономики / А.Л. Жилиева, А.В. Савченко А.В. // Поволжский торгово-экономический журнал, 2014. - № 1 (35). - С. 27-34.
30. Заболеваемость раком предстательной железы, почки и мочевого пузыря в России и Омской области / О. В. Леонов, В. Т. Долгих, Е. И. Копыльцов [и др.] // Онкоурология. – 2008. – № 1. – С. 63–67.
31. Заболотнева, А.А. Молекулярные маркеры рака мочевого пузыря: от частного к целому / А.А. Заболотнева, [и др.] // Онкоурология. 2011. - №3. – С. 16-19.
32. Заболотнева, А.А. Способ диагностики рака мочевого пузыря с помощью онкомаркера TFDP1 (варианты) и набор для его осуществления / Заболотнева А.А., [и др.] // патент на изобретение RUS 2463354, от 16.03.2011.
33. Заболотнева, А.А. Способ оценки эффективности терапии рака мочевого пузыря человека методом иммуноферментного анализа / А.А. Заболотнева [и др.] // Патент на изобретение РФ №2468088 от 16.03.2011.
34. Завьялова, Е.С. Значение классических морфологических признаков для прогнозирования течения переходно-клеточного рака мочевого пузыря / Е.С. Завьялова [и др.] // Нефрология, 2010. - Т. 14, №1. - С. 81-85.
35. Завьялова, Е.С. Клинико-морфологические критерии прогнозирования клинического течения переходно-клеточного рака мочевого пузыря: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. - Санкт-Петербург, 2010. – 156 с.
36. Зимичев А.А., Климентьева М.С., Корабельников А.С. Возможности ранней диагностики рака мочевого пузыря и ее влияние на прогноз заболевания / А.А. Зимичев, М.С. Климентьева, А.С. Корабельников // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2015. - Т. 17, № 5-3. - С. 780-785.

37. Зимичев, А.А. Комплексный подход к прогнозированию отдаленных результатов лечения рака мочевого пузыря / А.А. Зимичев, М.Б. Пряничникова, В.Н. Маклаков // Урология, 2010. - №3. - С. 47-49.

38. Зимичев, А.А. Морфолого-математическая оценка роли факторов в прогнозировании отдаленных результатов лечения рака мочевого пузыря / А.А. Зимичев [и др.] // Креативная хирургия и онкология, 2010. - №4. - С. 33-35.

39. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) / под ред. В. И. Чиссова, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М. : ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрав соцразвития России, 2012. – 260 с.

40. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М. : ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2014. – 250 с.

41. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России. – 2015. – илл. –250 с.

42. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена -филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, – 2017. – илл. – 250 с.

43. Иванова, А. Е. Методология оценки экономических потерь от нездоровья / А. Е. Иванова, А. Ю. Михайлов // Менеджер здравоохранения. – 2012. – № 2. – С. 33–37.

44. Измайлов, А.А. Молекулярно-генетические маркеры прогноза при поверхностном раке мочевого пузыря / А.А. Измайлов [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана, 2011. - Т. 6, №5. - С. 47-51.

45. Кипп, Б.Р. Количественная оценка флуоресцентной гибридизации в диагностике рецидивов рака мочевого пузыря и его прогрессии в

мышечноинвазивную стадию / Б.Р. Кипп [и др.] // Мол. диагн. – 2009. – № 11(2). – С. 148–154.

46. Иммуногистохимические маркеры рака мочевого пузыря. Обзор литературы // Молодежный научный форум: Естественные и медицинские науки: электр. сб. ст. по материалам I студ. междунар. заочной науч.-практ. конф. — М.: «МЦНО». — 2013 — № 1(1) / [Электронный ресурс] — Режим доступа. — URL: https://nauchforum.ru/archive/MNF_nature

47. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком мочевого пузыря / М.И. Волкова [и др.]. – Москва, 2014. – 32 с.

48. Когана, М.И. Краткие рекомендации // Европейская ассоциация урологов. – 2011. – С. 7-29.

49. Когония, Л.М. Анализ заболеваемости злокачественными новообразованиями в САО И СЗАО Москвы (в сравнении с Россией и Москвой) / Л.М. Когония // Социальные аспекты здоровья населения, 2012. - Т. 25, № 3. - С. 5.

