

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: **Зуков Руслан Александрович**
доктор медицинских наук, доцент

Научный консультант: **Куртасова Людмила Михайловна**
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты: **Латыпов Виктор Равильевич,**
Доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра хирургии с курсом мобилизационной подготовки и медицины катастроф, профессор кафедры.

Спирина Людмила Викторовна
доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный медицинский исследовательский центр Российской академии наук», лаборатория биохимии опухолей, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2017 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.002.279.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Томского НИМЦ www.onco.tnimc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Фролова Ирина Георгиевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Риск развития злокачественных опухолей мочевого пузыря увеличивается с возрастом и имеет половые особенности: мужчины заболевают в 2,5-10 раз чаще, чем женщины [Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., 2017]. Пик заболеваемости раком мочевого пузыря (РМП) регистрируется в возрастной категории 50-80 лет (средний возраст - 67 лет) [Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., 2016]. 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. Ежегодно в России РМП заболевают более 16 тыс. человек. За последнее десятилетие в стране отмечается рост заболеваемости на 20,3% [Андреева Ю.Ю., Франк Г.А., 2012; Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., 2017].

«Классической триадой» в первичной диагностике РМП считают ультразвуковое исследование (УЗИ) мочевого пузыря, цистоскопию (ЦС) с биопсией и цитологическое исследование мочи (ЦИМ) [Волченко Н.Н., 2011; Зимичев А.А., Климентьева М.С., Корабельников А.С., 2015].

Цитологический метод исследования для диагностики РМП рекомендован Европейской ассоциацией онкоурологов, 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% [Леонов М.Г., 2014].

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. Основой 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 [Rosenthal D.L. et al., 2016].

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 [Аполихин О.И., 2015; Волкова М.И. и др., 2014; Сивков А.В., 2013; Balci M. et al., 2015; Ramaniuk V.P. et al., 2014].

Тест UBC характеризуется 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 [Moro F.D., 2013; Tzortzis V. et al., 2011; Balci M. et al., 2015; Al-Ahmadie H.A. et al., 2012].

Отсутствие специфичных маркеров, ассоциированных с РМП, 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 [Бабаян А.Ю., 2011; Немцова М.В., Кушлинский Н.Е., 2015; Jones T.D. et al., 2005].

Функционально молекула CD13, или аминопептидаза 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. Увеличение экспрессии Lewis-X-антиген рассматривается некоторыми авторами как признак переходного клеточного рака. CD45 или LCA (Leukocyte common antigen) является основным лейкоцитарным антигеном. Ген CD45 идентифицирован на 1 хромосоме человека (локус 1q31 – 32) [Бабаян А.Ю., 2011; Немцова М.В., Кушлинский Н.Е., 2015; Al-Ahmadie H.A. et al., 2012].

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 исследования выделены объекты изучения:

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

Дизайн исследования представлен на рис. 1.

При половозрастном распределении выявлено, что средний возраст наблюдаемых пациентов составил $63,7 \pm 10,30$ лет, среди них мужчин – 105 (64,80%), женщин – 57 (35,20%). Средний показатель в группе контроля - $58,7 \pm 8,2$ лет.

Среди наблюдаемых пациентов жителей города – 116 (71,60%), села – 46 (28,40%).

Из сопутствующей патологии у наблюдаемых больных МНРМП наиболее часто встречались заболевания сердечно-сосудистой системы – 138 (85,20%), дыхательных путей – 46 (28,40%), желудочно-кишечного тракта – 91 (56,20%), мочеполовой системы – 9 (5,60%), костно-суставной системы – 37 (22,80%), поражения других систем и органов – 43 (26,50%)



Рис. 1- Дизайн исследования.

