

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РЕНТГЕНРАДИОЛОГИИ"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ДЗИДЗАРΙΑ Александр Гудисович

**Молекулярно-генетические особенности
мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря**

3.1.6 Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор медицинских

наук, профессор

Павлов А.Ю.

Москва 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. РАК МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ. МЫШЕЧНО-НЕИНВАЗИВНАЯ ФОРМА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТКАНЕЙ ..	74
3.1 Высокочувствительные и высокоспецифичные гены.....	74
3.2 Гены со средним уровнем специфичности, чувствительности и неинформативные гены	100
ГЛАВА 4. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ, КЛИНИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	192
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	208
ВЫВОДЫ	217
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	220
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	221

Список использованных сокращений

АПХТ - адъювантная полихимиотерапия.

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ДНК - Дезоксирибонуклеиновая кислота

ДГПЖ- доброкачественная гиперплазия предстательной железы

ИМТ - Индекс массы тела.

кДНК - комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КРР - колоректальный рак.

КТ - компьютерная томография

ЛУ - лимфатические узлы

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

МКБ-мочекаменная болезнь

МНИРМП- мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря

МИРМП- мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря

МРТ - магнитно-резонансная томография

МСКТ - мультиспиральная компьютерная томография

ОБ - Окружность бедер

ОТ - Окружность талии

ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография

РВ-ПЦР - Полимеразная цепная реакция в реальном времени

РМП – рак мочевого пузыря

РНК - Рибонуклеиновая кислота

ТУР\TUR\TURB – трансуретральная резекция

УЗИ - Ультразвуковое исследование

ФДД – фотодинамическая диагностика

ЭКГ – Электрокардиография

AUA\AAU – American Urology Association (американская ассоциация урологов)

BCG\БЦЖ- bacillus Gelmette-Guerin бацилла Кальметта-Герена (противотуберкулёзная вакцина)

CUETO - Испанское Урологическое Общество Лечения Рака

EAU\EAU - European association of urology (европейская ассоциация урологов)

EORTC – European Organisation for Research and Treatment of Cancer (Европейская организация по лечению рака)

FDA - Food and Drug Administration (управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)

Cis – carcinoma in situ

CEU\ CEUS - contrast enhanced ultrasonography (УЗИ с контрастным усилением)

HAL- гексиламинолевулинат

NBI – узкоспектровая эндоскопия

IARC -The International Agency for Research on Cancer (международное агентство изучения рака)

MMC – митомицин\ Mitomycin

NHIS - The National Health Interview Survey (национальное исследование медицинской информации)

NIH-AARP - National Institutes of Health and American Association of Retired Persons (национальный институт здоровья и пенсионеров США)

PUNLMP - Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential. Папиллярная уротелиальная опухоль с низким потенциалом злокачественности

TCGA - The Cancer Genome Atlas (атлас ракового генома)

VI-RADS- he Vesical Imaging–Reporting and Data System (бальная система оценки данных МРТ мочевого пузыря)

ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря является одним из наиболее распространенных видов опухоли во всем мире. Ежегодно диагностируется около 400 000 новых случаев заболевания [12]. Приблизительно 70-80% пациентов с впервые диагностированным раком мочевого пузыря имеют мышечно-неинвазивную форму злокачественного новообразования (МНИРМП), такую как неинвазивная папиллярная опухоль (pTa), карцинома in situ (CIS; pTis) или ранняя инвазивная опухоль (без мышечной инвазии, pT1). Неадекватное по объему и несвоевременно выполненное лечение ведет к прогрессированию заболевания и к необходимости повторных вмешательств, в том числе с выполнением органоуносящей операции. Обычно эти опухоли рецидивируют в 50-70% случаев, при этом примерно в 10-20% случаев прогрессируют до мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (МИРМП) [14]. На сегодняшний день все еще остро стоит вопрос о необходимом объеме вмешательства при МНИРМП: о необходимости индукционного курса внутрипузырной терапии или БЦЖ терапии, о показаниях к поддерживающей внутрипузырной терапии, радикальных цистэктомиях с различными вариантами деривации мочи. На сегодняшний день для решения вышеизложенных вопросов лечения МНИРМП в общепризнанных руководствах не используется генетика и выбор тактики основывается исключительно на клинико-морфологических данных, что не достаточно для решения имеющихся вопросов.

Наращение количества молекулярно-генетических событий в клетках опухоли играет большую роль в прогрессировании злокачественного процесса, что подтверждается большим количеством публикаций. Поиск генов-маркеров и их сочетаний для оценки прогноза заболевания и выбора тактики лечения является важнейшим направлением развития клинической онкологии. Все классификации, используемые сегодня, не отражают гетерогенность заболевания и не позволяют на раннем этапе определить

оптимальный вариант лечения для конкретного пациента. Результаты анализа выявили, что существующие номограммы EORTC и EAU не оптимальны для оценки риска прогрессии и рецидива. Их применение сопряжено с высоким процентом рецидивов в группах первичных пациентов после удаления МНИРМП, большая часть рецидивов приходится на первый год наблюдений [180]. Осуществлялись неоднократные попытки улучшить эффективность применения номограмм через подготовку прогностических моделей для определенных когорт пациентов или путем оценки генного полиморфизма опухоли. [50].

Основной целью определения генов-маркеров является возможность оценить прогноз заболевания и улучшить процесс принятия клинических решений. Оптимальным методом прогнозирования и определения групп риска на сегодняшний день является многофакторный анализ, сочетающий как молекулярно-генетический анализ опухоли, так и клиничко-морфологические характеристики РМП. Не велика вероятность существования одного единственного гена, способного определять потенциал злокачественности и поведение опухоли, для выбора оптимального метода лечения, что побуждает многих исследователей к изучению и оценке комплексных путей. [101]. Панели маркеров, включающие драйверы ключевых путей в сочетании с клиническими и патологическими переменными, могут быть наиболее многообещающим подходом для точной стратификации риска и принятия клинических решений при РМП. Основываясь на литературных данных, следует вывод, что сам по себе для оценки прогноза заболевания не может быть использован ни один биомаркер, чтобы полноценно влиять на тактику лечения пациентов. Поэтому считается, что широкая панель генов-маркеров может повысить точность прогнозирования [153].

Сегодня существует неотложная необходимость в исследованиях молекулярно-генетического профиля РМП, как гетерогенного заболевания с высоким злокачественным потенциалом.

Так, для раков иной локализации (молочная железа, колоректальный рак итд) существуют и применяются в практике молекулярно-генетические тесты опухолевой ткани, позволяющие с вероятностью до 90% оценивать риск развития рецидива.

Современные подходы к лечению рака мочевого пузыря требуют понимания молекулярной патологии, молекулярных подтипов опухоли, биомаркеров, сигнальных путей. Новые достижения в понимании молекулярных характеристик рака мочевого пузыря могут привести к эволюции в понимании патогенеза заболевания: от сложно классифицируемых гетерогенных групп заболевания с разнообразным клиническим течением и терапевтическими ответами, к более специфически, молекулярно-генетически обоснованным подтипам, что позволит повысить эффективность лечения через реализацию персонифицированных протоколов лечения МНИРМП.

Цель исследования:

Улучшение результатов лечения пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря с учетом клинико-морфологических и молекулярно-генетических характеристик опухоли.

Задачи исследования:

1. Изучить молекулярно-генетический профиль опухолевой ткани МНИРМП, слизистой оболочки мочевого пузыря после специализированного противоопухолевого лечения, а так же в неизменной слизистой мочевого пузыря у больных с другими заболеваниями (пациенты с онкологическими болезнями иной локализации, ДГПЖ, МКБ).

2. Провести сравнительный анализ полученных данных молекулярно-генетического профиля тканей трёх исследуемых групп.

3. Определить на основании проведения сравнительного анализа экспрессии генов специфические для МНИРМП маркеры с высокой

чувствительностью и специфичностью, изучив их прогностическую значимость во взаимосвязи с количеством, размером и дифференцировкой опухоли, гематурией, ИМТ, возрастом, полом, курением, наследственностью пациентов.

4. Проанализировать безрецидивную выживаемость после комбинированного лечения МНИРМП (ТУР + внутривезикулярная химиотерапия) в первые 12 месяцев во взаимосвязи с разным уровнем экспрессии наиболее информативных генов и выделить прогностические группы риска рецидива МНИРМП.

5. Разработать и обосновать оптимальный алгоритм лечения и обследования пациентов с МНИРМП с учетом выявленных молекулярно-генетических особенностей опухолевой ткани.

Научная новизна

Впервые в Российской Федерации у больных с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря, на собственном клиническом материале изучена экспрессия 66 генов (ответственные за апоптоз, пролиферацию, ангиогенез, адгезию, ремоделирование межклеточного матрикса, маркеры и факторы врожденного и приобретенного иммунитета, рецепторы эстрогенов и прогестерона, ароматазу): MGB1, CTSL2, BCL2, TERT, HER2, PTEN, BAG1, PGR, GREM1, MMP2, PAPP, MMP7, IL2, MMP8, IL2Ra, IL6, IL12a, IL7, IL15, IL8, IL1b, IL10, TPA, IFN γ , CD45, TNF- α , C-MYC, BIRC5, CCND1, NDRG1, CD68, Ki67, CD56, TGF β , CD69, VEGFA189, TLR4, HLA-G1, TLR-7, HLA-G5, GATA2, IL-28a, LGALS1, IL-29, LIF, LIFR, CCNB1, ESR1, GRB7, MMP11, STK15, MYBL2, VEGFA121, BAX, VEGFA165, TLR2, P16INK4A, SCUBE2, MMP9, GSTM1, GNLY, P14ARF (P19ARF), IGF1, COX-2, IFG-2, CYP19A.

На основании сравнительного анализа выявленных уровней экспрессии генов в опухолевой ткани и неизменной слизистой мочевого пузыря, определены информативные молекулярные маркеры негативного прогноза МНИРМП.

Выполнена оценка уровня экспрессии различных групп генов в ткани опухоли при МНИРМП во взаимосвязи с клинико-морфологическими характеристиками первичной опухоли.

Определены генетически-детерминированные группы риска рецидива МНИРМП.

Создан алгоритм диагностики и лечения МНИРМП с возможностью раннего прогнозирования и диагностики рецидивов.

Практическая значимость работы

Проведенное исследование позволило повысить эффективность лечения МНИРМП благодаря выявлению групп риска рецидива и прогрессии на основании оценки экспрессии мРНК генов в ткани опухоли.

Доказана необходимость определения молекулярно-генетически детерминированных групп риска в дополнение к клинико-морфологическим характеристиками опухоли для более достоверной оценки риска заболевания.

Доказана необходимость оценки экспрессии Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5 и сочетаний MYBL2+TLR2, BIRC5 + Ki67, MYBL2+MMP11 для более достоверного определения групп риска рецидива и прогрессии МНИРМП.

Продемонстрировано отсутствие достоверной взаимосвязи благоприятной клинико-морфологической характеристики опухоли и реального риска рецидива\прогрессии МНИРМП.

Обоснована необходимость выполнения адьювантного курса внутрипузырной химиотерапии\иммунотерапии после ТУР мочевого пузыря, в случае повышения экспрессии мРНК от одного до трех генов-маркеров (Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5) при отсутствии клинико-морфологических показаний к данной терапии.

Определена группа пациентов с показанием к поддерживающей внутрипузырной терапии (гиперэкспрессия мРНК Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5 или сочетаний MYBL2+TLR, BIRC5+Ki67, MYBL2+MMP11), при

отсутствии негативных клинико-морфологических факторов риска рецидива и прогрессии заболевания.

У пациентов с гиперэкспрессией мРНК генов-маркеров или сочетаний генов-прогноза (Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5 или сочетаний MYBL2+TLR, BIRC5+Ki67, MYBL2+MMP11) при наличии неблагоприятных клинико-морфологических факторов негативного прогноза необходимо решать вопрос о ранней цистэктомии ввиду высокого риска рецидива болезни и прогрессии.

Разработанный в ФГБУ РНЦПР Минздрава России алгоритм лечения МНИРМП на основании клинико-морфологических и молекулярно-генетических характеристик опухоли позволяет врачам практического звена находить наиболее эффективный вариант лечения пациентов.

Положения выносимые на защиту

- В опухолевой ткани мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря определяется достоверное повышение экспрессии маркеров пролиферации: Ki67, CCNB1, MYBL2, TPA и маркера ингибитора апоптоза BIRC5.
- Маркерами неблагоприятного прогноза МНИРМП является гиперэкспрессия Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5 и сочетания прогностических белков MYBL2+TLR2, BIRC5 + Ki67, MYBL2+MMP11 .
- Высокоинформативные и высокочувствительные гены Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5 с высокой достоверностью коррелируют с БРВ при МНИРМП.
- Безрецидивная выживаемость пациентов с МНИРМП с высокой достоверностью коррелирует с 7 генами: BIRC5, Ki67, CCNB1, MYBL2, MMP11, TLR2, STK15.
- Показатели экспрессии генов - достоверные дополнительные критерии оценки прогноза в выборе тактики лечения пациентов с МНИРМП.
- Определение группы риска и последующее специализированное лечение пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря должно

проводиться с соблюдением разработанного алгоритма, а также с учетом прогностических факторов.

Внедрение результатов работы

Результаты диссертации внедрены в работу ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» МЗ РФ. Полученные результаты работы могут быть рекомендованы к применению в онкологических центрах РФ.

Апробация работы

Материалы работы доложены на 1142-м заседании Московского общества урологов г. Москва 2022, Московском онкологическом форуме г. Москва 2021, IV форуме социальных инноваций регионов г. Москва 2021, XVIII Конгрессе Российского общества урологов и Российско-Китайском Форуме по урологии г. Екатеринбург 2018 г., XI Конгрессе Российского общества онкоурологов г. Москва 2016 год.

Апробация работы состоялась 16 июня 2022 г на совместном заседании Ученого совета и научно-практической конференции ФГБУ РНЦРР Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, среди которых 14 статей опубликованы в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ (из них 2 в журналах, входящих в систему SCOPUS) и 1 статья в зарубежном журнале входящем в систему SCOPUS.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, клиническое значение результатов молекулярно-генетического исследования тканей, интерпретация и прогностическое значение результатов молекулярно-генетического исследования), заключения, выводов, практических

рекомендаций и списка использованной литературы. Текст диссертации изложен на 248 страницах машинописного текста, иллюстрирован 129 таблицами, 38 рисунками. Библиографический указатель включает 247 источников: из них 8 русскоязычных, 239 зарубежных.

ГЛАВА 1. РАК МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ. МЫШЕЧНО-НЕИНВАЗИВНАЯ ФОРМА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).

Эпидемиология

Ежегодно во всем мире диагностируется 430000 новых случаев рака мочевого пузыря [12]. Заболеваемость раком мочевого пузыря значительно различается между географическими регионами, так что стандартизированная по возрасту заболеваемость почти в три раза выше в более развитых странах (9,5 на 100000 населения), чем в менее развитых странах (3,3 на 100000 населения) [63]. Самая высокая стандартизированная по возрасту заболеваемость наблюдается в Европейских странах (а именно в Испании, Италии, Дании и Швейцарии), Северной Америке, некоторых странах Северной Африки (Египет) и Западной Азии (Турция, Израиль), особенно у мужчин [1]. Напротив, самые низкие показатели были отмечены в Центральной и Южной Америке, в странах Африки к югу от Сахары и Юго-Восточной Азии [12]. Уротелиальный рак остается наиболее распространенным типом рака мочевого пузыря в Северной Америке и Европе, однако в Египте 10-40% случаев РМП представляет собой плоскоклеточный рак, связанный с инфицированием кровянистыми сосальщиками (шистосомоз) [152].

Заболеваемость раком мочевого пузыря выше среди белого населения, чем у других этнических групп [34,239], что может быть связано с уровнем диагностики заболевания в развитых и менее развитых странах. Следует отметить, что глобальные изменения уровня смертности от РМП менее заметны, чем изменения заболеваемости. Различия уровня смертности в различных странах отражают, по крайней мере частично, доступ к современным методикам диагностики и новейшим протоколам лечения. На глобальном уровне стандартизированная по возрасту смертность от рака

мочевого пузыря в последнее время снизилась, особенно в развитых странах [12].

Факторы риска.

Курение сигарет является наиболее распространенным фактором риска развития заболевания. Опубликованные данные показывают, что табак является причиной половины всех случаев заболевания [67], однако очевидна задержка в 20-30 лет между воздействием сигарет и постановкой диагноза [144]. Текущая заболеваемость РМП является самой высокой в регионах с высоким уровнем курения в 1980-х годах [12,152]. Таким образом, модели курения могут частично объяснить географические различия в эпидемиологии рака мочевого пузыря.

Также широко исследовалась связь между некоторыми факторами окружающей среды и развитием заболевания. Диета с низким содержанием фруктов и овощей, городская жизнь связаны, хотя и не всегда, с повышенным риском развития рака мочевого пузыря [78,204]. Кроме того, некоторые данные свидетельствуют о том, что употребление алкоголя увеличивает риск развития заболевания [154]. Потребление воды или пищи, загрязненные мышьяком, может объяснить данные о повышенной заболеваемости РМП в некоторых регионах. Например, загрязнение мышьяком коррелировало с риском развития РМП в Аргентине, Чили и Бангладеш [34,85].

Профессиональное воздействие канцерогенов уже давно связано с риском развития рака мочевого пузыря. Согласно анализам, наибольший риск возникает в промышленных зонах, перерабатывающих краску, резину, нефтепродукты и красители, в то время как наибольший риск смертности от заболевания возникает у работников электротехнической и химической промышленности [50,204]. Тем не менее считается, что не более 8% случаев связаны с такими воздействиями [163], а глобальное влияние

профессиональных рисков на заболеваемость РМП еще предстоит полностью выяснить.

Некоторые данные подтверждают генетическую предрасположенность к раку мочевого пузыря, гены, участвующие в метаболизме канцерогенов, такие как N-ацетилтрансфераза и GSTM1 ассоциируются с повышенным риском развития РМП [11]. Крупные полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) обнаружили варианты последовательностей, которые могут увеличить риск заболеваемости РМП. Например, изменения в белке – переносчике мочевины, который кодируется SLC14A1, связаны с концентрацией мочи в почках и могут влиять на контакт канцерогенов с поверхностью уротелия [82,105,106,174,233].

При первоначальном диагнозе около 75% пациентов имеют мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря (МНИРМП), ограниченный слизистой оболочкой (T_a и T_{is}) и поражающий собственную пластину слизистой оболочки мочевого пузыря (T₁), но не собственно-мышечную оболочку. РМП высокой степени злокачественности T₁ составляет от 25% до 43% всех МНИРМП и имеет более высокий риск рецидива и прогрессирования до инвазивного заболевания [131]. Чаще всего распределение по стадиям выглядит следующим образом: pT_a – 70%, pT₁ – 20%, pT_{is} – 10% [169]. Последние данные показывают, что риск рецидива мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря высокой степени злокачественности составляет 40% при периоде наблюдения 5 лет, риск перехода в мышечно-инвазивную форму – 21% [131]. В настоящее время этих пациентов сложно идентифицировать проспективно [113,220]. Мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря включает в себя стадии от T_{2a} до T_{4b} в зависимости от степени мышечной инвазии и в большинстве случаев имеет высокую степень злокачественности [6]. Врачи часто сталкиваются с неэффективностью лечения и/или рецидивами во всех группах РМП, терапия этого заболевания является сложной задачей, а современные системы классификации не отображают его гетерогенность.

Огромные усилия прилагаются, чтобы понять биологию рака мочевого пузыря. Конечная цель проводимых исследований – на ранних этапах спрогнозировать вероятность рецидива и ответ на лечение, чтобы принять правильное клиническое решение.

Клеточное происхождение рака мочевого пузыря.

Уротелий мочевого пузыря состоит из 3-х типов клеток. Базальные клетки, прилегающие к базальной мембране, наименее дифференцированы и экспрессируют базальные цитokerатины СК5/6 и СК14 [115]. Базальные клетки также экспрессируют поверхностные якорные молекулы, такие как рецепторы ламинина и b4-интегрин [86,115]. Другим характерным маркером базальных клеток являются рецепторы гиалуроновой кислоты (CD44) [38]. Из уротелия были выделены также стволовые клетки, которые имели фенотип, схожий с фенотипом базальных уротелиальных клеток [38,86]. Промежуточные клетки, находящиеся между базальным и люминальным слоями, демонстрируют умеренную дифференцировку и экспрессируют пониженный уровень СК18, CD44 и СК5/6 [32]. Пролиферативный потенциал промежуточных клеток ограничен [62,168]. Поверхностные или люминальные клетки представляют собой окончательно дифференцированные зонтичные клетки, которые экспрессируют уроплакины и СК20 [62]. В нескольких исследованиях были получены убедительные доказательства того, что стволовые клетки являются вероятным источником рака мочевого пузыря [1,38,86,115]. Паракринная передача сигналов является ключевым регулятором опухолевых стволовых клеток и включает в себя несколько важных онкогенных путей патогенеза. В нескольких исследованиях сообщалось, что самые ранние онкогенные изменения могут наблюдаться не только в местах наличия дисплазий или рака *in situ*, но также в морфологически неизмененных уротелиальных тканях [40,51,240]. Анализ картирования тканей мочевого пузыря показал, что начальная клональная экспансия пренеопластических уротелиальных клеток характеризовалась

делецией ДНК рядом с геном RB1 в области хромосомы 13q14 [108,127]. Делеция наблюдалась на больших участках неопластического уротелия, а также на участках уротелия с минимальным отклонением от нормальной картины или на участках без патологии. Главный опухолевый супрессор RB1 не был мутирован в нормальной, без морфологических отклонений, слизистой оболочке, что позволяет предположить наличие других альтернативных генов, так называемых, генов – предшественников, которые были драйверами этой экспансии. Пять генов – предшественников были идентифицированы, как потенциальные ингибирующие факторы канцерогенеза рака мочевого пузыря: интегральный мембранный белок 2В (ITM2B), рецепторы лизофосфатидной кислоты 6 (LPAR6), рецептор мотилина (MLNR), кальций – связывающий белок 39 (CAB39L), ADP-рибозилирующий фактор, подобный GTP11 (ARL11) [119]. Экспрессия генов – предшественников подавляется в первую очередь гиперметилированием и реже возникновением мутаций, что приводит к значительному подавлению на уровне мРНК более 50% клеточных линий рака мочевого пузыря. Исследования показывают, что нарушение регуляции генов – предшественников может быть первоначальным молекулярным изменением, тогда как нарушение функции RB1 гена - последующим событием, связанным с развитием рака мочевого пузыря [108,119].

Дуальная концепция канцерогенеза РМП.

Не смотря на сходные мутационные особенности, мутационная нагрузка и общие изменения в геномной архитектуре при МНИРМП и МИРМП различны. При секвенировании генома мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря было зарегистрировано от 169 до 195 мутаций на образец [20,149] по сравнению с 302 мутациями, выявленными при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря [36]. Основываясь на том факте, что МНИРМП и МИРМП имеют различное клиническое поведение, гистологию и эволюцию были предложены два пути канцерогенеза: папиллярный и непиллярный. Теория папиллярного пути развития говорит о том, что

МНИРМП низкой степени злокачественности развивается из гиперплазированной ткани мочевого пузыря. Папиллярный уротелиальный рак характеризуется экзофитными выростами на поверхности слизистой оболочки, они обычно редко прорастают стенку мочевого пузыря и не склонны к метастазированию. Предшественниками МИРМП считают плоскую дисплазию или рак *in situ*. Эти опухоли имеют высокую склонность к прорастанию стенки мочевого пузыря и часто дают отдаленные метастазы. МНИРМП высокой степени злокачественности, по-видимому, происходит при одновременном возникновении гиперплазии и дисплазии, что позволяет предположить, что эти два пути канцерогенеза пересекаются. Папиллярный путь характеризуется активацией или гиперэкспрессией онкогенов, которые приводят к развитию геномно-стабильных неинвазивных опухолей низкой степени злокачественности (Ta). Для данного вида опухолей характерно наличие мутаций FGFR3 [36,87,158,201,227]. Следовательно, они рассматриваются как движущие изменения папиллярного пути развития РМП [36,26,158, 227,244]. Мутации FGFR3 связаны с хорошим прогнозом и низкой частотой рецидивов, часто сопровождаются наличием мутаций в промоторе гена теломеразы обратной транскриптазы (TERT) [90]. Ген FGFR3 регулирует активацию путей патогенеза RTK/RAS/RAF/MAPK и PI3K/Akt/mTOR. Путь патогенеза RTK/RAS/RAF/MAPK был предложен как вероятный механизм регуляции роста клеток МНИРМП низкой степени злокачественности [26,93]. Мутации в PI3K, лизиндеметилазе 6A (KDM6A), STAG2 часто встречаются в опухолях Ta низкой степени злокачественности и связаны с низким риском прогрессирования и рецидива [132,139,206]. Геномный и транскриптомный ландшафт МНИРМП стадии Ta низкой степени злокачественности указывает на важную роль устойчивой пролиферативной подачи сигналов и характеризуется более четко выраженными мутациями при сравнении с МИРМП. МНИРМП высокой степени злокачественности уже имеет некоторые геномные изменения характерные для МИРМП.

Непапиллярный путь развития дает начало в большинстве случаев мышечно-инвазивной форме рака мочевого пузыря. Здесь также присутствуют характерные мутации, хромосомные аномалии, возникающие в результате дефектов в генах механизмов репликации/репарации ДНК и мутаций в генах – супрессорах опухолей [113]. Рак *in situ* может преобразоваться в МИРМП за счет постепенного накопления геномных аномалий [3,27,145].

Мутации в генах опухолевой супрессии, таких как TP53, RB1 и PTEN, часто встречаются при МИРМП [100,113,194]. Мутации гена TP53 играют важную роль в непапиллярном пути развития опухоли, присутствуют в 50% случаев при МИРМП и в 10-20% случаев при T1 высокой степени злокачественности [87,158, 173,194]. В некоторых опухолях потеря функции p53 происходит одновременно с потерей функции RB1 [48,80,100,200]. Известно, что уровень RB1 обратно коррелирует с уровнем p16 (CDKN2A), а изменения в сигнальном пути опухолевого супрессора RB1/p16 связаны с повышенным риском прогрессирования при МИРМП [194]. В некоторых случаях функция RB1 блокируется из-за гиперэкспрессии циклина D1 (CCND1) или потери CDKN2A, что характерно для опухолей высокой степени злокачественности [87,158,173,199]. Таким образом, гетерогенные механизмы, приводящие к сходному фенотипу, являются возможной причиной неэффективности лечения и развития резистентности.

Дефекты в генах ответа на повреждения ДНК присутствуют приблизительно в 30% случаев при МИРМП и МНИРМП высокой степени злокачественности, тогда как они отсутствуют в большинстве случаев при МНИРМП низкой степени злокачественности [60]. Наиболее часто изменяется ген ERCC2, компонент механизма эксцизионной репарации нуклеотидов. Выявляется его мутация в опухолях T1 высокой степени злокачественности в 17%, при МИРМП – в 20% случаев, при Ta – мутаций данного гена обычно не наблюдается [158]. Интересно, что мутации в генах пути патогенеза эксцизионной репарации нуклеотидов могут возникать при различных типах

рака, но повторяющиеся мутации встречаются редко, исключение составляет ERCC2 при РМП [158]. В «Атласе генома рака» (TCGA) была описана сигнатура ERCC2 и подтверждена его связь с курением [4,87,100]. Функция ERCC2 в уротелии неизвестна, но, учитывая его связь с курением, можно предположить, что он защищает уротелий от повреждений, вызванных канцерогенными метаболитами, накапливающимися в моче.

Несколько генетических изменений, связанных с МИРМП, регулируют рост и инвазию клеток. Гены семейства EGFR – EGFR и HER2 часто гиперэкспрессируются при МИРМП и особенно при метастатической форме РМП [37,87,158]. Активация гена EGFR вызывает активацию путей патогенеза RAS/MAPK и PI3K/AKT/mTOR. Более того, в качестве факторов транскрипции члены семейства EGFR могут индуцировать экспрессию онкогенов, способствующих пролиферации, таких как MYC и CCND1, или генов, регулирующих миграцию/инвазию, таких как COX2 и MMPs [75,181,224]. Амплификация HER2 больше выражена в метастатических лимфатических узлах, а гиперэкспрессия как HER, так и EGFR связана с более высоким риском рецидива и прогрессирования [47,66,87,126,140].

Изменения пути патогенеза PI3K/AKT/mTOR участвуют в прогрессировании МИРМП [73,76]. PTEN негативный регулятор PI3K, подавляется более чем в 90% случаев при МИРМП и в 40% случаев при МНИРМП [16,73,224]. Потеря PTEN связана с агрессивным течением МИРМП и прогрессированием заболевания. Более чем в 40% опухолей МИРМП потеря PTEN сочетается с потерей TP53 [164]. Потеря PTEN и TP53 ассоциируется с плохой выживаемостью [164,224], предполагается, что потеря PTEN и TP53 способствует инвазии опухоли и образованию метастазов [164].

Геномная и транскриптомная характеристики рака мочевого пузыря выявили определенные молекулярные альтерации при МНИРМП и МИРМП низкой степени злокачественности. В этих же исследованиях отмечено

сходство между МИРМП и МНИРМП высокой степени злокачественности. Мутации, влияющие на гены механизмов репликации/репарации ДНК и гены – супрессоры опухолей являются общими для папиллярных опухолей высокой степени злокачественности, и Та/Т1 и МИРМП, развивающихся непиллярным путем. Это свидетельствует о том, что два пути развития рака мочевого пузыря могут пересекаться. В связи с этим 10-20% случаев МИРМП может возникать в результате прогрессирования МНИРМП высокой степени злокачественности.

Молекулярные подтипы и биологические особенности РМП.

Теория двух путей развития РМП может быть использована для понимания ранних стадий заболевания, но учитывая его сложность и гетерогенность, она не может объяснить биологию и прогрессирование некоторых видов опухолей. Профилирование опухолей в крупномасштабных когортах, позволяет идентифицировать молекулярные подтипы РМП с определенным клиническим и молекулярным фенотипом. Такой подход позволяет улучшить понимание биологии этого сложного комплексного заболевания. По результатам исследований РМП был подразделен на молекулярные подтипы на основе транскриптомных данных.

Nedegaard et al. были выделены 3 молекулярных подтипа МНИРМП (Класс I, II и III), ассоциированных с определенными базальными и люминальными признаками и прогнозом заболевания (Таблица 1) [87]. Класс I, куда входят опухоли с люминальными признаками, ассоциируется с хорошим прогнозом заболевания, характеризуется повышенной экспрессией регуляторов раннего клеточного цикла (CCND1) и наличием мутации FGFR3. Учитывая его особенности, класс I сравнили с уробазальным подтипом А (UroA) по Sjödaahl et al, которые проанализировали смешанную когорту пациентов с МНИРМП и МИРМП [200]. UroA был представлен в большинстве случаев при неинвазивных опухолях низкой степени злокачественности.

Класс II характеризуется люминальными признаками, здесь отмечено наличие повышенной экспрессии регуляторов поздней фазы клеточного цикла и факторов транскрипции, ассоциирующихся с эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT) и ERBB2. Класс II сравнили с геномно-нестабильным подтипом по Sjö Dahl et al. Класс III, имеющий базально-подобные признаки характеризуется более короткой общей выживаемостью, наличием базального фенотипа с FGFR3 мутациями. Только опухоли Классов II и III связаны с высокой степенью злокачественности, высоким риском рецидива (по EORTC) и возможностью перехода в мышечно-инвазивную форму рака мочевого пузыря. Таким образом, неинвазивные опухоли Класса II могут прогрессировать в мышечно-инвазивную форму РМП по непапиллярному пути [87].

Таблица 1.

Молекулярные подтипы МНИРМП и их основные характеристики.

Подтипы МНИРМП	Гистологический тип	Онкогенный механизм	Молекулярные характеристики	Стадия/степень дифференцировки	Ассоциированные риски
Класс I	Люминальный	FGFR3 мутация	ERBB3 гиперэкспрессия RAS/RAF/MAPK путь патогенеза Ранняя регуляция клеточного цикла (CCND1 амплификация)	Низкая степень диф-ки и низкая стадия	Низкий риск рецидива
Класс II	Люминальный	HER2 мутация	TP53/RB1 потеря ERCC2 мутации Поздняя регуляция клеточного цикла EMT факторы транскрипции ARVCF мутационная сигнатура	Высокая стадия и степень диф-ки	Высокий риск прогрессирования
Класс III	Базальный	FGFR3 мутация	Спящее состояние опухоли, которая переходит в класс II при прогрессировании	Низкая степень диф-ки и низкая стадия	Высокий риск прогрессирования

Переход опухолей Класса I в мышечно-инвазивную форму РМП осуществляется по папиллярному пути, но это происходит крайне редко. Что касается опухолей Класса III (признаки базального фенотипа с мутациями гена FGFR3), то необходимо продолжить их дальнейшее изучение для понимания особенностей и характеристик данного класса.

В настоящее время имеющиеся данные о молекулярных подтипах МНИРМП весьма ограничены. Необходимо продолжить работу в этом направлении, поиск маркеров прогноза заболевания должен помочь в выявлении пациентов с высоким риском рецидива и/или прогрессирования заболевания.

Для мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря на сегодняшний день несколько групп предложили сопоставимые молекулярные классификации, которые были связаны с конкретными биологическими особенностями, клиническими исходами и эффективностью лечения (Таблица 2) [53,87,100,102,133,142,166,187,200]. Консенсусная классификация была получена при комбинации анализа шести ранее опубликованных классификаций МИРМП: Baylor [142], University of North Carolina (UNC) [53], Carter d'Identite des Tumeurs (CIT) Curie [166], MD Anderson Cancer Center (MDA) [43], Lund [133], TCGA [100] с общедоступными данными транскриптома МИРМП. Согласно этим данным, на сегодняшний день описано 6 молекулярных подтипов МИРМП: Люминальный папиллярный (LumP), Люминальный неспецифический (LumNS), Люминальный нестабильный (LumU), Базально/плоскоклеточный (Ba/Sq), Богатый стромой подтип, Нейроэндокриноподобный (NE-like) [100].

Наиболее распространенный подтип – базально/плоскоклеточный (Ba/Sq) – 35% [100], характеризующийся базальной и плоскоклеточной дифференцировкой опухоли. Для этого молекулярного подтипа характерна экспрессия маркеров базальных и стволовых клеток, таких как KRT5/6, KRT14 и CD44, в норме экспрессирующихся в базальном слое или в слое стволовых клеток уротелия [42,200]. Они тесно связаны с активацией регулона STAT3,

повышенным уровнем HIF1A и подавлением генов, связанных с дифференцировкой уротелия, таких как FOXA1, GATA3, PPARG [100]. Часто встречаются мутации регулятора клеточного цикла TP53 (61%), он играет ключевую роль в непапиллярном пути развития РМП [100,194]. При базально/плоскоклеточном подтипе мутации RB1 встречаются у 25% опухолей, одновременные мутации TP53 и RB1 – в 14% опухолевой ткани, что предполагает наличие взаимодействия между двумя регуляторами клеточного цикла.

Таблица 2.

Молекулярные подтипы МИРМП и их основные характеристики.

МИРМП Подтипы	Гистологический тип	Онкогенный механизм	Молекулярные хар-ки	Стадия	Подтипы
LumP	Люминальный	FGFR3 мутации CDKN2A делеции	RAS/RAF/MAPK высокая активность пути KDM6a мутации STAG2 мутации	T2+	TP53 – подобный P53 – WT
LumNS	Люминальный	PPARG мутации	ELF3 мутации Повышенная стромальная и средняя иммунная инфильтрация	T2+	Люминально - инфильтративный
LumU	Люминальный	HER2 амплификация. Геномная нестабильность	TP53 - потеря ERCC2 мутации Высокая акт-ть клеточного цикла APODEC+ PPARG мутации	T2+	
<i>Ba/Sq</i>	Базальный и плоскоклеточный	EGFR- мутации	TP53 и/или RB1 потеря STATактивация Повышение акт-ти HIF1A	T3/T4	Клаудин – низкий уровень Снижение экспрессии клаудин-3 и клаудин-4 TK – обогащенный Гиперэкспрессия EMT Высокий риск метастазирования
<i>Stroma-rich</i>	Базальный и люминальный		Повышенная стромальная иммунная инфильтрация		
<i>NE-like</i>	Нейроэндокринный	TP53 и/или RB1 потеря	Высокая акт-ть клеточного цикла. Трансдифференцировка уротелия		

На моделях мышей было показано, что наличия одновременных мутации в TP53 и RB1 не всегда достаточно для индукции пути инвазии при РМП,

мутации других генов способствует поддержанию потенциала инвазии, а также важную роль играет микроокружение опухолевой клетки [5].