50. Кузьменко, А.В. Флюоресцентная цистоскопия в диагностике и лечении рецидивов поверхностного рака мочевого пузыря / Кузьменко А.В., [и др.] // Прикладные информационные аспекты медицины, 2016. - Т. 19, № 3. - С. 200-205.

51. Лелявин, В.К. Мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря: клинические и морфологические особенности, результаты, анализ выживаемости / К.Б. Лелявин, В.В. Дворниченко // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН, 2013. - №5(93). - С. 53-59.

52. Леонов, М.Г. Совершенствование цитологической диагностики рака мочевого пузыря / М.Г. Леонов, [и др.] // Онкоурология. 2014. № 4. С. 37-41.

53. Леонов, М.Г. Изучение заболеваемости раком мочевого пузыря в Краснодарском крае в 2003-2012 гг. / М.Г. Леонов [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник, 2014. - № 3. - С. 72-77.

54. Люлько, А.В., Молчанов Р.Н., Шпонька И.С. Оценка экспрессии маркеров клеточного цикла и межклеточной адгезии у пациентов с

поверхностным раком мочевого пузыря / А.В. Люлько, Р.Н. Молчанов, И.С. Шпонька // Урологія=Урология, 2012. - Т. 16, № 1 (60). - С. 52-60.

55. Майсков, И.И. Сравнительная оценка белков мочи как потенциальных маркеров в диагностике рака мочевого пузыря / И.И. Майсков [и др.] // Астраханский медицинский журнал, 2013. - Т. 8, №4. - С. 21-27.

56. Матвеев, В.Б. Возможности применения метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (fish) в диагностике рака мочевого пузыря и его рецидивов / В.Б. Матвеев [и др.] // Онкоурология, 2011. - №4. - С. 90-96.

57. Методология расчета экономических потерь от смертности, заболеваемости и инвалидизации населения: приказ Минздравсоцразвития РФ от 10.04.2012 № №323-н // Бюл. нормативных актов федеральных органов исполнительной власти. – 2012. – № 34. – 20 авг.

58. Михайленко, Д.С. Определение мутации генов FGFR3 и PIK3CA в ДНК из осадка мочи у больных раком мочевого пузыря / Михайленко Д.С., [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология, 2015. -№ 4. - С. 38-41.

59. Михайленко, Д.С., Кушлинский Н.Е. Соматические мутации и аберрантное метилирование - потенциальные генетические маркеры рака мочевого пузыря / Д.С. Михайленко, Н.Е. Кушлинский // Клиническая лабораторная диагностика, 2016. - Т. 61, № 2. - С. 78-83.

60. Михайлов, В.Ю. Клинико-диагностическое значение биомаркеров в выборе лечебной тактики при немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря: диссертация ... кандидата медицинских наук, 14.01.23 / ГОУВПО "Саратовский государственный медицинский университет". Саратов, 2011. – 139 с.

61. Молчанов, Р.Н., Шпонька И.С. Иммуногистохимическая оценка рака мочевого пузыря, протекающего на фоне хронического воспаления / Р.Н. Молчанов, И.С. Шпонька // Морфологія. 2014. Т. 8. № 3. С. 42-49.

62. Молчанов, Р.Н., Шпонька И.С. Экспрессия маркеров воспаления и оксидативного стресса у пациентов с раком мочевого пузыря / Р.Н. Молчанов, И.С. Шпонька // Урологія=Урология, 2011. -Т. 15, № 4 (59). - С. 46-52.