Бессимптомное течение заболевания отмечалось у 51 (31,50%) пациента. Клинические проявления у 111 (68,50%) больных МНРМП распределились следующим образом: гематурию отмечал 91 (56,20%) пациент – 62 (38,30%) мужчины и 29 (17,90%) женщин, жалобы на дизурические расстройства определялись у 71 (48,30%) больного, 39 (24,10%) мужчин и 32 (19,70%) женщин соответственно; болезненность при акте мочеиспускания – у 46(28,40%) пациентов: 31(19,10%) мужчина и 15(9,30%) женщин; жалобы на слабость, недомогание и общее нарушение самочувствия отмечалась у 13(8,00%) человек – 10 (6,20%) мужчин и 3 (1,80%) женщины.

Среди лабораторных изменений в анализах крови наиболее часто регистрировалось повышенная СОЭ, анемия, лейкопения. Снижение скорости клубочковой фильтрации отмечалось у 110 (67,90%) пациентов: незначительное снижение определялось у 88(80,00%) случаев, умеренное - в 22(20,00%).

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

Все 162 пациента были прооперированы в объеме трансуретральной резекции (ТУР) мочевого пузыря. 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 (40,00%) мужчин и 17 (29,80%) женщин, по передней стенке - у 2 (1,80%) мужчин, по задней стенке - у 25 (23,80%) мужчин и 19 (33,30%) 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 (33,3%) 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.

Гистологическая структура 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. По степени дифференцировки выявлены следующие показатели: высокая степень (G1) отмечалась у 42 (25,90%) пациентов, умеренная (G2) у 100 (61,70%) и низкая (G3) у 20 (12,40%) пациентов.

По стадии заболевания все пациенты разделены следующим образом: Та - 48 (29,60%) пациентов, Tis - 10 (6,20%) и T1 - 104 (64,20%) пациента.

Гладкое течение послеоперационного периода было у 157 (96,9%) больных, осложненное - у 5 (3,1%). В послеоперационном периоде все пациенты получали внутрипузырную химиотерапию митомицином С 40 мг внутрипузырно, еженедельно, экспозиция 1-2 часа, курс 8 инстилляций.

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

В зависимости от особенностей характера клинического течения заболевания все больные МНРМП, включенные в исследование, были разделены на две группы. Первую группу составили 113 (70,40%) пациентов с МНРМП без рецидива заболевания, вторую - 49 (29,60%) пациентов из основной группы с МНРМП, у которых в ходе динамического наблюдения диагностирован рецидив заболевания.

С целью определения уровня экспрессии поверхностных антигенов CD13, CD15, CD45 исследуемую порцию мочи пациента центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 минут для выделения клеточных элементов осадка. 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 (Becton Dickinson, 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 убрали в темное место. Инкубацию клеточной взвеси проводили при комнатной температуре на протяжении 15 минут.

После инкубации проводили измерение флуоресценции на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, 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 (Becton Dickinson, 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).

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 мечеными флуоресцеинизотиоцианатом (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 FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Для работы использовали только CD45-негативные клетки, в каждом образце проводили оценку не менее, чем 10 000 событий. Точное разделение полученных данных на фазы клеточного цикла и их анализ осуществляли с помощью специализированной программы ModFit LTSoftware (Becton Dickinson, США). Результат измерения выражали в долях (%) клеток, находящихся в той или иной фазе митотического цикла.

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

Нормальность распределения количественных признаков оценивалась критерием Шапиро-Уилкса. При нормальном распределении признаков определялись среднее арифметическое значение и стандартная ошибка ($M \pm m$), значимость признаков оценивалась с помощью параметрического критерия Стьюдента. При распределении признаков, отличного от нормального в качестве оценки использовались медиана с

интерквартильным размахом (Me, C₂₅-C₇₅), значимость различий оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Значимость различий качественных признаков в группах наблюдения оценивали при помощи непараметрического критерия χ^2 Пирсона. Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического критерия Спирмена. Различия оценивались как статистически значимые при $p < 0,05$.

Для оценки показателей выживаемости больных МНРМП применялся метод анализа дожития по Каплану-Мейеру. Для определения факторов, оказывающих статистически значимое влияние на показатели выживаемости, использовался метод регрессионного анализа Кокса. Для создания прогностических моделей использованы методы дискриминантного и множественного регрессионного логистического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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 (3,10%) 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 (96,90%) случаях, осложненное - в 5 (3,10%). Осложнения распределились следующим образом: цистит - у 3 (1,86%) пациентов, парацистит - у 1 (0,62%), паравезикальный затек - у 1 (0,62%).