Известно, что взаимодействие между опухолевой клеткой и микроокружением является важной составляющей процесса ее инвазии. При раке мочевого пузыря снижение уровня молекул клеточной адгезии CDH1 (E-кадгерин) и активация их блокаторов транскрипции, таких как ZEB1, ZEB2, SNAU-1 и TWIST ассоциируются с плохим прогнозом и высоким риском метастазирования [43,137]. У пациентов с базально/плоскоклеточной формой заболевания выявляется высокая активность EGFR и активация маркеров взаимодействия опухоли и клеточного микроокружения [43,87,137]. Базально/плоскоклеточный подтип включает в себя подгруппу опухолей с низким уровнем клаудина, которые не вошли в общепринятую классификацию, но были описаны в других исследованиях [102,178]. Опухоли с низким уровнем клаудина принципиально отличаются от базально/плоскоклеточных опухолей по своему ответу на НАПХТ, что подчеркивает важность молекулярных подмножеств внутри подтипов общепринятой классификации. Подтип Claudin – low сравнили с подтипом базально-плоскоклеточным инфильтративным, предложенным Marzouka et al [133], при котором отмечена гиперэкспрессия CDH3 (P-кадгерин) и EGFR, но нет экспрессии ERBB2 и ERBB3 [133]. Учитывая различия в прогнозе и ответе на лечение сравнение характеристик опухолей Claudin-low и базально/плоскоклеточных позволит нам понять пути патогенеза, вовлеченные в формирование этих двух базальных подтипов, что, возможно, поможет в выборе вариантов лечения.

Люминальноподобные опухоли (LumP, LumU и LumNS) являются производными папиллярного пути развития, для них характерно наличие люминальных маркеров: KRT20, уроплакинов, UPK1A UPK2, обычно

экспрессируемых в терминальных уротелиальных клетках. Для люминальных форм МИРМП характерна экспрессия генов факторов транскрипции: PPAR γ , GATA3 и FOXA1, участвующих в дифференцировке уротелия, а также факторов регуляции и рецепторов передачи сигнала ESR2 [43,100].

Подтип LumP является наиболее распространенным (24%) с лучшей общей выживаемостью при сравнении с другими люминальными подтипами. Для опухолей LumP характерно наличие мутаций или амплификации гена FGFR3 [100]. Подтип LumP сравнили с уротелиоподобным подтипом по Sjö Dahl et al, ранее называвшимся – уробазальным (UroA и UroB) [133,201]. Учитывая повышенную экспрессию FGFR3 и гомозиготные делеции CDKN2A в 33% опухолей LumP, можно предположить, что опухоли LumP представляют собой фракцию люминальных FGFR3- мутантных новообразований, которые из опухолей Класса I прогрессировали по папиллярному пути патогенетического развития [53].

Считается, что опухоли подтипа LumP плохо отвечают на химиотерапию на основе препаратов платины (цисплатин) в отличие от базально/плоскоклеточного подтипа [178]. Choi et al описали подтип люминальных опухолей у которых выявлена экспрессия гена TP53 WT, для них характерна резистентность к химиотерапии. Молекулярная основа положительной или отрицательной p53-сигнатуры в контексте химиотерапии при РМП до конца не изучена. В анализе, проведенном консорциумом The Cancer Genome Atlas (TCGA) было показано, что амплификация или гиперэкспрессия MDM2 способствует инактивации p53 в 76% случаев [87]. Необходимо продолжить изучение механизмов резистентности к химиотерапии у данного подтипа люминальных опухолей.

LumU подтип ассоциируется с наихудшей выживаемостью среди люминальных опухолей. Для него характерна наибольшая геномная нестабильность (мутации ERCC2, TP53 гиперэкспрессия HER2),

индуцированная полипептидоподобным ферментом корректирования мРНК аполипротеина В (АРОВЕС – относится к семейству цитидиндеаминаз, которые участвуют в геномном удалении чужеродной ДНК) [37,87,100,158,202]. Он соответствует геномно-нестабильному подтипу, описанному Sjödaahl et al.

Последний люминальный подтип, предложенный в консенсусной классификации, был назван – неспецифическим люминальным (LumNS), встречается в 8% случаев. Для него характерно наличие повышенной стромальной и умеренной иммунной инфильтрации, содержит мутации, влияющие на регуляторные факторы, такие как ELF3 и PPARG. Для LumNS также характерна невысокая общая выживаемость. Он сравним с эпителиально-инфильтративным подтипом, выделенным Sjödaahl et al, который сочетает в себе черты подтипов геномно-нестабильного и уробазального [200].

Дополнительно был выделен богатый стромой подтип, который характеризуется высокой инфильтрацией ткани опухоли стромальными и иммунными клетками. Этот подтип характеризуется экспрессией генов гладкой мускулатуры, эндотелиальных клеток, фибробластов и миофибробластов. Для этого подтипа не было выделено четких характеристик, возможно, он мог стать результатом кластерного анализа. Можно сделать вывод, что LumNS и богатый стромой подтип, представляют собой гетерогенный класс опухолей, изучение которых необходимо продолжать для понимания их происхождения, что позволит в будущем определить оптимальный для этого подтипа метод лечения.

Нейроэндокриноподобный подтип является самым редким в общепризнанной классификации и выявляется только в 3% случаев при МИРМП. Эти опухоли обогащены маркерами нейроэндокринной дифференцировки – синаптофизином, хромагранином А (CGA) и

нейроспецифической энтолазой (NSE или CD56). Кроме того, они характеризуются высокой активностью клеточного цикла и одновременным появлением мутаций или делеций TP53 и RB1 [100,200]. Пациенты, у которых выявлены изменения как в TP53, так и в RB1, имеют высокий риск прогрессирования РМП и худший клинический прогноз заболевания по сравнению с пациентами, имеющими изменения только в одном из вышеуказанных генов [8,194]. Чаще всего в мочевом пузыре встречаются мелкоклеточный рак (SCCB) и крупноклеточный рак (LCCB), как правило они диагностируются уже на поздних стадиях заболевания [229]. На сегодняшний день нет четких рекомендаций по лечению нейроэндокринных опухолей. Стратегия лечения обычно соответствует терапевтическим подходам, используемым при мелкоклеточном раке легкого [74]. Однако, этого явно недостаточно для лечения этой наиболее агрессивной формы РМП, 5-летняя ОВ составляет приблизительно 20% [229]. Очень мало известно о биологии и эволюции нейроэндокринных опухолей. Последние данные подтверждают гипотезу о том, что SCCB происходит из уротелиальных клеток. Однако процессы трансдифференцировки уротелиальных клеток не изучены [39,229]. Нейроэндокринные опухоли встречаются редко, что затрудняет крупномасштабный геномный и транскриптомный анализ данных.

Текущие терапевтические опции для рака мочевого пузыря.

МНИРМП диагностируется при выполнении цистоскопии, в последующем выполняется ТУР мочевого пузыря. Степень гистологической дифференцировки опухоли определяется в соответствии с классификацией ВОЗ [210]. Были созданы таблицы риска прогрессирования заболевания EORTC [220]. В связи с высокой частотой рецидивов больные подлежат пожизненному наблюдению. Пациенты с низким риском рецидива в течение 24 часов после операции получают внутривезикулярную химиотерапию митомицином С или доксорубицином [19]. Она воздействует на опухолевые клетки, возможно, оставшиеся в мочевом пузыре после ТУР и значительно

снижает уровень ранних рецидивов [18,156]. Пациентам с промежуточным и высоким риском развития рецидива рекомендовано введение внутривезикулярной БЦЖ вакцины, которая представляет собой аттенуированный штамм *Mycobacterium bavis*. Это увеличивает время до возникновения рецидива [14,18,98,218]. БЦЖ не всегда хорошо переносится, а риск рецидива колеблется от 30% до 40% [219]. В одном из мета-анализов было показано улучшение показателей выживаемости при раке мочевого пузыря T1G3 при выполнении ранней цистэктомии. Этот вывод согласуется с работой Varca et al [228], который считает, что отсрочка выполнения радикальной цистэктомии позволяет опухолевым клеткам распространяться по лимфатическим сосудам [97,116]. Некоторые авторы оценили коэффициент риска отсрочки лечения как 5,13 ($p < 0,01$) [228]. Выполнение цистэктомии сильно влияет на качество жизни и может считаться для части пациентов чрезмерным лечением. Кроме того, даже выполнение радикальной цистэктомии на ранних этапах не гарантирует полного излечения. Stein et al [212] выявили, что уровень смертности пациентов с T1G3 стадией рака мочевого пузыря, подвергшихся радикальной цистэктомии составляет 20%, таким образом, выполнение немедленной цистэктомии недостаточно для предотвращения онкологической смертности у данной группы больных. Следовательно, имеющиеся на сегодняшний день данные недостаточно доказательны, чтобы оправдать немедленную цистэктомию без попытки проведения консервативной терапии.

Проведение НАПХТ с включением препаратов платины (цисплатин) перед выполнением цистэктомии является золотым стандартом лечения неметастатической формы МИРМП [230]. НАПХТ может выполняться по схеме MVAC (метотрексат, винбластин, доксорубицин, цисплатин) и GC (гемцитабин + цисплатин) [208,230]. Ожидаемая продолжительность жизни увеличивается у 40% пациентов, получавших НАПХТ, что может быть связано с уменьшением размеров первичной опухоли, воздействием на микрометастазы [46,99,230,241]. У 10% пациентов с МИРМП выявляются

отдаленные метастазы при постановке диагноза, в 40-50% случаев отдаленные метастазы выявляются при прогрессировании заболевания. В этом случае терапией первой линии является химиотерапия с включением препаратов платины (цисплатин) [46,99,230], при развитии резистентности к цисплатину FDA одобрило применение ингибиторов иммунных контрольных точек: атезолизумаба, авелумаба, ниволумаба и пембролизумаба. Однако только 20-25% пациентов положительно реагируют на это лечение [2,84,99,171,197]. Недавно были одобрены новые таргетные препараты для лечения пациентов, резистентных к химиотерапии с препаратами платины и ингибиторам контрольных точек. Эрдафитиниб – ингибитор тирозинкиназы рецептора фактора роста фибробластов (FGFR), он одобрен при наличии альтераций в FGFR3 или FGFR2 [123.143]. Энфортаунаб ведотин – конъюгат антител и препарата, мишенью которого является нектин-4, показал многообещающие результаты [172]. Важно отметить, что выживаемость пациентов с МИРМП остается неизменной в течение последних 30-ти лет [24]. Идентификация прогностических биомаркеров является одной из основных задач при РМП.

Использование молекулярных подтипов для выбора варианта лечения.

По данным исследований, следует отбирать базальные опухоли для проведения НАПХТ, учитывая их гипоксичное микроокружение [137,178,179,238]. Лучевая терапия из-за отсутствия прогностических биомаркеров используется недостаточно и в основном с паллиативной целью. Недавно полученные данные свидетельствуют о том, что опухоли с повышенной экспрессией генов, связанных с активацией Т-клеток и сигнальным путем INF γ , выиграют от проведения лучевой терапии [58]. Однако необходимо продолжить изучение влияния лучевой терапии на молекулярные подтипы.

В контексте иммунобиотерапии ни один из молекулярных подтипов, предложенных в консенсусной классификации, не имеет профиля, связанного с положительным ответом на лечение ингибиторами контрольных точек [130]. Однако, высокая инфильтрация CD8⁺ Т-клеток была связана с опухолями с низким уровнем клаудина [102,178] и опухолями люминальных подтипов [178]. Поэтому появилось предположение, что именно этим пациентам могут помочь ИКТ [147,171,197]. Нейроэндокринные опухоли, учитывая у них самую высокую мутационную нагрузку и наличие антигенов, должны были выиграть от применения ингибиторов контрольных точек [110]. Однако на сегодняшний день эффективность ИКТ при данном виде рака мочевого пузыря – сомнительна.

Имеются данные о том, что часть пациентов с РМП, может отвечать на таргетную терапию [173]. Выявляется экспрессия EGFR в опухолях базально\плоскоклеточного подтипа. Таким образом, выбор этих опухолей для проведения таргетной терапии кажется многообещающим. Моноклональные антитела или ингибиторы тирозинкиназы, нацеленные на EGFR мутации, эффективны при раке легких, головы и шеи, толстой кишки [57]. Использование этих препаратов при EGFR- мутированном раке мочевого пузыря показало противоречивые результаты [92,157,161,162,214,232]. В настоящее время афатиниб, ингибиторы тирозинкиназы, ERBB2 и EGFR второго поколения проходят II фазу клинических исследований при метастатическом раке мочевого пузыря с мутациями HER2/ERBB3 и амплификацией HER2/EGFR [28]. Примечательно, что устойчивость к ингибиторам ТК может возникать в результате появления вторичных мутаций, активации альтернативных путей патогенеза или аномалий в нижестоящих сигнальных трансдукторах [91]. В случае с EGFR на примере рака толстой кишки было показано, что мутации RAS (KRAS, NRAS) могут ингибировать ответ на таргетную EGFR – направленную терапию [55,166]. Таким образом, взаимодействие между мутационным статусом RAS и EGFR – направленной

терапией требует дальнейшего изучения. Комбинированную таргетную терапию следует рассматривать в случае RAS – опосредованной резистентности к ингибиторам EGFR [166].

В отличие от других солидных опухолей, таргетная HER2 терапия при МИРМП не показала многообещающих результатов, на сегодняшний день не одобрен к применению ни один препарат из этой группы [151,161]. Было показано, что отбор пациентов, основанный на методах секвенирования ДНК и РНК лучше разделяет респондентов от нереспондентов [111,114].

Гиперэкспрессия FGFR3 является основным онкогенным механизмом в опухолях LumP и может рассматриваться как потенциальная терапевтическая мишень для этих опухолей [100]. Как уже отмечалось выше, эрдафитиниб – ингибитор тирозинкиназной активности FGFR, был недавно одобрен для лечения пациентов с химиорезистентным местнораспространенным или метастатическим раком мочевого пузыря, имеющим мутации в FGFR3 и FGFR2 [123,143]. Учитывая, что опухоли LumP резистентны к препаратам платины [178], таким пациентам может быть предложена таргетная FGFR3 терапия.

Отсутствие прогностических биомаркеров – первая причина неэффективности лечения.

Основной проблемой МИРМП является высокая частота рецидивов, в связи с чем появляется необходимость более раннего выявления опухолей с потенциалом прогрессирования. Риск рецидива после выполнения внутрипузырной химиотерапии варьирует между опухолями низкого, высокого и промежуточного прогноза, в также при выполнении немедленного или отсроченного лечения. Для опухолей с низким риском рецидивирования безрецидивная выживаемость (БРВ) не изменяется при выполнении немедленного (43%) или отсроченного (46%) лечения [29]. Однако, выполнение внутрипузырной химиотерапии в течение 24 часов после

операции снижает риск рецидива с 31% до 20% при опухолях промежуточного прогноза заболевания и с 35% до 28% при опухолях неблагоприятного прогноза [29].

Хотя внутривезикулярная БЦЖ терапия применяется уже больше 30 лет, механизм ее действия еще находится в стадии изучения. У ~ 40% пациентов после БЦЖ терапии в течение 2-х лет выявляется рецидив заболевания [99,213]. Многие факторы могут стать причиной рецидива и/или прогрессирования заболевания: наличие отдаленных метастазов до начала лечения, неадекватная иммунная реакция на БЦЖ терапию, адаптивная иммунная резистентность с гиперэкспрессией PD-1 и PD-L1 [104,160,246]. Предпочтительным методом лечения при возникновении рецидива после БЦЖ терапии является выполнение цистэктомии [19]. Исследовалась комбинация ингибиторов иммунных контрольных точек в сочетании с БЦЖ терапией, основанием послужил факт участия PD-L1 и PD-1 в развитии резистентности к БЦЖ терапии и возникновении рецидивов [155]. Необходимы дальнейшие исследования, которые помогут стратифицировать пациентов на тот или иной вид лечения, необходим поиск биомаркеров [52,61,103,202]. Механизмы резистентности МИРМП к системному лечению неизвестны, в настоящее время существует проблема выявления молекулярных биомаркеров, позволяющих выбрать эффективное лечение. Единый подход к лечению такого гетерогенного заболевания, безусловно, является ограничивающим фактором. Разделение пациентов на подтипы на основе молекулярных особенностей может быть использовано для выбора варианта терапии [130,138,178]. Следует отметить, что неэффективность лечения часто наблюдается как при МНИРМП, так и при МИРМП. Это может указывать на тот факт, что современные классификации не отражают гетерогенность рака мочевого пузыря, что не позволяет на ранних этапах выбрать эффективное для того или иного подтипа лечение.

Маркеры прогноза рака мочевого пузыря.

Наращение количества молекулярно-генетических событий в клетках опухоли играет большую роль в прогрессировании злокачественного процесса, что подтверждается большим количеством публикаций. Поиск генов-маркеров и их сочетаний для оценки прогноза заболевания и выбора тактики лечения является важнейшим направлением развития клинической онкологии. Для МНИРМП факторами прогностической значимости на данный момент являются: p53, Ki67, BIRC5 (сурвивин), β -катенин, E-кадгерин и N-кадгерин. Ведутся работы по изучению прогностической роли белков: циклин B1 (CCNB1), MYBL2, тканевой полипептидный антиген (TPA), MMP11, TLR2 и TLR4. Анализы, проведенные многими исследователями, позволили разработать прогностические модели для оценки краткосрочных и долгосрочных рисков рецидива опухоли. Среди них наиболее важными являются таблицы, разработанные Европейской организацией по исследованию и лечению рака (EORTC) и Испанским урологическим онкологическим клубом (CUETO). EORTC разработала прогностическую модель, основанную на анализе течения заболевания у больных раком мочевого пузыря в стадии T_a или T₁. В работе Sylvester et al. [217,218] 78% пациентов, включенных в исследование, получали адъювантное лечение — большинству пациентов назначали доксорубицин, цисплатин, митомицин или эпирубицин внутривезикулярно (менее 10% пациентов проводили внутривезикулярную терапию БЦЖ). Исследователи провели статистический анализ для определения факторов риска рецидива, оценивались: количество и размер опухолевых узлов, наличие сопутствующей карциномы in situ (CIS), стадия заболевания, степень дифференцировки опухоли, частота рецидивов [217].

Модель оценки CUETO основана на анализе течения заболевания у пациентов, получавших внутривезикулярную БЦЖ терапию. Анализы, проведенные исследователями, показали, что параметрами, связанными с

повышенным риском рецидива опухоли в этой группе больных, являются пол, возраст, количество новообразований, предшествующие рецидивы опухоли, T-стадия по классификации TNM, наличие сопутствующего рака *in situ*, степень дифференцировки опухоли [64]. Выбору оптимальной схемы лечения также может способствовать отнесение пациентов к одной из трех групп риска по критериям, разработанным Европейской ассоциацией урологов (EAU) [19]. Группы риска EAU определялись на основании имеющейся в литературе информации, в частности, данных таблиц риска EORTC.

Результаты анализа показывают, что модели EORTC и EAU не являются оптимальными инструментами для оценки риска рецидива. Использование таблиц EORTC в группе пациентов после удаления первичной опухоли вызывает сомнения, в основном из-за высокого уровня рецидивов, возникших в течение первого года наблюдения [180]. Многие исследователи предпринимали попытки улучшить алгоритмы, разработанные EORTC. Некоторые авторы сосредоточились на подготовке прогностических моделей для конкретных групп пациентов, в то время как другие пытались определить вероятность рецидива опухоли путем оценки полиморфизма генов, воспаления или присутствия онкомаркеров в моче [49,94,107,117]. Также была проанализирована возможность повышения точности этих алгоритмов с помощью иммуногистохимии [153]. Passoni N et al. дополнили алгоритмы, разработанные EORTC и CUETO, уровнями экспрессии белков p53, p21, p27, Ki-67 и циклина E, показав, что включение экспрессии Ki-67 несколько увеличивает прогностическую способность моделей [153]. В исследовании Semeniuk-Wojtas A et al были проанализированы уровни экспрессии маркера пролиферации Ki-67 и двух маркеров апоптоза, p53 и сурвивина, поскольку путь регуляции клеточного цикла является одним из наиболее распространенных путей патогенеза при раке мочевого пузыря.

Ki-67 представляет собой ядерный белок, связанный с транскрипцией рибосомной РНК. Экспрессия Ki-67 выявляется во всех пролиферирующих

клетках, кроме клеток в фазе G₀, а максимальный уровень белка обнаруживается в фазе G₂ или во время митоза. Ki-67 гиперэкспрессируется в растущих раковых клетках, а наличие Ki-67 – позитивных опухолевых клеток указывает на плохой прогноз заболевания. Функция белка Ki-67, вероятно, зависит от организации гетерохроматина и предотвращения агрегации митотических хромосом, что приводит к их соответствующему распределению в дочерних клетках [205]. Белок Ki-67 является маркером ростовой фракции клеток и, следовательно, также может быть признан маркером биологической агрессивности рака.

Белок p53 может индуцировать апоптозную гибель клеток и экспрессируется, среди прочего, в ответ на повреждение ДНК. В нормальных клетках p53 регулирует экспрессию своих нижестоящих генов-мишеней, чтобы регулировать широкий спектр биологических процессов и предотвращать онкогенез [15]. Мутации в TP53 являются наиболее распространенными мутациями при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря (49% образцов) и в 58% случаев выявляются при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря (T1G3) (Weinstein JN Cancer Genome Atlas Research Network, 2014 г).

Сурвивин, также известный как BIRC5 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat – containing 5) – низкомолекулярный цинк-содержащий металлопротеин, относится к семейству ингибиторов апоптоза. Белок кодируется геном BIRC5, расположенным на длинном плече 17 хромосомы.

Основной функцией сурвивина считается блокирование процессов апоптоза, за что отвечает цитоплазматический пул белка [3,7]. Показано, что сурвивин ингибирует Вах- и Fas-зависимые сигнальные пути индукции апоптоза. Сурвивин может быть мишенью p53, а функция p53 может регулироваться активностью survivin [95]. Apollo et al. обнаружили

отрицательную корреляцию между экспрессией сурвивина и мутационным статусом p53 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря [13].

Сурвивин конститутивно экспрессируется в раковых стволовых клетках за счет передачи сигналов через путь митоген-активированной протеинкиназы (МАРК), фактора транскрипции Sp-1 (белок специфичности 1) и c-Myc [7].

На патологическую роль белка указывает значительно повышенный уровень экспрессии. Изучение экспрессии маркера ИГХ методом выявило экспрессию сурвивина у 2/3 больных остеосаркомой, у половины пациентов с колоректальным раком, у трети больных раком желудка [124]. Накопленные сведения позволяют предположить, что экспрессия сурвивина наблюдается при различных неопластических процессах, причем его уровень зависит от локализации, стадии и степени гистологической дифференцировки опухоли.

В многоцентровом международном валидационном исследовании добавление сурвивина к молекулярной панели значительно улучшило точность прогнозирования рецидива заболевания и безрецидивной выживаемости больных раком мочевого пузыря [184].

Мета-анализ 14 крупных исследований, в который вошли 2165 больных раком мочевого пузыря показали значимую взаимосвязь уровня экспрессии сурвивина со временем наступления рецидива, безрецидивной и общей выживаемостью [96].

В исследовании Semeniuk-Wojtas A et al статистический анализ, основанный на результатах иммуногистохимической оценки и клинических данных у больных первичным раком мочевого пузыря без адьювантного внутрипузырного лечения, была разработана прогностическая модель, позволяющая определять вероятность рецидива. Модель RECINT, основана на оценке четырех параметров: диаметр опухоли и интенсивность окрашивания ядер на p53, Ki-67 и сурвивин. Выбранным параметрам были присвоены

баллы, отражающие их пропорциональный вклад в риск рецидива рака. На основании суммарного балла, полученного в модели, пациенты были разделены на четыре группы с разным уровнем риска рецидива. У пациентов первой группы риск рецидива был самым низким. Их суммарная оценка составила 0 и 6 баллов, что означает, что опухоль, удаленная при ТУР, была небольшой и характеризовалась низким уровнем экспрессии белков, регулирующих цикл клеточного деления. В этой группе больных вероятность рецидива в течение 1 года после удаления опухоли составила 16% и оставалась неизменной в последующие годы наблюдения. У больных, отнесенных ко второй группе по модели RECINT (7-8 баллов), риск рецидива составил 25% через 1 год и 42% через 2 года и был аналогичен риску рецидива в группе лечения БЦЖ. Однако в последующие годы вероятность рецидива у больных второй группы постепенно увеличивалась, достигая 60% через 5 лет. Больные 3-й группы (9–10 баллов) характеризовались высоким (50%) риском рецидива в течение первого года наблюдения. Наибольший риск рецидива наблюдался у больных, отнесенных к четвертой группе, у которых имелись крупные опухоли диаметром >4 см, состоящие из клеток с высокой активностью деления (11–14 баллов). Риск рецидива в этой группе составил 73% в течение первого года и более 95% в течение пяти лет после удаления первичной опухоли. Таким образом авторы исследования сделали вывод, что пациенты, отнесенные к первой группе по модели RECINT, могут не получить существенной пользы от применения внутрипузырной адъювантной иммунотерапии БЦЖ. Однако терапию БЦЖ следует рассматривать у остальных пациентов, особенно у пациентов из третьей и четвертой групп, которые имели высокий риск рецидива [180]. Аналогичные выводы были получены Ding et al. Исследователи показали, что учет уровня экспрессии белка Ki-67 при определении риска рецидива с использованием модели EORTC повышает точность диагностического процесса [54].

Преимуществом предложенной модели RECINT, является правильный отбор пациентов для адьювантной внутрипузырной иммунотерапии БЦЖ, что особенно важно из-за потенциальных побочных эффектов, связанных с терапией. Кроме того, эта модель проста, осуществима и относительно недорога. Однако исследование имеет несколько ограничений, в том числе небольшой размер выборки, его ретроспективный и одноцентровый характер, а также отсутствие внешнего контроля. Модель должна быть утверждена другими центрами через проспективные исследования.

Другим белком, который может влиять на прогноз заболевания является Циклин В1 (CCNB1) - регуляторный протеин, участвующий в процессах митоза. Одним из признаков рака является отсутствие регуляции клеточного цикла. Роль циклина В1 заключается в переходе клетки из фазы G2 в фазу M1, но его регуляция в опухолевых клетках нарушается. Избыточная экспрессия циклина В1 может приводить к неконтролируемому росту клеток за счет связывания с Cdk. Высокие уровни экспрессии циклина В1 выявляются при различных видах рака, они обычно наблюдаются до того, как клетки станут иммортализованными и анеуплоидными, что может способствовать хромосомной нестабильности и агрессивному характеру некоторых видов рака. Высокие уровни циклина В1 также могут быть связаны с со степенью инвазии и агрессивностью опухоли, поэтому концентрацию циклина В1 можно использовать для определения прогноза онкологического заболевания. Kim et al обнаружили, что рецидив мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря может быть опосредован путями FOXM1-CCNB1-Fanconi и в значительной степени связан с экспрессией CCNB1 [109].

Не так давно было выявлено, что протоонкоген MYBL2 (член семейства транскрипционных факторов MYB – ядерный белок, участвующий в поддержании клеточного цикла) может являться прогностическим биомаркером [25,175,222]. Данный протеин фосфорилируется циклинА/циклин – зависимой киназой 2 во время S-фазы клеточного цикла и

обладает действием, как активатора, так и репрессора. Он активирует гены Cdc2, циклина D1 и белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста 5. На сегодняшний день выявлено, что гиперэкспрессия MYBL2 связана с неблагоприятным прогнозом у пациентов с раком молочной железы, колоректальным, мочевого пузыря, гепатоцеллюлярным раком [22,72,81,165,167,242]. Появилось предположение, что повышенная экспрессия MYBL2 может быть связана с передачей сигналов p53 и генами, связанными с клеточным циклом, мутация TP53 часто сопровождается повышенной экспрессией MYBL2. Это согласуется с результатами Fischer et al., которые показали, что путь p53-p21-DREAM-CDE/CHR подавляет экспрессию MYBL2 [31]. В исследовании Zekun Xin et al. авторы выбрали рак молочной железы, простаты и легких для дальнейшего изучения механизма экспрессии MYBL2. Исследуемые образцы были разделены на четыре группы в зависимости от наличия или отсутствия мутаций TP53 и уровня экспрессии MYBL2. Выявлено, что в группе с низким уровнем экспрессии MYBL2 и без изменений TP53 прогноз был лучше по сравнению с прогнозом в группе с высоким уровнем экспрессии MYBL2 и мутированным TP53. Полученные данные дополнительно прояснили механизм, связанный с MYBL2, и определили, что пациенты могут выиграть от использования MYBL2 в качестве биомаркера. Получена прямая корреляционная зависимость между повышенной экспрессией MYBL2 и высоким индексом Глисона при раке предстательной железы, при тройном негативном статусе рака молочной железы и при плоскоклеточном раке легкого. Исследование Zekun Xin et al. показало, что повышенная экспрессия MYBL2 может использоваться в качестве биомаркера плохого прогноза для пациентов при раке предстательной железы, молочной железы и легкого. Работы по изучению экспрессии MYBL2 при других видах злокачественных опухолей продолжаются [235].

Клиническая полезность цитокератинов хорошо известна, т.к. они отражают активность эпителиальных опухолевых клеток. Чаще всего онкологи используют три цитокератиновых маркера - тканевой полипептидный антиген (ТРА), тканевой полипептид-специфический антиген (ТРС) и СУFRA 21-1. При определении уровня ТРА в сыворотке крови мы получаем информацию об уровне цитокератинов 8, 18, и 19 типов. Эти цитокератины в норме обнаруживаются в большинстве эпителиальных клеток. Экспрессия цитокератинов зависит от типа эпителиальных клеток, степени дифференцировки и развития ткани. При трансформации нормальных клеток в злокачественные обычно сохраняются цитокератиновые паттерны, и это свойство позволяет применять цитокератины в качестве опухолевых маркеров [45,118]. Впервые ТРА был получен в 1980-х годах из нерастворимых тканевых субстратов нескольких типов злокачественных опухолей. Иммуно-электромикроскопические исследования К.Zimer с соавторами в 1985 г показали, что антитела к ТРА могут связываться с филаментами цитокератина. В настоящее время он используется как маркер пролиферации и дифференцировки неплоскоклеточных опухолей [226]. ТРА позволяет дифференцировать прогрессию опухолевого роста. Повышенный уровень тканевого полипептидного антигена (ТРА) наблюдается при раке мочевого пузыря, раке молочной железы и колоректальном раке [23,77,122,148].

Было показано, что ТРА является чувствительным сывороточным маркером у пациентов с РМП с точки зрения диагностики, прогноза, мониторинга лечения и последующего наблюдения. По некоторым данным чувствительность для местно-распространенного заболевания и метастатического заболевания варьирует от 60% до 70% и от 85% до 95%, соответственно [135,136]. Повышение уровня ТРА в сыворотке до начала лечения предсказывает наличие диссеминированной формы заболевания у пациентов с T1G3 и T2 стадиями с чувствительностью 90% и специфичностью 95% [65,136]. ТРА можно также использовать для мониторинга

терапевтической эффективности у пациентов с раком мочевого пузыря. Было показано, что пациенты, реагирующие на лечение, обычно имеют нормализованные уровни ТРА в сыворотке крови, тогда как у пациентов с прогрессирующим клиническим течением уровень ТРА остается высоким [177,226]. При динамическом наблюдении ТРА показал высокую чувствительность для раннего выявления прогрессирования заболевания, при этом повышение значений ТРА в сыворотке часто предшествуют обнаружению другими традиционными методами [135,226]. Литературных данных об экспрессии тканевого полипептидного антигена в опухолевых тканях и его влиянии на прогноз заболевания и выживаемость немного.

Таким образом, цитокератины можно считать полезными онкомаркерами в онкологии. Основная их роль, на данном этапе, заключается в мониторинге лечения и ранней диагностике рецидива, и прогрессирования заболевания.

Как уже отмечалось выше, разработка высокочувствительных, специфичных методов мониторинга, прогноза при раке мочевого пузыря является одним из основных вопросов современной онкологии. В исследовании Chen Chen et al было показано, что в небольшой когорте пациентов при секвенировании РНК выделено 17 генов, в том числе MMP11, который ассоциирован со стадией TNM, общей выживаемостью при РМП, что соотносится с данными Li et al [120]. Полученные результаты указывают на прогностическую ценность MMP11 при уротелиальном раке.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой внеклеточные ферменты, которые разрушают внеклеточный матрикс и регулируют активность цитокинов и факторов роста [31,121,134]. Данные некоторых исследований указывают на то, что MMP11 экспрессируется в ткани мочевого пузыря, коррелирует с плохим прогнозом заболевания и выживаемостью пациентов с РМП и может быть многообещающим биомаркером [41]. Для скрининга, предполагаемого биомаркера в The Cancer

Genome Atlas (TCGA), был проведен сбор данных и выполнен биоинформационный анализ [170]. Всего было идентифицировано 4442 дифференциально экспрессируемых гена (DEGs) – 1712 с повышенной экспрессией и 2730 с пониженной экспрессией. MMP11 является одним из генов с наиболее высокой экспрессией у пациентов с РМП во всех молекулярных подтипах, исключение составляет LumP подтип: нейроэндокринный (n=20, p <0,0001), базально/плоскоклеточный (n=142, p <0,0001), люминальный (n=26, p <0,0001), люминальный инфильтративный (n=78, p <0,0001), люминальный папиллярный (n=142, p =0,1006), что подтверждается предыдущими исследованиями, демонстрирующими прогностическую роль MMP11 и еще 10 генов в прогрессировании РМП и влиянии на выживаемость [41]. MMP11 был выбран в качестве предполагаемого диагностического биомаркера для дальнейшего изучения из-за его секреторных свойств и высокой активности. Действительно, повышенный уровень белка MMP11 был обнаружен как в тканях первичного рака, так и в клеточных линиях РМП.

Опухолевые клетки используют несколько механизмов для регуляции экспрессии онкогена и гена – супрессора опухоли, чтобы способствовать инициации, прогрессированию опухоли и резистентности к терапии. В исследовании Chen Chen et al выявлено, что гипометилирование промотора участвует в активации MMP11 при раке мочевого пузыря как *in vivo*, так и *in vitro*. Эти данные позволяют предположить, что статус метилирования в промоторе MMP11 также можно использовать в качестве диагностического и прогностического индикатора при РМП [41]. MMP11 функционирует как матриксная металлопептидаза, регулируя уровни белка внеклеточного матрикса, что указывает на критическую роль в миграции и инвазии солидных злокачественных опухолей [69,231]. В 2016г. Li et al [121] определили прогностическую роль MMP11 в метастазировании и плохой выживаемости при уротелиальных карциномах с помощью иммуногистохимического

исследования. В исследовании Chen Chen et al при использовании РНК секвенирования было показано, что MMP11 имеет прямую корреляционную зависимость со стадией опухоли, степенью дифференцировки опухоли, процессами метастазирования и рецидивом и обратно пропорционально связан с прогнозом эффективности лечения и выживаемостью [41]. Корреляция между уровнем MMP11 и общей выживаемостью была подтверждена при помощи регрессионного анализа Коха (HR=1,057; 95CI=0,995-1,123; p=0,028). Следовательно, MMP11 может также использоваться как биомаркер рака мочевого пузыря.

Прогностическая роль MMP11, вероятно, опосредована его проонкогенной активностью. Таким образом, будущее направление исследований будет сосредоточено на роли MMP11 при прогрессировании РМП и его резистентности к терапии. Учитывая, что белок MMP11 преимущественно расположен во внеклеточном матриксе ингибирование его будет возможно при помощи специфического блокатора или нейтрализующего антитела, что в конечном итоге меняет опухолевое микроокружение и позволяет улучшить ответ на химиотерапию и иммунобиотерапию.

Агонисты Toll- подобных рецепторов (TLR) также могут обладать иммунотерапевтическим потенциалом при рак мочевого пузыря. TLR представляют собой класс PRR рецепторов, которые управляют иммунными ответами, распознавая различные молекулярные комплексы, ассоциированные с патогенами (PAMP) [30]. На основании гомологии последовательностей TLR позвоночных сгруппированы в 6 подсемейств. Наиболее известные примеры PAMPs включают липосахариды грамотрицательных бактерий [44], пептидогликаны грамположительных бактерий [221], вирусные одноцепочечные РНК [125], вирусные двухцепочечные РНК [216], которые распознаются TLR4, TLR2, TLR7 и TLR3, соответственно. TLR играют важную роль в инициации врожденного

иммунного ответа [88]. Также они могут экспрессироваться и на опухолевых клетках, могут участвовать не только в прогрессировании опухоли, но и в лечении рака [198]. TLR распознают вторгающиеся патогены и инициируют иммунный ответ для удаления инфекционных агентов. TLR2, TLR4 и TLR5 являются наиболее эффективными в защите мочевыводящих путей от инфекций [9,207]. Имея третье место по частоте соматических мутаций, рак мочевого пузыря является одним из наиболее иммуногенных видов рака. В нескольких исследованиях изучались различные молекулярные аспекты РМП, что привело к идентификации молекулярной патологии, молекулярных биомаркеров и молекулярных путей, участвующих в развитии РМП.

Как отмечалось выше, МНИРМП и МИРМП имеют разные молекулярные особенности, что приводит к гетерогенности их клинического поведения [112]. Идентификация новых молекулярных биомаркеров может помочь в стратификации групп риска и стратегий лечения. Возможно, понимание генетического разнообразия полиморфизма TLR поможет выбрать подходящее лечение.

Активация TLR может иметь двойную роль в опухолевых клетках: туморогенный эффект (позитивная регуляция опухоли), а также противоопухолевый эффект (негативная регуляция опухоли). После активации TLR NF- κ B транслоцируется в ядро и инициирует процесс транскрипции генов, участвующих в пролиферации клеток, включая циклин D1, циклин D2, cMyc, cMyb, циклооксигеназу (COX-2), BCL-2 и BCL-XL [225]. Таким образом, NF- κ B считается промотором опухоли [159]. Передача сигналов TLR в микроокружении опухоли сопровождается сложными взаимодействиями между раковыми клетками и PAMPs. TLR могут способствовать выживанию раковых клеток и ангиогенезу посредством воздействия цитокинов и хемокинов [150,176].