63. Немцова, М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярный патогенез рака мочевого пузыря / М.В. Немцова, Н.Е. Кушлинский // Альманах клинической медицины. 2015. № 41. С. 79-88.
64. Опенко, Т.Г. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в Новосибирске по данным популяционного регистра рака / Т.Г. Опенко, Г.И. Симонова // Мир науки, культуры, образования, 2011. - № 6-2. - С. 404-408.
65. Павлов, В.Н. Генетические маркеры прогноза рецидива поверхностного рака мочевого пузыря / В.Н. Павлов [и др.] // Уральский медицинский журнал. 2012. - №3. - С. 20-23.
66. Павлов, В.Н. Генетические факторы риска развития рака мочевого пузыря / В.Н. Павлов В.Н. [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология, 2010. - №2. - С. 30-33.
67. Павлов, В.Н. Молекулярные маркеры прогноза при раке мочевого пузыря / В.Н. Павлов [и др.] // Онкоурология, 2012. - №2. - С. 32-37.
68. Перепечин, Д.В. Прогнозирование течения местно-распространенного рака мочевого пузыря на основе математического моделирования / Д.В. Перепечин, А.М. Ульбашев // В книге: Материалы XIII Конгресса Российского общества урологов, 2013. - С. 364-365.
69. Понукалин, А.Н. Влияние метода деривации мочи на отдаленные результаты и качество жизни у больных раком мочевого пузыря после радикальной цистэктомии / А.Н. Понукалин [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана, 2011. - Т. 6, №2. - С. 195-200.
70. Понукалин, А.Н. Оценка эффективности различных иммуногистохимических маркеров в стадировании и прогнозе мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря / А.Н. Понукалин, Г.Н. Маслякова, Е.Н. Цмокалюк // Саратовский научно-медицинский журнал, 2014. - Т. 10, №1. - С. 124-128.
71. Праворов, А.В. Проблемы клинического стадирования при раке мочевого пузыря до радикальной цистэктомии / А.В. Праворов // Онкологический журнал, 2013. - Т. 7, №3(27). - С. 47-51.

72. Пушкин, А.С., Рыжак Г.А., Парфёнов Ю.А. Технология флуоресцентной *in situ* гибридизации в ранней диагностике рецидива рака мочевого пузыря у лиц пожилого и старческого возраста / А.С. Пушкин, Г.А. Рыжак, Ю.А. Парфёнов // *FundamentalResearch*, 2012. - №10. – С. 296-299.

73. Пушкин, А.С. Ранняя диагностика рецидива рака мочевого пузыря методом флуоресцентной *in situ* гибридизации в первые 24 мес после трансуретральной резекции мочевого пузыря у лиц пожилого и старческого возраста / А.С.Пушкин, Г.А. Рыжак // *Успехи геронтологии*, 2012. - Т. 25, №4. - С. 745-748.

74. Пушкин, А.С. Флуоресцентная *in situ* гибридизация в диагностике рецидивов поверхностного рака мочевого пузыря после трансуретральной резекции у лиц пожилого и старческого возраста / А.С. Пушкин: диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.01.30. - Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии Северо-Западного отделения РАМН, Санкт-Петербург, 2012. – 177 с.

75. Русаков, И.Г. Флуоресцентная цистоскопия у больных немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря / И.Г. Русаков // *Biomedical Photonics*. 2015. - Т. 4, № 3. - С. 29-35.

76. Русаков, И.Г. Флуоресцентные методы диагностики и неинвазивный рак мочевого пузыря: состояние проблемы / И.Г. Русаков [и др.] // *Урология*, 2008. - №3. - С. 67-72.

77. Русаков, И.Г. Фотодинамическая диагностика и флуоресцентная спектроскопия при поверхностном раке мочевого пузыря / И.Г. Русаков [и др.] // *Онкоурология*, 2009. - №4. - С. 41-46.

78. Рязанцев, Е.А. Иммунобиологические аспекты канцерогенеза рака мочевого пузыря (обзор литературы) / Е. В. Рязанцев [и др.] // *Вестник Мордовского университета*, 2013. – №1-2. - С.136-142.

79. Сафиуллин, К.Н. Клиническое значение некоторых иммуногистохимических маркеров при немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря / К.Н. Сафиуллин [и др.] // *Онкоурология*, 2010. - №4. - С. 36-41.