В 12 (7,40%) случаях после первичной ТУР через 5-6 недель произведена резекция *second look*. Повторная операция выполнялась у пациентов с низкой 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, 1,20%), 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.

3-летняя общая опухолеспецифическая выживаемость у пациентов, включенных в исследование, составила 100%, безрецидивная - 69,80%.

Среднее время до возникновения рецидива составило $10,20 \pm 0,84$ мес. Один рецидив за весь период динамического наблюдения (36 месяцев) отмечался у 44 (89,80%) 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, в оставшихся 18,40% случаях время рецидива варьировало от одного до трех лет.

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 (8,00%) пациентов 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.

Особенности 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 – пациенты без рецидива, n=113; 2 группа – больные с подтвержденным рецидивом заболевания, n=49). В сравниваемых группах соотношение мужчин и женщин было сопоставимым: в 1 группе – 34,50% составили женщины и 65,50% – мужчины; во 2 группе – 36,70% и 63,30% (p=0,91; p=0,84). Средний возраст пациентов первой группы составил 63,02±1,01 лет (для мужчин – 61,64±1,17, для женщин – 65,64±1,85), второй группы – 63,63±1,52 лет (для мужчин – 63,35±2,05, для женщин - 64,17±2,26).

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

При анализе клинической симптоматики у пациентов с МНРМП 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.

Анализ показателей общего анализа крови у больных с МНРМП, обнаружил повышение содержания базофилов (0,64±0,37) у пациентов с рецидивирующим течением заболевания, в сравнении с группой без рецидива (p<0,05). При сравнении показателей общего анализа мочи, основных биохимических показателей крови, скорости клубочковой фильтрации, коагулограммы, статистически значимых различий в исследуемых группах выявлено не было.

Размер опухоли 0,5-1 см в 2,2 раза (p<0,05) чаще регистрировался у пациентов 2 группы, в сравнении с 1 группой больных МНРМП. При этом размеры опухоли более 1,0 см не имели статистически значимых различий по частоте выявления в сравниваемых группах.

В отношении количества опухолей у пациентов с МНРМП, установлено, 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 чаще регистрировался у пациентов 2 группы (p<0,01).

При анализе стадии заболевания у пациентов с МНРМП было выявлено значимое увеличение в 5,3 раза (p<0,05) количества пациентов с T_{1S} по сравнению с пациентами без рецидива заболевания.

При гистологическом исследовании переходно-клеточный вариант МНРМП определялся в большинстве случаев. Степень дифференцировки опухоли мочевого пузыря: выявлены статистически значимые различия только при 3-й степени клеточной анаплазии (G3), которая чаще отмечалась у пациентов 2 группы (p<0,05).

Таким образом, анализ изучаемых факторов у больных МНРМП показал наличие ряда параметров, ассоциированных с рецидивирующим течением заболевания: наличие гематурии, небольшой размер опухоли, мультицентричность роста, наличие T_{1S}, низкая степень дифференцировки опухоли, повышение содержания базофилов периферической крови.

Фенотипическая характеристика клеток осадка мочи у больных с верифицированным МНРМП и при развитии рецидива 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. Установлено статистически значимое увеличение экспрессии CD13 ($p < 0,0001$), CD15 ($p < 0,00001$), CD45 ($p < 0,0001$) антигенов на клетках осадка мочи у пациентов с МНРМП по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Таблица 1- Показатели экспрессии поверхностных антигенов CD13, CD15, CD45 у больных МНРМП и группы контроля

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, выходящим за пределы уротелия. Увеличение экспрессии Lewis-X (CD15) расценивается как признак злокачественного перерождения тканей органа. Рост в моче количества клеток, экспрессирующих антиген CD45⁺ в определенной мере может отражать реакцию иммунной системы на растущую опухоль.