Экспрессия TLR на опухолевых клетках может запускать сигнальный каскад NF- κ B, выработку провоспалительных цитокинов и антиапоптотических белков, способствуя росту опухоли и пролиферации раковых клеток. Для повышения иммунитета в микроокружении опухоли привлекается больше иммунных клеток. Следовательно, опухолевые клетки продуцируют дополнительные проангиогенные факторы и факторы роста, вызывая повышенную устойчивость раковых клеток к цитотоксичности, опосредованной лимфоцитами. Раковые клетки используют различные стратегии уклонения от иммунного ответа, включая продукция TGF- β и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), повышающую и понижающую регуляцию специфических поверхностных молекул. Следовательно, опухолевые клетки не распознаются иммунными клетками и происходит уклонение от иммунного ответа [203] МНИРМП сопровождается снижением экспрессии TLR2, TLR9, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, при МИРМП демонстрируется снижение продукции TLR9 [17].

Характеристика иммунной микросреды опухоли, включая противоопухолевые иммунные субпопуляции и противоопухолевый профиль РМП, может быть полезной для прогнозирования клинического исхода. Следовательно, нарушение предопухолевого микроокружения и преобразование иммунного ответа из проопухолевого в противоопухолевый можно рассматривать как стратегию иммунотерапии [21]. Стимуляция противоопухолевого иммунитета с помощью иммуностимуляторов или вакцинации является перспективной стратегией лечения. Антагонисты TLR были признаны потенциальными агентами для улучшения противоопухолевой иммунотерапии. Исследования в этой области продолжаются [21].

Пациенты с РМП считаются подходящей популяцией для применения новых иммунотерапевтических стратегий. Иммунотерапия рака значительно продвинулась вперед благодаря идентификации прогностических биомаркеров [83]. PD-1 представляет собой рецептор клеточной поверхности

активированных Т-клеток, регулирует активацию Т-клеток посредством взаимодействия с PD-L1 – трансмембранным белком, экспрессируемым на различных типах клеток [146]. Контрольные точки PD-1, PD-L1 и CTLA-4 считаются первичными молекулярными мишенями для блокирования. Они являются негативными регуляторами иммунной функции Т-клеток [33] и их ингибирование приводит к повышенной активации иммунной системы. Опухолевые клетки ускользают от иммунитета, повышая экспрессию PD-L1. Следовательно, блокада PD-1 и PD-L1 является стратегией преодоления ускользания опухоли [215]. Ингибиторы контрольных точек не так давно были одобрены FDA для лечения уротелиального рака [79].

В настоящее время проводятся исследования *in vitro* и *in vivo* для поиска альтернативных вариантов для пациентов, не ответивших на предыдущее лечение. Исследования TLR – агонистов для лечения РМП показали многообещающие результаты. Imiquimod, TMX-101 TMX-202 (агонисты TLR7) были протестированы при РМП. Также был отмечен эффект агонистов TLR9 и TLR2 в снижении роста опухоли мочевого пузыря у мышей. Необходимы дальнейшие исследования по улучшению терапевтических стратегий с использованием путей TLR в качестве противоопухолевой иммунотерапии.

Заключение.

Основной целью определения генов-маркеров является возможность оценить прогноз заболевания и улучшить процесс принятия клинических решений. На сегодняшний день, недостаточно просто выявить статистически значимую связь маркера и прогноза заболевания, а необходимо показать улучшенную прогностическую точность многофакторной модели в сочетании с уже имеющимися клиническими признаками [190].

РМП является гетерогенным заболеванием. Поэтому маловероятно, что существует один-единственный маркер, который может адекватно

охарактеризовать потенциал и поведение злокачественной опухоли, чтобы сделать надежные выводы о возможных вариантах лечения. Это побудило многих исследователей оценивать комплексные пути, а не отдельные маркеры [101,193]. Панели маркеров, включающие драйверы ключевых путей в сочетании с клиническими и патологическими переменными, могут быть наиболее многообещающим подходом для точной стратификации риска и принятия клинических решений при РМП.

Тканевые биомаркеры теоретически можно использовать при МНИРМП для прогнозирования онкологических исходов, таких как рецидив и прогрессирование, а также ответ на внутривенное введение БЦЖ, и, в идеале, их можно использовать для улучшения индивидуального лечения и наблюдения на основе индивидуальных профилей риска. Кроме того, они могут быть полезны для определения доли пациентов с МНИРМП высокого риска, у которых, вероятно, разовьется прогрессирование заболевания до инвазивного заболевания, что требует интенсификации лечения, например, выполнение ранней радикальной цистэктомия.

На сегодняшний день интенсивно изучаются биомаркеры, являющиеся регуляторами клеточного цикла, ангиогенеза, апоптоза, сигнальные белки. Так p53, связан с признаками агрессивности опухоли и коррелирует с неблагоприятными онкологическими исходами [71,183,184,187,192,193]. Два метаанализа, обобщающие роль p53 при МНИРМП, показали, что его избыточная экспрессия может предсказать прогрессирование у пациентов с T1G3, но не может предсказать ответ на терапию БЦЖ [56,243]. Однако неоднородность включенных исследований и ограничения, связанные с иммуногистохимией, препятствовали каким-либо четким выводам [56].

Связь между измененной экспрессией Rb1 и прогнозом при РМП относительно слаба, и в большинстве исследований не удалось найти связь с рецидивами и прогрессированием [223]. Совсем недавно было показано, что

Rb1 может иметь прогностическое значение для рецидива и прогрессирования РМП только в сочетании с другими биомаркерами, например, p53 [183,193].

Было обнаружено, что антиапоптотический биомаркер сурвивин предсказывает рецидив, прогрессирование и выживаемость [182,189]. В самой крупной серии Fristrup et al. [70] проанализировали экспрессию сурвивина у 283 пациентов с МНИРМП и сообщили о прямой корреляции его гиперэкспрессии с рецидивами, прогрессированием и ОВ. Недавно в метаанализе 14 исследований сообщалось о статистически значимой связи VIRC5 с рецидивами, безрецидивной и общей выживаемостью [96]. Однако проспективных крупных исследований не хватает. Исследованы и другие биомаркеры апоптоза, такие как Bcl-2 и Вах, но работ по этой теме мало [10,234]. Наконец, было показано, что биомаркеры клеточного сигнального пути, такие как члены семейства ErbB и FGFR, а также биомаркеры ангиогенеза (VEGF) и инвазии опухолевых клеток (Е-кадгерин и N-кадгерин), связаны с прогнозом при МНИРМП [35,237].

Основываясь на литературных данных, можно сделать вывод, что ни один из оцениваемых тканевых биомаркеров сам по себе не может быть использован для прогнозирования онкологических исходов с достаточной точностью, чтобы влиять на тактику лечения в клинической практике. Поэтому постулируется, что панель биомаркеров может повысить точность прогноза [153,245]. Однако даже в этом случае результаты противоречивы, и, следовательно, на сегодняшний день из-за низкого уровня доказательности и противоречивых результатов использование тканевых биомаркеров при РМП широко не рекомендуется.

Тканевые биомаркеры МИРМП отражают изменения во многих путях патогенеза с глубоким нарушением регуляции в сложных молекулярных схемах. Следовательно, эти изменения могут служить прогностическими

факторами исходов, предикторами ответа на терапию, а также могут выступать в качестве терапевтических мишеней.

В нескольких ретроспективных исследованиях сообщалось, что гиперэкспрессия p53 также является прогностическим белком при МИРМП, особенно у пациентов после выполнения радикальной цистэктомии [188,191]. Однако в настоящее время использование p53 в качестве прогностического биомаркера при МИРМП все еще не рекомендовано, несмотря на более чем 100 исследований, оценивающих его достоверную значимость.

Как и при МНИРМП, биомаркеры апоптоза, такие как сурвивин и семейство Bcl-2, связаны с прогнозом заболевания при МИРМП [101]. Интересно, что доля образцов со сверхэкспрессией сурвивина прогрессивно увеличивается от МНИРМП к МИРМП [182]. В большом многоцентровом международном исследовании добавление сурвивина значительно улучшило точность клинико-патологических признаков для прогнозирования рецидива заболевания и безрецидивной выживаемости в подгруппе пациентов с заболеванием pT1-3N0M0 [186]. Биомаркеры пролиферации и ангиогенеза, такие как Ki67, VEGF, были связаны с более высокой стадией заболевания, лимфоваскулярной инвазией, метастазированием в лимфатические узлы, рецидивом заболевания и ухудшением показателей безрецидивной выживаемостью [89,128,129,247].

Всесторонняя характеристика геномного ландшафта рака мочевого пузыря с помощью TCGA привела к идентификации при МНИРМП трех молекулярных подтипов (Класс I, II и III), при МИРМП – шести молекулярных подтипов (Люминальный папиллярный, Люминальный неспецифический, Люминальный нестабильный, Базально/плоскоклеточный, Подтип богатый стромой, Нейроэндокриноподобный). Полученные результаты указывают на наличие различных молекулярных подтипов с характерными признаками

экспрессии, которые могут влиять на прогноз и выбор терапевтических стратегий [141].

Прогнозирование ответа на химиотерапию может быть полезным для принятия решения относительно типа и сроков системной и местной терапии. При МНИРМП после ТУР выполняется внутривезикулярная терапия цитостатиками (митомицин С, доксорубицин) или БЦЖ терапия. Однако риск рецидива опухоли составляет 30-40%. Нарушение регуляции клеточного цикла является характерной чертой опухолевых клеток. Несколько регуляторов клеточного цикла и маркеров пролиферации были протестированы в качестве предикторов ответа на химиотерапию, таких как CyclinD1, CCND1 и Ki-67. Отличительной чертой рака является их способность избегать апоптоза, процесса, контролируемого каспазами. Каспазы, в свою очередь, регулируются несколькими молекулами, участвующими в обнаружении повреждений ДНК или митохондрий, включая p53 и Bcl-2. p53 широко тестировался при РМП как прогностический биомаркер, так и предиктор ответа на лечение. Хотя первоначальные ретроспективные исследования были многообещающими, результаты рандомизированных испытаний не показали роли p53 в качестве предиктора ответа на химиотерапию. Исследование III фазы, предназначенное для оценки преимуществ стратификации пациентов на основе статуса p53 для адъювантной химиотерапии на основе цисплатина, не смогло подтвердить прогностическую значимость экспрессии p53 [59,211].

Многие химиотерапевтические агенты действуют, вызывая повреждения ДНК. Раковые клетки с дефектными механизмами репарации ДНК неспособны исправить повреждения, вызванные цитостатиками, и, следовательно, более восприимчивы к гибели. Белки, участвующие в обнаружении и восстановлении повреждений ДНК, которые играют роль в

ответе на химиотерапию РМП, включают BRCA-1, BRCA-2, RAD51, PARP1, ERCC1, ERCC2, ATM, RB1 и FANCC. [209,236].

В последние годы иммунотерапия показала беспрецедентную активность при РМП после неэффективности терапии на основе цисплатина. В контексте иммунобиотерапии ни один из молекулярных подтипов не имеет профиля, связанного с положительным ответом на лечение ингибиторами контрольных точек [130]. Обнаружение PD-L1 в образцах опухолей с помощью иммуногистохимии (ИГХ) использовалось в нескольких клинических испытаниях для оценки возможности экспрессии PD-L1 в качестве прогностического биомаркера. Поскольку тестирование на PD-L1 не стандартизировано, оценка PD-L1 имеет несколько ограничений. Группа, предварительно получавшая цисплатин в исследовании Imvigor 210, выявила связь между частотой объективного ответа на атезолизумаб и статусом экспрессии PD-L1 (Частота объективного ответа составила 27% у пациентов с PD-L1-позитивными иммунными клетками $\geq 5\%$ против 18% у пациентов с PD-L1-позитивными иммунными клетками $\geq 1\%$ против 15% у всех пациентов) [171]. Наоборот, в исследовании CheckMate 032 не было различий в частоте объективного ответа между пациентами с экспрессией PD-L1 $< 1\%$ и пациентами с экспрессией PD-L1 $\geq 1\%$ (26,2% против 24,0%, соответственно) [195]. В исследовании CheckMate 275, где оценивалась эффективность ниволумаба при метастатической уротелиальной карциноме после терапии препаратами платины подтвердили связь частоты объективного ответа с эффективностью иммунотерапии (частота объективного ответа составила 28,4, 23,8 и 16,1% у пациентов с экспрессией PD-L1 5% и выше, 1% и выше и менее 1%, соответственно) [196]. В исследовании KEYNOTE-045 эффективность пембролизумаба оказалась независимой от экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках [68]. Несмотря на эти многообещающие результаты, использование биомаркеров для прогнозирования ответа на системную иммунотерапию остается ограниченным. Действительно, значительная часть

пациентов с отрицательным статусом биомаркеров все еще отвечает на лечение, а многие пациенты с положительным статусом биомаркеров не реагируют [171,196]. Возможно, пространственные, временные и гетерогенные факторы являются ограничивающими факторами биомаркера PD-1 [185].

Имеются данные о том, что часть пациентов с раком мочевого пузыря может отвечать на таргетную терапию [173]. В настоящее время афатиниб, ингибиторы тирозинкиназы, ERBB2, EGFR, FGFR2 и FGFR3 проходят II-III фазы клинических испытаний. На сегодняшний день нет данных о биомаркерах прогноза ответа на таргетную терапию.

Современные системы классификации не полностью отражают гетерогенность рака мочевого пузыря. Результаты молекулярного исследования когорт пациентов показывают, что группировка пациентов в классы на основе молекулярного ландшафта может быть использована для изучения патогенеза этого сложного заболевания. Ранние данные свидетельствуют о том, что эти исследования также можно использовать для прогнозирования ответа на лечение. В идеале, чтобы получить надежные результаты мы должны совместить клинический, генетический и иммуногистохимический профиль каждой опухоли. Основной проблемой МНИРМП является высокая частота рецидивов, в связи с чем появляется необходимость более раннего выявления опухолей с высоким потенциалом прогрессирования. Механизмы резистентности МИРМП к системному лечению неизвестны, в настоящее время существует проблема выявления молекулярных биомаркеров, позволяющих выбрать эффективное лечение. Для МНИРМП факторами прогностической значимости на сегодняшний день являются: p53, Ki 67, BIRC5 (сурвивин), β -катенин, E-кадгерин, N-кадгерин. Ведутся работы по изучению прогностической роли белков: циклин B1 (CCNB1), MYBL2, тканевой полипептидный антиген (TPA), MMP11, TLR2 и TLR4. Существует острая необходимость в клинических исследованиях,

изучающих молекулярно-генетический профиль такого сложного, гетерогенного заболевания, как рак мочевого пузыря. Использование биомаркеров позволит индивидуализировать лечение пациентов РМП и, несомненно, за этим будущее современной медицины. Это подтверждается эффективным использованием такого подхода при опухолях других локализаций. Так, для рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы эффективно используются молекулярно-генетические анализы, такие как Oncotype, MammaPrint, PAM50 и другие, позволяющие с достоверностью до 90% оценивать риск развития рецидива на основании анализа экспрессии комплекса генов в ткани опухоли. На основании анализа литературы мы предположили, что аналогичный подход может быть эффективен и для МНИРМП.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор клинического материала проводился на базе научно-исследовательского отдела хирургии, урологии, гинекологии и инвазивных технологий в онкологии. Обследование и лечение пациентов осуществлялось в профильных клинических подразделениях ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ. Морфологическое исследование выполнено в патологоанатомическом отделении ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ. Молекулярно-генетическое исследование проведено в научно-исследовательском отделе молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей подразделениях ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ.

Обоснование дизайна исследования.

Согласно данным ракового генома (TCGA), для мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря характерна высокая мутационная. Транскрипционный анализ мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря выявил также высокую мутационную нагрузку. Рак мочевого пузыря является молекулярно-гетерогенным заболеванием, что должно способствовать развитию молекулярно-обоснованного персонализированного подхода к лечению.

Современные подходы к лечению рака мочевого пузыря требуют понимания молекулярных подтипов опухоли. Новые достижения в понимании молекулярных характеристик рака мочевого пузыря могут привести к эволюции в понимании патогенеза заболевания. Идентификация молекулярно-генетических подтипов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря может позволить проведение персонализированного лечения пациентов.

В исследование вошло 308 пациентов, получивших специальное лечение в Российском Научном Центре Рентгенорадиологии за период с 2017 по 2020гг, из них 238 пациентов с МНИРМП.

Из 238 пациентов первичной группы в исследовательскую группу I после анализа данных отобраны первичные онкологические больные (n=83) с диагнозом мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря (критерии включения: первичный МНИРМП, больные в ходе лечения которым была выполнена цистоскопия и биопсия опухоли мочевого пузыря с одновременным проведением ТУР, ФДД и внутривезикулярной химиотерапией препаратом митомицин или доксорубицин и в последующем выполнен полный курс индукционной внутривезикулярной химиотерапии, 6-8 еженедельных введений, контрольные цистоскопии выполнялись каждые три месяца в течение года).

В вторую группу были включены пациенты (n=81) с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря, которым было выполнено специальное лечение (ТУР мочевого пузыря + полный курс внутривезикулярной химиотерапии) и на стадии динамического наблюдения при цистоскопии производился забор неизмененных тканей мочевого пузыря для выполнения морфологического и молекулярно-генетического исследований.

Группа 3 (n=70) – контрольная группа, состоящая из пациентов с онкологическими заболеваниями других локализаций, а также из пациентов с ДГПЖ, МКБ, у которых при выполнении цистоскопии производился забор тканей мочевого пузыря для выполнения морфологического и молекулярно-генетического исследований (рисунок 1).

Формирование групп сравнения проводилось в зависимости от решаемой задачи. Оценку репрезентативности определяли по формулам оценки репрезентативности для количественных и качественных признаков при неодинаковом числе наблюдений в группах.

Первым этапом работы явилось создание базы данных пациентов, прошедших лечение в РНЦРР за период с 2017 по 2020гг. и находившихся под дальнейшим динамическим наблюдением.

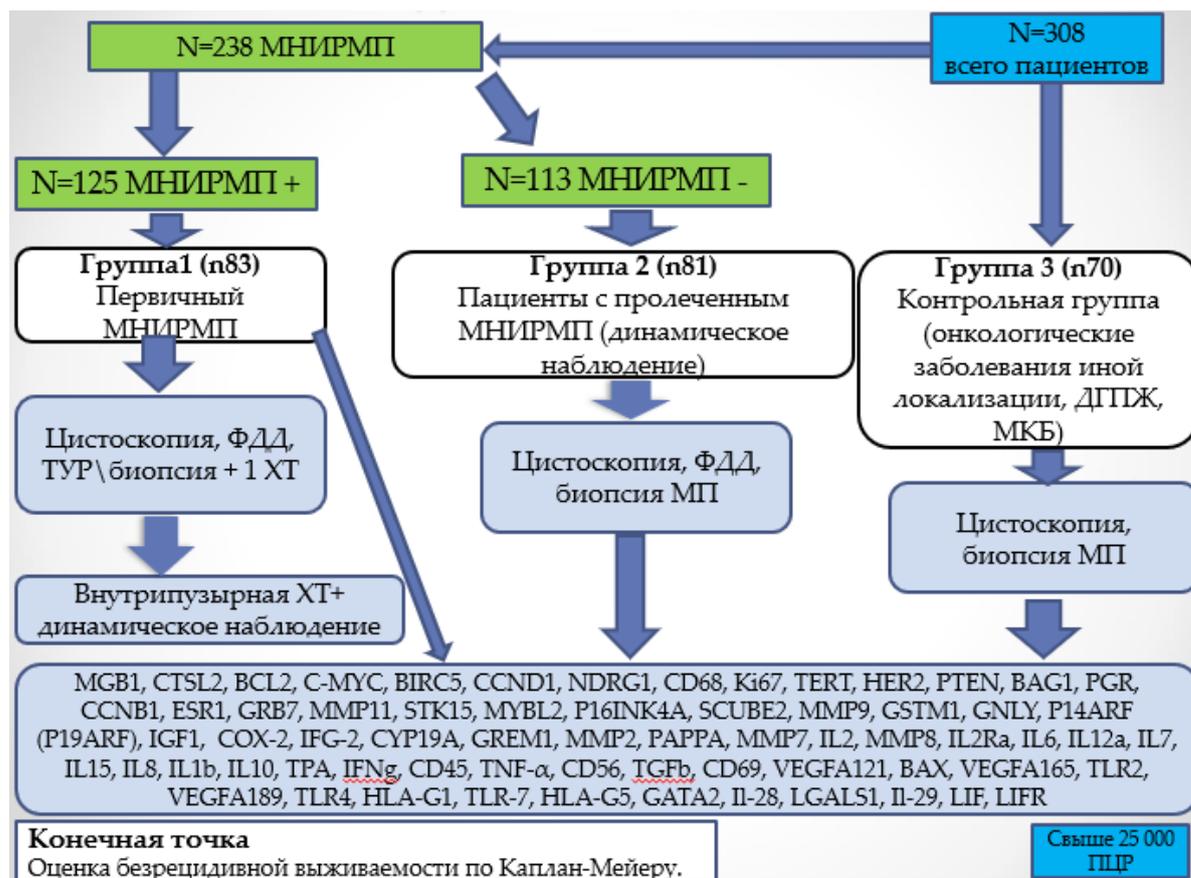


Рис.1 Дизайн исследования.

Первым этапом работы явилось создание базы данных пациентов, прошедших лечение в РНЦРР за период с 2017 по 2020гг. и находившихся под дальнейшим динамическим наблюдением.

Лечение первой исследовательской группы пациентов было выполнено согласно клиническим протоколам РНЦРР МЗ РФ, подразумевающим забор биопсии из опухоли и неизменной ткани мочевого пузыря с использованием эндоскопической фотодинамической диагностики с одновременной трансуретральной резекцией (ТУР) стенки мочевого пузыря с опухолью, а также проведение внутривезикулярной химиотерапии препаратами доксорубицин или митомицин, далее контрольные цистоскопии выполнялись каждые три месяца в течение года.

У всех пациентов произведено определение уровня экспрессии мРНК генов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

В последующем произведен сравнительный анализ транскрипции генов:

1. В ткани опухоли в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания, результатов лечения.
2. В морфологически-неизменной ткани мочевого пузыря у пациентов с МНИРМП.
3. В ткани мочевого пузыря у пациентов с пролеченным МНИРМП, находящихся под динамическим наблюдением.
4. В ткани мочевого пузыря у пациентов с гиперплазией предстательной железы, аденомой предстательной железы, раком предстательной железы и другими онкологическими заболеваниями.

Морфологическое изучение материала проводилось в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей мочевого пузыря Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ).

Методом полимеразной цепной реакции определялась экспрессия мРНК следующих генов: MGB1, CTSL2, BCL2, TERT, HER2, PTEN, BAG1, PGR, GREM1, MMP2, PAPPA, MMP7, IL2, MMP8, IL2Ra, IL6, IL12a, IL7, IL15, IL8, IL1b, IL10, TPA, IFN γ , CD45, TNF- α , C-MYC, BIRC5, CCND1, NDRG1, CD68, Ki67, CD56, TGFb, CD69, VEGFA189, TLR4, HLA-G1, TLR-7, HLA-G5, GATA2, II-28a, LGALS1, II-29, LIF, LIFR, CCNB1, ESR1, GRB7, MMP11, STK15, MYBL2, VEGFA121, BAX, VEGFA165, TLR2, P16INK4A, SCUBE2, MMP9, GSTM1, GNLV, P14ARF (P19ARF), IGF1, COX-2, IFG-2, CYP19A

Полимеразная цепная реакция – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале.

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) используется для идентификации известной последовательности РНК. Суть реакции – синтез двухцепочечной РНК на матрице одноцепочечной РНК. Для этого одноцепочечную РНК превращают в реакции обратной транскрипции в комплементарную ДНК (кДНК) и далее амплифицируют уже ДНК – матрицу, используя традиционную ПЦР.

ОТ-ПЦР широко используют для выявления вирусов, геном которых представлен РНК (ВИЧ, Гепатит С, вирусы гриппа и другие), для диагностики генетических заболеваний и полуколичественного определения специфических молекул РНК в клетке или ткани, как индикатор экспрессии мРНК соответствующих генов.

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси основных компонентов:

1. Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, идентичные противоположным концам противоположных цепей искомого участка ДНК-мишени. Служат затравкой для синтеза комплементарной цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы и играют ключевую роль в образовании и накоплении продуктов реакции амплификации.
2. Таq – полимеразы – термостабильный фермент, который обеспечивает достраивание 3' – конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.
3. Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение рН.
4. Анализируемый образец - подготовленный для внесения в реакционную смесь препарат.

Если в исследуемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходят изменения, которые обеспечивают

определенными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов:

Денатурация – это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований противоположных цепей ДНК под воздействием высоких температур.

Отжиг – это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК – мишени. Праймеры подбирают так, чтобы они ограничивали искомым фрагмент ДНК и были комплементарны противоположным цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа. Если это условие не соблюдено, то отжига праймера не происходит.

Элонгация (синтез). После отжига праймеров Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается. Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагменты ДНК.

Для подготовки пробы к постановке ПЦР используют различные методики выделения. Их суть заключается в экстракции нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) из исследуемого материала и удалении или нейтрализации посторонних примесей. На сегодняшний день основным методом детекции результатов ПЦР является гибридационно-флюоресцентный метод.

Флюоресцентные методы детекции построены на использовании флуорохромов – молекул, обладающих способностью к свечению, в результате поглощения световой энергии. Детекция осуществляется специальными приборами после амплификации (ПЦР с анализом результатов по конечной точке). Технология позволяет минимизировать риск

контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов.

Таким образом в нашей работе каждый образец материала биопсии сразу помещали в раствор солей, стабилизирующих РНК EverFresh RNA (Клоноген, Санкт-Петербург). Образцы сразу использовали для анализа или хранили при -70С. На этапе выделения РНК использовались коммерческие наборы колонок RNeasy mini Kit (Qiagen, Германия). Обработку исследуемого материала проводили в соответствии с протоколом компании-производителя. Из протокола был исключен этап обработки ДНКазой I, так как использовались праймеры, специфические только для кДНК. РНК элюировали в 100 мкл DEPC-обработанной воды. Объем конечного раствора составлял 100 мкл со средней концентрацией РНК в нем 35-40 мкг/мл.

Реакцию обратной транскрипции ставили в отдельной пробирке сразу после получения РНК, используя ген-специфичные праймеры, наборы реагентов, протоколы и оборудование ЗАО «НПФ ДНК-Технология» (Россия). Реакцию проводили при температуре 40°С в течение 30 минут, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°С в течение 5 минут. Для увеличения объемов образцов после ОТ кДНК разводили в 2 раза в воде, не содержащей РНК-каз до конечного объема 40 мкл. Полученный раствор кДНК либо сразу использовали для ОТ-ПЦР, либо хранили при -20С.

Для постановки ПЦР использовали реактивы и протокол фирмы «ДНК-Технология». Контроль отсутствия реакции на геномную ДНК ставили с образцами, не прошедшими реакцию обратной транскрипции, которые разводили в ТЕ-буфере в конечной концентрации, эквивалентной конечной концентрации кДНК.

В каждой постановке ПЦР использовали отрицательный контроль. Для оценки отсутствия контаминации использовали реакционную смесь без матрицы. На образцах, прошедших все стадии выделения РНК без добавления

фермента для обратной транскрипции, оценивали возможное наличие амплификации примесей геномной ДНК. В контрольных образцах после 50 циклов продукт амплификации отсутствовал. Реакцию амплификации проводили в дублях, из которых в расчет брали среднее значение точки пересечения (crossing point, Cp). ДНК-зонды, которые использовали для детекции продуктов амплификации исследуемых и референсных генов, были помечены флуоресцентным красителем FAM. Оптимальную температуру отжига праймеров и зондов подбирали экспериментально с использованием режима «градиент температур», для всех тест-систем эта температура составила 64°C. Амплификацию выполняли в режиме «реального времени» в объеме 12 мкл по следующей программе: 1 цикл – 80°C, 30 сек, 94°C 1 мин; 50 циклов – 94°C 10 сек, 64°C 20 сек, использовали приборы “ДТ-96” и “ДТ-Prime 5” производства фирмы ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64°C.

Методы определения и расчета уровня относительной экспрессии мРНК исследуемых генов по контрольным генам.

Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, методом сравнения индикаторных циклов (Cp) с использованием нормализации по контрольным генам (House Keeping Gene) согласно методике Vandesompele. В качестве контрольных генов использовали GUSB (бета-глюкуронидаза), B2M (бета-2-микроглобулин) и HPRT1 (гипоксантин-гуанин фосфорибосилтрансфераза 1), как наиболее стабильно экспрессируемых в различных тканях. Они были подобраны экспериментально таким образом, чтобы диапазон экспрессии контрольных генов перекрывал диапазон экспрессии всех исследуемых генов. По контрольным генам нормировали количество мРНК для каждого образца. Реакцию амплификации проводили в дублях, из которых в расчет брали среднее значение точки пересечения Cp (crossing point).

Формулы расчета:

Уровень экспрессии без учёта количества материала, $[C_i]$, определяли как

$[C_i] = 2^{C_p} - C_{p \min}$, где C_p – значение индикаторного цикла в исследуемом образце, а $C_{p \min}$ – минимальное значение индикаторного цикла (соответствует максимальному значению экспрессии) во всей выборке для данного гена, 2 – эффективность амплификации. Сначала вычислялись нормировочные факторы для каждого из нормировочных генов по формуле:

$$NF = 2^{C_p} - C_{p \min},$$

где C_p – значение индикаторного цикла в исследуемом образце, а $C_{p \min}$ – минимальное значение индикаторного цикла (соответствует максимальному значению экспрессии) во всей выборке для нормировочного гена. Нормировочный фактор NF с учётом всех нормировочных генов рассчитывается как среднее геометрическое:

$$NF = \sqrt[3]{NF_{b2m} \times NF_{gusb} \times NF_{hprt1}}$$

Уровень экспрессии с учётом нормировочного фактора рассчитывали, как $[CNF] = [C_i] / NF$ и использовали для определения относительного уровня экспрессии по формуле $[CNF] / [CNF \min]$, где $CNF \min$ – значение CNF в образце с минимальным уровнем экспрессии.

В результате расчета в исследуемой выборке по каждому из 66 генов определялся образец с самым низким уровнем экспрессии. Этот образец (всего 66 образцов, соответствующих числу исследованных генов) приобретал значение «1». В остальных образцах с более высоким уровнем экспрессии (больше, чем «1») значения показывали, во сколько раз экспрессия гена выше по отношению к образцу со значением «1».

Диагностика рака мочевого пузыря в исследовании проводилась при помощи цистоскопии с фотодинамической терапией.

Методика выполнения ТУР с ФДД.

На первом этапе производилась катетеризация мочевого пузыря катетером Фоллея 14 Сн. По катетеру внутривезикулярно вводилось 1.5 г препарата Аласенс в разведении на 50 мл физиологического раствора. Экспозиция препарата до 60 минут. ФДД выполнялась с помощью эндоскопического оборудования фирмы KARL-STORZ-ENDOSKOPE: ФДД камера SCB Tricam SLII, источник света SCB D-Light C, цистоскопы и резектоскопы KARL-STORZ-ENDOSKOPE. Анестезия при ТУР – СМА. ТУР всегда начинался и завершался фотодинамической диагностикой.

В РНЦРР используется общепринятая методика удаления опухоли единым блоком (en-BLOCK). Источник энергии для ТУР ERBE ICC 300, лазер для en-block энуклеации IPG Photonics FiberLase U1.

Принцип заключается в круговом разрезе слизистой оболочки на безопасном расстоянии от очага поражения с последующей подготовкой и удалением всей опухоли, включая подлежащую часть детрузора. Образец извлекался с помощью ирригационного шприца низкого давления или граспера.

Внутривезикулярное введение Митомицина.

На операционном столе, после удаления опухоли внутривезикулярно вводилось 40.0 мг препарата Митомицин. Противопоказанием к интраоперационному введению Митомицина являлось наличие интраоперационной перфорации стенки мочевого пузыря и активной гематурии.

Методика введения: 40мг Митомицина разводилось в 40мл изотонического раствора натрия хлорида. Полученный раствор по катетеру вводился в мочевой пузырь.

Аналогичная дозировка препарата Митоминин использовалась при еженедельном внутривузырном введении препарата. В послеоперационном периоде внутривузырно химиопрепарат вводился в течение 6-8 недель 1 раз в неделю. Экспозиция химиопрепарата во всех случаях составляла 60 минут.

Выбор основных характеристик и статистических критериев при их сравнении осуществлялся после изучения распределения признака и его сравнения с распределением Гаусса по критерию Колмогорова-Смирнова. Для числовых признаков с распределением, соответствующим распределению Гаусса, рассчитывали средние значения числовых признаков, стандартное отклонение. Достоверность различий p рассчитывали дисперсионным анализом. При количестве групп более двух p рассчитывали с учетом множественности сравнений (по критерию Scheffe). Для анализа связанных значений применяли T-test.

Для признаков с распределением, значительно отличающимся от нормального, рассчитывалась медиана, квартили и применялись непараметрические методы сравнения несвязанных признаков (Kruskal-Wallis Anova & Median test при количестве сравниваемых групп более двух и Mann-Whitney при сопоставлении двух групп). Для связанных значений применялся критерий Wilcoxon matched pairs test.

При сравнении частот строились таблицы сопряженности признаков. Для расчета p использовался точный критерий Фишера (при небольших объемах групп) и непараметрический критерий χ^2 -2. Для частот, характеризующих чувствительность и специфичность, рассчитывали 95% доверительные интервалы. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Проводился корреляционный анализ Pearson (Spearman для непараметрических данных) с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости.

Пороговые значения изучаемых показателей, разделяющие исследуемые группы, определялись методом построения кривых ROC.

После однофакторного анализа изучаемых показателей выполнялся дискриминантный анализ с целью минимизации факторов, значимо разделяющих основные группы.

Расчет безрецидивной выживаемости выполнялся точным методом Kaplan-Maier, сравнение кривых выживаемости выполнялось методом Cox и Log-Rank. Для отбора независимых факторов, показавших при однофакторном анализе значимую связь исследуемого фактора с безрецидивной выживаемостью, применялся Proportional hazard Cox regression.

При выборе статистических процедур учитывались методологические требования Международного конгресса по гармонизации GGP “Статистические принципы для клинических исследований”, (ICH Guidelines//Good Clin.Pract.J. – 1998.-Vol.5, № 4. – P.27-37).

Все вычисления проводились на персональном компьютере с помощью математических пакетов «STATISTICA-12» и SPSS-22.

Результаты клинико-морфологической характеристики пациентов.

Методом полимеразной цепной реакции была изучена экспрессия мРНК 66 генов: MGB1, CTSL2, BCL2, TERT, HER2, PTEN, BAG1, PGR, GREM1, MMP2, PAPPА, MMP7, IL2, MMP8, IL2Ra, IL6, IL12a, IL7, IL15, IL8, IL1b, IL10, TPA, IFN γ , CD45, TNF- α , C-MYC, BIRC5, CCND1, NDRG1, CD68, Ki67, CD56, TGFb, CD69, VEGFA189, TLR4, HLA-G1, TLR-7, HLA-G5, GATA2, Il-28a, LGALS1, Il-29, LIF, LIFR, CCNB1, ESR1, GRB7, MMP11, STK15, MYBL2, VEGFA121, BAX, VEGFA165, TLR2, P16INK4A, SCUBE2, MMP9, GSTM1, GNLY, P14ARF (P19ARF), IGF1, COX-2, IFG-2, CYP19A.

Как уже отмечалось выше, изучение генов проводилось в трех типах тканей: в опухолевой ткани мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря,

неизменной слизистой мочевого пузыря у пациентов находящихся под динамическим наблюдением после специализированного лечения мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря и у пациентов с «условно здоровым» мочевым пузырем, имеющих онкологические заболевания других локализаций.

Рак мочевого пузыря стадии pTa является гетерогенным заболеванием с большими вариациями частоты рецидивов, в опухолях pT1 существует значительная прогностическая изменчивость. В частности, для опухолей pT1G3 естественное течение заболевания варьирует от отсутствия рецидива после резекции до быстрого прогрессирования, мышечно-инвазивной и метастатической стадии. Эта изменчивость может поставить под угрозу стандартное клиническое ведение пациентов и требует индивидуальной стратификации рисков.

Возраст пациентов, включенных в наше исследование, варьировал от 20 лет до 91 года, медиана составила 62 года, большинство пациентов были старше 44 лет. При сравнении групп по возрастному составу выявлено, что в 1 группу вошли более возрастные пациенты, различия достоверны (таблица 3).

Таблица 3.

Распределение пациентов, вошедших в исследование, по группам и возрасту.

Группы	Кол-во больных	Средний возраст (лет)	Ошибка	Возраст мин	Возраст макс
1	83	66,3	1,24	29,0	91,0
2	81	60,8*	1,42	22,0	91,0
3	70	58,4**	1,99	20,0	89,0
Всего	234	62,0	0,91	20,0	91,0

*- p=0,03; ** - p=0,002

Распределение больных по группам представлено в таблице 4. В работу были включены пациенты только с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря, в качестве группы контроля были взяты пациенты с условно «здоровым» мочевым пузырем и онкологическими заболеваниями других локализаций, и гиперплазией предстательной железы, а также пациенты с пролеченным раком мочевого пузыря начальных стадий, находящихся под динамическим наблюдением. В 1 группе распределение больных по стадиям выглядело следующим образом: T1N0M0 – 64 (77,1%), TisN0M0 – 14 (16,9%), TaN0M0 – 5 (6,9%).