80. Сивков, А.В. Молекулярно-генетические маркеры рака мочевого пузыря в клинической практике / А.В. Сивков [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология, 2013. - №3. - С. 48-55.
81. Сеницина, О.В. Молекулярно-генетическая методика оценки риска неблагоприятного течения заболевания при поверхностном раке мочевого пузыря / О.В. Сеницина [и др.] // Медицинский алфавит, 2014. - Т. 3. - №15. - С. 56-57.
82. Слесаревская М.Н., Соколов А.В. Опыт применения флюоресцентной цистоскопии в диагностике поверхностного рака мочевого пузыря / М.Н. Слесаревская, А.В. Соколов // Урологические ведомости, 2014. - Т. 4, № 1. - С. 3-7.
83. Смаль, М.П. Мутации гена TP53 и их прогностическая значимость при раке мочевого пузыря / М.П. Мпаль, [и др.] // Молекулярная медицина. 2015. № 6. С. 26-32.
84. Состояние онкологической помощи населению России в 2011 году / под ред. В. И. Чиссова, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М. : ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. – 240 с.
85. Состояние онкологической помощи населению России в 2012 году / Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М.: ФГБУ «МНИОИ им. П. А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2013. – 232 с.
86. Состояние онкологической помощи населению России в 2013 году / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М. : ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2014. – 235 с.
87. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М. : ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2015. – 236 с.
88. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М. : ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2016. – 236 с.

89. Спирина, Л.В. Активность протеасом и их субъединичный состав при раке почки и мочевого пузыря / Л.В. Спирина [и др.] // Онкоурология, 2010. - №3. - С. 12-15.
90. Старцев, В.Ю., Колмаков А.Ю. Совершенствование алгоритма диагностики рака мочевого пузыря, обусловленного мочеполовым шистосомозом / В.Ю. Старцев, А.Ю. Колмаков // Медицинский вестник Башкортостана. 2015. Т. 10, № 3. С. 196-199.
91. Траксов, И.С. Особенности заболеваемости раком мочевого пузыря в разных группах населения республики Мордовия (по данным за 2010 год) / И.С. Траксов [и др.] // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке, 2013. - Т. 15, № 1-4. - С. 358-359.
92. Троянов, А.В. Диагностика и прогнозирование рецидива немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря при помощи клинических методов и fish-анализа (обзор литературы) / А.В. Троянов // Онкоурология, 2012. - №3. - С. 43-51.
93. Хачатурян, А.В. Использование реакции флуоресцентной *in situ* гибридизации при раке мочевого пузыря: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук. Москва, 2012 - 29 с.
94. Цмокалюк, Е.Н. Иммуногистохимические маркеры прогноза развития рецидива неинвазивных уротелиальных карцином / Е.Н. Цмокалюк, Г.Н.Маслякова // Бюллетень медицинских интернет-конференций, 2013. - Т. 3, №4. - С. 902-905.
95. Чернышев, И.В. Иммуногистохимические и молекулярно-генетические факторы прогноза при ранних стадиях инвазивного рака мочевого пузыря / И.В. Чернышев [и др.] // Онкоурология, 2011. - №3. - С. 20-25.
96. Чиссов, В.И. Злокачественные новообразования в России в 2008 г. (заболеваемость и смертность) / В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова // ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий», 2010. - 256с.

97. Шишло, Л.М. Определение диагностической и прогностической ценности растворимого рецептора фактора некроза опухоли p55 при раке мочевого пузыря / Л.М. Шишло [и др.] // Онкологический журнал, 2009. - Т. 3, №2(10). - С. 39-45.
98. Abogunrin, F. The impact of biomarkers in multivariate algorithms for bladder cancer diagnosis in patients with hema-turia / F. Abogunrin, [et al.] // Cancer. 2012. Vol. 118. N 10. P. 2641-2650.
99. Al-Ahmadie, H.A., Chen Y.B., Reuter V.E. Molecular diagnostics of bladder and kidney cancers / Principles of Molecular Diagnostics and Personalized Cancer Medicine, 2012. - С. 492-505.
100. Amirghofran, Z., Monabati A., Khezri A. Apoptosis in transitional cell carcinoma of bladder and its relation to proliferation and expression of p53 and bcl-2// Pathol Oncol Res, 2004. - V. 10, №3. - P. 154.
101. Androutsopoulos, V.P. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention / V.P. Androutsopoulos, A.M. Tsatsakis, D.A. Spandidos // BMC Cancer. – 2009. – Vol. 9. – pp. 187-189.
102. Aoki, S. Thymidine phosphorylase expression as a prognostic marker for predicting recurrence in primary superficial bladder cancer / S. Aoki [et al.] // Oncol. Rep., 2006. - Vol. 16. – pp. 279-284.
103. Babjuk, M. Guidelines on TaT1 (nonmuscle invasive) bladder cancer. European Association of Urology (EAU) / M. Babjuk [et al.] // Eur. Urol. – 2008, Aug. – Vol. 54 (2). – pp. 303-314.
104. Balci, M, Tuncel A, Guzel O, Aslan Y, Sezgin T, Bilgin O, Senel C, Atan A. Use of the nuclear matrix protein 22 BladderChek test in the diagnosis of residual urothelial cancer before a second transurethral resection of bladder cancer. //Int Urol Nephrol. 2015 Vol. 47, N.3 P. 473-477
105. Bartsch, G. Expression profiling for bladder cancer: strategies to uncover prognostic factors / G. Bartsch, A.P. Mitra, R.J. Cote // Expert Review of Anticancer Therapy, 2010. - Vol. 10 (12). – pp. 1945-1954.