Количество клеток во всех фазах клеточного цикла статистически значимо отличалось у пациентов с МНРМП по сравнению с группой контроля (табл. 2).

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, возможно, характеризует перераспределение всего клеточного пула в сторону активной пролиферации.

Таблица 2 - Показатели клеточного цикла у больных МНРМП и группы 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	14,69	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

На втором этапе 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 (1 группа – больные без рецидива, n=113; 2 группа – пациенты с верифицированным рецидивом заболевания, n=49). Выявлено, что показатели экспрессии антигенов CD13, CD15, CD45 в клеточном осадке мочи у больных МНРМП сравниваемых групп, статистически значимых различий не имели (табл. 3).

При сравнительном анализе показателей митотического 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 группой больных ($p < 0,05$) (табл. 4).

Таблица 3 - Показатели экспрессии поверхностных антигенов 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	10,56	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

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.

Таблица 4 - Показатели клеточного цикла 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 - 3,20	0,099

Примечание: p – статистическая значимость различий

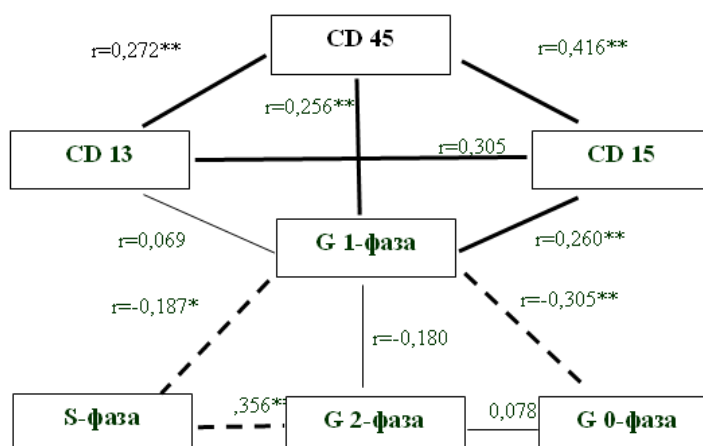
Оценка сопряженности фенотипических показателей клеток осадка мочи у больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря с характером течения заболевания

При оценке результатов корреляционного анализа в группе пациентов без рецидива МНРМП между показателями экспрессии 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 (рис. 2). 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.

По своему качественному составу установленные корреляционные связи в группе пациентов с рецидивирующим течением заболевания 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 (рис. 3).

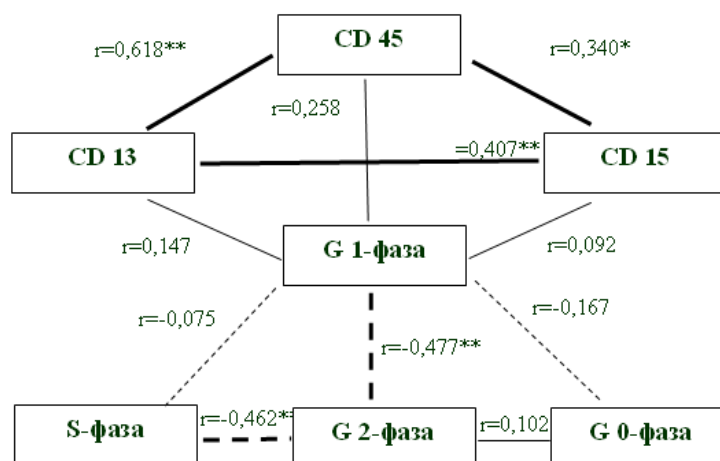
Кроме того, количество корреляционных связей между фазами клеточного цикла, а также их взаимосвязей с показателями, характеризующими экспрессию поверхностных клеточных антигенов (CD13, CD15, CD45) было 2 раза меньше, чем в группе пациентов с безрецидивным течением МНРМП. Необходимо отметить, что в группе пациентов с рецидивирующим течением МНРМП по сравнению с группой больных без рецидива заболевания не установлено достоверных корреляционных

связей между экспрессией поверхностных антигенов (CD13, CD15, CD45) и фазами клеточного цикла (рис. 2; рис. 3).