Таблица 4.

Распределение больных, вошедших в исследование по онкологическим локализациям.

Локализация процесса	1 группа	2 группа	3 группа	Всего
РМП	83			83 (35%)
РМП в стадии д/наблюдения		81		84 (35,5%)
Рак предстательной железы			34	70 (29,5%)
Гинекологический рак			14	
Рак толстой кишки			3	
Рак щитовидной железы			2	
Рак яичка			2	
Забрюшинная липосаркома			1	
Доброкачественная гиперплазия предстательной железы			14	
Всего	83	81	70	234

В группе 4 в наблюдались пациенты после лечения рака мочевого пузыря T1N0M0 стадии. В группе 3 пациентов с IV стадией онкологических заболеваний не было. Виды онкологических заболеваний по группам представлены в таблице 4.

Морфологическое подтверждение диагноза имели все пациенты. Гистологически рак мочевого пузыря был представлен уротелиальным раком различной степени дифференцировки (таблица 5).

Таблица 5.

Распределение пациентов, вошедших в исследование, в зависимости от степени дифференцировки опухоли.

Группы	Степень дифференцировки			Всего
	G1	G2	G3	
1	47 (56,6%)	2 (2,4%)	34 (41%)	83
2	38 (46,9%)	3 (3,7%)	40 (49,3%)	81
Всего	85	5	74	166

Достоверных различий в распределении пациентов в зависимости от степени дифференцировки уротелиального рака в группах 1 и 2 не получено ($p > 0,05$).

При оценке в группах уровня наличия гематурии достоверных различий не получено ($p > 0,05$). Имеет место тенденция к увеличению уровня гематурий в группе 2 – 66 (81,5%) против 53 (63,9%) – в группе 1 (таблица 6).

При обращении пациентов картина первичной опухоли в мочевом пузыре оценивалась в зависимости от количества первичных очагов и размеров первичной опухоли. Эти данные представлены в таблице 7.

Таблица 6.

Наличие гематурии в группах пациентов, вошедших в исследование

Группа	Гематурия		Всего
	Есть	Нет	
1	53 (63,9%)	30 (36,1%)	83
2	66 (81,5%)	15 (18,5%)	81
Всего	119	45	164

Таблица 7.

Распределение пациентов, вошедших в исследование, в зависимости от количества первичных очагов в мочевом пузыре и размеров первичной опухоли

Группа	Количество очагов			Всего
	1	2-7	≥ 8	
1	71 ((85,5%)	11 (13,3%)	1 (1,2%)	83
2	49 (60,5%)	19 (23,5%)	13 (16%)	81
Всего	120	30	14	164
Группа	Размер первичной опухоли		Всего	
	< 3см	≥ 3 см		
1	58 (69,9%)	25 (30,1%)	83	
2	44 (54,4%)	37 (45,6%)	81	
Всего	102	62	164	

Из таблицы видно, что в 1 группе выявлено большее количество пациентов с одним опухолевым очагом, выявленным при цистоскопии, различия

достоверные ($p < 0,05$). При сравнении групп по размерам первичной опухоли отмечена тенденция к большему количеству больных с размером первичной опухоли < 3 см в 1 группе 58 (69,9%) и 44 (54,4%), соответственно, однако различия недостоверные ($p > 0,05$).

При сравнении пациентов по соблюдению питьевого режима различий не выявлено, т.к. согласно данным анамнеза более 1.5 литров жидкости выпивали в день практически все пациенты.

Одним из значимых факторов канцерогенеза является курение и ожирение. Анамнез по курению удалось собрать у всех пациентов, он представлен в таблице 8.

Таблица 8.

Характеристика пациентов, вошедших в исследование, с учетом данных анамнеза по курению.

Группы	Курение		Всего
	Есть	Нет	
1	46 (55,4%)	37 (44,6%)	83
2	33 (40,7%)	48 (59,3%)	81
3	13 (18,6%)	57 (81,4%)	70
Всего	92	142	234

Нами получены достоверные различия между количеством курящих пациентов из группы 3 – 13 (18,6%) и 1 группы – 46 (55,4%) ($p=0,002$), а также 2 группы – 34 (40,7%) ($p=0,001$). То есть можно говорить о наличии прямой корреляционной зависимости между курением и развитием рака мочевого пузыря в нашей работе.

При сравнении по индексу массы тела (ИМТ) достоверных различий не получено (таблица 9). Во всех группах прослеживается тенденция к увеличению ИМТ >20. Индекс массы тела >25 выявлен более чем в 60% наблюдений. Нарушение толерантности к глюкозе и сахарный диабет 2 типа отмечены у более 65 пациентов.

Таблица 9.

Характеристика пациентов, вошедших в исследование, в зависимости от ИМТ.

Группы	Индекс массы тела			Всего
	<20	20-30	>30	
1	3 (3,6%)	58 (69,9%)	22 (26,5%)	83
2	2 (2,5%)	54 (66,7%)	25 (30,8%)	81
3	6 (8,6%)	43 (61,4%)	21 (30%)	70
Всего	11	155	68	234

Наследственная предрасположенность к развитию рака мочевого пузыря в наших группах не прослеживается (таблица 10).

Таблица 10.

Распределение пациентов, вошедших в исследование, по наследственной онкологической предрасположенности.

Группы	Рак у родственников 1-2 колена		Всего
	Есть	Нет	
1	46 (56,1%)	36 (43,9%)	82
2	32 (61,5%)	20 (38,5%)	52
Всего	78	56	134

Данную информацию удалось получить в 134 случаях: в 1 группе - у 82-х, и во 2а – у 52-х больных. Достоверных различий в наших двух группах по наследственной предрасположенности к развитию рака мочевого пузыря (родственники 1 и 2 колена) не выявлено ($p > 0,05$). Как уже отмечалось выше, пациентам 1 группы выполнялась трансуретральная резекция с последующей внутривезикулярной химиотерапией. Как правило, внутривезикулярная химиотерапия проводилась препаратом митомицин. В 1 группе внутривезикулярная химиотерапия выполнена 79 (59,0%), во 2 – 55 (41,0%) больным, достоверных различий не получено ($p > 0,05$).

Таким образом, группы не различались по степени дифференцировки опухоли мочевого пузыря, по уровню гематурии, размеру первичной опухоли, питьевому режиму, индексу массы тела, наследственной предрасположенности, проведенной внутривезикулярной химиотерапии. Достоверные различия получены при сравнении групп по возрастному составу выявлено, что в 1 группу вошли более возрастные пациенты, различия достоверны ($p < 0,05$), по большему количеству пациентов с одним опухолевым очагом при первичной диагностике (в 1 группе – 85,5%, в 2 группе – 59,5%, $p < 0,05$), по большему количеству курящих пациентов в группе 1 – 55,4% ($p = 0,0002$), в группе 2 – 40,5% ($z = 0,001$) при сравнении с группой 3 (18,6%).

ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТКАНЕЙ

На основании анализа результатов молекулярно-генетического профиля тканей в группах были определены пороги соотношения чувствительности и специфичности различных генов. Определены три группы генов. Гены показавшие чувствительность и специфичность 75% и выше, отнесены к высокоинформативным. Гены с чувствительностью и специфичностью от 50% до 75%, отнесенные к группе с средним уровнем до 50% к неинформативным генам.

3.1 Высокочувствительные и высокоспецифичные гены

При изучении вероятных опухолевых маркеров в качестве центральной характеристики брали медиану, в качестве меры разброса – квартили и применяли непараметрические методы анализа (например, критерий Краскела – Уоллиса, медианный тест).

Ki-67.

Ki-67 представляет собой ядерный белок, связанный с транскрипцией рибосомной РНК и является маркером клеточной пролиферации. При изучении вероятных генов-маркеров в качестве центральной характеристики брали медиану, в качестве меры разброса – квартили и применяли непараметрические методы анализа (например, критерий Краскела – Уоллиса, медианный тест). В таблице 11 представлены данные по медианам и квартилям показателя Ki-67.

В 1 группе значение медианы равно 39,4, во 2 группе – 0, в 3 группе -7,7, полученные различия статистически значимы ($p < 0,05$). По уровню Ki-67 нами были выделены две подгруппы (таблица 12).

Таблица 11.

Данные изменения Ki-67 в исследуемых группах.

Группы	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75
1	83	0	608,9	0	39,4	128,0
2	81	0	222,9	0	0*	7,2
3	70	0	247,3	0	7,7**	22,6
Всего	234	0	608,9	0	6,5	36,8

*- $p < 0,03$; **- $p < 0,01$

Таблица 12.

Распределение образцов ткани в группах по уровню Ki-67.

Группы	Ki-67		Всего
	Низкий	Высокий	
1	24 (28,9%)	59 (71,1%)	83
2	44 (54,3%)	37 (45,7%)	81
3	22 (31,4%)	48 (68,6%)	70
Всего	90	144	234

В 1 группе количество образцов с низким уровнем Ki-67 24 (28,9%), во 2 группе – 44 (54,3%), в 3-ей – 22 (31,4%), т.е. имеет место тенденция к повышению количества образцов ткани с низким уровнем белка Ki-67 во 2 группе. Ниже представлены данные по средним значениям, медианам и квартилям среди повышенных значений показателя Ki-67 (таблица 13).

Таблица 13.

Данные изменения высокого уровня Ki-67 исследуемых группах.

Группы	Мин значение	Макс значение	Q25	Медиана	Q75
1	59	2,6	32	76,1	157,6
2	37	1,7	3,9	10,6*	26,9
3	48	1,0	7,6	14,7*	29,9
Всего	144	1,0	7,9	25,5	80,3

*- $p < 0,0001$

В группе 1 медиана составила 76,1 (во 2 группе – 10,6, в 3 группе – 14,7), различия достоверные ($p < 0,0001$).

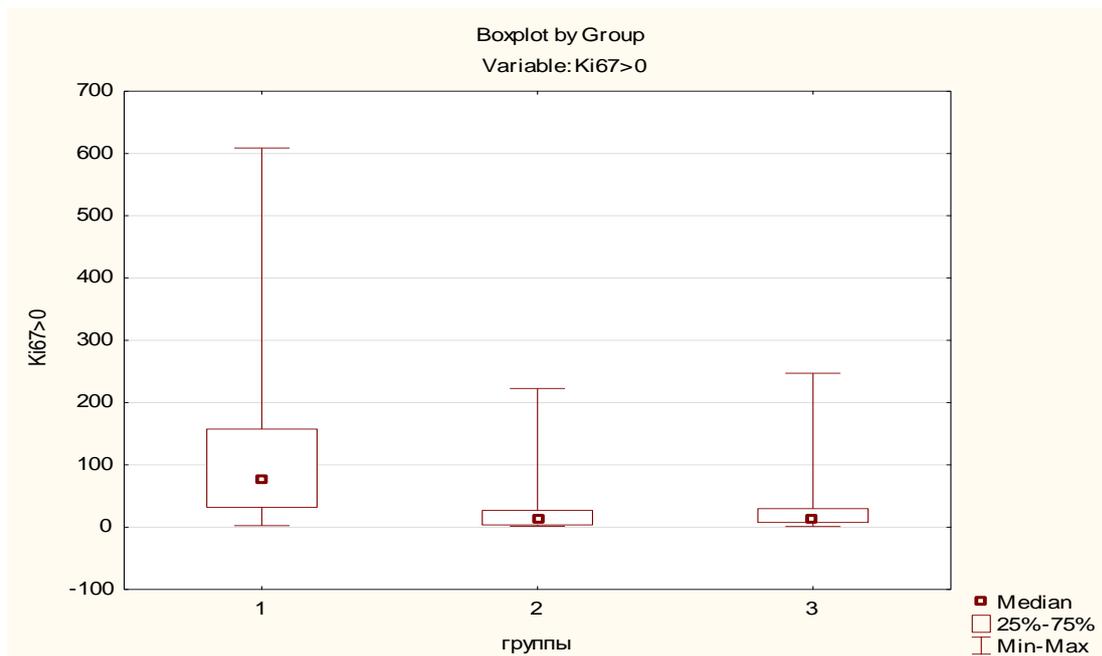


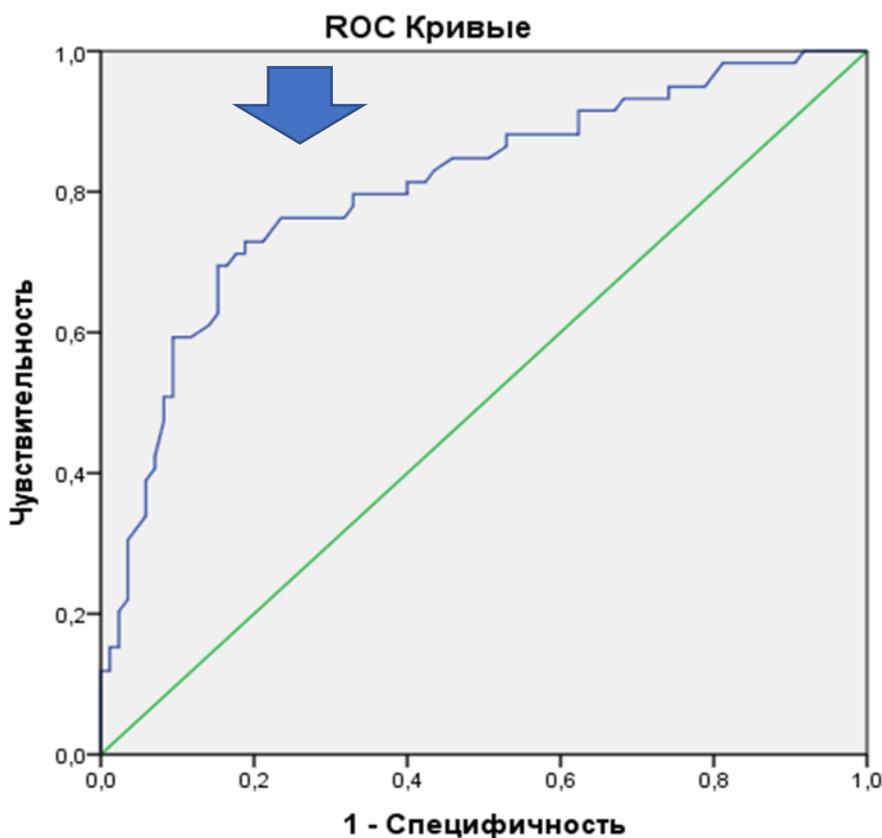
Рис. 2 Данные изменения медианы Ki-67 исследуемых группах.

Из таблицы 13 и рисунка 2 видно, что при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря уровень Ki-67 достоверно выше в группе 1 по сравнению с группами контроля.

Нами оценена информативность повышенных уровней Ki-67 при помощи построения ROC-кривых (показывают зависимость количества верно классифицируемых положительных примеров от количества неверно классифицируемых отрицательных примеров. Для идеального классификатора график ROC-кривой проходит через верхний левый угол). Для показателя Ki-67 площадь под кривой составила $0,81 \pm 0,04$, рисунок 3.

Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности, разделяющее группы контроля от группы больных с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря, находится в районе Ki-67 равным 30. Так чувствительность данного порога составила 76,3%, специфичность 75%-

78,4%, то есть данный показатель обладал приемлемой для медицинских исследований информативностью (более 75%).



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 3 ROC-кривые при экспрессии Ki-67.

Расчеты показателей чувствительности (т.е. вероятность наличия рака) и показателя специфичности (т.е. пациент находится в ремиссии или мочевого пузыря без онкологии) представлены в таблице 14.

При оценке экспрессии Ki-67 в зависимости от характеристик опухоли, возраста, пола и клинических проявлений заболевания проявилась тенденция к повышению уровня данного показателя при наличии гематурии, при размерах опухоли ≥ 3 , при курении в анамнезе, полученные различия недостоверны (таблица 15).

Данные чувствительности и специфичности показателя Ki-67 исследуемых группах.

Группы	Ki-67		Всего
	<30	≥30	
1	14 (23,7%) *	45 (76,3%) *	59
2	29 (78,4%) *	8 (21,6%)	37
3	36 (75%) *	12 (25%)	48
Всего	79	65	144

*- $p < 0,0001$

При оценке экспрессии Ki-67 в зависимости от характеристик опухоли, возраста, пола и клинических проявлений заболевания проявилась тенденция к повышению уровня данного показателя при наличии гематурии, при размерах опухоли ≥ 3 , при курении в анамнезе, полученные различия недостоверны (таблица 15).

Таким образом, нами определен порог соотношения чувствительности и специфичности показателя Ki-67 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря, который равен 30 о.е, при значении >30 можно с большей долей вероятности говорить о неблагоприятном прогнозе развития заболевания.

С учетом приемлемой для медицинских исследований информативностью ($>75\%$) Ki-67 можно считать маркером биологической агрессивности для мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря по данным нашей работы.

Зависимость экспрессии Ki-67 от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	Ki-67				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	34	39,4	106,6	157,6	P=0,09
Нет	25	25,1	50,2	115,4	
Всего	59	32,0	76,1	157,6	
Размер опухоли					
<3см	45	24,3	71,0	132,5	P=0,08
≥3см	14	87,4	144,7	215,3	
Всего	59	32,0	76,1	157,6	
Курение в анамнезе					
Есть	53	32,0	93,7	215,6	P=0,17
Нет	26	32,0	60,6	128,0	
Всего	59	32,0	76,1	157,6	

CCNB1 (Циклин В1).

Циклин В1 является регуляторным белком, участвующем в процессах митоза. Роль циклина В1 заключается в переходе клетки из фазы G2 в фазу M1, но его регуляция в опухолевых клетках нарушается. Высокие уровни экспрессии циклина В1 выявляются при различных видах рака, они обычно наблюдаются до того, как клетки станут иммортализованными и анеуплоидными, что может способствовать хромосомной нестабильности и агрессивному характеру некоторых видов рака. Высокие уровни циклина В1 также могут быть связаны с со степенью инвазии и агрессивности опухоли, поэтому концентрацию циклина В1 можно использовать для определения

прогноза онкологического заболевания. Митотический специфический циклин В1 у человека кодируется геном CCNB1.

Нами оценен уровень экспрессии мРНК гена CCNB1 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря. В таблице 16 приведены данные по медиане, среднему значению и квартилям в группах.

Таблица 16.

Данные характеристик CCNB1 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	404,4*	83	0	9089,6	79,0	171,9*	374,8	0	955,4
2	76,1	81	0	388,0	27,9	55,7	107,6	0	207,9
3	67,7	70	0	415,9	28,8	52,9	81,6	0	200,9
Всего		234							

*- $p < 0,0001$

Из таблицы видно, что среднее значение показателя CCNB1 в 1 группе составило 404,4 о.е. [95%CI 0-955,4], во 2-ой – 76,1 [95%CI 0-207,9], в 3-ей – 67,7 [95%CI 0-200,9], медиана составила – 171,9, 55,7 и 53,0, соответственно, различия достоверные ($p < 0,0001$).

Здесь также нами оценена информативность экспрессии показателя при помощи построения ROC – кривой (рисунок 4). Площадь показателя под кривой составила $0,79 \pm 0,03$.

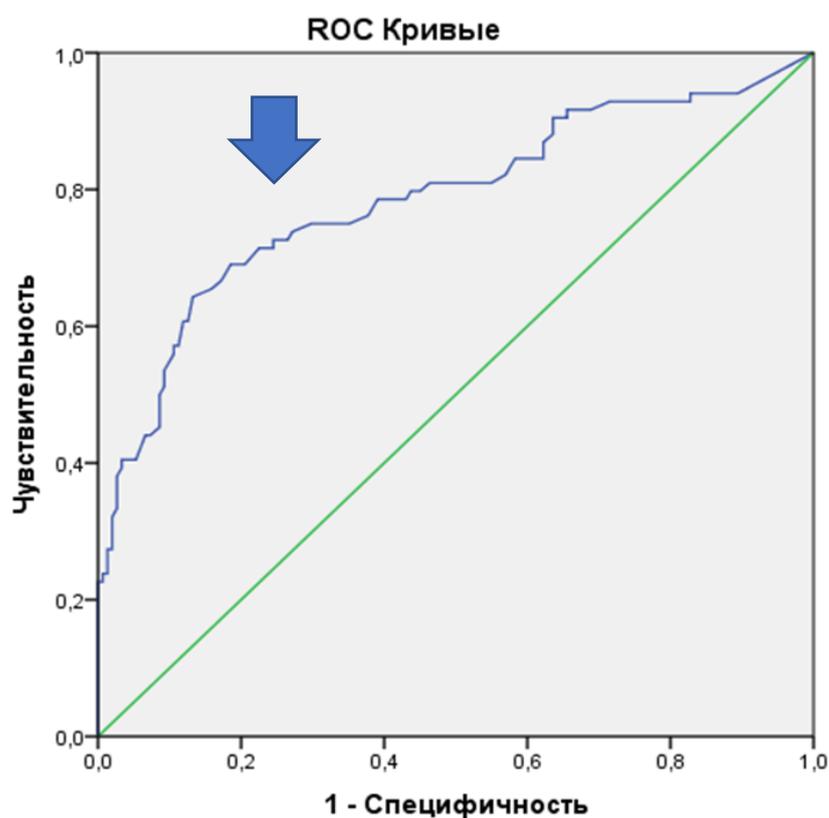
Расчеты показателя чувствительности (т.е. вероятности наличия рака) и специфичности (т.е. пациент находится в ремиссии или мочевого пузыря без онкологических заболеваний в прошлом) представлены в таблице 17.

Таблица 17.

Данные чувствительности и специфичности показателя CCNB1.

Группы	CCNB1		Всего
	<83	>83	
1	20 (24,3%)	63 (75,7%)*	83
2	53 (65,4%)	20 (34,6%)	81
3	53 (75,7%)*	17 (24,3%)	70
Всего	127	108	234

*-p <0,0001



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис.4 ROC-кривые при экспрессии CCNB1.

Из таблицы видно, что чувствительность гена CCNB1 составила 75,7%, специфичность во 2 группе 65,4%, в 3-ей группе (условно «здоровый» мочевого пузыря) – 75,7%. Таким образом, экспрессия мРНК гена CCNB1 обладает приемлемой для медицинских исследований информативностью (> 75%). Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности, разделяющее группы контроля от групп больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря, лежит в районе 83 о.е. Эти данные для наглядности проиллюстрированы на рисунке 5.

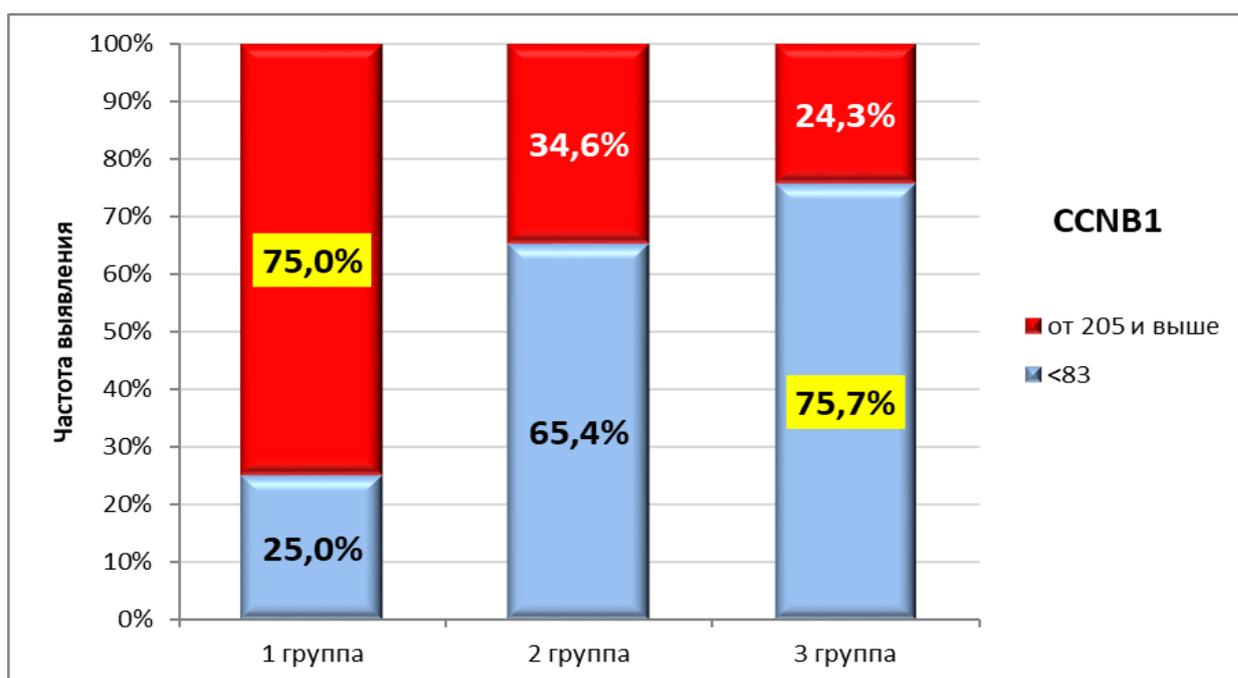


Рис. 5 Данные чувствительности и специфичности показателя CCNB1.

Оценена взаимосвязь экспрессии показателя с возрастом, полом, стадией заболевания, дифференцировкой опухоли, гематурией, курением в анамнезе, индексом массы тела – достоверных различий не выявлено. Отмечена тенденция к повышению уровня экспрессии мРНК гена CCNB1 при размере опухоли ≥ 3 см. Медиана показателя при размере < 3 см составила – 137,2 о.е, при ≥ 3 см – 284,0 ($p=0,09$) (таблица 18).

Соответственно, наилучшее соотношение чувствительности и специфичности, разделяющее группы контроля от групп с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря при экспрессии мРНК гена CCNB1

лежит в районе 83, чувствительность в 1 группе составила 75,7%, специфичность в группе динамического наблюдения – 65,4%, в группе с условно «здоровым» мочевым пузырем – 75,7%.

Таблица 18.

Зависимость экспрессии Ki-67 от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	Ki-67				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	34	39,4	106,6	157,6	P=0,09
Нет	25	25,1	50,2	115,4	
Всего	59	32,0	76,1	157,6	
Размер опухоли					
<3см	45	24,3	71,0	132,5	P=0,08
≥3см	14	87,4	144,7	215,3	
Всего	59	32,0	76,1	157,6	
Курение в анамнезе					
Есть	53	32,0	93,7	215,6	P=0,17
Нет	26	32,0	60,6	128,0	
Всего	59	32,0	76,1	157,6	

С учетом приемлемой для медицинских исследований информативностью (>75%) ген CCNB1 можно считать геном-маркером для мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря по данным нашей работы.

MYBL2.

Белок, кодируемый этим геном – член семейства транскрипционных факторов MYB – ядерный белок, участвующий в поддержании клеточного цикла. Данный протеин фосфорилируется циклина/циклин – зависимой киназой 2 во время S-фазы клеточного цикла и обладает действием, как активатора, так и репрессора. Он активирует гены Cdc2, циклина D1 и белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста 5.

На сегодняшний день выявлено, что при гиперэкспрессии MYBL2 ухудшается прогноз заболевания у пациентов с раком молочной железы, колоректальным раком, раком мочевого пузыря, гепатоцеллюлярным раком [R. Baucley, F Ren, M. Zhang et al.]. Также отмечено, что гиперэкспрессия MYBL2 в сочетании с мутацией p53 значительно ухудшает выживаемость пациентов. Нами оценена экспрессия белка при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря, а также в неопухолевых тканях мочевого пузыря.

В таблице 19 представлены данные по медианам, средним значениям и квартилям показателя.

Таблица 19.

Данные характеристик MYBL2 исследуемых групп.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	502,9*	83	0	10085,5	60,8	227,6*	521,0	0	172,2
2	68,5	81	0	1552,1	3,6	12,6	52,0	0	294,1
3	41,2	70	0	315,2	0	12,6	39,4	0	274,4
Всего		234							

*- $p < 0,0001$

В первой группе медиана белка MYBL2 составила 227,6, во второй и третьей группах – 12,6, различия статистически достоверные ($p < 0,0001$), среднее значение показателя составило 502,9 [95%CI 0-1722,2], 68,5 [95%CI 0-294,1], 41,2 [95%CI 0-294,4], соответственно, различия статистически значимые ($p < 0,0001$).

Данные по экспрессии белка MYBL2 в образцах тканей представлены в таблице 20.

Таблица 20.

Данные экспрессии MYBL2 в исследуемых группах.

Группы	MYBL2		Всего
	Не выявлен	Выявлен	
1	4 (4,8%)	79 (95,2%)*	83
2	17 (21%)	64 (79%)	81
3	20 (29%)	50 (71%)	70
Всего	41	193	234

*- $p=0,009$

В первой группе количество образцов с экспрессией мРНК гена MYBL2 составило 79 (95,2%), что достоверно больше при сравнении с другими группами ($p=0,009$).

Анализ показателей гена MYBL2 в подгруппах с экспрессией представлен в таблице 21.

Из таблицы видно, что в 1 группе среднее значение показателя равно 534,8 [95% CI 17,1 – 1722,2] и медиана – 256,0, достоверно выше по сравнению с данными, полученными во 2 и 3 группах ($p < 0,0001$).

Таблица 21.

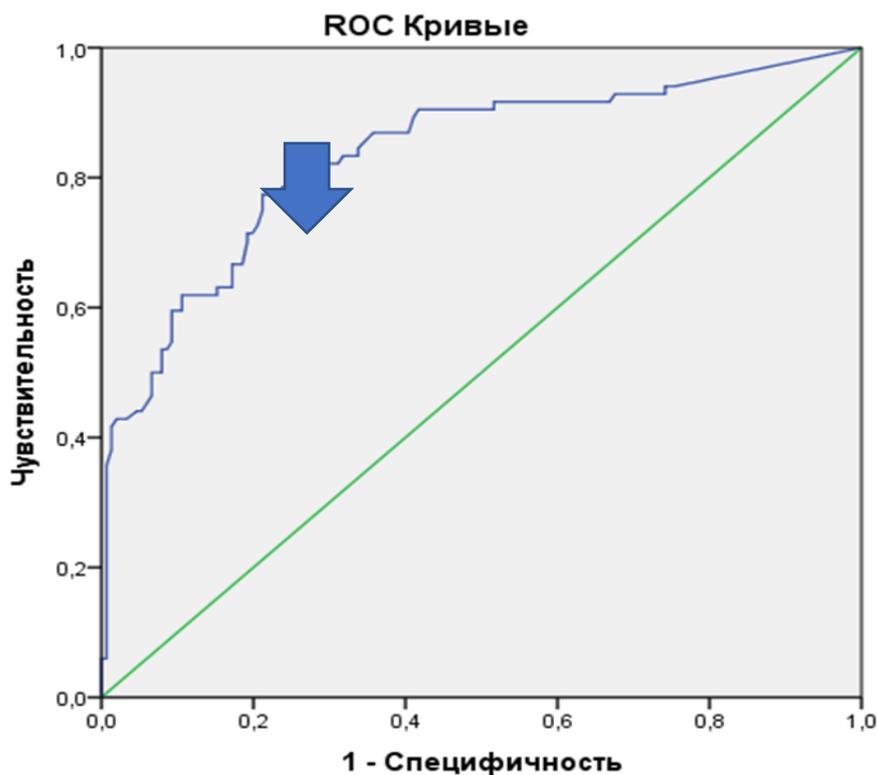
Данные экспрессии MYBL2 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	534,8*	79	2,4	10085,5	73,5	256,0*	588,1	17,1	1722,2
2	86,7	64	1,0	1552,1	8,0	17,5	90,7	3,6	304,4
3	57,2	50	3,2	315,2	10,6	25,6	53,8	6,1	274,4
Всего		193							

*- $p < 0,0001$

Произведена оценка информативности экспрессии MYBL2 при помощи ROC – кривых (рисунок 6).

Площадь под кривой составила $0,83 \pm 0,03$. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности, разделяющее группы контроля от группы с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря находится в районе 60.



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 6 ROC-кривые при экспрессии MYBL2.

Так чувствительность порога составила 75,9%, специфичность во 2 группе (группа пролеченных пациентов с МНИРМП, находящихся под динамическим наблюдением) – 75,3%, в 3 группе (пациенты с «условно» здоровым мочевым пузырем) – 82,9%. Расчеты показателей чувствительности и специфичности представлены в таблице 22.

При оценке зависимости гена MYBL2 от возраста, пола, стадии заболевания, степени дифференцировки опухоли, количества опухолевых очагов, индекса массы тела достоверных различий не получено.

Выявлена тенденция к увеличению уровня экспрессии MYBL2 при наличии гематурии в 1 группе – медиана 247,3 и у курящих больных – медиана 356,3, соответственно.

Данные чувствительности и специфичности показателя MYBL2.

Группы	MYBL2		Всего
	<60	≥60	
1	20 (24,1%)	63 (75,9%)*	83
2	61 (75,3%)*	20 (24,7%)	81
3	58 (82,9%)*	12 (17,1%)	70
Всего	139	95	234

*-p <0,0001

Статистически значимые различия получены при оценке экспрессии показателя в зависимости от размеров опухоли. Так при размере опухоли <3см медиана экспрессии MYBL2 составила 152,3 о.е, при размере ≥3см - 477,7о.е. (p=0,005) (таблица 23).

Таким образом, нами определен порог соотношения чувствительности и специфичности экспрессии MYBL2 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря, значение которого лежит в районе 60. При значении >60 о.е. можно с большей долей вероятности говорить о неблагоприятном прогнозе развития заболевания.

Таким образом, нами определен порог соотношения чувствительности и специфичности экспрессии MYBL2 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря, значение которого лежит в районе 60. При значении >60 о.е. можно с большей долей вероятности говорить о неблагоприятном прогнозе развития заболевания.

Зависимость MYBL2 от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	MYBL2				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	53	66,3	247,3	588,1	P=0,45
Нет	30	39,4	131,8	415,9	
Всего	83	59,7	207,9	530,1	
Размер опухоли					P=0,005
<3см	58	38,1	152,3	388,0	
≥3см	25	163,1	477,7	831,7	
Всего	83	59,7	207,9	530,1	
Курение в анамнезе					P=0,08
Есть	46	61,8	356,3	675,6	
Нет	37	57,7	163,1	337,8	
Всего	83	59,7	247	530,1	

С учетом приемлемой для медицинских исследований информативностью (>75%) ген MYBL2 можно считать геном-маркером для мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря по данным нашей работы.

ТРА.

ТРА – это тканевой полипептидный антиген (цитокератины 8,18,19). ТРА является сывороточным маркером пролиферации из группы цитокератинов. Маркер определяется в сыворотке крови при процессах некроза опухолевых клеток и обнаруживается в большинстве эпителиальных клеток. ТРА

позволяет дифференцировать прогрессию опухолевого роста. При этом ТРА измеряет смесь продуктов деградации цитокреатинов 8, 18, и 19 типов. Эти цитокератины в норме обнаруживаются в большинстве эпителиальных клеток и сохраняются в аналогичных клетках и тканях при малигнизации.

В настоящее время он используется как маркер пролиферации и дифференцировки неплоскоклеточных опухолей (Van Popel H. 1996). Повышенный уровень тканевого полипептидного антигена (ТРА) наблюдается при раке мочевого пузыря, раке молочной железы и колоректальном раке.

В работе тканевой полипептидный антиген определялся в тканевых образцах и впервые был изучен при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря. В таблице 24 представлены данные по медианам, средним значениям и квартилям тканевого полипептидного антигена.

Таблица 24.

Данные характеристик ТРА исследуемых групп.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	1787,0**	82	0	24833,5	0	401,7*	2195,0	0	5996,9
2	130,1	81	0	1782,9	0	1,0	142,0	0	675,6
3	177,8	70	0	3956,5	0	44,5	150,2	0	568,1
Всего		233							

*- p <0,002; **- p <0,001

В 1 группе медиана ТРА составила 401,7 о.е., во 2-ой – 1,0, в 3-ей – 44,5, различия статистические достоверные ($p < 0,002$), достоверные различия между группами получены и по средним значениям показателя - 1787,0 [95%CI 0-5996,9], 130,1 [95%CI 0-675,6], 177,8 [95%CI 0-569,1], соответственно ($p < 0,001$).

Из таблицы 25 видно, что достоверно большее количество образцов тканей с экспрессией белка ТРА выявлено в 1 группе – 58 (70,7%) ($p=0,02$).

Таблица 25.

Данные экспрессии ТРА в исследуемых группах.

Группы	MYBL2		Всего
	Не выявлен	Выявлен	
1	24 (29,3%)	58 (70,7%)*	82
2	40 (49,4%)	41 (50,6%)	81
3	26 (37,1%)	44 (62,9%)	70
Всего	90	143	233

*- $p=0,02$

Ниже представлены данные по медианам, средним значениям и квартилям в подгруппе больных с выявленной экспрессией ТРА (таблица 26).