106. Beyan, C. Variant hairy cell leukemia following papillary urothelial neoplasm of bladder / C. Beyan, K. Kaptan // J. Coll. Physicians. Surg. Pak., 2014, Mar. – Vol. 24, 1. – P. 27-28.

107. Birkhahn, M. Mitra A.P., Cote R.J. Molecular markers for bladder cancer: the road to a multimarker approach Expert Rev / M. Birkhahn, A.P. Mitra, R.J. Cote // Anticancer Ther., 2007. - Vol. 7 (12). - pp. 1717-1727.

108. Birkhahn, M. Predicting recurrence and progression of noninvasive papillary bladder cancer at initial presentation based on quantitative gene expression profiles / M. Birkhahn, A.J. Williams // Eur. Urol., 2010. - Vol. 57 (1). - pp. 12-20.

109. Brauers, A. Second resection and prognosis of primary high risk superficial bladder cancer: is cystectomy often too early? / A. Brauers, R. Buettner, G. Jakse // J. Urology. – 2001, Mar. – Vol. 165 (3). – pp. 808-810.

110. Brown, N.S. Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors / N.S. Brown [et al.] // Cancer Res., 2000. - Vol. 6. – pp. 298-302.

111. Bryan, R.T. Urinary EpCAM in urothelial bladder cancer patients: characterisation and evaluation of biomarker potential / R.T. Bryan, [et al.] // Br. J. Cancer, 2014. – Vol. 4, №110(3). – P. 679-685.

112. Cancer Vaccines: Pessimism in Check / S. Mocellin, S. Mandruzzato, V. Bronte, F. Marincola // Nat. Med. 2004. - Vol. 10. - pp. 1278-1280.

113. Cheng, L. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice / L. Cheng, [et al.] // Hum. Pathol., 2011. - Vol. 42, №4. – P. 455-458.

114. Chu H., Wang M., Zhang Z. Bladder cancer epidemiology and genetic susceptibility / H. Chu, M. Wang, Z. Zhang // Journal of Biomedical Research, 2013. - T. 27, № 3. - C. 170-178.

115. Covey, T.M. Single cell network profiling assay in bladder cancer / T.M. Covey, [et al.] // Cytometry, 2013, Apr. – Vol. 83(4). – P. 386-395.

116. Dakubo, G.D. Clinical implications and utility of field cancerization / G.D. Dakubo, J.P. Jakupciak, M.A. Birch-Machin, R.L. Parr // Cancer. Cell. Int. 2007. – Vol. 7. – pp. 2-15.