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

Рисунок 2 - Схема корреляции фенотипического спектра клеток осадка мочи у больных без рецидива МНРМП.



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

Рисунок 3 - Схема корреляции фенотипического спектра клеток у больных с рецидивирующим течением МНРМП.

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. 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.

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.

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

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 множественного логистического регрессионного и дискриминантного анализа.

Наибольшую точность в оценке информативности изучаемых факторов в отношении диагностики первичной опухоли мочевого пузыря продемонстрировала регрессионная модель построенная на основании данных наблюдения за 162 больными МНРМП и 69 здоровыми донорами:

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

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.

Показатель Exp(B) указывает на высокую вероятность наличия рака мочевого пузыря при повышении показателей экспрессии антигенов CD15 и CD45.

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.

В отношении оценки вероятности развития рецидива МНРМП после комбинированного лечения наибольшую прогностическую точность также продемонстрировала регрессионная логистическая модель. В качестве метода построения модели был использован алгоритм их принудительного включения, что позволяет оценить статистическую значимость каждого предиктора для итогового прогноза.

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

где

p – вероятность развития рецидива заболевания,

x_1 – доля клеток в S фазу клеточного цикла,

x_2 – доля клеток в G0 фазу клеточного цикла,

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

x_4 – количество опухолей ($b_4= 0,729$).

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 ($\chi^2=51,526$; $p<0,001$).

Статистически значимыми предикторами развития 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%. При этом модель обладает специфичностью 91,2% чувствительность 69,4%, общая 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.

Следующий этап работы включало оценку 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

В регрессионной модели Кокса 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 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.

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%. Вероятность достижения безрецидивной выживаемости на протяжении 36 месяцев при уровне показателя клеток осадка мочи в S-фазе до 66,8% составляет 80% (рис. 4).

Для показателя доли клеток осадка мочи в G0-фазе в соответствии с его средним уровнем в группе контроля, выборка была поделена на 2 подгруппы – первая со значениями показателя до 11% и вторая - с уровнем показателя 11% и более. Вероятность достижения 3-летней безрецидивной выживаемости при уровне клеток осадка мочи в G0-фазе более 11% составляет около 78% (рис. 4).

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. 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%. (рис. 5).

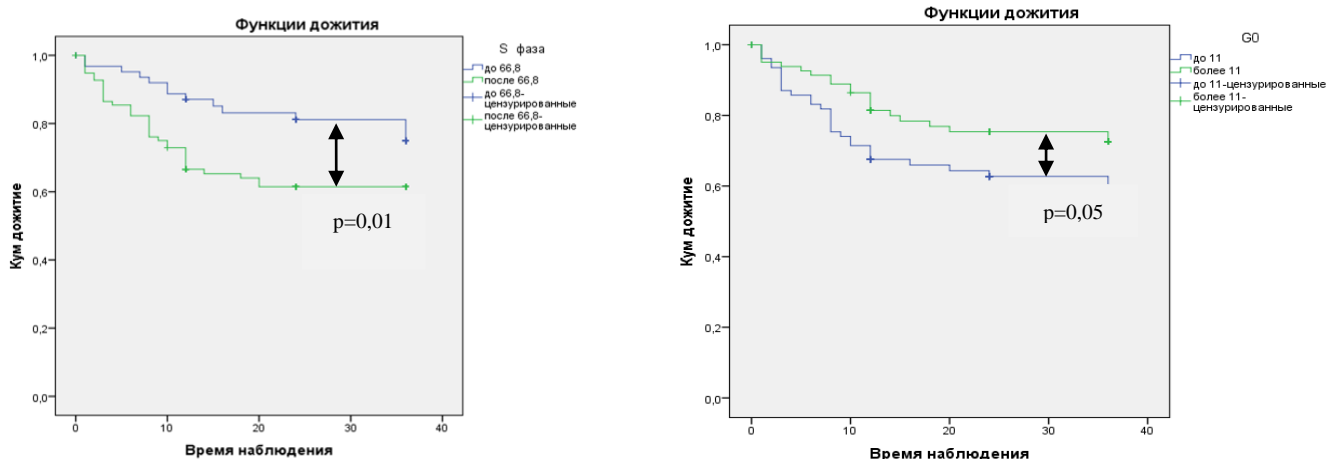


Рисунок 4 - Кривые Каплана-Мейера оценки безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения при разной доле клеток осадка мочи в S-фазе и G0-фазе.