Выявлено, что 1 группа статистически достоверно отличается от 2 и 3 групп по медиане показателя ТРА – 1177,0, 142,0 и 113,5, соответственно ($p < 0,0001$) и по уровню средних значений – 2526,4 [95%CI 21,9-10809,4] в 1 группе, 257,0 [95%CI 35,5-749,7] – во 2-ой, 282,9 [95%CI 10,9-675,6] – в 3 группах ($p < 0,0001$).

Данные экспрессии ТРА исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	2526,4	58	12,6	24833,5	388,0	1177,0	2998,4	21,9	10809,4
2	257,0	41	1,0	1782,9	61,8	142,0	222,9	35,5	749,6
3	282,9	44	6,5	3956,4	52,0	113,5	300,3	10,9	675,6
Всего		143							

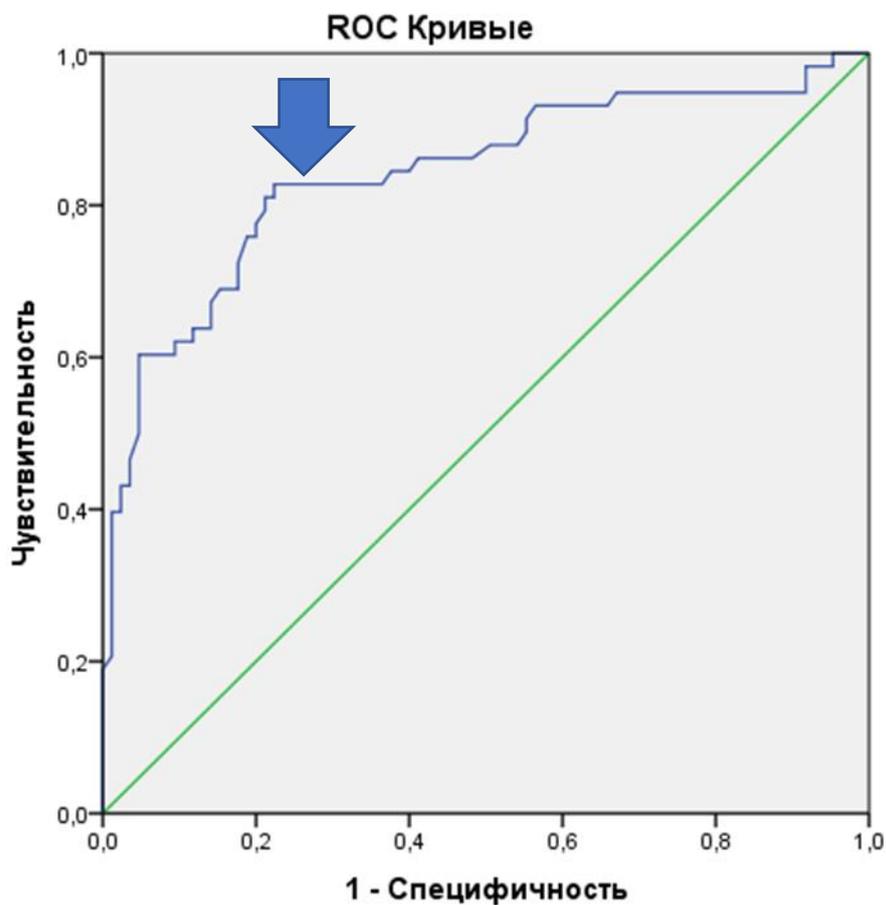
*- $p < 0,0001$

Произведена оценка информативности тканевого полипептидного антигена при помощи ROC-кривых (рисунок 8). Площадь под кривой составила $0,84 \pm 0,04$.

Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности, разделяющее группы контроля от группы больных с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря, находится в районе ТРА равным 300. Так чувствительность порога составила 81%, специфичность во 2 группе – 82,9%, в 3-ей – 75%. Эти данные представлены в таблице 27.

При оценке зависимости экспрессии ТРА от возраста, пола, стадии заболевания, степени дифференцировки опухоли, количества опухолевых очагов, гематурии, курения в анамнезе, индекса массы тела достоверных

различий не получено. Выявлена достоверная связь экспрессии ТРА с первичным размером опухоли (таблица 28).



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 8 ROC-кривые при экспрессии ТРА.

Таблица 27.

Данные чувствительности и специфичности показателя ТРА.

Группы	ТРА		Всего
	<300	≥300	
1	11 (19%)	47 (81%)*	58
2	34 (82,9%)*	7 (17,1%)	41
3	33 (75%)*	11 (25%)	44
Всего	78	65	143

* -p <0,0001

Зависимость ТРА от первичного размера опухоли.

Размер опухоли	ТРА				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
<3см	44	320,7	923,4	2195,0	P=0,006
≥3см	14	1217,8	3691,5*	5220,6	
<i>Всего</i>	58				

Из таблицы видно, что при размере опухоли ≥ 3 см достоверно выше медиана ТРА – 3691,5 о.е. против 923,4 при размере <3см ($p=0,006$).

Таким образом, нами определен порог соотношения чувствительности и специфичности тканевого полипептидного антигена при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря, который равен 300 о.е., т.е. данный показатель по результатам нашей работы можно отнести к генам-маркерам МНИРМП, при его значении > 300 о.е. можно с большей долей вероятности говорить о неблагоприятном прогнозе заболевания.

BIRC5 (Сурвивин).

Сурвивин, также известный как BIRC5 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat – containing 5) – низкомолекулярный цинк-содержащий металлопротеин, относится к семейству ингибиторов апоптоза. Белок кодируется геном BIRC5, расположенным на длинном плече 17 хромосомы.

Основной функцией сурвивина считается блокирование процессов апоптоза, за что отвечает цитоплазматический пул белка. Показано, что сурвивин ингибирует Вах- и Fas-зависимые сигнальные пути индукции апоптоза.

Сурвивин конституивно экспрессируется в раковых стволовых клетках за счет передачи сигналов через путь митоген-активированной протеинкиназы (МАРК), фактора транскрипции Sp-1 (белок специфичности 1) и с-Мус [Слепов Е.В., Башмакова Е.Е., 2021].

На патологическую роль белка указывает значительно повышенный уровень экспрессии. Изучение экспрессии маркера ИГХ методом выявило экспрессию сурвивина у 2/3 больных остеосаркомой, у половины пациентов с колоректальным раком, у трети больных раком желудка [Lu C.D., Altiori D.C., 1998]. Накопленные сведения позволяют предположить, что экспрессия сурвивина наблюдается при различных неопластических процессах, причем его уровень зависит от локализации, стадии и степени гистологической дифференцировки опухоли.

В многоцентровом международном валидационном исследовании добавление сурвивина к молекулярной панели значительно улучшило точность прогнозирования рецидива заболевания и безрецидивную выживаемость больных раком мочевого пузыря [Shariat SF, Chade DC, 2010].

Мета-анализ 14 крупных исследований, в который вошло 2165 больных раком мочевого пузыря показали значимую взаимосвязь уровня экспрессии сурвивина со временем наступления рецидива, безрецидивной и общей выживаемости [Jean C, Kim M, Kvak C, 2013].

Мы проанализировали уровень экспрессии мРНК гена BIRC5 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря (таблица 29). Выявлено, что среднее значение экспрессии мРНК гена BIRC5 в 1 группе составило 121,4 [95% CI 0-388,8], во 2-ой и 3-ей группах – 16,5 4 [95% CI 0-76,1] и 31,2 [95% CI 0-157,6], соответственно ($p=0,0006$). Медиана в 1 группе составила 48,6 ое ($p=0,0006$).

Данные характеристик BIRC5 исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	121,4*	83	0	1910,9	0	48,6*	175,8	0	388,0
2	16,5	81	0	200,9	0	0	15,5	0	76,1
3	31,2	70	0	415,9	0	0	33,1	0	157,6
Всего		234							

*- $p = 0,0006$

Выявлено, что среднее значение экспрессии мРНК гена BIRC5 в 1 группе составило 121,4 [95% CI 0-388,8], во 2-ой и 3-ей группах – 16,5 [95% CI 0-76,1] и 31,2 [95% CI 0-157,6], соответственно ($p=0,0006$). Медиана в 1 группе составила 48,6 ое ($p=0,0006$).

Ниже представлены данные распределения образцов тканей в зависимости от экспрессии мРНК гена BIRC5 (таблица 30). Нами получено, что достоверно чаще экспрессия мРНК гена выявляется в 1 группе, т.е. при наличии опухоли ($p=0,0001$).

Таблица 30.

Данные экспрессии BIRC5 в исследуемых группах.

Группы	BIRC5		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	24 (28,9%)	59 (71,7%)*	83
2	54 (67%)	27 (33%)	81
3	36 (51%)	34 (49%)	70
Всего	114	120	234

*- $p=0,0001$

В таблице 31 представлен анализ параметров в подгруппе с экспрессией BIRC5.

Таблица 31.

Данные экспрессии BIRC5 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	172,9	59	2,9	1910,9	45,3	107,6*	256,0	6,1	494,6
2	49,6	27	4,3	200,9	15,5	27,9	66,3	5,5	168,9
3	64,1	34	1,0	415,9	14,4	36,3	64,0	10,2	265,0
Всего		120							

*- $p < 0,002$

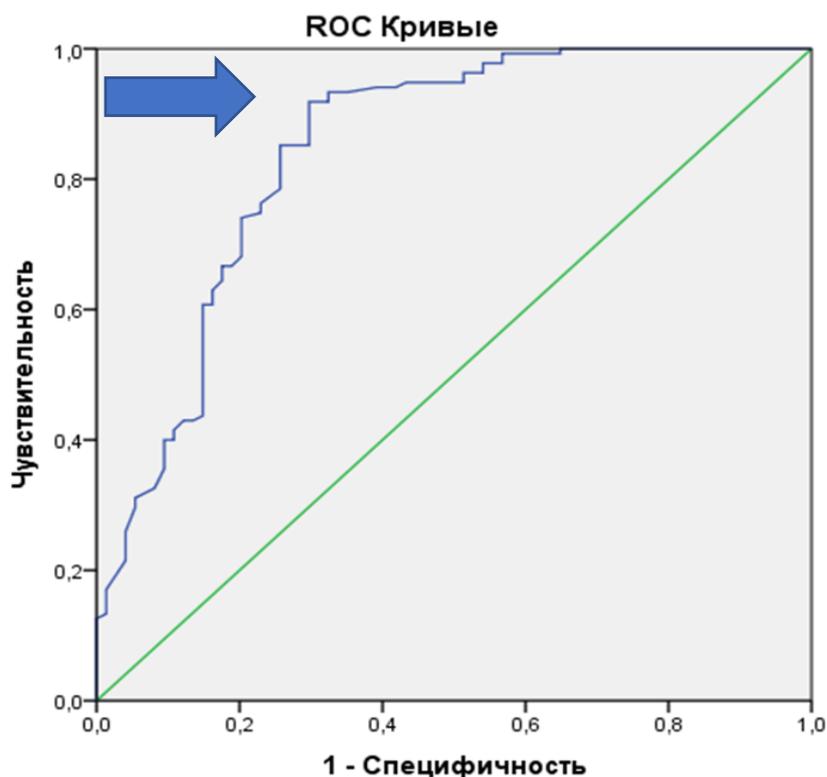
Из таблицы видно, что медиана показателя достоверно больше в 1 группе – 107,6, против 27,9 и 36,3, во 2-ой и 3-ей группах, соответственно ($p=0,002$).

Построена ROC-кривая, позволяющая оценить информативность экспрессии BIRC5 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря (рисунок 8).

Площадь под кривой равна $0,71 \pm 0,04$. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности находится в районе 16.

Расчеты показателей чувствительности и специфичности представлены в таблице 32. Чувствительность данного порога составила 75,9%,

специфичность во 2 группе – 75%, в 3 группе – 75,7%.



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 8. ROC-кривые при экспрессии BIRC5.

Таблица 32.

Данные чувствительности и специфичности показателя BIRC5.

Группы	BIRC5		Всего
	<16	≥16	
1	20 (24,1%)	63 (75,9%)*	83
2	61 (75%)	20 (25%)	81
3	53 (75,7%)	17 (24,3%)	70
Всего	134	100	234

* -p <0,0001

Таким образом, нами определен порог соотношения чувствительности и специфичности ген BIRC5 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря, который равен 16 о.е., т.е. данный показатель по результатам нашей работы можно отнести к генам-маркерам МНИРМП, при его значении > 16 о.е. можно

с большей долей вероятности говорить о неблагоприятном прогнозе заболевания.

При рассмотрении взаимосвязи с клиническими и анамнестическими факторами нами отмечены достоверные различия уровня экспрессии мРНК гена *VIRC5* – у 66% пациентов при наличии гематурии против 34% при ее отсутствии ($p=0,04$). Также выявлена тенденция к увеличению уровня экспрессии показателя при курении, медиана показателя у курящих пациентов составила – 128,0 о.е., у некурящих – 78,8 о.е., различия недостоверные ($p=0,009$) (таблица 33).

Таблица 33.

Зависимость экспрессии *VIRC5* от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	VIRC5				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	35	53,8	128,0	274,4	P=0,04
Нет	24	16,7	66,9	194,0	
Всего	59	45,3	107,6	256,0	
Размер опухоли					
<3см	44	27,5	94,2	251,6	P=0,14
≥3см	15	52,0	128,0	256,0	
Всего	59	45,3	107,6	256,0	
Курение в анамнезе					
Есть	33	52,0	128,0	284,0	P=0,08
Нет	26	25,1	78,8	194,0	
Всего	59	45,3	107,6	256,0	

3.2 Гены со средним уровнем специфичности, чувствительности и неинформативные гены

PGR

По данным некоторых работ было отмечено сходство подтипов рака молочной железы и мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря, отмечено, что четыре таргетных гена – ESR, PGR, HER2 и Ki-67 имеют разнообразную экспрессию при раке мочевого пузыря. В отличие от ситуации с раком молочной железы, диагностика и лечение рака мочевого пузыря в настоящее время все еще зависит от гистопатологических характеристик, не включающих молекулярное подтипирование. В нашем исследовании мы оценили прогностическую эффективность экспрессии PGR, ESR1 и HER2 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря.

PGR – ген экспрессии рецепторов прогестерона, кодирует наличие рецепторов прогестерона на клеточной мембране.

В таблице 34 представлены медианы, средние значения, квартили показателя PGR.

Таблица 34.

Данные характеристик PGR в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	197,0*	83	0	1499,2	4,1	36,6*	177,9	0	1024,0
2	726,7*	81	0	3213,7	238,9	548,7*	1097,5	0	2048,0
3	921,9*	70	0	9410,1	163,1	453,6*	1176,3	0	2521,4
Всего		234							

*-p <0,0001

Из таблицы видно, что среднее значение показателя достоверно меньше в первой группе - 197,0 [95%CI 0-1024], при сравнении со второй – 726,7 [95%CI 0-2048,0] и третьей – 921,9 [95%CI 0-2521,0] группами ($p < 0,0001$). Аналогично медиана показателя в 1 первой группе достоверно меньше – 36,6, при сравнении с медианой во 2 и 3 группах – 548,7 и 453,6, соответственно ($p < 0,0001$).

Далее мы проанализировали группы по выявлению экспрессии показателя в образцах ткани (таблица 35).

Таблица 35.

Данные экспрессии PGR в исследуемых группах.

Группы	PGR		Всего
	Не выявлен	Выявлен	
1	9 (10,8%)	74 (89,2%)	83
2	9 (1,1%)	72 (88,9%)	81
3	7 (10%)	63 (90%)	70
Всего	25	209	234

В группах количество образцов тканей с экспрессией показателя PGR сопоставимо, достоверных различий не выявлено.

В таблице 36 представлены медианы, средние значения и квартили гена PGR в подгруппе пациентов с наличием экспрессии. Медиана белка PGR в 1 группе составила 66,3, что достоверно ниже таковой во 2 группе – 664,9 ($p=0,0001$), и в 3 группе – 530,1 ($p=0,0001$).

Данные экспрессии PGR исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	223,5	74	1,0	1499,2	10,2	66,3*	265,0	1,8	1097,5
2	817,6	72	16,0	3213,7	309,8	664,9*	1097,5	56,7	2195,0
3	1024,4	63	45,3	9410,1	247,3	530,1*	1260,7	87,4	2521,4
Всего		205					1260,7		

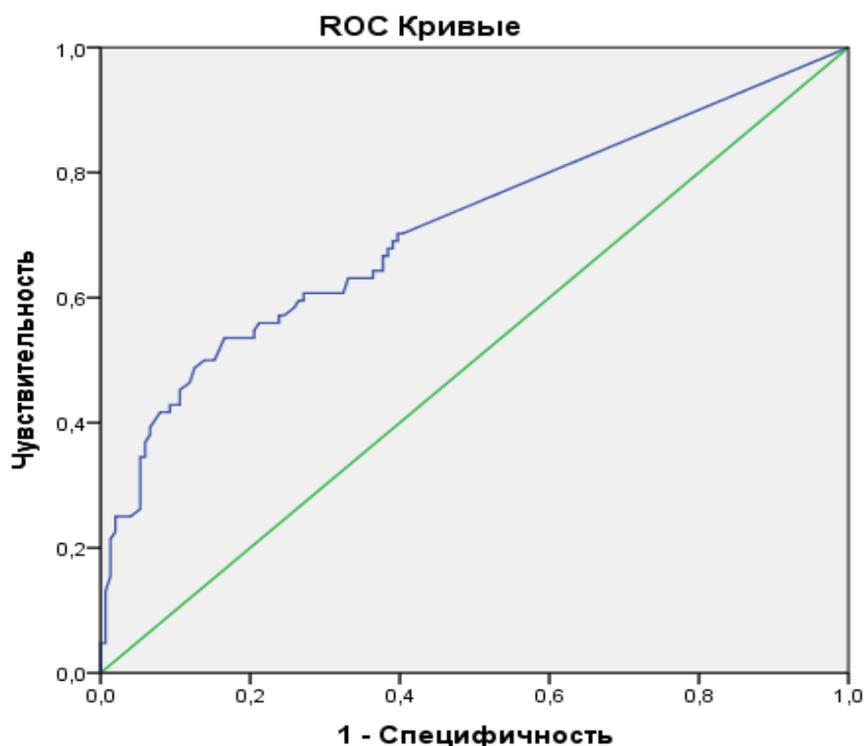
$P_{1-2}=0,0001$; $p_{1-3}=0,0001$; $p_{2-3}=0,001$

С помощью построения ROC-кривой оценена информативность уровня экспрессии PGR (рисунок 9). Площадь под кривой составила $0,75 \pm 0,03$.

Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности, разделяющее группы контроля от групп больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря, находится в районе 270 о.е. Чувствительность данного порога составила 68,7%, специфичность во 2 группе – 70,4%, в 3 группе – 65,7%.

Данные показателей чувствительности (т.е. вероятности наличия рака) и показателя специфичности (т.е. пациент находится в ремиссии или мочевого пузыря без онкологии) представлены в таблице 37.

В нашем исследовании показатели экспрессии VIRC5 при МНИРМП не обладают приемлемой для медицинских исследований информативностью, т.е. белок нельзя назвать геном-маркером, однако можно считать, что он обладает диагностической ценностью.



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 9 ROC-кривые при экспрессии PGR.

Таблица 37.

Данные чувствительности и специфичности показателя PGR в исследуемых группах.

Группы	PGR		Всего
	≥ 270	< 270	
1	26 (31,3%)	57 (68,7%)*	83
2	57 (70,4%)*	24 (29,6%)	81
3	46 (65,7%)	24 (34,3%)	70
Всего	129	105	234

*- $p=0,05$

В нашем исследовании показатели экспрессии VIRC5 при МНИРМП не обладают приемлемой для медицинских исследований информативностью, т.е. белок нельзя назвать геном-маркером, однако можно считать, что он обладает диагностической ценностью.

При оценке зависимости показателя от возраста, пола, стадии заболевания степени дифференцировки опухоли, степени выраженности

гематурии, количества опухолевых очагов в мочевом пузыре, курения в анамнезе и индекса массы тела (ИМТ) достоверных различий не получено. Отмечается тенденция к уменьшению медианы показателя при размере очага ≥ 3 см ($p=0,09$) (таблица 38).

Таблица 38.

Зависимость экспрессии PGR от клинических и анамнестических факторов в исследуемых группах.

Размер опухоли	PGR				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	52	12,8	92,2	31,1	P=0,09
Нет	21	5,5	14,4	10,2	
Всего	73	10,2	66,3	26,3	
Курение в анамнезе					
Есть	41	5,5	42,2	137,2	P=0,18
<i>Нет</i>	32	12,3	91,0	343,8	
<i>Всего</i>	73	10,2	66,3	265,0	

ESR1.

ESR1 – это ген экспрессии рецепторов эстрогена – кодирует наличие рецепторов эстрогена на клеточной мембране, лиганд активированный фактор транскрипции, состоящий из нескольких доменов, важных для связывания гормонов, связывания ДНК и активации транскрипции. Белок локализуется в ядре, где он может образовывать гомодимер или гетеродимер с рецептором эстрогена.

В нашей работе проанализирован уровень экспрессии вышеуказанного гена в опухолевых и неопухолевых тканях мочевого пузыря при мышечно-неинвазивном раке. В таблице 39 представлены данные по медиане, средним значениям и квартилям показателя.

Таблица 39.

Данные характеристик ESR1 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	188,7	83	0	2048,0	0	13,7*	134,9	0	1136,2
2	305,5	81	0	1782,0	0	55,7	415,9	0	1305,2
3	710,7	70	0	14263,1	38,1	230,7*	445,7	0	3327,0
Всего		234							

$P=0,0014$

Нами выявлено, что медиана в 1 группе составила 13,7 о.е., во 2 – 55,7 о.е, в 3 – 230,7 (различия между 1 и 3 группами достоверны, $p=0,0014$). Данные по экспрессии белка ESR1 в образцах тканей представлены в таблице 40. Из таблицы видно, что в 1 группе количество образцов тканей с экспрессией ESR1 составило 58 (69,9%), во 2 – 43 (53,1%), в 3 – 54 (77,1%), различия между 1 и 3 группой достоверные ($p=0,005$).

Из таблицы видно, что в 1 группе количество образцов тканей с экспрессией ESR1 составило 58 (69,9%), во 2 – 43 (53,1%), в 3 – 54 (77,1%), различия между 1 и 3 группой достоверные ($p=0,005$).

Таблица 40.

Данные экспрессии ESR1 в исследуемых группах.

Группы	ESR1		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	25 (30,1%)	58 (69,9%)*	83
2	38 (46,9%)	43 (53,1%)	81
3	16 (22,9%)	54 (77,1%)*	70
Всего	79	155	234

*-p=0,005

Далее нами проанализирована подгруппа больных с экспрессией мРНК гена ESR1 (таблица 41).

Таблица 41.

Данные экспрессии ESR1 в исследуемых группах.

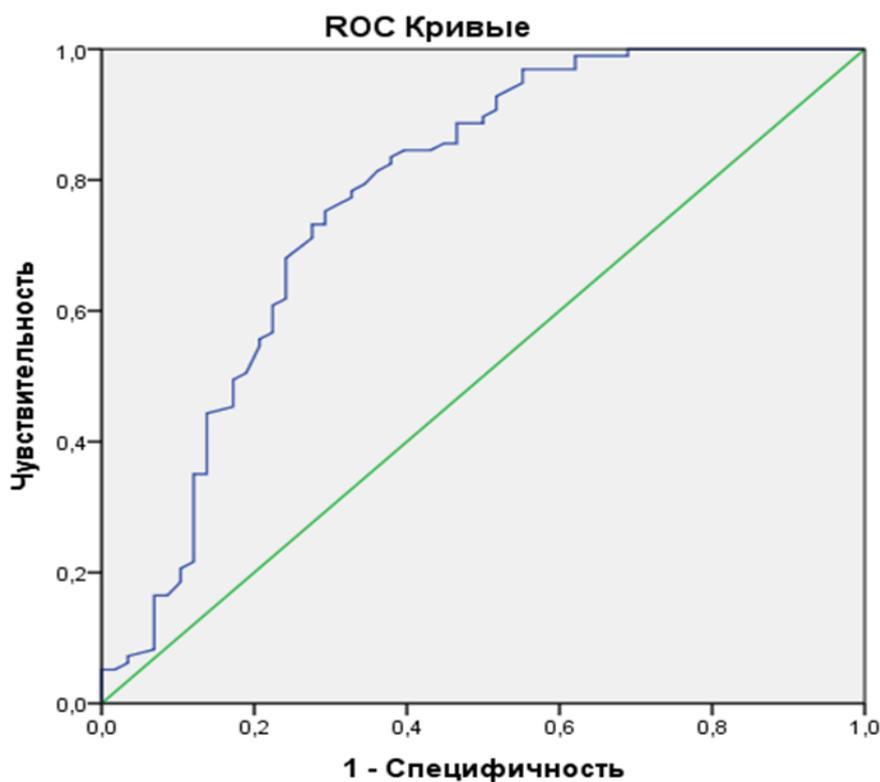
Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	273,3	58	1,0	2048,0	12,6	71,1*	230,7	3,5	1722,2
2	575,4	43	36,8	1782,9	230,7	415,9*	861,1	55,7	1552,1
3	921,2	54	19,0	14253,1	147,0	332,0*	776,0	59,7	3565,8
Всего		155							

*- p <0,0001

В 1 группе медиана составила 71,1 о.е., во 2 – 415,9, в 3 – 332,0 ($h < 0,0001$), т.е. различия статистически достоверные и указывают на более низкую экспрессию ESR1 в опухолевых тканях по сравнению с группами контроля. Здесь также нами оценена информативность экспрессии ESR1 при

помощи ROC – кривых (рисунок 10). Площадь под кривой составила $0,75 \pm 0,04$.

Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности, разделяющее группы контроля от пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря лежит в районе 200 о.е



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис.10 ROC-кривые при экспрессии ESR1

Так чувствительность данного порога составила 72,4%, специфичность для 3 группы – 66,7%, для 2 – 81,4%. Расчеты показателей чувствительности (т.е. вероятность наличия рака) и специфичности (т.е. пациент находится в ремиссии или мочевого пузыря без онкологических болезней) представлены в таблице 42. Таким образом, мы выявили, что медиана экспрессии ESR1 достоверно ниже ($p=0,0014$) при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря по сравнению с группами контроля. Нами определен порог соотношения чувствительности и специфичности гена ESR1 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря.

Таблица 42.

Данные чувствительности и специфичности показателя ESR1 в исследуемых группах.

Группы	ESR1		Всего
	>200	<200	
1	41 (27,6%)	42 (72,4%)*	58
2	35 (81,4%)*	8 (18,6%)	43
3	36 (66,7%)*	18 (33,3%)	54
Всего	87	68	155

*-p <0,0001

Нами проведена оценка зависимости экспрессии мРНК гена ESR1 от возраста, пола, стадии заболевания, дифференцировки опухоли достоверных различий не выявлено. (таблица 43).

Таблица 43.

Зависимость экспрессии мРНК ESR1 от клинических и анамнестических факторов в исследуемых группах.

Гематурия	ESR1				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	33	12,1	43,7	230,7	P=0,5
Нет	25	23,4	93,7	187,4	
Всего	58	12,6	71,1	230,7	
Размер опухоли					P=0,07
<3см	45	13,9	93,7	439,7	
≥3см	13	12,6	33,1	57,7	
Всего	58	12,6	71,1	230,7	
Курение в анамнезе					P=0,1
Есть	32	12,6	41,6	157,7	
Нет	26	23,4	95,4	494,6	
Всего	58	12,6	71,1	230,7	

BCL2.

Является внутриклеточным белковым фактором, негативным регулятором апоптоза. Подавляет апоптоз во многих клеточных системах. Регулирует клеточную смерть, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны. Ингибирует каспазы за счет предотвращения выхода цитохрома С из митохондрий и/или за счет связывания фактора, активирующего апоптоз АРАF1.

Прогностическое значение Bcl2 показано для нескольких видов опухолей, таких как Неходжинская лимфома, плоскоклеточный рак, рак молочной железы, рак желчного пузыря, тимома. Белок Bcl2 также связан с наличием резистентности опухоли к терапии.

Нами также изучен вышеуказанный белок при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря. В таблице 44 представлены данные по медианам, квартилям, средним значениям показателя. Из таблицы видно, что медиана экспрессии белка Bcl2 достоверно выше в 3 группе (пациенты с условно «здоровым» мочевым пузырем) – 204,4 против 37,4 – в 1 группе и 48,4 – во 2 группе ($p=0,002$).

Таблица 44.

Данные характеристик Bcl2 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	152,9	83	0	1060,1	0	37,4	177,5	0	749,6
2	226,7	81	0	1398,9	0	48,5	337,8	0	955,4
3	513,2	70	0	4705,7	24,3	204,4*	568,1	0	2272,4
Всего		234							

* $p=0,0019$

В таблице 45 представлены данные по экспрессии мРНК Bcl2 в группах. Из таблицы видно, что во 2 группе выявлено достоверно больше количество пациентов с отсутствием экспрессии мРНК Bcl2 ($p=0,006$).

Таблица 45.

Данные экспрессии Bcl2 в исследуемых группах.

Группы	Bcl2		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	23 (27,7%)	60 (72,3%)	83
2	38 (47%)*	43 (53%)	81
3	17 (24%)	53 (76%)	70
Всего	78	156	234

*- $p=0,006$

Проанализируем подгруппу с экспрессией белка Bcl2 (таблица 46).

Таблица 46.

Данные экспрессии Bcl2 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	214,1*	60	1,0	1060,1	24,7	92,1*	326,5	4,2	818,6
2	427,1	43	26,9	1398,8	0	304,4	630,3	48,5	1060,1
3	677,8	53	24,3	4705,1	174,9	304,4	675,6	53,8	2906,3
Всего		156							

*- $p = 0,002$

Из таблицы видно, что в подгруппе с экспрессией белка Bcl2 получены достоверные различия по медиане показателя: в 1 группе – 92,1, во 2 –ой и 3–ей группах – 304,4 ($p=0,002$).

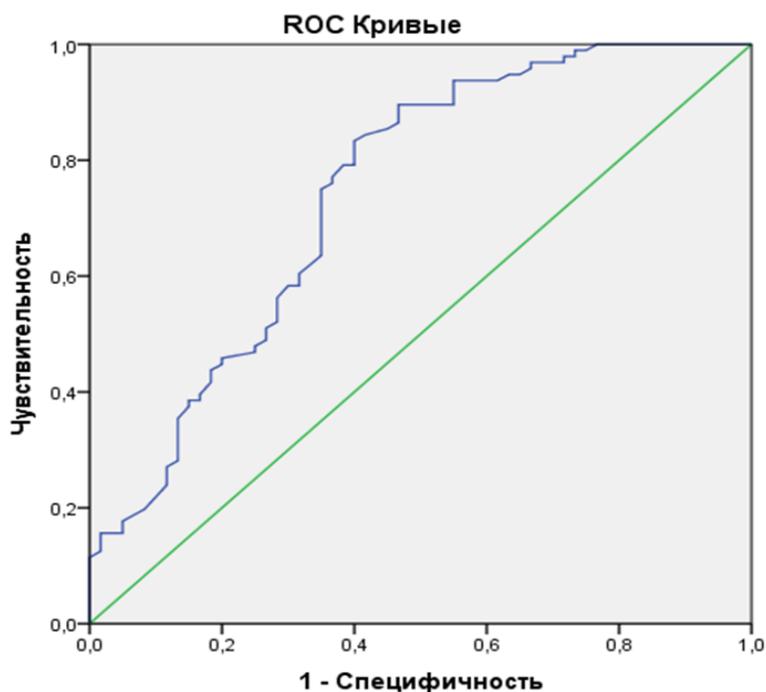
Была построена ROC-кривая для оценки информативности экспрессии мРНК Bcl2 (рисунок 11), данные по чувствительности и специфичности приведены в таблице 47.

Таблица 47.

Данные чувствительности и специфичности показателя Bcl2 в исследуемых группах.

Группы	Bcl2		Всего
	<170	≥170	
1	39 (65%)	21 (35%)	60
2	12 (28%)	31 (72%)	43
3	13 (25%)	40 (75%)	53
Всего	64	42	156

Построение порога с помощью ROC кривых не показало чувствительность и специфичность от 75% и более. Наилучшее соотношение получено в районе 170 о.е., это соответствует нижней квантили в 3 группе. Можно говорить о том, что низкая экспрессия мРНК Bcl2 ≤ 170 менее характерна для здоровых тканей мочевого пузыря, однако Bcl2 по полученным результатам нельзя считать геном-маркером.



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис.11 ROC-кривая при экспрессии Bcl2.

При оценке зависимости Vcl2 от возраста, пола, стадии заболевания, дифференцировки опухоли, наличия гематурии, количества очагов в мочевом пузыре, индекса массы тела, наследственной предрасположенности статистически значимых различий не получено. Сильная зависимость экспрессии мРНК Vcl2 отмечена от наличия фактора курения в анамнезе (таблица 48).

Таблица 48.

Зависимость экспрессии Vcl2 от курения.

<i>Курение</i>	<i>Vcl2</i>		<i>Всего</i>
	<i>Экспрессия не выявлена</i>	<i>Экспрессия выявлена</i>	
<i>Есть</i>	12 (26%)	34 (74%)	46
<i>Нет</i>	11 (30%)	25 (70%)	37
<i>Всего</i>	23	60	83

Оценка фактора курения в зависимости от степени экспрессии Vcl2 представлена в таблице 49.

Таблица 49.

Зависимость уровня экспрессии Vcl2 от курения.

<i>Курение</i>	<i>Vcl2</i>		<i>Всего</i>
	<i>< 170</i>	<i>≥ 170</i>	
<i>Есть</i>	26 (76%)*	8 (24%)	34
<i>Нет</i>	13 (50%)	13 (50%)	26
<i>Всего</i>	39	21	60

*- $p=0,03$

Мы выявили, что у курящих пациентов достоверно чаще встречаются пониженные значения показателя $Vc12 < 170$ в 76% случаев при сравнении с пациентами, у которых анамнез без курения $Vc12 \geq 170$ – 24% ($p=0,03$).

Таким образом, нам удалось определить порог соотношения чувствительности и специфичности белка $Vc12$, который равен 170. Однако чувствительность данного порога составила 65%, специфичность во 2 группе – 72%, в 3 – 75%, т.е. данный показатель не обладает приемлемой для медицинских исследований информативностью. Нами показано, что уровень $Vc12$ достоверно снижается у курящих пациентов.

CD45.

Белок CD45 является членом семейства тирозиновых протеинфосфатаз. Тирозиновые протеинфосфатазы являются компонентами сигнальных путей клетки, регулирующих рост, дифференцировку, митотический цикл и злокачественное перерождение клетки. Данная фосфатаза является важнейшим регулятором передачи сигнала от T и B-клеточных рецепторов. Она может взаимодействовать с компонентами рецепторов напрямую, а также активировать киназы Src-семейства, необходимых для передачи сигналов от данных рецепторов. CD45 также подавляет JAK-киназы, и таким образом, выступает в качестве негативного регулятора передачи сигнала от рецепторов цитокинов.

В таблице 50 представлены данные по средним значениям, медианам и квартилям белка CD45 при изучении его экспрессии в опухолевых образцах и условно «здоровой ткани» мочевого пузыря.

Мы получили достоверно меньшую медиану показателя CD45 в 1 группе – 77,5 по сравнению со 2 группой – 1499,2 ($p=0,0002$) и с 3 группой – 725,8 ($p=0,006$).

Частота выявления белка в группах составила: в 1-ой – 76,8%, во 2 и 3 группах – 79% и 82,9%, соответственно, различия недостоверные ($p=0,64$).

Таблица 50.

Данные характеристик CD45 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	1460,8	82	0	16384,0	1,1	77,5*	955,4	0	9742,0
2	4160,5	81	0	28516,2	147,0	1499,2*	5792,6	0	15286,8
3	2969,2	70	0	20882,4	187,4	725,8	3821,7	0	13777,3
Всего		233							

* $p_{1-3}=0,006$; $p_{1-2}=0,0002$

Таблица 51.

Данные экспрессии CD45 в исследуемых группах.

Группы	CD45		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	19 (23,2%)	63 (76,8%)	82
2	17 (21,0%)	64 (79,0%)	81
3	12 (17,1%)	58 (82,9%)	70
Всего	48	185	233

Анализируем средние значения, медианы и квартили CD45 у пациентов с экспрессией белка (таблица 52).

Данные экспрессии CD45 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	1901,4	63	1,0	16384,0	21,9	326,3*	1782,9	2,0	11993,8
2	5265,6	64	26,9	28526,2	687,5	3446,4	7778,2	147,0	18179,2
3	3571,5	58	93,7	20882,4	362,0	1525,7*	5042,8	137,2	14766,1
Всего		185							

*- $p_{1-2} = 0,0001$, $p_{1-3} = 0,001$

Из таблицы видно, что достоверно ниже медиана показателя CD45 выявляется в 1 группе – 326,3 по сравнению со 2 и 3 группами – 3446,4 ($p=0,0002$) и 1525,7 ($p=0,001$), соответственно.

Построена ROC-кривая, позволяющая нам оценить порог чувствительности и специфичности белка CD45 (рисунок 12). Площадь под кривой равна $0,73 \pm 0,04$. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности показателя CD45 находится в районе 900. Данные по чувствительности и специфичности представлены в таблице 53.