117. Ebos, J.M., Kerbel R.S. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis// *Nat Rev Clin Oncol*, 2011. - Vol. 8, №4. - pp. 10—21.
118. Eissa, S. Noninvasive diagnosis of bladder cancer by detection of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and their inhibitor (TIMP-2) in urine / S. Eissa [et al.] // *Eur. Urology*. 2007. – Vol. 52 (5). – pp. 1388-1397.
119. Eruslanov, E. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer / E. Eruslanov, [et al.] // *Int. J. Cancer.*, 2012, Mar. – Vol. 1, №130 (5). – P. 1109-1119.
120. Ferlay, J. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006 / J. Ferlay [et al.] // *Ann. Oncol.* 2007. Vol. 18 (3). P. 581-592.
121. Freedman N.D. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women / N.D. Freedman, [идр.] // *JAMA*. 2011. Т. 306. № 7. С. 737-745.
122. Frum, R. MDM2 controls the timely expression of cyclin A to regulate the cell cycle / R. Frum, M. Ramamoorthy, L. Mohanraj // *Mol. Cancer. Res.*, 2009. - Vol. 7. – pp. 1253.1267.
123. Gao, W. Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XPD and XRCC1, p53 gene mutations and bladder cancer risk / W. Gao [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2010, Jul. – Vol. 24 (1). – pp. 257–262.
124. Genheimer, C.W. Increased urothelial cell detection in the primary bladder smooth muscle cell cultures with dual MACS/qRT-PCR approach / C.W. Genheimer, [et al.] // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2011. - №19 (2). – P. 184-189.
125. Gerhards, S. Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma / S. Gerhards, [et al.] // *Urology*, 2001. - Vol. 57. - pp. 675-679.
126. Golovina, D.A. Complex of Molecular Genetic and Immunohistochemical Methods for Detection of Human Papillomavirus in the Bladder Cancer Epithelium / D.A. Golovina, [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014. – Vol. 157, No. 1. – P. 70-73.

127. Golovina, D.A. Loss of Cell Differentiation in HPV-Associated Bladder Cancer / D.A. Golovina, [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016. - Vol. 161, No. 1. – P. 96-98.
128. Gonzalez-Campora, R. BCL-2, TP53 and BAX protein expression in superficial urothelial bladder carcinoma / R. Gonzalez-Campora [et al.] // *Cancer Lett.*, 2007. - Vol. 250. - pp. 292-299.
129. Grando, J.P. Association between polymorphisms in the biometabolism genes CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in bladder cancer / J.P. Grando [et al.] // *Clin. Exp. Med.*, 2009. - Mar. – Vol. 9 (1). – pp. 21-28.
130. Grossman, H.B. Expression of the $\alpha 6 \beta 4$ integrin provides prognostic information in bladder cancer / H.B. Grossman [et al.] // *Oncol. Rep.*, 2000. Vol. 7. - pp. 13-16.
131. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.*, 2000. - Vol. 100. - pp. 57-70.
132. He, S. Mechanisms of stem cell self-renewal / S. He, D. Nakada, S.J. Morrison // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2009/ - Vol. 25. – pp. 377-406.
133. Hehlhans, S. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies / S. Hehlhans, M. Haase, N. Cordes // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2007. - Vol. 1775 (1). - pp. 163-180.
134. Hernández, S. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas / S. Hernández, [et al.] // *J. Clin. Oncol.*, 2006. - Vol. 24, №22. – P. 3664-3671.
135. Herr, H. Bladder Cancer Collaborative Group. Standardization of radical cystectomy and pelvic lymph node dissection for bladder cancer: a collaborative group report / H. Herr [et al.] // *J. Urology*, 2004. – Vol. 171. – pp. 1823-1828.
136. Herr, H. Surgical factors influence bladder cancer outcomes: a cooperative group report / H. Herr [et al.] // *J. Clin. Oncol*, 2004. – Vol. 22. – pp. 2781-2789.
137. Hussain, S.A. BCL2 expression predicts survival in patients receiving synchronous chemoradiotherapy in advanced transitional cell carcinoma of the bladder / S.A. Hussain [et al.] // *Oncol. Rep.*, 2003. - Vol. 10. - pp. 571-576.