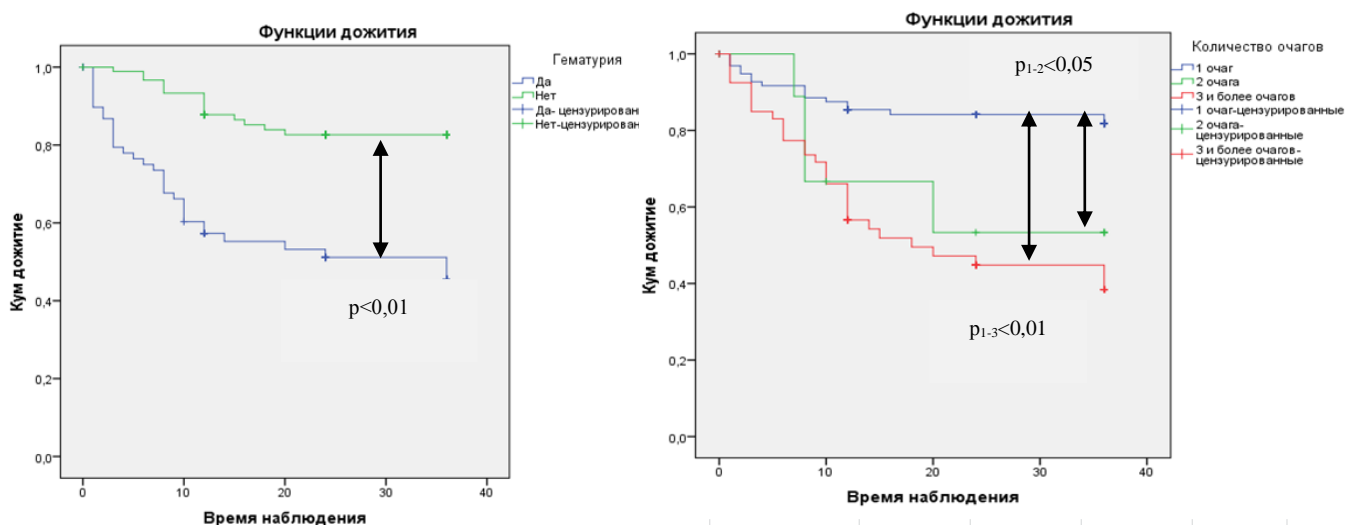


Рисунок 5 - Кривые Каплана-Мейера оценки безрецидивной выживаемости у больных МНРМП после комбинированного лечения в зависимости от количества опухолей и наличия гематурии.

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%. Вероятность безрецидивного дожития до окончания 36-месячного периода наблюдения у пациентов при отсутствии гематурии составила более 85%. В то же время, для пациентов при наличии гематурии вероятность безрецидивного дожития составила около 50% (рис. 5).

Таким образом, в результате проведенного комплексного математического анализа с использованием регрессии Кокса и метода Каплана-Мейера установлены клиничко-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%.

ВЫВОДЫ

1. Определены клиничко-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.

ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Семёнов, Э.В. Клеточный цикл в неизмененных и опухолевых клетках уротелия при поверхностном раке мочевого пузыря // А.В. Мазаев, Р.А. Зуков, А.В. Мошев, Е.Ю. Якунина // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные медицинские технологии в диагностике и лечении онкологических заболеваний», 21-23 октября 2015 года, г. Красноярск. – С. 96-101.
2. Семёнов, Э.В. Распределение клеток по фазам клеточного цикла в опухолевой и неизмененной ткани при поверхностном раке мочевого пузыря // А.В. Мазаев, Р.А. Зуков, А.В. Мошев, Е.Ю. Якунина // Злокачественные опухоли. – 2015. – №4. – спец. вып. 2. – С. 125-126.
3. Семёнов, Э.В. Современные методы анализа осадка мочи: использование метода проточной цитофлуориметрии // А.В. Мазаев, А.В. Мошев, Е.В. Слепов, Р.А. Зуков // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные медицинские технологии в диагностике и лечении онкологических заболеваний», 21-23 октября 2015 года, г. Красноярск. – С. 151-153.
4. Семёнов, Э.В. Факторы прогноза у больных раком мочевого пузыря // А.В. Мазаев, Р.А. Зуков, Л.М. Куртасова // Сибирское медицинское обозрение. – 2015. – №5. – С. 13-22.
5. Семёнов, Э.В. Изучение показателей клеточного цикла при раке мочевого пузыря в неизмененной, перитуморальной ткани и опухоли // Е.В. Слепов // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии. – Томск: Издательство Томского университета. – 2016. – С. 167-170.
6. Семёнов, Э.В. Проточная цитофлуориметрия как современный метод анализа клеточного осадка мочи // Е.Ю. Якунина, А.В. Мошев, А.В. Мазаев // Сибирское медицинское обозрение. – 2016. – №5. – С. 111-112.
7. Семёнов, Э.В. Распределение клеток по фазам клеточного цикла в неизмененной и опухолевой ткани при уротелиальном раке // Е.Ю. Якунина, А.В. Мазаев, Ю.В. Козина, А.А. Модестов // Сибирское медицинское обозрение. – 2016. – №5. – С. 114-116.
8. Семёнов, Э.В. Характеристика апоптоза, некроза и особенностей клеточного цикла в опухолевой ткани при уротелиальном раке // Е.В. Слепов, А.В. Мазаев, Л.М. Куртасова, Р.А. Зуков // Сибирское медицинское обозрение. – 2016. – №6. – С. 20-27.

9. Семёнов, Э.В. Определение маркеров рецидива поверхностного рака мочевого пузыря на основании данных проточной цитофлуориметрии // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии. – Томск, Издательство Томского университета. – 2017. – С. 113-114.
10. Семёнов, Э.В. Фенотипические особенности клеток осадка мочи пациентов с поверхностным раком мочевого пузыря // Р.А. Зуков, Е.В. Слепов, Л.М. Куртасова // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Том 16. – №3. – С. 52-56.
11. Семёнов, Э.В. Проточная цитофлуориметрия как способ диагностики поверхностного рака мочевого пузыря // Материалы XXIV международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», 10-14 апреля 2017 года, г. Москва, секция клеточная биология – №34.
12. Семёнов, Э.В. Прогнозирование рецидива неинвазивного рака мочевого пузыря на основании клинико-морфологических параметров и показателей клеточного осадка мочи // Врач-аспирант. – 2017. – №5(84). – С.24-32.
13. Семёнов, Э.В. Разработка алгоритма диагностики рака мочевого пузыря на основании исследования клеток осадка мочи методом проточной цитометрии // А.В. Мазаев // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – №4; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26681>.

Программа для ЭВМ

1. 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» / Семёнов Э.В., Зуков Р.А., Слепов Е.В., Куртасова Л.М.; зарегистрировано 09.10.2017.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
ЗНО – злокачественные новообразования
КО – клеточный осадок
КЦ – клеточный цикл
МНРМП – мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря
РМП – рак мочевого пузыря
СНМП – симптомы нижних мочевых путей
ТУР – трансуретральная резекция
ЦИМ – цитологическое исследование мочи
ЦС – цистоскопия
G0 – фаза покоя
G1 – пресинтетическая фаза
G2 – постсинтетическая фаза
M – митотическая фаза
T_{IS} – carcinoma in situ