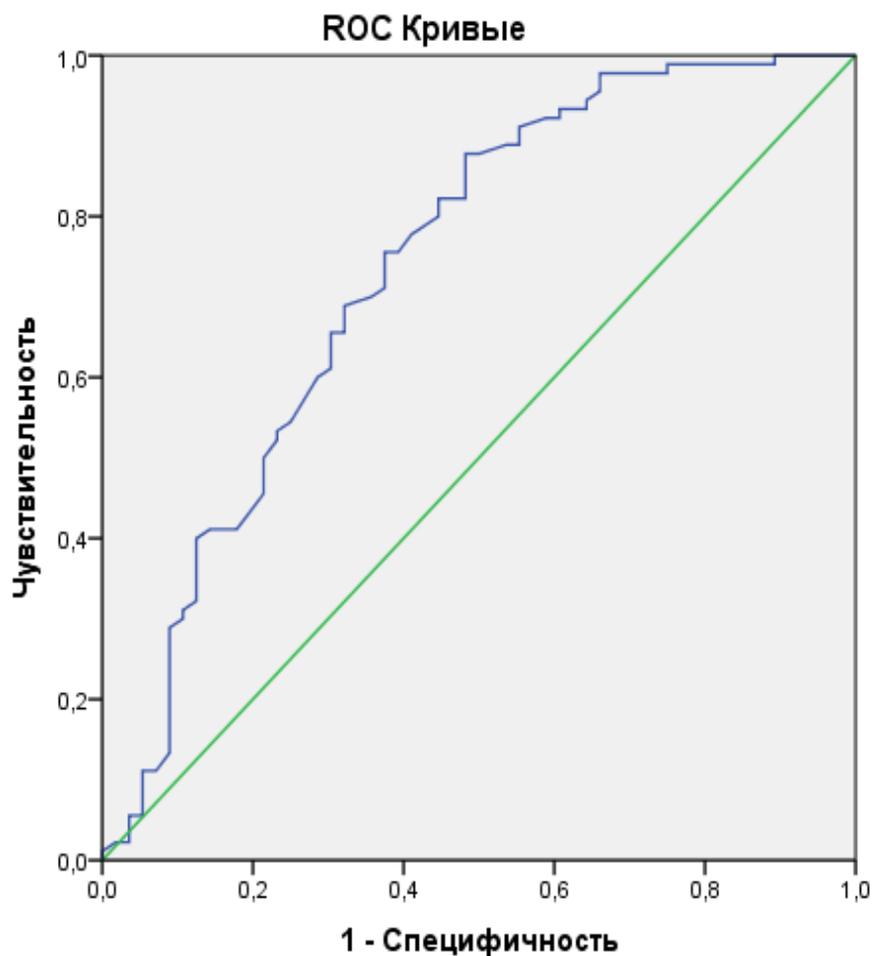
Таблица 53.

Данные чувствительности и специфичности показателя CD45 по группам исследования.

Группы	CD45		Всего
	≥ 900	< 900	
1	22 (34,9%)	41 (65,1%)	63
2	44 (68,8%)	20 (31,2%)	64
3	34 (58,6%)*	24 (41,4%)	58
Всего	100	85	185

*- $p < 0,0004$

Полученные различия достоверны, однако данный показатель не обладает приемлемой для медицинских исследований информативностью, т.е. белок CD45 нельзя считать геном-маркером.



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 12. ROC-кривая при экспрессии CD45.

Оценена взаимосвязь белка CD45 с возрастом, полом. Стадией заболевания, степенью дифференцировки опухоли, наличием гематурии, размером первичной опухоли, количеством очагов в мочевом пузыре, курением в анамнезе, индексом массы тела, наследственным онкоанамнезом - статистически значимых различий не выявлено. Имеется тенденция к снижению медианы белка при наличии курения в анамнезе (таблица 54).

Таблица 54.

Зависимость экспрессии CD45 от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	CD45				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	33	26,0	97,0	222,9	P=0,34
Нет	23	29,9	93,7	284,0	
Всего	56	28,9	95,4	260,5	
Размер опухоли					
<3см	43	33,1	132,5	326,3	P=0,14
≥3см	13	18,4	76,1	194,0	
Всего	56	28,9	95,4	260,3	
Курение в анамнезе					
Есть	32	25,1	71,2	175,3	P=0,06
Нет	24	32,7	235,1	343,8	
Всего	56	28,9	95,4	260,5	

GRB7.

GRB7 – некаталитический внутриклеточный адаптерный белок, вовлеченный в миграцию клеток, отмечается его гиперэкспрессия в некоторых инвазивных и метастатических солидных опухолях. Показано увеличение экспрессии этого белка при раке молочной железы, гиперэкспрессия GRB7 коррелирует с плохим прогнозом заболевания. Считается, что ингибирование его может быть эффективно при лечении рака молочной железы (Nadler Y et al, 2010). Мы проанализировали уровень экспрессии этого белка при мышечно-

неинвазивном раке мочевого пузыря. Данные по медиане, средним значениям и квартилям представлены в таблице 55.

Таблица 55.

Данные характеристик GRB7 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	5273,9	83	0	29532,2	2,5	3158,9*	7917,7	0	20882,4
2	1531,5	81	0	14766,1	0	100,4	1978,2	0	6888,6
3	1868,9	70	0	20882,4	33,1	1024,6*	2352,5	0	6654,0
Всего		234							

* $p_{1-3}=0,02$; $p_{1-2}=0,0007$

Достоверно больше медиана белка GRB7 выявлена в 1 группе – 3158,9, при сравнении со 2 и 3 группами – 1004 ($p=0,0007$) и 1024,6 ($p=0,02$), соответственно. В таблице 56 представлено распределение образцов тканей в зависимости от наличия экспрессии.

Таблица 56.

Данные экспрессии GRB7 в исследуемых группах.

Группы	GRB7		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	20 (24,1%)	63 (75,9%)*	83
2	38 (47%)	43 (53%)	81
3	15 (21%)	55 (79%)	70
Всего	74	161	234

*- $p=0,001$

Достоверно больше пациентов с экспрессией белка GRB7 выявлено в 1 группе - 75,9% ($p=0,001$) при сравнении с пациентами этой же группы и 3 группы, у которых не было выявлено экспрессии белка. Далее нами проанализирована подгруппа больных с экспрессией белка GRB7 (таблица 57).

Таблица 57.

Данные экспрессии GRB7 в исследуемых группах.

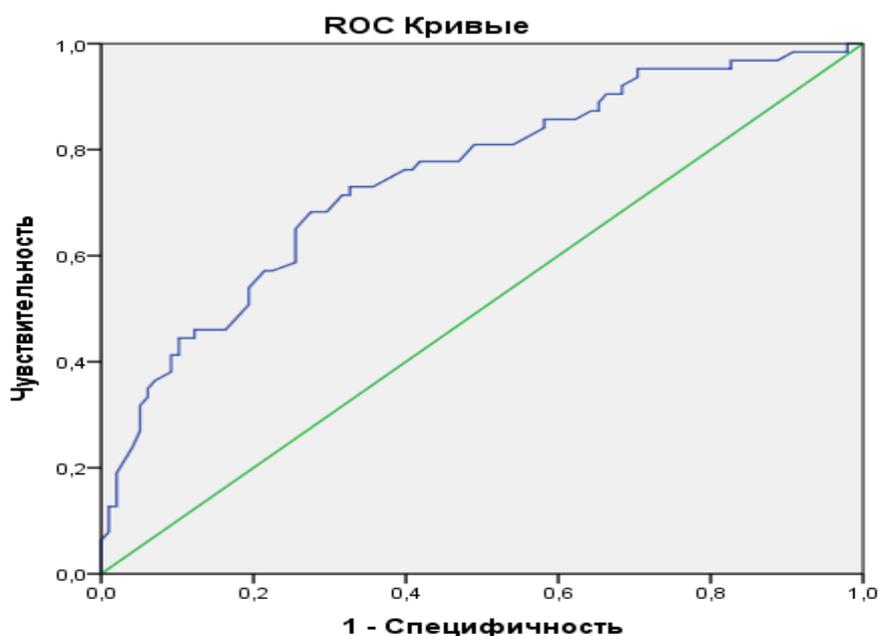
Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	7031,9	63	4,9	29532,1	2194,9	4389,9*	9741,9	652,6	22381,0
2	2884,9	43	1,0	1476,1	477,7	1910,9	4544,8	100,4	9741,9
3	2378,6	55	3,0	20882,4	548,7	1722,2*	2998,4	33,1	6653,9
Всего		161							

*- $p_{1-3} = 0,0001$; $p_{1-2} = 0,0003$

На рисунке 13 представлен график ROC-кривой, которая позволяет оценить показатели чувствительности и специфичности белка GRB7. Площадь под кривой равна $0,75 \pm 0,04$.

Оптимальное соотношение чувствительности и специфичности лежит в районе 2900. Чувствительность показателя GRB7 составила 68%, специфичность во 2 группе – 65%, в 3 группе – 75% (таблица 58).

Полученные различия достоверны, однако показатель не имеет приемлемой для медицинских исследований информативностью, т.е. белок нельзя считать геном-маркером мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, но он может обладать некоторой диагностической ценностью.



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 13 ROC-кривая при экспрессии GRB7.

Таблица 58.

Данные чувствительности и специфичности показателя GRB7.

Группы	GRB7		Всего
	<2900	≥2900	
1	20 (32%)	43 (68%)*	63
2	28 (65%)	15 (35%)	43
3	41 (75%)	14 (25%)	55
Всего	89	72	161

*- p=0,0001

Выполнена оценка зависимости экспрессии белка GRB7 от возраста, пола, стадии заболевания, наличия гематурии, размеров первичной опухоли, количества опухолевых очагов в мочевом пузыре, курения, индекса массы тела, статистически значимых различий не получено. Выявлена тенденция к увеличению медианы белка GRB7 при опухолях со степенью дифференцировки G1 (таблица 59).

Таблица 59.

Зависимость экспрессии GRB7 от клинических и анамнестических факторов.

Степень дифференцировки опухоли	GRB7				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
G1	35	2896,3	6427,3	10085,5	P=0,09
G2	1	5229,6	5220,6	5220,6	
G3	26	1606,8	3326,9	6653,9	
Всего	62	2194,9	4315,2	9741,9	
Гематурия					
Есть	38	2048,0	4467,4	10085,5	P=0,2
Нет	25	2797,7	4240,4	9410,1	
Всего	63	2194,9	4389,9	9741,9	
Размер опухоли					
<3см	48	2020,4	4315,2	9089,6	P=0,2
≥3см	15	2610,3	4544,8	18179,2	
Всего	63	2194,9	4389,9	9741,9	
Курение в анамнезе					
Есть	36	1827,4	3385,6	9576,1	P=0,18
Нет	27	3444,3	6427,3	10085,5	
Всего	63	2194,9	4389,9	9741,9	

IL-2 (Интерлейкин-2).

Это пептид, представитель группы интерлейкинов (одной из разновидностей цитокинов). Является активатором клеточного иммунитета и медиатором воспаления, активирует противоопухолевый иммунитет.

Продуцируется клетками в ответ на антигенную и митогенную стимуляцию. Необходим для пролиферации Т-клеток и других процессов, регулирующих иммунный ответ. Интерлейкины-2 действует через гетеродимерный комплекс рецептора Интерлейкина-2, состоящего из трех субъединиц: рецептор интерлейкина-2 альфа (CD25), рецептор интерлейкина-2 бета (CD122) и рецептор интерлейкина-2 гамма (CD132). Интерлейкин-2 активирует различные сигнальные пути, такие как Ras/MAPK (сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы), JAK/Stat и PI3K/Ak+ (сигнальный путь фосфоинозитид-3 киназы).

В работе произведена оценка экспрессии Интерлейкина-2 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря и в неопухолевых тканях мочевого пузыря. В таблице 60 представлены данные по медианам, средним значениям, квартилям показателя.

Таблица 60.

Данные характеристик ИЛ-2 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	3981,7	82	0	311743,5	4,4	30,1	100,4	0	374,8
2	250,3	81	0	1606,8	59,7	147,0*	315,2	0	922,9
3	208,7	70	0	1663,5	0	90,5*	315,2	0	699,4
Всего		233							

* $p_{1-3}=0,03$; $p_{1-2}=0,0002$

Нами выявлена достоверно меньшая медиана ИЛ-2 в 1 группе – 30,1 о.е. при сравнении со 2 и 3 группами – 147,0 ($p=0,0002$) и 90,5 ($p=0,03$), соответственно. Далее произведено разделение пациентов на подгруппы в зависимости от уровня экспрессии ИЛ-2 в образцах тканей (таблица 61).

Таблица 61.

Данные экспрессии П-2 в исследуемых группах.

Группы	П-2		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	16 (20%)	66 (80%)	82
2	17 (21%)	64 (79%)	81
3	18 (26%)	52 (74%)	70
Всего	51	182	233

Достоверных различий по наличию или отсутствию экспрессии П-2 в опухолевых и неопухолевых тканях мочевого пузыря не получено ($p=0,6$).

В таблице 62 представлены результаты анализа показателя в подгруппе с экспрессией П-2. Здесь также получены достоверные различия по медиане показателя в 1 группе он меньше – 50,2 о.е. по сравнению со 2 и 3 группами – 204,4 и 160,4, соответственно ($p<0,0001$).

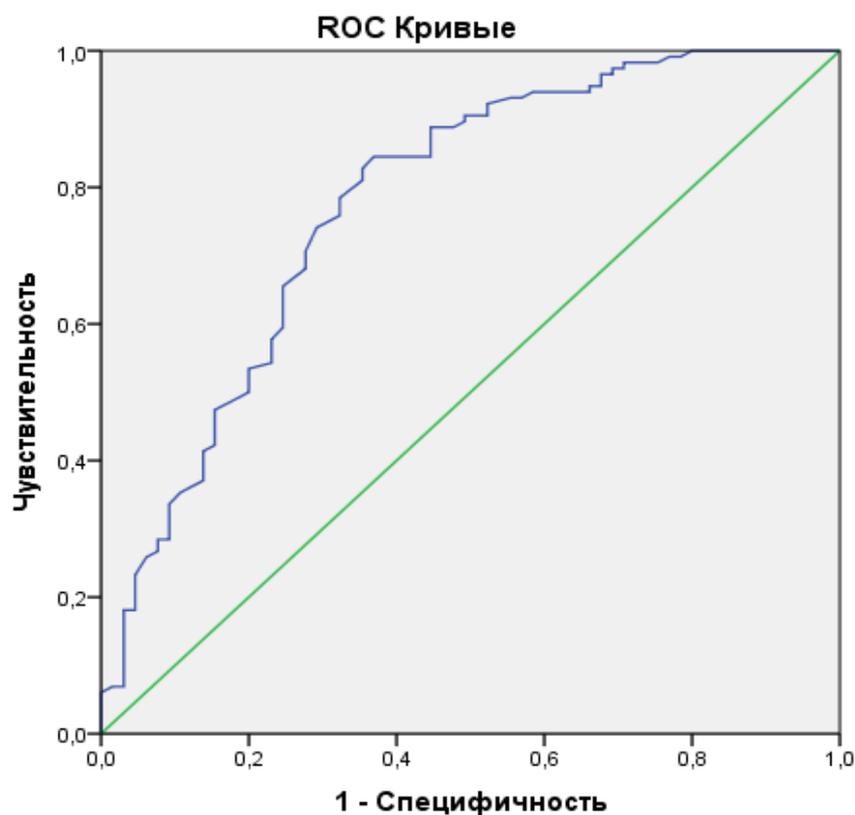
Таблица 62.

Данные экспрессии П-2 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	113,5	66	1,0	891,4	13,9	50,2	115,4	2,5	374,8
2	316,8	64	16,6	1606,8	113,4	204,4*	368,4	59,7	1024,0
3	281,0	52	10,9	1663,5	83,0	160,4*	395,3	19,0	699,4
Всего		182							

*- $p<0,0001$.

На рисунке 14 представлена ROC- кривая, позволяющая оценить порог чувствительности и специфичности П-2. Площадь под кривой равна $0,78 \pm 0,04$. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности находится в районе 100 о.е.



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рисунок 14. ROC-кривая при экспрессии IL-2.

Нами произведено распределение по подгруппам с учетом полученного значения порога (таблица 63).

Таблица 63.

Данные чувствительности и специфичности показателя IL-2. в исследуемых группах

Группы	IL-2		Всего
	≥ 100	< 100	
1	20 (30,3%)	46 (69,7%)	66
2	54 (84,4%)	10 (15,6%)	64
3	33 (63,5%)	19 (36,5%)	52
Всего	107	75	182

*- $p=0,0001$

Из таблицы видно, что чувствительность показателя составила 69,7%, специфичность во 2 группе – 84,4%, в 3 группе – 63,5%. Различия статистически значимые, однако полученные значения не обладают приемлемой для медицинских исследований информативностью,

следовательно, IL-2 нельзя считать геном-маркером для мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, хотя белок обладает определенной диагностической ценностью.

При оценке зависимости IL-2 клинических и анамнестических данных пациентов достоверных различий не получено (таблица 64).

Таблица 64.

Зависимость экспрессии IL-2 от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	IL-2				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	43	12,6	50,2	104,0	P>0,05
Нет	21	16,0	71,0	174,9	
Всего	64	13,5	55,0	131,2	
Размер опухоли					
<3см	43	14,9	73,6	194,0	P=0,06
≥3см	21	12,6	26,0	73,5	
Всего	64	13,5	55,0	131,2	
Курение в анамнезе					
Есть	37	8,9	61,8	100,4	P=0,5
Нет	27	17,1	39,8	174,9	
Всего	64	13,5	55,0	131,2	

IL-12 (Интерлейкин-12)

Интерлейкин-12 является гликопротеином, который состоит из двух гликизированных субъединиц: р40 и р35, связанных между собой дисульфидными мостиками. Дисульфидные связи играют важную роль в биологической активности IL-12. IL-12 действует как ростовой фактор при активации Т и NK- клеток. При этом он действует в качестве индуктора секреции IFN- γ и ингибитора синтеза IgE, индуцированного IL-4. IL-12 активирует и цитотоксичность макрофагов, а дефицит его продукции макрофагами может значительно снижать противоопухолевую активность. Усиление роста опухоли, в частности, рака прямой кишки, ассоциируется со снижением продукции IL-12 и усилением продукции IL-10. Важным свойством Интерлейкина-12 является усиление экспрессии FasL и индукция апоптоза. Интерлейкин-12 ингибирует ангиогенез. Антиангиогенное действие Интерлейкина-12 реализуется на уровне рецепторов протеинкиназ, адгезивных молекул, интегринов и других поверхностных структур усиления продукции IFN- γ .

Уровень экспрессии IL-12 был также проанализирован в нашей работе. Данные по медианам, средним значениям и квартилям показателя представлены в таблице 65.

Таблица 65.

Данные характеристик IL-12 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	6,7	82	0	93,7	0	1,7*	8,9	0	32,0
2	9,1	81	0	90,6	0	0*	14,4	0	46,9
3	11,6	70	0	55,7	0	4,2	20,4	0	43,7
Всего		233							

*p=0,7

Из таблицы видно, что медиана показателя в 1 группе равна 1,7 о.е., во 2 группе -0, в 3-ей – 4,2, достоверных различий не получено ($p=0,7$).

В таблице 66 представлено распределение образцов тканей в зависимости от уровня экспрессии П-12.

Таблица 66.

Данные экспрессии П-12 в исследуемых группах.

Группы	П-12		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	38 (46,3%)	44 (53,7%)*	82
2	54 (66,7%)	27 (33,3%)*	81
3	33 (47,1%)	37 (52,9%)*	70
Всего	125	108	233

*- $p=0,06$

Имеет место тенденция к большей экспрессии показателя П-12 в 1 группе – 36,6% по сравнению со 2 группой – 19,8% и с 3 группой – 28,6%, однако различия недостоверные ($p=0,06$).

В таблице 67 представлен анализ показателя П-12, выполненный в подгруппе пациентов с выявленной его экспрессией.

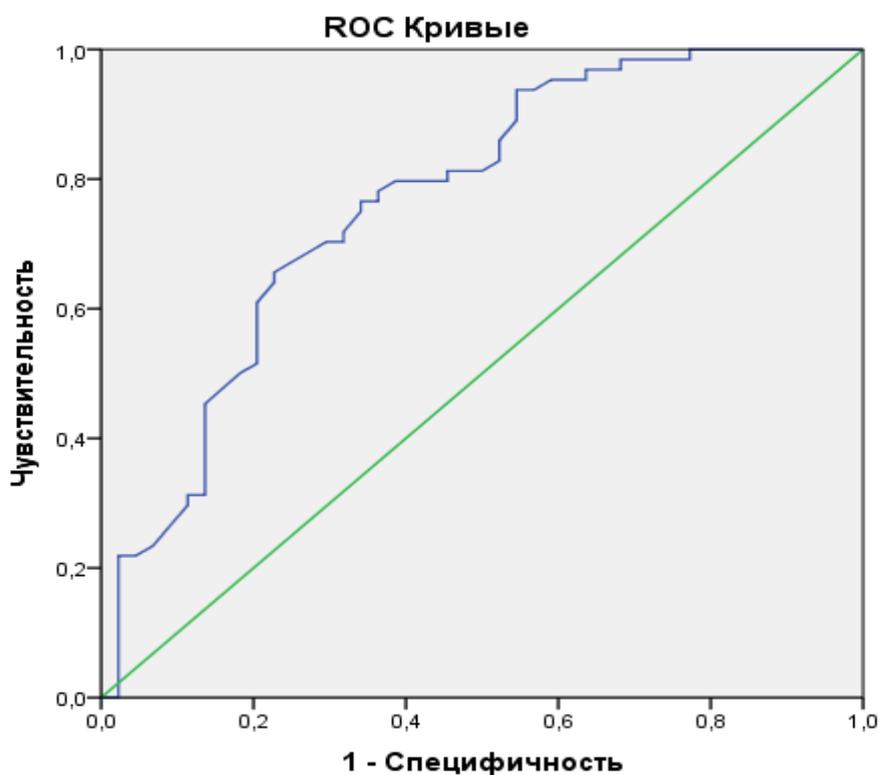
Из таблицы видно, что медиана показателя П-12 в подгруппе пациентов с его экспрессией достоверно меньше в группе 1 – 8,1 о.е. по сравнению с медианой 2 и 3 групп – 19,7 ($p=0,0006$) и 20,4 ($p=0,0005$), соответственно.

Для оценки чувствительности и специфичности построена ROC-кривая, которая представлена на рисунке 15.

Данные экспрессии IL-12 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	12,6	44	1,0	93,7	2,9	8,1	14,4	1,4	35,5
2	27,2	27	5,1	90,5	14,4	19,7*	40,8	6,5	61,8
3	21,9	37	2,7	55,7	11,3	20,4*	32,0	4,0	48,5
Всего		108							

*- $p_{1-2}=0,0006$; $p_{1-3}=0,0005$



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 15 ROC-кривая при экспрессии IL-12.

Площадь под кривой равна $0,77 \pm 0,05$. Оптимальное соотношение чувствительности и специфичности лежит в районе 14.

Распределение пациентов с экспрессией показателя IL-12 в зависимости от уровня экспрессии представлена в таблице 68.

Таблица 68.

Данные чувствительности и специфичности показателя IL-12 в исследуемых группах.

Группы	IL-12		Всего
	≥ 14	< 14	
1	12 (27,3%)	32 (72,7%)*	44
2	21 (77,8%)	6 (2,2%)	27
3	23 (62,2%)	14 (37,8%)	33
Всего	56	52	108

*- $p < 0,0004$

Таким образом, чувствительность показателя составила 72,7%, специфичность во 2 группе – 77,8%, в 3 группе – 62,2%. Полученные различия достоверны ($p < 0,0004$), однако показатель не показал приемлемой для медицинских исследований информативности ($> 75\%$), т.е. он не может считаться геном-маркером для МНИРМП, обладает некоторой диагностической ценностью.

При анализе зависимости IL-12 от возраста, пола, стадии заболевания, степени дифференцировки опухоли, наличия гематурии в анамнезе, размеров опухоли, количества опухолевых очагов, курения в анамнезе, индекса массы тела, достоверных различий не выявлено (таблица 69).

Зависимость экспрессии IL-12 от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	IL-12				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	26	2,8	5,1	14,4	P=0,6
Нет	18	4,3	9,4	14,5	
Всего	44	2,9	8,1	14,4	
Размер опухоли					
<3см	32	3,1	10,0	17,1	P=0,1
≥3см	14	2,3	4,7	10,6	
Всего	44	2,9	8,1	14,4	
Курение в анамнезе					
Есть	26	2,6	4,9	15,5	P=0,47
Нет	18	4,3	10,7	13,9	
Всего	44	2,9	8,1	14,4	

IL-15 (Интерлейкин-15).

Интерлейкин-15 - это недавно открытый цитокин, который обладает многими биологическими свойствами IL-2. Играет ключевую роль в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета. Благодаря провоспалительному и антиапоптотическому эффектам IL-15 участвует в процессах созревания, выживания и дифференцировки не только иммунокомпетентных, но и многих других клеток. IL-15 активно экспрессируется множеством клеток в различных тканях и органах. Роли, которые играет IL-15 при различных патологических

состояниях могут быть диаметрально противоположными, поэтому и подходы к коррекции его активности различные [Малашенкова И.К., Казанова Г.В., 2014]. Мы также оценили уровень экспрессии П-15 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря и в условно «здоровой ткани» мочевого пузыря. В таблице 70 представлены данные по медиане, средним значениям и квартилям показателя.

Таблица 70.

Данные характеристик П-15 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	20,2	82	0	78,8	8,6	15,5	28,8	1,7	46,9
2	29,9	81	0	78,8	78,8	27,9*	42,2	0	64
3	42,1	70	0	499,6	16,6	28,3*	48,5	0	90,5
Всего		233							

* $p_{1-2}=0,0006$; $p_{1-3}=0,0003$

Выявлено, что медиана показателя П-15 достоверно меньше в 1 группе – 15,5, при сравнении со 2 группой – 27,9 ($p=0,0006$) и с 3 группой – 28,3 ($p=0,0003$). Нами произведена оценка экспрессии П-15 в образцах тканей (таблица 71).

Из таблицы видно, что экспрессия показателя в тканях выявляется практически с одинаковой частотой во всех группах, полученные различия недостоверны ($p=0,16$).

Таблица 71.

Данные экспрессии IL-15 в исследуемых группах.

Группы	IL-15		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	3 (3,7%)	79 (96,3%)	82
2	7 (8,6%)	74 (91,4%)	81
3	8 (11,4%)	62 (88,6%)	70
Всего	18	215	233

Далее проанализирована подгруппа пациентов, у которых выявлена экспрессия показателя IL-15 (таблица 72).

Таблица 72.

Данные экспрессии IL-15 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	20,9	79	1,0	78,8	8,9	16,6	28,8	2,9	55,7
2	32,8	74	4,0	78,8	23,4	28,9*	42,2	7,7	68,6
3	47,5	62	3,9	494,6	23,4	32,6*	50,2	12,1	90,5
Всего		215							

*- $p_{1-2}=0,0007$; $p_{1-3}=0,0001$

Нами получено, что медиана показателя IL-15 у пациентов с экспрессией достоверно ниже в 1 группе – 16,6, по сравнению со 2 и 3 группами – 28,8 ($p=0,0007$) и 32,6 ($p=0,0001$), соответственно.

Была построена ROC-кривая для оценки чувствительности и специфичности показателя IL-15 (рисунок 16).

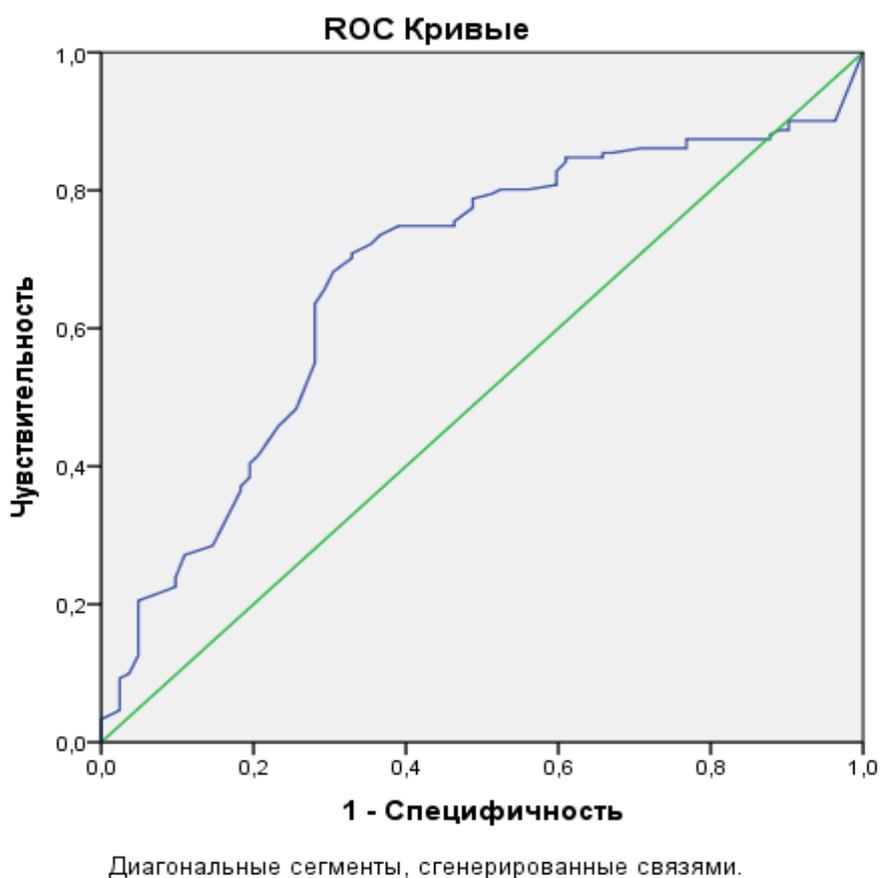


Рисунок 16. ROC-кривая при экспрессии IL-15.

Площадь под кривой равна $0,74 \pm 0,04$. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности находится в районе 25.

В таблице 73 представлены результаты распределения пациентов с учетом полученного значения порога. Выявлено, что чувствительность показателя равна 70,1%, специфичность во 2 группе – 70,3%, в 3 группе – 71%.

Выявленные различия достоверны, однако выявленная чувствительность и специфичность показателя IL-15 не позволяет его считать

геном-маркером, т.к. полученные значения не обладают приемлемой для медицинских исследований информативностью, показатель может обладать диагностической ценностью.

Таблица 73.

Данные чувствительности и специфичности показателя П-15 в исследуемых группах.

Группы	П-15		Всего
	≥ 25	< 25	
1	23 (29,1%)	56 (70,1%)	79
2	52 (70,3%)	22 (29,7%)	74
3	44 (71%)	18 (29%)	62
Всего	119	96	215

*- $p < 0,0001$

Выявлено, что чувствительность показателя равна 70,1%, специфичность во 2 группе – 70,3%, в 3 группе – 71%. Выявленные различия достоверны, однако выявленная чувствительность и специфичность показателя П-15 не позволяет его считать геном-маркером, т.к. полученные значения не обладают приемлемой для медицинских исследований информативностью. Показатель может обладать диагностической ценностью.

Проанализирована зависимость П-15 от некоторых клинических и анамнестических данных. Не выявлено достоверных различий при оценке зависимости от возраста, пола, стадии заболевания, степени дифференцировки опухоли, размеров опухолевого узла, количества опухолевых очагов, курения в анамнезе и индекса массы тела (таблица 74). Проанализирована зависимость П-15 от некоторых клинических и анамнестических данных. Не выявлено достоверных различий при оценке зависимости от возраста, пола, стадии

заболевания, степени дифференцировки опухоли, размеров опухолевого узла, количества опухолевых очагов, курения в анамнезе и индекса массы тела (таблица 74).

Таблица 74.

Зависимость экспрессии IL-15 от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	IL-15				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	50	8,9	16,6	28,8	P=0,2
Нет	28	9,4	16,3	30,9	
Всего	78	8,9	16,6	28,8	
Размер опухоли					
<3см	54	8,9	18,4	34,3	P=0,2
≥3см	24	7,9	14,4	20,8	
Всего	78	8,9	16,6	28,8	
Курение в анамнезе					
Есть	44	8,4	15,5	23,0	P=0,45
Нет	34	9,8	17,5	38,1	
Всего	78	8,9	16,0	28,8	

IL-7 (Интерлейкин-7).

Интерлейкин-7 – это цитокин, стимулирующий гемопоэз. Продуцируется фибробластами и стромальными костномозговыми клетками. IL-7 стимулирует пролиферацию, но не дифференцировку пре- и про-B-клеток и не обладает активностью в отношении дифференцированных B-клеток. Также IL-7 стимулирует пролиферацию незрелых и дифференцированных

активированных Т-клеток. Он эффективен и в иммунотерапевтическом разрушении опухолевых клеток CD4+ Т-клетками. Совместно с IL-2 он может применяться в консолидационной иммунотерапии злокачественных новообразований у пациентов после трансплантации костного мозга. IL-7 может индуцировать апоптоз опухолевых клеток.

Нами выполнено определение экспрессии IL-7 в опухолевых и неопухолевых тканях мочевого пузыря и изучено значение данного показателя для мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря. Данные по медианам, средним значения и квартилям представлены в таблице 75.

Таблица 75.

Данные характеристик IL-7 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	12,3	82	0	68,6	0	7,2	17,8	0	45,3
2	15,2	81	0	104,0	0	0	28,8	0	48,5
3	34,3	70	0	548,7	0	23,1*	34,3	0	87,4
Всего		233							

*p=0,01

Достоверные различия выявлены между медианами 1 и 3 групп – 7,2 и 23,1, соответственно (p=0,01).

Распределение образцов тканей в группах в зависимости от наличия экспрессии показателя представлено в таблице 76.

Таблица 76.

Данные экспрессии П-7 в исследуемых группах.

Группы	П-7		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	25 (30%)	57 (70%)	82
2	41 (51%)	40 (49%)*	81
3	21 (30%)	49 (70%)	70
Всего	87	146	233

*-p=0,009

Из таблицы видно, что достоверно реже экспрессию показателя П-7 выявляли во 2 группе (пациенты с пролеченным МНИРМП, находящиеся под динамическим наблюдением). В таблице 77 нами проанализированы данные показателя П-7 у пациентов с выявленной его экспрессией.

Таблица 77.

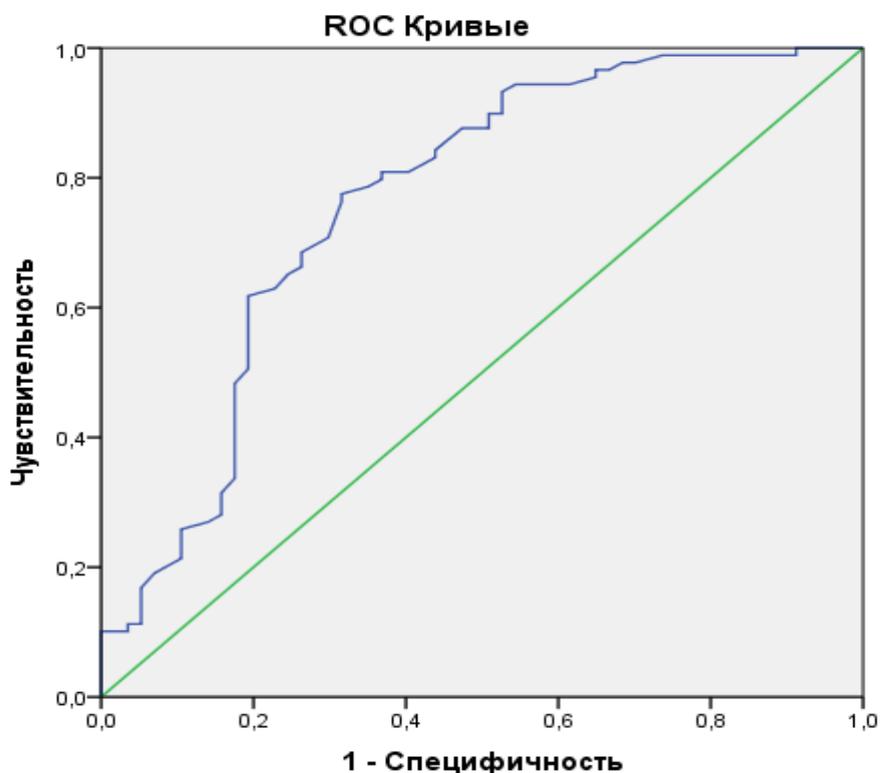
Данные экспрессии П-7 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	17,7	57	1,0	68,6	6,7	13,5	22,6	1,2	55,7
2	30,9	40	7,2	104,0	16,6	28,8*	39,4	8,5	82,4
3	49,0	49	2,8	548,7	21,1	30,9*	45,3	11,7	163,1
Всего		146							

*- p₁₋₂=,0,0003; p₁₋₃=0,0001

Из таблицы видно, что достоверно меньше медиана показателя П-7 выявлена в группе 1 – 13.5 о.е. по сравнению со 2 группой – 28,8 (p=0,0003) и с 3 группой – 30,9 (p=0,0001).

На рисунке 17 представлена ROC-кривая показателя IL-7. Площадь под кривой равна $0,76 \pm 0,04$. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности находится в районе 20.



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 17 ROC-кривая при экспрессии IL-7.

В таблице 78 представлено распределение пациентов с учетом полученного порогового значения показателя IL-7.

Таблица 78.