138. Jebar, A.H. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma / A.H. Jebar [et al.] // *Oncogene*, 2005. - Vol. 24. – pp. 5218-5225.
139. Jones, T.D. Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis / T.D. Jones, [et al.] // *Clin. Cancer Res.* 2005. – Vol. 11(18). – pp. 6512-6519.
140. Kim, Y.K. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer / Y.K. Kim, W.J. Kim // *J. Int. Urology*, 2009. - Jan. – Vol. 16 (1). – pp. 17-22.
141. Leissner, J. Extended radical lymphadenectomy in patients with urothelial bladder cancer: results of a prospective multicenter study / J. Leissner [et al.] // *J. Urology*, 2004. - Vol. 171. – pp. 139-144.
142. Leissner, J. Lymphadenectomy in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder: significance for staging and prognosis / J. Leissner [et al.] // *BJU Int.* – 2000. – Vol. 85. – pp. 817-821.
143. Leissner, J. Ranking of pelvic lymphadenectomy in therapy and prognosis of carcinoma of the bladder / J. Leissner [et al.] // *Akt. Urol.*, 2003. – Vol. 34. – pp. 392-397.
144. Liu, A.Y. Bladder expression of CD cell surface antigens and cell-type-specific transcriptomes / A.Y. Liu, [et al.] // *Cell. Tissue Res.*, 2012, Jun. – Vol. 348, №3. – P. 589-600.
145. Manfredi, J.J. The Mdm2.p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor / J.J. Manfredi // *Genes Dev.* 2010. - Vol. 24. pp. 1580-1589.
146. Memon AA, Sorensen BS, Meldgaard P. The relation between survival and expression of HER1 and her2 depends on the expression of HER3 and HER4: A study in bladder cancer patients// *Br J Cancer* 2006. V. 94. № 11. P. 3-9.
147. Moll, U.M. The MDM2-p53 Interaction / U.M. Moll, O. Petrenko // *Mol. Cancer. Res.*, 2003. - Vol. 1. - pp. 1001-1002.

148. Moro, F.D. Urinary markers in the everyday diagnosis of bladder cancer / F.D. Moro, C. Valotto, A. Guttilla, F. Zattoni // *Urologia*, 2013. – Vol. 80 (4). – pp. 265- 275.
149. Mueller J.L. Management of muscleinvasive bladder cancer / J.L.cMueller [et al.] // *Minerva Urol Nefrol*. 2013. Vol. 65. N 4. pp.235-248.
150. Nargund, V.H., Tanabalan C.K., Kabir M.N. Management of non-muscle-invasive (superficial) bladder cancer// *Semin Oncol*. 2012. - Vol. 39, №5. - pp. 59-72.
151. Noel, N. TP53 and FGFR3 gene mutation assessment in urine: pilot study for bladder cancer diagnosis / N. Noel, [et al.] // *Anticancer Research*. 2015. T. 35. № 9. C. 4915-4922.
152. Nonomura, N. The expression of thymidine phosphorylase is a prognostic predictor for the intravesical recurrence of superficial bladder cancer / N. Nonomura [et al.] // *Int. J. Clin. Oncol.*, 2006. - Vol. 11. - pp. 297-302.
153. Palit, V. [et al.] Expression of HIF-1a and Glut-1 in human bladder cancer / V. Palit [et al.] // *Oncol. Rep.*, 2005. - Vol. 14. - pp. 909-913.
154. Papadogianni, D. Expression of p53 family genes in urinary bladder cancer: correlation with disease aggressiveness and recurrence / D. Papadogianni, [et al.] // *Tumor Biology*. 2014. T. 35. № 3. C. 2481-2489.
155. Perabo, F.G. Bladder cancer cells acquire competent mechanisms to escape Fas-mediated apoptosis and immune surveillance in the course of malignant transformation / F.G. Perabo [et al.] // *Br. J. Cancer*, 2001. - Vol. 84. - pp. 1330-1338.
156. Pettit, S.J. Bladder cancer immunogenicity: expression of CD80 and CD86 is insufficient to allow primary CD4+ T cell activation in vitro / S.J. Pettit, [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*, 1999. - – Vol. 116, №1. – P. 48-56.
157. Puerta-Gil, P. MIR-143, MIR-222, and MIR-452 are useful as tumor stratification and noninvasive diagnostic biomarkers for bladder cancer / P. Puerta-Gi, [et al.] // *Am J Pathol*. 2012. Vol. 180, № 5. P. – 1808-1815.
158. Puzio-Kuter, A.M. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer / A.M. Puzio-Kuter, [et al.] // *Genes. Dev.*, 2009. - Vol. 23, №6. – pp. 675-680.

159. Ramaniuk, V.P. Polymorphism of DNA repair genes *ogg1*, *xrcc1*, *xpd* and *ercc6* in bladder cancer in Belarus / V.P. Ramaniuk, [et al.] // *Biomarkers*. 2014. T. 19. № 6.– pp. 509-516.
160. Rebecca, A. Mason, Elaine V. Morlock, Margaret R. Karagas. EGFR pathway polymorphisms and bladder cancer susceptibility and prognosis// *Carcinogenesis*, 2009. – Vol. 30, no.7. - pp. 1155-1160.
161. Sitohy, B., Nagy J.A., Dvorak H.F. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target // *Cancer Res*, 2012. - Vol. 72, no.8. - pp. 9-14.
162. Smal, M.P. FGFR3 and TP53 mutations in a prospective cohort of Belarusian bladder cancer patients / Smal M.P., [et al.] // *Experimental Oncology*. 2014. Vol. 36, № 4. - pp. 246-251.
163. Smal, M.P. The opposite association of HRAS 638 and KRAS mutations with clinical variables of bladder cancer / M.P. Smal., [et al.] // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015. Т. 19. no.5. - pp. 638-646.
164. Soubra, A., Risk M.C. Diagnostics techniques in nonmuscle invasive bladder cancer / A. Soubra, M.C. Risk // *Indian Journal of Urology*, 2015. - T. 31, no. 4. - pp. 283-288.
165. Starkov, K.E., Bunimovich-Mendrazitsky S. Dynamical properties and tumor clearance conditions for a nine-dimensional model of bladder cancer immunotherapy / K.E. Starkov, S. Bunimovich-Mendrazitsky / *Mathematical Biosciences and Engineering*, 2016. - Vol. 13, no.5. - pp. 1059-1075.
166. Stenzl, A. Update of the Clinical Guidelines of the European Association of Urology on muscle invasive and metastatic bladder carcinoma / A. Stenzl [et al.] // *Actas. Urol. Esp*. 2010, Jan. – Vol. 34 (1). – pp. 51-62.
167. Steven, K. Radical cystectomy and extended pelvic lymphadenectomy: survival of patients with lymph node metastasis above the bifurcation of the common iliac vessels treated with surgery only / K. Steven, A.L. Poulsen // *J. Urology*. – 2007. – Vol. 178. – pp. 1218-1223.

168. Szarvas, T. Matrix metalloproteinases and their clinical relevance in urinary bladder cancer / T. Szarvas [et al.] // *Nat. Rev. Urol.*, 2011. - Vol. 8(5). – pp. 1-8.
169. Terada, T. An autopsy case of clear cell adenocarcinoma of the urinary bladder / T. Terada // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2013, Jul. – Vol. 21(4). – P. 371-375.
170. Tzortzis, V., Zahos I., Melekos M. Bladder cancer / V. Tzortzis, I. Zahos, M. Melekos // *In books: Cancer Surgery in the Elderly*, 2011. - pp. 261-271.
171. Venyo, A. The expression of P53 in human urothelial carcinoma / A. Venyo, H. Greenwood, D. Maloney // *Webmed Central UROLOGY*, 2010. - Vol. 1(11). - pp. 1-12.
172. Wang, C. XRCC1 genetic polymorphisms and bladder cancer susceptibility: a metaanalysis / C. Wang, Y. Sun, R. Han // *J. Urology*. – 2008 Oct. – Vol. 72. – P. 869-872.
173. Wang, M. Genetic variants of XRCC1, APE1, and ADPRT genes and risk of bladder cancer / M. Wang [et al.] // *DNA Cell Biol.* – 2010, Jun. – Vol. 29 (6). – pp. 303-311.
174. World Health Organization: Fact Sheet No.311 (May 2012). www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/.
175. Wu, X.R. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways / X.R. Wu // *Nat. Rev. Cancer.*, 2005. – Vol. 5(9). – pp. 713-725.
176. Zhang, Y. Recent perspectives of bladder cancer diagnostics / Zhang Y., [et al.] // *Minerva Medicolegale*, 2016. - T. 107, №3. - pp. 162-166.
177. Zou, W. Regulatory T-cells, Tumor Immunity and Immunotherapy / W. Zou // *Nat. Rev. Immunol.* 2006. - Vol. 6. - pp. 295-307.