Данные чувствительности и специфичности показателя IL-7 в исследуемых группах.

Группы	IL-7		Всего
	≥ 20	< 20	
1	17 (29,8%)	40 (70,2%)	57
2	24 (60%)	16 (40%)	40
3	39 (79,6%)	10 (20,4%)	49
Всего	80	66	146

*- $p < 0,0001$

Чувствительность показателя составила 70,2%, специфичность во 2 группе – 60%, в 3-ей – 79,6%. Таким образом, можно сделать вывод, что данный показатель не является геном-маркером, т.к. не обладает приемлемой для медицинских исследований информативностью, однако может иметь некоторую диагностическую ценность. Его снижение отмечено в опухолевых тканях.

Анализ зависимости IL-7 от анамнестических и клинических данных представлен в таблице 79.

Таблица 79.

Зависимость экспрессии IL-7 от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	IL-7				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	34	7,2	12,0	24,3	P=0,3
Нет	23	5,1	13,5	20,4	
Всего	57	6,9	13,5	22,6	
Размер опухоли					
<3см	44	7,1	15,2	23,8	P=0,09
≥3см	13	4,4	9,5	10,6	
Всего	57	6,9	13,4	22,6	
Кол-во опухолевых очагов					
1	48	7,3	13,9	24,3	P=0,02
2-7	8	2,8	5,9	11,5	
>8	1	16,6	16,6	16,6	
Всего	57	6,9	13,5	22,6	

Здесь выявлено достоверное снижение медианы показателя при увеличении количества опухолевых очагов в мочевом пузыре ($p=0,02$) и отмечена тенденция к уменьшению медианы ПЛ-7 при размере опухолевого узла ≥ 3 см ($p=0,09$).

p16INK4A

Ген/белок p16INK4A – один из ключевых ингибиторов клеточного деления. Он участвует в делении клетки за счет блокирования сигнала на уровне циклина Д – активатора перехода клетки из G1 в S фазу клеточного цикла. Нарушение функционирования данного гена в виде мутации является механизмом канцерогенеза для многих типов злокачественных опухолей [Bazarov et al, 2011; Pape-Zambito D, 2014]. Имеются данные о том, что белок p16INK4A является маркером прогноза безрецидивной выживаемости при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря [J.A. March – Villalba, et al, 2019].

Мы оценили роль белка p16INK4A при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря. Данные по медианам, средним значениям и квартилям представлены в таблице 80.

Таблица 80.

Данные характеристик p16INK4A в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	37,4	83	0	230,7	8,3	28,3*	52,0	0	104,0
2	14,0	81	0	73,5	0	13,9	25,1	0	36,8
3	21,8	70	0	71,0	16,0	21,9	28,8	0	43,7
Всего		234							

* $p<0,0001$

Выявлено, что медиана показателя достоверно больше в 1 группе – 28,3, по сравнению с медианой p16INK4A 2-ой группы – 13,9 ($p < 0,0001$) и недостоверно больше медианы 3 группы – 21,9 ($p=0,1$). В таблице 81 приведены данные распределения образцов тканей в зависимости от экспрессии белка в исследуемых группах.

Таблица 81.

Данные экспрессии p16INK4A в исследуемых группах.

Группы	P16INK4A		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	20 (24,1%)	63 (75,6%)	83
2	38 (47%)*	43 (53%)	81
3	14 (20%)	56 (80%)	70
Всего	73	162	234

*- $p=0,005$

Достоверно чаще отсутствие экспрессии белка наблюдалось во 2 группе – 47%, по сравнению с 1 и 3 группами – 24,1% и 20%, соответственно ($p=0,005$).

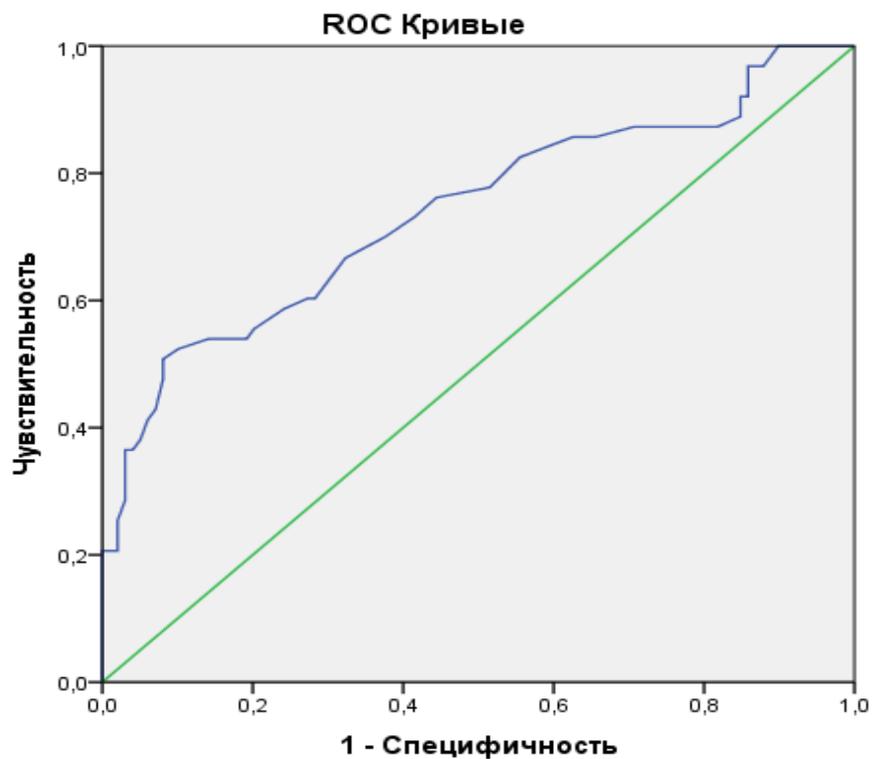
Мы проанализировали параметры показателя у пациентов с экспрессией мРНК p16NK4A (таблица 82). Здесь получены аналогичные закономерности по медиане белка p16INK4A, она достоверно выше в группе 1 – 39,4 по сравнению со второй группой – 24,3 ($p=0,001$) и недостоверно – при сравнении с 3 группой – 25,1 ($p > 0,05$).

Построена ROC-кривая, позволяющая оценить информативность экспрессии p16NK4A (рисунок 18).

Данные экспрессии p16INK4A в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	49,8	63	16,6	230,7	26,0	39,4	64,0	17,8	107,6
2	26,5	43	3,4	73,5	24,3	24,3	33,1	13,9	42,2
3	27,2	56	1,0	71,0	25,1	25,1	14,9	14,9	45,3
Всего		162							

*- $p < 0,001$



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рисунок 18. ROC-кривая при экспрессии p16INK4A.

Площадь под кривой равна $0,74 \pm 0,04$. Оптимальное соотношение чувствительности и специфичности лежит в районе 29.

Чувствительность данного порога составила 63.5%, специфичность во 2 группе – 69,8%, в 3 группе – 69,6%. Расчеты показателей чувствительности и специфичности представлены в таблице 83.

Таблица 83.

Данные чувствительности и специфичности показателя p16INK4A в исследуемых группах.

Группы	p16INK4A		Всего
	<45	≥45	
1	39 (61,9%)	24 (38,1%)	63
2	41 (95,3%)*	2 (4,7%)	43
3	53 (94,6%)	3 (5,4%)	56
Всего	133	29	162

*- $p < 0,0001$

Следовательно, при экспрессии белка p16INK4A ≥ 45 белок обладает диагностической ценностью.

Рассмотрим его взаимосвязи с клиническими и анамнестическими факторами (таблица 84).

При наличии экспрессии белка отмечены достоверные различия по медиане показателя при размерах опухоли $< 3\text{см}$ – 29,9 о.е. и $\geq 3\text{см}$ – 36,8 о.е. ($p=0,002$), а также имела место тенденция к повышению у курящих медиана составила 33.1 и 26,0, соответственно ($p=0,08$).

Зависимость экспрессии p16INK4A от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	P16INK4A				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	42	25,1	33,1	57,7	P>0,05
Нет	21	23,4	34,3	43,7	
Всего	63	24,3	33,1	50,2	
Размер опухоли					
<3см	52	23,4	29,9	43,7	P=0,003
≥3см	11	29,8	36,8	93,7	
Всего	63	24,3	33,1	50,2	
Курение в анамнезе					
Есть	53	23,4	33,1	50,2	P=0,08
Нет	10	21,1	26,0	33,7	
Всего	63	21,9	27,9	38,1	

PAPPA.

Относится к группе металлопротеиназ. Матриксные металлопротеиназы – это семейство внеклеточных цинк – зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса. Играют роль в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференцировке клеток, апоптозе, сдерживании роста опухолей. Основное отличие матриксных металлопротеиназ от эндопептидаз – их зависимость от ионов металлов, способность разрушать структуры внеклеточного матрикса.

В тканях PAPPA отвечает за межклеточное взаимодействие. Установлено, что экспрессия металлопротеиназ 2 и 9 играет важную роль в процессе метастазирования плоскоклеточного рака легкого, раке шейки матки, опухолях молочной железы, переходно-клеточном раке мочевого пузыря.

В нашей работе оценена роль экспрессии PAPPA при МНИРМП и в условно «здоровом» мочевом пузыре. Данные по медианам, средним значениям и квартилям представлены в таблице 85.

Таблица 85.

Данные характеристик PAPPA в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	529,1	82	0	5595,3	0	27,9	494,6	0	3104,2
2	1078,4	81	0	8192,0	0	0	1305,2	0	5996,9
3	1237,7	70	0	11190,6	0	494,6	1493,2	0	5995,3
Всего		233							

Группы сложно сравнить по медианам, тк. во 2 группе она равна 0. Далее анализ проводился у пациентов с наличием экспрессии белка PAPPA (таблица 86).

Достоверных различий по уровню экспрессии белка PAPPA между группами не получено. Проанализируем данные по средним значениям, медианам, квартилям показателя у пациентов с экспрессией белка (таблица 87).

Таблица 86.

Данные экспрессии PAPPA в исследуемых группах.

Группы	PAPPA		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	28 (34%)	54 (66%)	82
2	45 (56%)	36 (44%)	81
3	24 (34%)	46 (66%)	70
Всего	97	136	233

*- $p > 0,005$

Таблица 87.

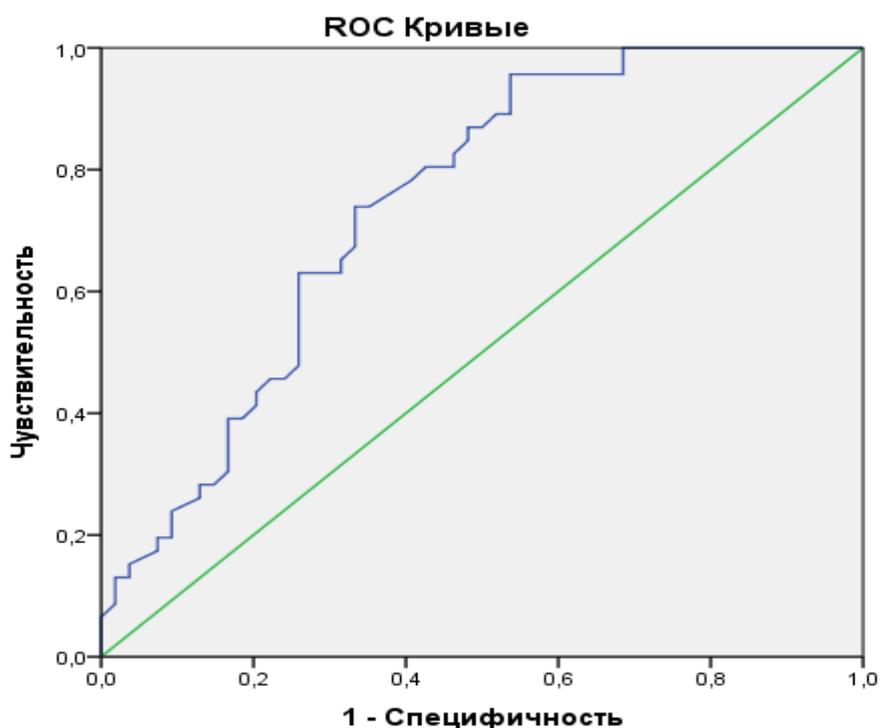
Данные экспрессии PAPPA в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	803,5	54	1,4	5595,4	27,9	235,1*	1176,3	4,6	3326,9
2	2426,5	367	1,0	8192,0	737Ю7	1525,7	3770,2	23,4	7131,6
3	1883,4	46	55.7	11190,6	494,6	1116,8	2352,5	163,1	5792,6
Всего		136							

*- $p < 0,0003$

Из таблицы видно, что в 1 группе отмечено достоверное снижение медианы -235.1 по сравнению со 2 и 3 группами – 1525,7 и 1116,8, соответственно ($p < 0,0003$).

Оценка информативности экспрессии белка PAPPA произведена при помощи построения ROC-кривых (рисунок 19).



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Ри. 19 ROC-кривая при экспрессии PAPPA.

Площадь под кривой равна $0,74 \pm 0,05$. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности, разделяющее группы контроля от групп больных МНИРМП составило 630 о.е. Так чувствительность данного порога – 67%, специфичность во 2 группе – 81%, в 3 группе – 67%, полученная диагностическая ценность – 72%. Расчеты показателей чувствительности и специфичности представлены в таблице 88.

Таблица 88.

Данные чувствительности и специфичности показателя PAPPA в исследуемых группах.

Группы	PAPPA		Всего
	≥ 630	< 630	
1	18 (33%)	36 (67%)	54
2	29 (81%)	7 (19%)	36
3	31 (67%)	15 (33%)	46
Всего	78	58	136

*- $p=0,0001$

Из таблицы видно, что при уровне белка PAPPA от 0 до 630 о.е. в 1 группе выявлено достоверно большее количество случаев экспрессии – 67% против 19% и 33% во 2 и 3 группах, соответственно ($p=0,0001$), что указывает на определенную диагностическую ценность показателя. Однако белок нельзя считать геном-маркером МНИРМП.

При наличии экспрессии белка отмечено достоверное снижение медианы показателя при размере опухолевого узла ≥ 3 см, она составила 62,6 о.е. по сравнению с 423,5 о.е. при опухолевом узле <3 см, при оценке зависимости показателя от других клинических и анамнестических факторов достоверных различий не получено (таблица 89).

Таблица 89.

Зависимость экспрессии PAPPA от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	PAPPA				<i>p</i>
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	33	27,9	222,9	955,4	P=0,71
Нет	21	38,1	430,6	1398,8	
Всего	54	27,9	235,1	1176,3	
Размер опухоли					
<3 см	42	45,3	423,2	1351,2	P=0,03
≥ 3 см	12	10,8	62,7	394,3	
Всего	54	27,9	235,1	1176,3	
Курение в анамнезе					
Есть	29	42,2	200,9	652,6	P=0,49
Нет	25	26,9	294,1	1845,8	
Всего	54	27,9	235,1	1176,3	

3.3 Гены, не имеющие диагностической ценности при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря.

SCUBE2.

Белок SCUBE2 повсеместно идентифицируется в эндотелии сосудов. Предполагается, что ген участвует в сигнальном пути hedgehog (HR) [P. Jakobs, 2017]. Считается, что SCUBE2 участвует в качестве важного модулятора в передаче сигналов между клетками [P. Jakobs, 2014]. Сообщается об экспрессии SCUBE2 в эпителии протоков молочных желез, у пациентов с инвазивным протоковым раком молочной железы выявлена взаимосвязь между экспрессией мРНК гена SCUBE2 и выживаемостью без прогрессирования. Однако на сегодняшний день информации об участии гена SCUBE2 в развитии других солидных опухолей недостаточно.

В нашем исследовании была изучена экспрессия мРНК гена SCUBE2 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря (таблица 90).

Таблица 90.

Данные характеристик SCUBE2 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	865,3	82	0	11585,2	0	215,3*	630,3	0	5042,8
2	801,5	81	0	11585,2	0	45,3	608,9	0	4390,0
3	1593,9	70	0	13307,9	0	514,8*	1910,9	0	7383,0
Всего		233							

*- $p_{1-3}=0,01$; $p_{2-3}=0,01$

Достоверные различия по медиане получены между 1 группой – 215,3 и 3 группой – 514,8 ($p=0,01$) и 2 и 3 группами – 45,3 и 514,8, соответственно

($p=0,01$). В таблице 91 представлено распределение образцов тканей в зависимости от экспрессии мРНК гена SCUBE2.

Таблица 91.

Данные экспрессии SCUBE2 в исследуемых группах.

Группы	SCUBE2		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	23 (28,1%)	59 (71,9%)	82
2	39 (48,2%)*	42 (51,8%)	81
3	23 (32,9%)	47 (67,1%)	70
Всего	85	148	233

*- $p=0,002$

Нами выявлено, что во 2 группе достоверно больше пациентов без экспрессии мРНК гена SCUBE2 в образцах тканей – 48,2% против 28,1% и 32,9% в 1 и 2 группах, соответственно ($p=0,02$).

Мы проанализировали данные пациентов с наличием экспрессии белка SCUBE2 (таблица 92).

Таблица 92.

Данные экспрессии SCUBE2 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	1202,7	59	1,0	11585,2	174,9	388,0*	989,1	14,9	8192,0
2	1545,8	42	5,7	11585,2	215,3	588,5	2048,0	57,7	4705,1
3	2373,9	47	38,1	13307,9	461,2	1176,3*	3104,2	174,9	9410,1
Всего		148							

*- $p=0,0005$

Получены достоверные различия по медиане показателя, в 1 группе она составила 388 о.е., в 3 группе – 1176,3 о.е. ($p=0,0005$), достоверных различий со 2 группой не выявлено. На рисунке 20 представлена ROC-кривая белка SCUBE2.

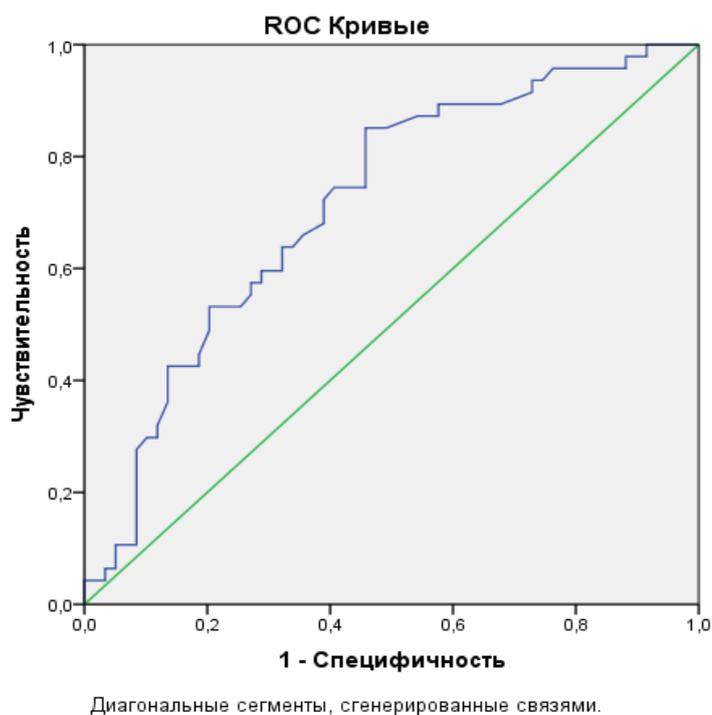


Рис. 20 ROC-кривая при экспрессии SCUBE2.

Площадь под кривой составила $0,72 \pm 0,05$. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности находится в районе 650.

Данные по чувствительности и специфичности представлены в таблице 93.

Таблица 93.

Данные чувствительности и специфичности показателя SCUBE2 в исследуемых группах.

Группы	PAPPA		Всего
	≥ 650	< 650	
1	20 (33,9%)	39 (66,21%)*	59
2	20 (47,6%)	22 (52,4%)	42
3	30 (63,8%)*	17 (36,2%)	47
Всего	70	78	148

*- $p < 0,05$

Чувствительность показателя составила 66,1%, специфичность во 2 группе – 47,6%, в 3 группе – 63,8%. Полученные различия недостоверны. Белок нельзя считать геном-маркером, также он не обладает диагностической ценностью.

При оценке зависимости показателя от клинических и анамнестических факторов достоверных различий не получено (таблица 94).

Таблица 94.

Зависимость экспрессии SCUBE2 от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	SCUBE2				<i>p</i>
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	36	156,0	368,9	1138,9	P=0,9
Нет	23	181,0	494,6	724,1	
Всего	59	174,6	388,0	989,1	
Размер опухоли					
<3см	46	215,3	394,9	891,4	P=0,9
≥3см	13	128,0	388,0	989,1	
Всего	59	174,9	388,0	989,1	
Степень дифференцировки опухоли					
G1	33	215,3	388,0	803,4	P=0,7
G2	2	415,9	415,9	415,9	
G3	24	130,3	328,9	1440,2	
Всего	59	174,9	388,0	891,4	
Курение в анамнезе					
Есть	34	152,2	368,9	891,4	P=0,49
Нет	25	222,9	494,6	989,1	
Всего	59	174,9	388,0	989,1	

TNF- α .

Фактор некроза опухоли – α (раннее известный, как кахектин) был отмечен как феномен в момент его открытия и до сих пор сохраняет свои позиции в качестве одной из наиболее интенсивно исследуемых молекул. На сегодняшний день установлено, что TNF- α , являясь ключевым цитокином иммунной системы, в норме выполняет гомеостатическую функцию и регулирует множество биологических процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, апоптоз различных клеток и т.д. Имеет избирательную способность тормозить рост и вызывать лизис злокачественных клеток, геморрагический некроз опухолей, активировать иммунный противоопухолевый ответ, оказывая повреждающее действие на сосуды [Carswell E.A. , 1975, Elinav E, 2013, Hu. X 2017].

Мы оценили роль фактора роста опухоли – α при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря. В таблице 95 приведены данные по медианам, средним значениям, квартилям показателя.

Таблица 95.

Данные характеристик TNF- α в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	95,1*	82	0	699,4	23,4	60,0	132,5*	0	284,0
2	176,5	81	0	861,1	78,8	119,4	238,9*	0	461,4
3	133,1	70	0	445,7	48,5	89,0	215,3*	0	374,8
Всего		233							

*- $p_{1-2}=0,004$; $p_{1-3}=0,004$.

Выявлено, что медиана белка TNF- α достоверно меньше в группе 1 – 132,5 о.е при сравнении со 2 и 3 группами – 238,9 и 215,3, соответственно ($p=0,004$). Аналогичная ситуация наблюдается и со средним значением

показателя. Далее приведены данные по распределению образцов тканей в зависимости от экспрессии белка в исследуемых группах (таблица 96).

Таблица 96.

Данные экспрессии TNF- α в исследуемых группах.

Группы	TNF- α		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	5 (6%)	77 (94%)	82
2	10 (12%)	71 (88%)	81
3	10 (14%)	60 (86%)	70
Всего	25	208	233

*- $p > 0,005$

Из таблицы видно, что группы сравнимы по наличию экспрессии белка TNF- α , достоверных различий не выявлено.

Проанализированы данные по средним значениям, медианам, квартилям показателя у пациентов с экспрессией белка (таблица 97).

Таблица 97.

Данные экспрессии TNF- α в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	101,2*	77	1,0	699,4	27,9	68,6	132,5	2,2	304,4
2	191,0	71	19,7	861,1	90,5	142,0	256,0	42,2	461,4
3	155,3	60	2,4	445,7	60,8	111,4	111,4	27,3	381,4
Всего		208							

*- $p < 0,0001$

Нами получено достоверное снижение медианы в 1 группе по сравнению с 2 и 3 группами – 68,6 о.е. против 142,0 и 111,4, соответственно ($p < 0,001$), и среднего значения показателя – 101,2, 191,0 и 155,3, соответственно ($p < 0,001$).

Для оценки информативности экспрессии TNF- α выполнено построение ROC-кривой (рисунок 21). Площадь под кривой равна $0,71 \pm 0,04$. Наилучшее соотношение чувствительность и специфичности составляет 95 о.е. Чувствительность данного порога составила – 65%, специфичность – во 2 группе – 72%, в 3 – 57%.

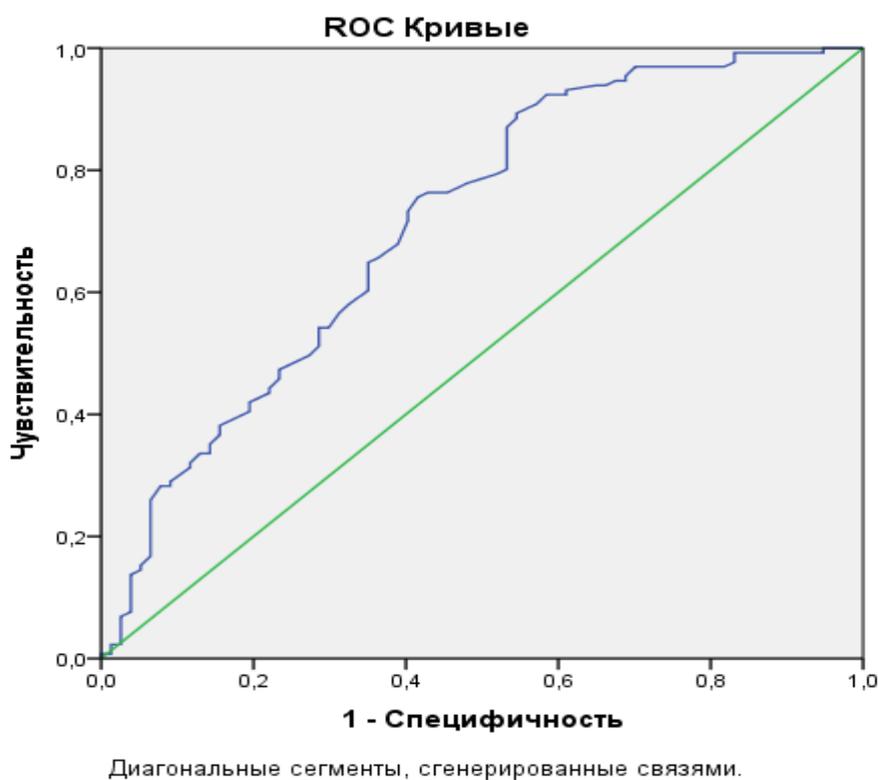


Рис. 21 ROC-кривая при экспрессии TNF- α .

Данные по показателям чувствительности и специфичности представлены в таблице 98.

Таблица 98.

Данные чувствительности и специфичности показателя TNF- α в исследуемых группах.

Группы	TNF- α		Всего
	≥ 95	< 95	
1	27 (35%)	50 (65%)	71
2	57 (72%)	20 (28%)	71
3	34 (57%)	26 (43%)	60
Всего	112	96	208

*- $p=0,05$

Из таблицы видно, что экспрессия белка обладает определенной диагностической ценностью, по порогу 85 отделяется 2/3 пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря и 2/3 пациентов в контрольных группах. Однако с учетом полученной информативности, экспрессию TNF- α нельзя считать геном-маркером при МНИРМП. Диагностическая ценность минимальна.

Оценена зависимость белка от клинических и анамнестических данных (таблица 97). Достоверных различий не получено. Выявлена тенденция к уменьшению медианы показателя при наличии курения в анамнезе ($p=0,07$).

Таблица 99.

Зависимость экспрессии TNF- α от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	TNF- α				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	48	25,5	76,1	76,1	P=0,33
Нет	28	28,9	40,8	40,8	
Всего	76	26,9	68,6	68,6	
Размер опухоли					
<3см	53	29,9	71,0	157,6	P=0,13
\geq 3см	23	8,3	48,5	90,5	
Всего	76	26,9	68,6	132,5	
Степень дифференцировки опухоли					
G1	40	24,7	51,2	121,9	P=0,33
G2	2	78,8	158,8	238,9	
G3	34	30,9	76,1	132,5	
Всего	76	27,9	68,6	132,5	
Курение в анамнезе					
Есть	42	25,1	43,7	90,5	P=0,07
Нет	34	32,0	104,0	168,9	
Всего	76	26,9	68,6	132,5	

VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189.

Сосудистый эндотелиальный фактор роста – гетеродимерный гликопротеиновый фактор, существующий, по крайней мере в 5 изоформах, имеющих сходную биологическую активность., но существенно различающихся по биодоступности.

В ряде случаев показано, что повышенная экспрессия VEGF коррелирует с неблагоприятным прогнозом и высокой вероятностью рецидивов. VEGF-A, также называют VEGF первоначально был охарактеризован как фактор сосудистой проницаемости, но впоследствии была открыта его митогенная активность по отношению к эндотелиоцитам. Альтернативный сплайсинг гена VEGF человека приводит к образованию 6 изоформ: 121, 145, 165, 183, 189 и 206 аминокислотных остатков.

Повышенная экспрессия VEGF опухолевыми клетками может играть важную роль в патогенезе злокачественных образований, поскольку кровоснабжение является одним из определяющих факторов роста опухоли. VEGF запускает неопластический ангиогенез, в результате возрастает плотность микрососудов и малигнизированная ткань получает больше питательных веществ.

Продемонстрировано, что VEGF играет важную роль в поддержке жизнеспособности вновь образованных неопластических сосудов, особенно при дефиците перicyтов, тогда как низкий уровень экспрессии VEGF приводит к апоптозу эндотелиальных клеток [Abramsson A, 2002, Behjamine L.E, 1997].

В присутствии VEGF неопластическая сосудистая сеть продолжает существовать за счет усиления экспрессии антиапоптотических белков Bcl2, XIAP, Bcl-A1, сурвивина [Ferara N, 1999, Gerber HP. 1998].

Таким образом, в течение всего времени развития опухоли интенсивность образования новых сосудов зависит от уровня синтеза VEGF [Gerber H.P., 1998]. Многие опухоли не только VEGF – позитивны, но и экспрессируют VEGFR рецепторы, в этом случае VEGF действуют непосредственно на опухолевые клетки, как аутокринный фактор. Положительная корреляция между уровнем экспрессии VEGF в первичной опухоли и вероятностью рецидивов показана в исследованиях различных видов злокачественных опухолей: рака молочной железы, колоректального рака, гепатоцеллюлярного рака, немелкоклеточного рака легкого, раке яичников.

Повышение экспрессии VEGF увеличивает резистентность опухоли к химиотерапии [Pegram M.D., 2002]. Следовательно, уровень VEGF может служить важным и достоверным маркером как в предсказании эффективности химиотерапии и лучевой терапии, так и в оценке риска повторных рецидивов при различных новообразованиях [Poon RT, 2001, Toi M, 2002].

Мы проанализировали уровень экспрессии 3-х изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) - VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189 в тканях мочевого пузыря и при МНИРМП. Данные по медианам, средним значениям и квартилям представлены в таблице 100.

Нами выявлена достоверно большая медиана VEGFA121 в 1 группе – 13,7 по сравнению со 2 и 3 группами – 8,0 и 7,5 о.е., соответственно ($p=0,002$) и достоверно большее среднее значение показателя в той группе – 25,0 [95% CI 3,5 – 93,7] ($p=0,002$).

Аналогичная тенденция при сравнении медианы VEGFA165 – 20,0; 12,1 и 11,3, соответственно ($p=0,001$). Медиана VEGFA189 достоверно больше в 1 группе – 45,3 при сравнении со 2 группой – 3,2 ($p=0,001$), различия с 3 группой – 38,1 о.е., статистически, недостоверны ($p=0,2$).

Уровень экспрессии VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
VEGFA121									
1	25,0*	82	0	157,6	7,7	13,7*	28,8	0	93,7
2	10Ю8	81	0	50,2	4,8	8,0	12,6	0	34,3
3	11,6	70	0	157,6	4,4	7,5	10,2	0	36,9
Всего		233				*_ p=0,002			
VEGFA165									
1	38,1	82	0	315,2	8,9	20,0*	42,2	1,2	181,0
2	48,2	81	0	2435,5	4,8	12,1	19,0	0	87,4
3	15,2	70	0	128,0	5,5	11,3	19,0	0	42,2
Всего		233				*_ P=0,001			
VEGFA189									
1	125,1	82	0	2048,9	0	45,3*	128,0	0	530,1
2	39,3	81	0	512,0	0	3,2	5,7	0	174,9
3	53,0	70	0	512,0	0	38,1	71,0	0	174Ю9
Всего		233				*_=0,001			

Данные по наличию экспрессии в тканях, рассматриваемых изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста представлены в таблице 101. Достоверных различий по уровню экспрессии VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189 в опухолевых и неопухолевых тканях мочевого пузыря при МНИРМП не получено ($p > 0,05$).

Таблица 101

Данные экспрессии VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189 в исследуемых группах.

Группы	VEGFA121		Всего
	Нет экспрессии	Есть экспрессия	
1	2 (4,4%)	80 (97,6%)	82
2	5 (6,2%)	76 (93,8%)	81
3	5 (7,1%)	65 (92,9%)	70
Всего	12	221	233
	VEGFA165		
1	4 (4,9%)	78 (95,1%)	82
2	6 (7,4%)	75 (92,6%)	81
3	8 (1,4%)	62 (88,6%)	70
Всего	18	215	233
	VEGFA189		
1	26 (31,7%)	56 (68,3%)	82
2	40 (49,4%)	41 (50,5%)	81
3	21 (30%)	49 (70%)	70
Всего	87	146	233

Далее представлен анализ показателей в подгруппе с наличием экспрессии 3-х изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста (таблица 102).

Здесь также получены достоверные различия по медиане всех трех изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста ($p=0,004$).

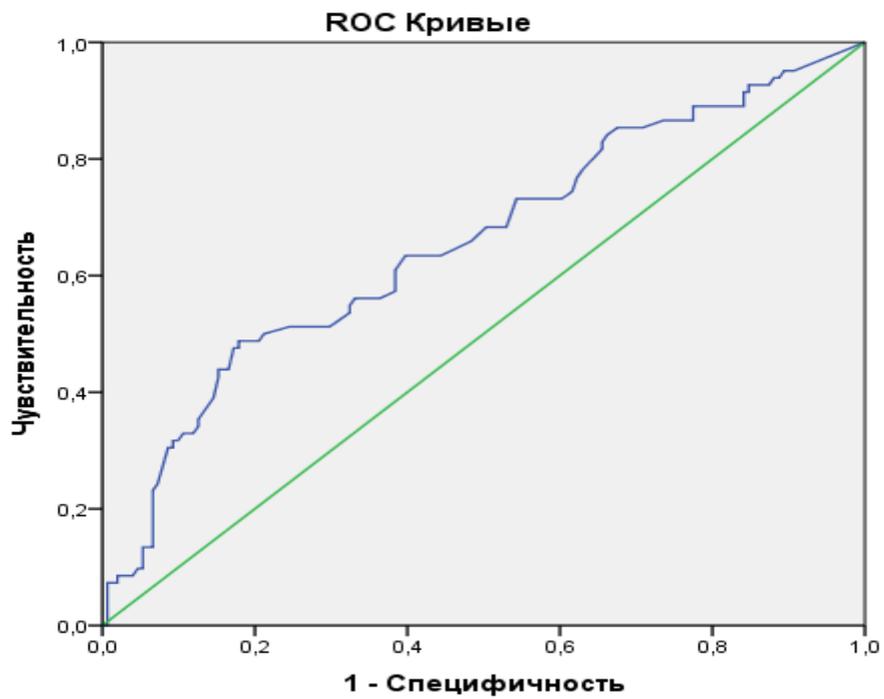
Данные экспрессии 3-х изоформ VEGF в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
VEGFA121									
1	27,5	80	1,3	157,7	8,1	14,2*	29,1	4,1	93,7
2	12,1	76	1,2	50,1	5,1	8,2	12,8	2,2	35,2
3	13,2	65	1,0	156,6	7,7	7,8	11,1	3,4	36,8
Всего		221							
VEGFA165									
1	40,0	78	1,2	315,2	10,9	23,4*	45,3	3,0	181,0
2	52,0	75	1,0	2435,5	5,5	12,6	19,7	2,2	89,0
3	17,1	62	1,2	128,0	8,3	12,6	19,7	3,5	42,2
Всего		215							
VEGFA189									
1	183,1	56	3,6	2048,0	43,7	92,1*	194,0	27,9	891,4
2	77,6	41	3,2	512,0	32,0	55,7	78,8	13,0	284,0
3	75,7	49	1,0	512,0	35,6	55,7	84,4	13,0	401,7
Всего		146							

*- p=0,004

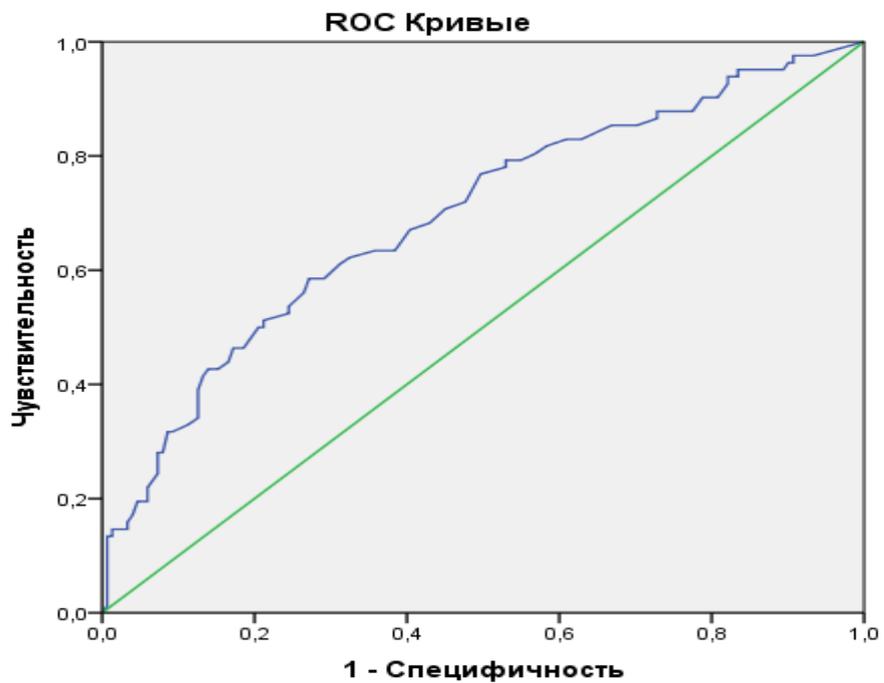
На рисунке 22 представлена ROC-кривая для VEGFA121, рисунке 23 – для VEGFA165, на рисунке 24 – для VEGFA189. Площадь под кривой составила $0,7 \pm 0,04$, $0,7 \pm 0,04$ и $0,7 \pm 0,05$, соответственно.

Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности для показателя VEGFA121 равно 9, для показателя VEGFA165 – 13, для показателя VEGFA189 – 63. Чувствительность VEGFA121 составила 63,4%, специфичность во 2 группе – 58%, в 3 группе = 65,7%, для показателя VEGFA165 – 63,4%, 59,3% и 61,4%, соответственно, для показателя VEGFA189 – 62,5%, 68,3% и 59,2%, соответственно.



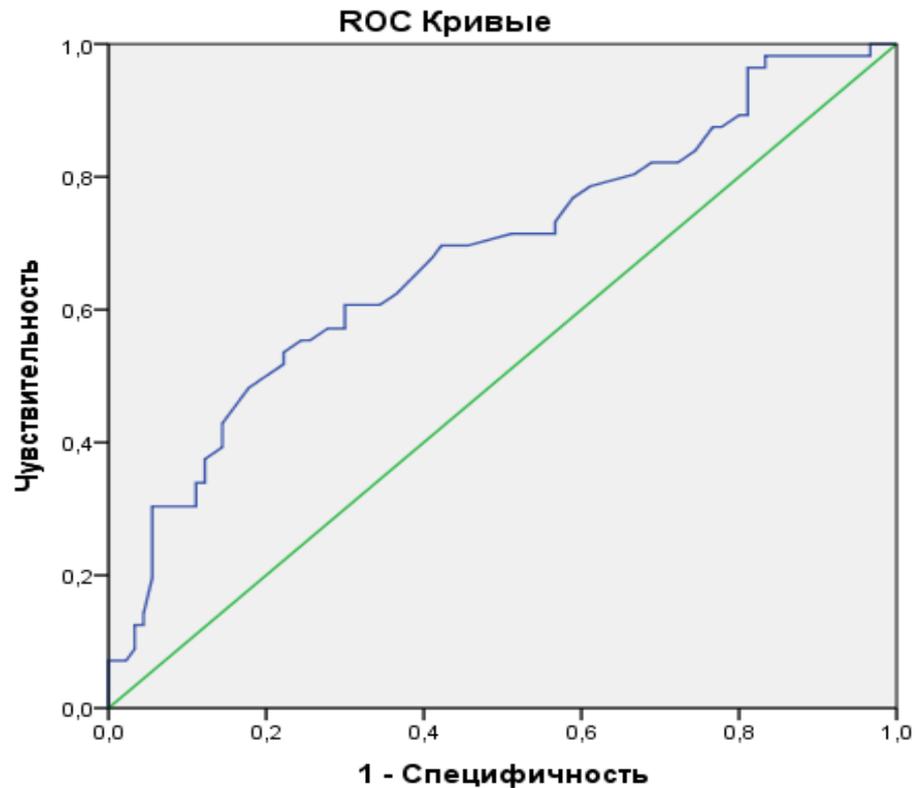
Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 22 ROC-кривая при экспрессии VEGFA121



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 23 ROC-кривая при экспрессии VEGFA165.



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 24 ROC-кривая при экспрессии VEGFA189.

Таким образом, полученные значения чувствительности и специфичности не обладают приемлемой для медицинских исследований информативностью, следовательно, рассмотренные изоформы сосудистого эндотелиального фактора роста нельзя считать генами-маркерами, а также они не обладают диагностической ценностью при МНИРМП.

Оценка зависимости рассматриваемых изоформ эндотелиального сосудистого фактора роста VEGF от клинических и анамнестических данных представлена в таблице 103.

Отмечено, что медиана показателей VEGFA165 и VEGFA189 достоверно увеличивается при размере опухоли ≥ 3 см ($p=0,05$), во всех остальных случаях – различия статистически незначимые.

Таблица 103.

Зависимость экспрессии VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189 от клинических и анамнестических факторов в исследуемых группах.

Гематурия	Медиана		
	VEGGFA121	VEGFA165	VEGFA189
Есть	16,0	24,3	43,7
Нет	11,5	12,1	39,4
p	0,5	0,3	0,3
Степень дифференцировки опухоли			
G1	8,7	26,4	100,4
G2	7,7	11,4	-
G3	6,5	15,2	64,0
p	0,2	0,3	0,3
Размер опухоли			
< 3см	11,7	16,0	85,9
≤ 3см	20,4	25,6	114,2
p	0,14	0,05	0,05
Курение в анамнезе			
Есть	12,1	17,1	82,0
Нет	15,2	20,0	104,0
p	0,5	0,8	0,7

IL-1b, IL-8, IL-10, IL-28a.

Интерлейкин-1b, как и другие интерлейкины относится к цитокинам. Он представляет собой провоспалительный цитокин, играющий важную роль в патогенезе рака. Полиморфизм – 3ГТ/С гена интерлейкина 1b (IL-1b) связан с риском развития рака из-за его влияния на транскрипцию IL-1b.

Интерлейкин 8 (IL-8) представляет собой хемокин с определяющим аминокислотным мотивом СЧС, также известен как обладающий онкогенными и проонкогенными свойствами. На сегодняшний день имеются данные о том, что IL-8 может способствовать росту опухоли путем активации процессов онкогенеза. Более высокие уровни интерлейкина 8 присутствуют у пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря при сравнении с данными, полученными у больных с МНИРМП с чувствительностью и специфичностью анализа 71%. Однако низкая чувствительность анализа (62%) предполагает, что IL-8 в моче не является хорошим маркером для ранней диагностики рака мочевого пузыря, но может служить предиктором прогноза [Nikmet, 2004].

Злокачественные опухоли человека характеризуются дефицитом антигенспецифического иммунитета и внутриопухолевых CD8⁺ Т-клеток. С другой стороны, воспалительные макрофаги и медиаторы хронического воспаления широко распространены у пациентов с поздней стадией рака. Дефицит внутриопухолевых Т-клеток и хроническое воспаление были независимо связаны с неблагоприятным прогнозом у пациентов с раком. Противовоспалительный цитокин IL-10 Из таблицы видно, что имеет место тенденция к более частому выявлению подавляет макрофагальные и провоспалительные ответы Т-клеток Th 17 путем ингибирования воспалительных цитокинов IL-6 и IL-12/23. Провоспалительная роль IL-10 способствовала предположению, что IL-10 подрывает противоопухолевый иммунитет. Гиперэкспрессия IL-10 в модели рака человека или лечение пролонгированным IL-10 приводили к отторжению опухоли и длительному противоопухолевому иммунитету. IL-10 стимулирует цитотоксичность CD8⁺ Т-клеток и экспрессию IFN- γ в CD8⁺ Т-клеток. Индуцированное IL-10 отторжение опухоли зависит от экспрессии IFN- γ и гранзимов в резидентных в опухоли CD8⁺ Т-клетках.

Интерлейкин 28 представлен в двух изоформах IL-28a и IL-28b и играет роль в иммунной защите против вирусов, в адаптивном иммунном ответе.

Нами изучена экспрессия вышеуказанных интерлейкинов (IL-1b, IL-8, IL-10, IL-28a) при МНИРМП. Распределение образцов тканей в зависимости от уровня экспрессии показателей представлено в таблице 104.

Таблица 104.

Данные экспрессии IL-1b, IL-8, IL-10, IL-28a в исследуемых группах.

Группы	Нет экспрессии	Есть экспрессия	Всего
IL-1b			
1	24 (29,3%)	58 (70,7%)	82
2	42 (51,9%)	39 (48,2%)	81
3	22 (31,4%)	48 (68,6%)	70
Всего	88	145	233
IL-8			
1	6 (7,3%)	76 (92,7%)	82
2	12 (14,8%)	69 (85,2%)	81
3	12 (17,1%)	58 (82,9%)	70
Всего	30	203	233
IL-10			
1	11 (13,4%)	71 (86,6%)	82
2	22 (27,2%)	59 (72,9%)	81
3	28 (40%)	42 (60%)	70
Всего	61	172	233
IL-28a			
1	28 (34,2%)	54 (65,9%)	82
2	50 (61,7%)	31 (38,3%)	81
3	34 (48,6%)	36 (51,4%)	70
Всего	112	121	233

Из таблицы видно, что имеет место тенденция к более частому выявлению интерлейкина 1b в 1 группе, различия недостоверные ($p>0,05$), экспрессия IL-8 сравнима в трех группах – 92,7%, 85,2% и 82,9%, соответственно, ($p>0,05$). Экспрессия IL-10 достоверно чаще выявляется в 1 группе – 86,6% ($p=0,007$) и IL-28a – также в 1 группе – 65,9% ($p=0,001$). В таблице 105 представлены медианы, квартили и средние значения при экспрессии IL-1b, IL-8, IL-10, IL-28a.

Таблица 105.

Данные экспрессии IL-1b, IL-8, IL-10, IL-28a в исследуемых группах

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
IL-1b									
1	745,8	58	1,0	6888,6	93,7	211,6	699,4	7,7	4544,7
2	1302,1	39	23,4	9089,6	115,4	256,0	1448,2	51,9	7643,1
3	528,4	48	5,5	4389,9	102,3	216,4	521,7	26,9	2702,3
Всего		145							
IL-8									
1	10688,9	76	18,4	397336	212,4	927,9	4250,6	27,9	33923
2	6630,4	69	5,1	83529,6	76,1	430,5	4705,1	11,7	30573
3	1312,9	58	5,3	10441,2	76,1	344,2	1217,7	9,5	6888
Всего		203							
IL-10									
1	438,3	71	1,0	20571,0	22,6	59,7	187,4	4,3	861,1
2	239,3	59	1,9	2272,4	42,2	107,6	304,4	11,7	1024,0
3	183,7	42	8,9	1552,1	33,1	72,3	200,9	9,5	530,0
Всего		172							
IL-28a									
1	337,6	54	1,0	2048,0	36,8	137,5	548,7	3,4	1260,6
2	289,1	31	2,4	102,4	123,7	247,3	415,8	26,0	675,5
3	354,0	36	14,4	3444,3	69,8	238,9	381,8	14,9	1351,2
Всего		121							

Таким образом, мы выявили, что при экспрессии IL-1b показатели медианы сравнимы в 3-х группах ($p=0,3$), по уровню средних значений выделяется 2 группа – 1302,1 (при сравнении с 1 группой – 745,8 и 3 группой – 528,3), различия также недостоверные ($p=0,3$). Следовательно, данный показатель не обладает информативностью при МНИРМП.

По данным экспрессии IL-8 достоверные различия по медиане получены между 1 и 3 группами: 927,9 и 344,2, соответственно ($p=0,001$). Однако, из-за широких пределов изменения белка от 5,1 до 397336,0 показатель оказался неинформативен.

При экспрессии IL-10 выявлено, что медиана 1 группы равна – 59,7 о.е., и она сравнима с медианой 3 группы – 72,3, имеет место тенденция к увеличению медианы 2 группы – 107,6 ($p=0,8$), однако здесь также наблюдаются широкие пределы разброса значений, что по результатам нашей работы делает показатель IL-10 неинформативным, как в плане диагностики, так и в плане прогноза заболевания.

Для IL-28a также получены сравнимые медианы в 3-х группах – 137,5, 247,3, 238,9, соответственно ($p=0,8$), что также указывает на неинформативность показателя при МНИРМП.

При рассмотрении зависимости интерлейкинов 1b, 8, 10 и 28a от клинических и анамнестических данных различия недостоверные.

MMP2, MMP7, MMP11.

Микроокружение опухоли состоит из множества биологически значимых элементов. Одним из наиболее важных его компонентов является внеклеточный матрикс. Наиболее важными веществами, участвующими в регуляции процессов внеклеточного матрикса, являются матриксные металлопротеиназы (MMP) и их эндогенные ингибиторы. Нарушение физиологического баланса между активацией и дезактивацией MMP может

привести к прогрессированию различных заболеваний в том числе злокачественных опухолей. Дисбаланс MMP и тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP) может привести к стимуляции процессов инвазии опухоли. Многочисленные исследования выявили повышенную экспрессию MMP2 и MMP7 при раке толстой кишки, яичников, молочной железы, мочевого пузыря, легких.

Было отмечено, что экскреция MMP2 с мочой связана с высокой степенью и высокой стадией заболевания при раке мочевого пузыря. Повышенные уровни MMP2 в моче в основном наблюдали у больных с инвазивными опухолями. Также было отмечено, что при раке мочевого пузыря в опухолевых образцах выявлено увеличение экспрессии MMP2 [Davies B, Jonathan W, 1993; Kanajama H, Yokota K, 1998].

Повышенная экспрессия MMP7 также по некоторым данным может выявляться при раке мочевого пузыря [Szarvas T, 2010]. Szarvas et al были проанализированы образцы опухоли при раке мочевого пузыря. Исследование показало гиперэкспрессию MMP7 в образцах ткани метастатического рака мочевого пузыря, тогда как в случаях локализованного заболевания экспрессия была нормальной.

MMP11, как отмечается, может оказывать двойное действие на опухоль. С одной стороны, MMP11 способствует развитию рака, ингибируя апоптоз, а также усиливая процессы инвазии опухолевых клеток, с другой стороны может подавлять процессы метастазирования.

В настоящее время по некоторым данным отмечено, что MMP11 может работать в качестве значимого опухолевого биомаркера для раннего выявления рака, определения стадии опухоли, прогностического анализа, мониторинга рецидива во время последующего наблюдения, а также может являться потенциальной мишенью при иммунотерапии [121].

Таким образом, нами проанализированы данные по медианам, средним значениям, квартилям показателей MMP2, MMP7 и MMP11 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря и в тканях условно «здорового» мочевого пузыря (таблица 106).

Таблица 106.

Характеристика экспрессии MMP2, MMP7 и MMP11 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
MMP2									
1	434,8	82	0	4705,1	66,3	154,9	374,8	1,0	1663,5
2	446,8	81	0	3444,3	90,5	200,8	512,0	0	1723,2
3	463,1	70	0	1978,2	59,7	227,1	724,1	0	1448,2
Всего		233				P>0,05			
MMP7									
1	538,5	82	0	7383,0	14,4	72,4	337,8	0	2610,3
2	192,0	81	0	3104,2	5,5	46,9	142,0	0	724,1
3	404,6	70	0	5792,6	16,6	62,9	274,4	0	2896,3
Всего		233				P>0,05			
MMP11									
1	197,8	83	0	3104,2	15,5	56,8	219,3	2	955,4
2	157,1	81	0	3213,7	24,3	73,5	147,0	0	477,7
3	89,8	70	0	1448,2	7,7	38,7	107,6	0	256,0
Всего		234				P>0,05			

Из таблицы видно, что достоверных различий не получено ни по медиане, ни по средним значениям показателей.

Далее представлено распределение образцов тканей в зависимости от наличия экспрессии белков MMP2, MMP7, MMP11 (таблица 107).

Таблица 107.

Распределение экспрессии MMP2, MMP7 и MMP11 в исследуемых группах.

Группы	Нет экспрессии	Есть экспрессия	Всего
MMP2			
1	4 (4,9%)	78 (95,1%)	82
2	9 (11,1%)	72 (88,9%)	81
3	11 (15,7%)	59 (84,3%)	70
Всего	24	209	233
MMP7			
1	5 (6%)	77 (94%)	82
2	17 (21%)	69 (79%)	81
3	11 (16%)	59 (84%)	70
Всего	33	200	233
MMP11			
1	6 (7,2%)	77 (92,8%)	83
2	10 (12,3%)	71 (87,7%)	81
3	12 (17,1%)	58 (82,9%)	70
Всего	28	206	234

Из таблицы видно, что уровень экспрессии MMP2, MMP7 и MMP11 во всех трех группах приблизительно одинаков, достоверных различий не выявлено ($p > 0,05$). Т.е. полученные нами данные указывают на то, что при неинвазивной форме рака мочевого пузыря экспрессия рассматриваемых белков в опухолевой и неопухолевой тканях мочевого пузыря не отличаются, что коррелирует с данными опубликованных исследований [Szarvas, 2010] по экспрессии MMP7 и впервые выявлено по экспрессии MMP2 и MMP11.

При анализе показателей от клинических и анамнестических данных достоверное снижение медианы MMP2 получено при опухолях со степенью дифференцировки G3 ($p = 0,02$), все остальные различия не достоверные.

CD68, CD69.

Как уже отмечалось выше решающую роль в развитии рака может играть микроокружение опухоли, которое образуется в результате взаимодействия и образования перекрестных связей между опухолевой клеткой и разными типами окружающих клеток, такие как инфильтрирующие иммунные, ангиогенные сосудистые, эндотелиальные и стромальные клетки [Airoid I, Bertaina A, 2015]. Изменения, происходящие в опухолевом микроокружении с клетками иммунной системы под влиянием опухоли, формируют иммунный профиль, характерный для данной конкретной опухоли. Анализ данных по экспрессии мРНК генов и клинических результатов 18000 опухолей человека позволил установить существенные различия в относительном составе лейкоцитов как между различными типами опухолей, так и внутри одного типа.

В опухолевом микроокружении выявляются следующие иммунные клетки: Т-лимфоциты, Тканево-резистентные Е-клетки памяти (T_{rm}). Оказалось, что инфильтрация солидных опухолей T_{rm} является благоприятным прогностическим признаком [Bech TE, Giraldo NA, 2016].

Солидные опухоли, большинство из которых эпителиального происхождения, часто оказываются заметно обогащенными клетками T_{rm} , которые отличаются экспрессией интегрина CD103, а также VLA-1 (CD49a) и CD-69 [Dzenidi FJ, 2015, Ganesan AP, 2017]. Инфильтрация эпителия опухоли T_{rm} коррелирует с более высокой общей выживаемостью больных раком молочной железы [Wang W, 2016], рака легкого [Wang ZQ, Milue K, 2016], а также рака мочевого пузыря [Wang B, Wu S, 2015].

Макрофаги, которые накапливаются в опухолевом микроокружении, связаны с ростом, ангиогенезом и метастазированием при различных видах рака. Они получили название опухолево-ассоциированные макрофаги (ТАМ). Так, при инфильтративно-отечной форме РМЖ было установлено, что в

опухолевом микроокружении TAM характеризуется выраженной экспрессией маркеров CD68 и CD163 [Jhaveri K, Tamlinisky E, 2016].

Мы проанализировали уровень экспрессии CD68 и CD69 в опухолевых тканях при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря и в условно «здоровых» тканях мочевого пузыря. В таблице 108 представлены данные по медианам, средним значениям и квартилям показателей.

Таблица 108.

Данные характеристик показателей в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
CD68									
1	9,0	83	0	59,7	4,1	6,5*	10,6	1,8	19,0
2	7,1	81	0	26,9	4,5	6,6*	9,4	0	13,2
3	8,3	70	0	43,7	4,8	7,0*	9,5	2,5	13,0
Всего		234				P=1,0			
CD69									
1	704,6	83	0	4705,1	0	157,7	861,1	0	3327,0
2	1616,4	81	0	29532,2	0	35,5	989,1	0	6427,3
3	1884,4	70	0	11993,8	0	543,3*	1978,2	0	10441,2
Всего		234				P=0,06			

Из таблицы видно, что медиана маркера CD68 достоверно не отличается во всех трех группах, т.е. можно сделать вывод, что данный показатель неинформативен при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря. При изучении маркера CD69 складывается несколько иная ситуация, так медиана

показателя недостоверно ниже в 1 группе – 157,7 о.е. Медиана во 2 группе – 35,5 при сравнении с медианой 3 группы – 543,4 получены достоверные различия ($p=0,06$).

Далее в таблице 109 представлено распределение образцов тканей в зависимости от уровня экспрессии CD69. Из таблицы видно, что во 2 группе (пациенты, находящиеся под динамическим наблюдением) количество пациентов разделилось приблизительно поровну: 49,4% - без экспрессии и 50,6% с экспрессией CD69. В 1 и 2 группах экспрессия CD69 выявлена в 68,3% и 71,4% случаев, соответственно.

Таблица 109.

Данные экспрессии CD69 в исследуемых группах.

Группы	Нет экспрессии	Есть экспрессия	Всего
1	27 (32,5%)	56 (67,5%)	83
2	40 (49,4%)	41 (50,5%)	81
3	20 (28,6%)	50 (71,4%)	70
Всего	87	147	234

Далее представлен анализ параметров в подгруппе пациентов с экспрессией CD6 (таблица 110). Выявлено, что медиана маркера CD69 достоверно меньше – 558,4 в 1 группе по сравнению со 2 и 3 группами – 989,1 и 1261,4, соответственно ($p=0,09$). Т.е. в нашей работе при МНИРМП большая экспрессия CD69 выявлена в неопухолевых тканях мочевого пузыря. Маркеры CD68 и CD69 оказались по данным нашего исследования неинформативными при неинвазивных опухолях мочевого пузыря.

При анализе показателей CD68 и CD69 от клинических и анамнестических данных различия не достоверны (таблица 111).

Таблица 110.

Данные экспрессии CD69 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	1046,4	56	1,0	4705,1	142,4	558,8*	1635,2	14,9	3956,4
2	3193,4	41	35,5	29532,1	401,7	989,1	4870,9	207,9	9410,1
3	2638,2	50	33,1	41993,8	415,9	1261,4	321,7	119,4	10441,2
Всего		147				P=0,009			

Таблица 111.

Зависимость экспрессии CD68, CD69 от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	Медиана	
	CD68	CD69
Есть	6,5	548,7
Нет	6,4	568,1
p	0,3	0,4
Степень дифференцировки опухоли		
G1	6,5	588,5
G2	5,8	-
G3	6,7	431,9
p	0,3	0,8
Размер опухоли		
< 3см	6,4	568,7
≤ 3см	7,7	568,1
p	0,3	0,8
Курение в анамнезе		
Есть	6,7	388,0
Нет	6,5	52,6
p	0,14	0,7

CCND1.

Ген CCND1, расположенный на хромосомном локусе 11q13 кодирует белок из семейства циклинов – циклин 1, регулирующий СК, который играет важную роль в регуляции клеточного цикла. Амплификация CCND1 наблюдается примерно у 10: пациентов с раком мочевого пузыря. Однако в существующей литературе об амплификации CCND1 и экспрессии Циклин D1 сообщается противоречивая информация об их клиническом значении и связи со стадией заболевания. В исследовании Khaby MN, et al была выявлена корреляция фенотипа циклина D1 с уровнем прогрессирования рака мочевого пузыря. Было выявлено, что отсутствие или низкий уровень экспрессии циклина D1 в новообразованиях мочевого пузыря коррелирует с лимфоваскулярной и мышечной инвазией опухоли. Предварительные данные указывают на то, что циклин D1 может рассматриваться в качестве тканевого биомаркера РМП.

В нашей работе мы определили уровень экспрессии мРНК гена CCND1. Данные по медианам, средним значениям и квартилям представлены в таблице 112.

Таблица 112.

Данные характеристик CCND1 исследуемых групп.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	79,3	83	0	922,9	23,0	46,9*	90,6	4,4	222,9
2	33,4	81	0	142,0	17,8	28,8	39,4	0	84,4
3	41,6	70	0	222,9	19,7	34,9	48,5	10,9	123,6
Всего		234							

*- $p_{1-2}=0,0004$; $p_{1-3}=0,08$

Полученные данные указывают на достоверное различие медиан показателя CCND1 1 и 2-ой групп – 46,9 и 28,8, соответственно ($p=0,0004$), тенденция к большей медиане выявлена в 1 группе при сравнении с 3-ей (34,9о.е.), ($p=0,08$).

С целью определения информативности показателя выполнено построение ROC-кривой (рисунок 25). Площадь под кривой равна $0,64 \pm 0,04$. Из графика видно, что по данным нашей работы информативность гена CCND1 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря низкая.

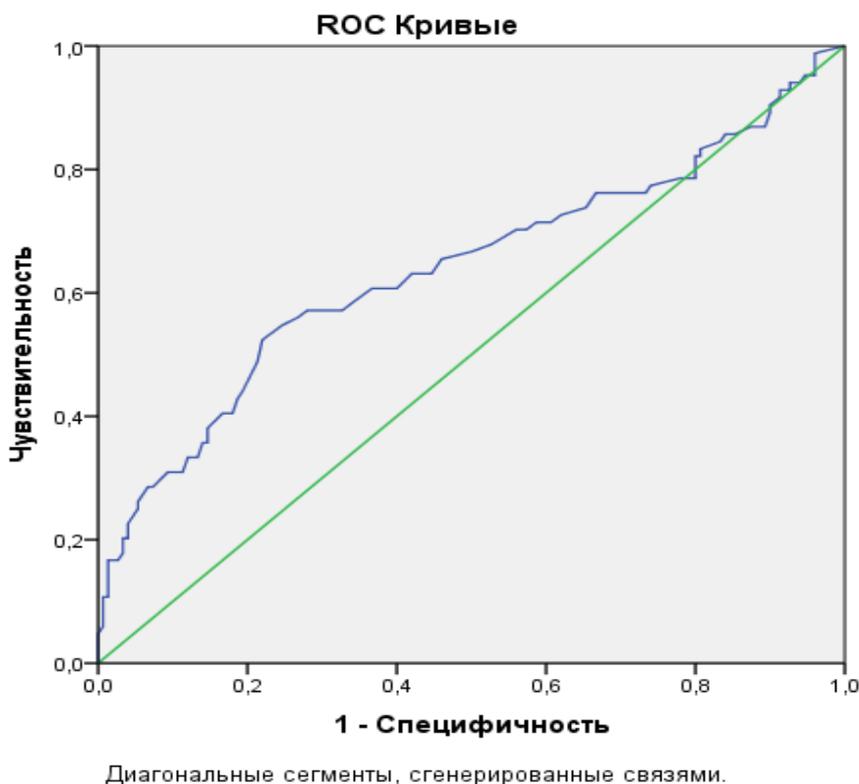


Рис. 25 ROC-кривая при экспрессии CCND1.

Из таблицы 113 видно, что выявлена тенденция к снижению медианы показателя CCND1 при наличии курения в анамнезе ($p=0,08$), отмечено достоверное снижение медианы при степени дифференцировки опухоли G3 ($p=0,02$).

Зависимость экспрессии CCND1 от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	CCND1				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	53	17,8	46,9	84,4	P=0,5
Нет	30	28,8	47,7	93,7	
Всего	83	22,6	46,9	93,7	
Размер опухоли					
<3см	58	24,3	48,5	87,4	P=0,5
≥3см	25	11,7	45,3	104,0	
Всего	83	22,6	46,9	93,7	
Степень дифференцировки опухоли					
G1	45	28,8	59,7	115,4	P=0,02
G2	2	17,8	27,3	36,7	
G3	35	13,0	38,1	57,7	
Всего	82	22,6	46,9	87,5	
Курение в анамнезе					
Есть	46	14,9	38,1	78,8	P=0,08
Нет	37	32,0	57,7	93,7	
Всего	83	22,6	46,9	87,5	

С-МУС.

С-Мус представляет собой протоонкоген, расположенный у человека на 8 хромосоме. Ген с-тус кодирует транскрипционный фактор, который димеризуется МАХ и другими факторами комплекса с-тус-МАХ, связывается и регулирует экспрессию приблизительно 10%-15% генов человека, играя важную роль в дифференцировке, росте, клеточном метаболизме, апоптозе и трансформации клеток. В раковых клетках нарушение регуляции гена с-тус в сочетании с большим количеством генов опухолевой супрессии, таких как

TP53, может привести к неконтролируемому росту клеток. Гиперэкспрессия с-тус характерна для большинства онкологических заболеваний и способствует развитию не менее 40: опухолей [Charalampos F, Fragkoulis, 2021].

В нашем исследовании мы оценили экспрессию с-тус при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря (таблица 114).

Таблица 114.

Данные характеристик с-тус исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	12,1	83	0	147,0	0,5	6,6*	13,9	0	40,8
2	10,0	81	0	200,9	0	2,1	8,9	0	52,0
3	8,4	70	0	71,0	2,5	4,7	9,2	0	40,8
Всего		234							

*- $p_{1-2}=0,006$

Медиана показателя достоверно больше в 1 группе – 6,6 о.е. по сравнению со 2 группой – 2,1 ($p=0,006$), при сравнении с 3 группой различия статистически незначимые. Произведена оценка распределения образцов тканей в зависимости от уровня экспрессии мРНК гена с-тус (таблица 115).

Таблица 115.

Данные экспрессии с-тус в исследуемых группах.

Группы	Нет экспрессии	Есть экспрессия	Всего
1	20 (24,1%)	63 (75,9%)	83
2	38 (46,9%)	43 (53,1%)	81
3	14 (20%)	56 (80%)	70
Всего	72	162	234

Из таблицы видно, что экспрессия мРНК гена с-тус выявлена в 1 группе в 75,9%, во 2-ой – в 53,1%, в 3-ей – в 80% случаев, достоверных различий не получено ($p>0,05$). Из особенностей следует отметить, что во 2 группе количество пациентов с и без экспрессии с-тус сравнимо – 53,1% и 46,9%, соответственно.

Проанализируем подгруппу с экспрессией мРНК гена с-тус (таблица 116). В подгруппах с экспрессией мРНК гена с-тус достоверных различий по медианам не получено: 10,2, 8,0 и 6,1, соответственно ($p=0,06$).

Таблица 116.

Данные экспрессии с-тус в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	16,3	63	1,0	146,0	4,8	10,2	17,8	1,5	50,2
2	18,9	43	1,8	200,9	3,9	8,0	17,1	2,1	61,8
3	10,5	56	1,5	71,0	3,7	6,1	10,9	2,2	52,0
Всего		162							

Это указывает на отсутствие различий по уровню экспрессии мРНК гена с-тус в группе мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря при сравнении с группами контроля. По данным нашей работы информативность показателя низкая.

BAG1.

Ассоциированный с Bcl2 AthanoGene-1 (BAG1) представляет собой многофункциональный белок, способный задерживать гибель клеток за счет

синергичного действия с Bcl2. BAG1 был описан как ген, являющейся частью регуляции путей апоптоза, транскрипции и пролиферации, дифференцировки клеток. Участие BAG1 в различных клеточных функциях частично является результатом субклеточной локализации трех основных изоформ белка: ядерная BAG1L, ядерно-цитозольная BAG1M и цитозольная BAG1. BAG1 разделяет антиапоптотические свойства с другим членом семейства BAG3. BAG1 и BAG3 участвуют в митоген-активировании протеинкиназы (MAPK), главным образом посредством активации c-RAF. Отдельные исследования подтвердили нарушение регуляции BAG1 и BAG3 при различных типах рака [Sanja Aveic, 2011].

Нами оценена экспрессия мРНК гена BAG1 при МНИРМП и в неопухолевых тканях мочевого пузыря. Данные по медианам, средним значениям и квартилям показателя представлены в таблице 117.

Таблица 117.

Данные характеристик BAG1 исследуемых групп.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	10,6	83	0	66,3	4,9	7,6*	14,4	2,1	26,9
2	11,7	81	0	43,7	4,6	8,0	17,1	0	34,3
3	14,8	70	0	181,0	4,1	7,2	17,8	1,4	39,4
Всего		234							

*-p=1,0

Достоверных различий по медианам в группах не получено, они составили 7,6, 8,0 и 7,2 о.е., соответственно (p=1,0). По данным нашей работы

информативность показателя низкая при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря.

IFN γ .

Интерферон-g играет ключевую роль в активации клеточного иммунитета и, как следствие, в стимуляции противоопухолевого иммунного ответа. Представляет собой белок, кодируемый геном IFN γ с биологической точки зрения IFN γ является плейотропным цитокином с противовирусной, противоопухолевой и иммуномодулируемой функциями. В опухолевом микроокружении IFN γ последовательно управляет как проонкогенным, так и противоопухолевым иммунитетом. IFN γ действует как цитотоксический цитокин вместе с гранзимом В и перфорином, чтобы инициировать апоптоз в опухолевых клетках. С другой стороны, IFN γ может активировать ингибирующие механизмы обратной связи для подавления сверхактивации иммунной системы, которая является связующим звеном в ускользании иммунного ответа в клеточном микроокружении. Таким образом, можно предположить, что добавление IFN γ при лечении онкологических больных с активным иммунитетом может быть как полезным, так и нанести вред [Jorgovanovic D et al, 2020].

Данные по основным характеристикам экспрессии белка IFN γ при МНИРМП представлены в таблице 118.

Показатели медианы белка IFN γ 1 и 3 групп достоверно различаются 26,5 и 113,8 о.е., соответственно ($p=0,02$), во 2 группе медиана составила 73,5, различия недостоверные ($p=0,09$). Данные распределения образцов тканей в зависимости о экспрессии белка приведены в таблице 119.

Во всех трех группах выявлено достаточно большое количество образцов тканей с экспрессией IFN γ , в 1 группе – 84,3%, во 2-ой – 77%, в 3-ей – 73: ($p=0,14$).

Таблица 118.

Данные характеристик IFN γ исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	275,2	83	0	13307,9	8,0	26,5*	97,0	0	401,7
2	193,0	81	0	476,3	18,4	73,5	230,7	0	861,1
3	273,9	70	0	2520,4	0	113,8*	294,1	0	1060,1
Всего		234							

*- $p_{1-3}=0,02$; $p_{1-2}=0,09$

Таблица 119.

Данные экспрессии IFN γ в исследуемых группах.

Группы	Нет экспрессии	Есть экспрессия	Всего
1	13 (15,7%)	70 (84,3%)*	83
2	19 (23%)	62 (77%)	81
3	19 (27%)	51 (73%)	70
Всего	51	183	234

*- $p=0,14$

Во всех трех группах выявлено достаточно большое количество образцов тканей с экспрессией IFN γ , в 1 группе – 84,3%, во 2-ой – 77%, в 3-ей – 73: ($p=0,14$).

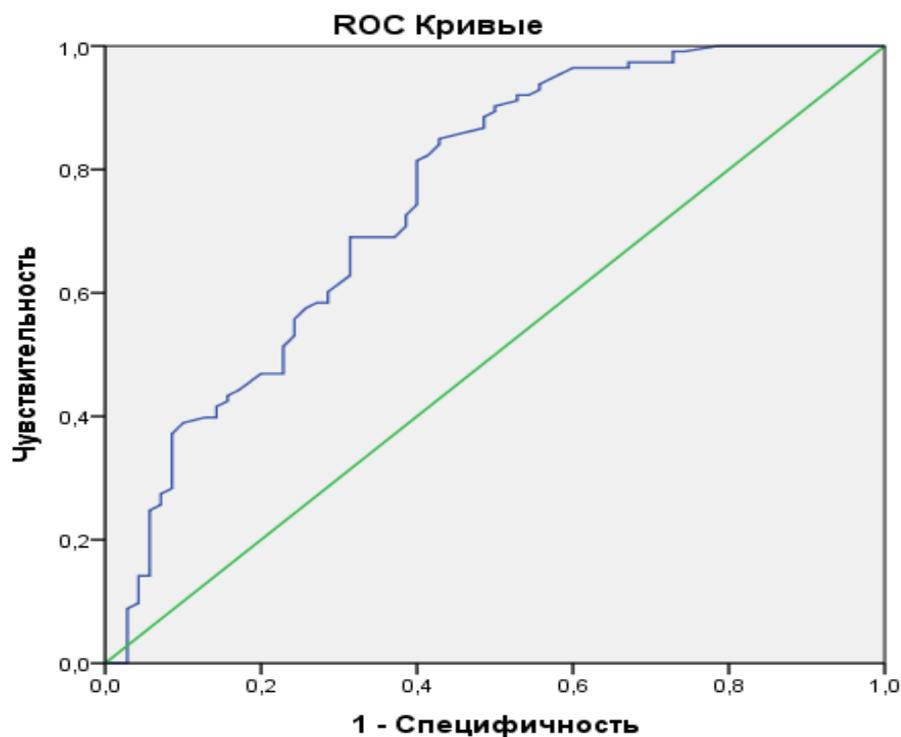
Мы проанализировали подгруппы пациентов с экспрессией IFN γ (таблица 120).

Данные экспрессии IFN γ в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	322,4	70	1,0	13307,9	15,5	40,2*	123,6	3,4	608,9
2	252,2	62	15,5	1176,3	59,7	113,5	388,0	26,9	891,4
3	375,9	51	16,6	2521,4	90,5	181,0	477,7	26,9	1606,8
Всего		183							

*- $p < 0,0005$

Из таблицы видно, что медиана в 1 группе достоверно меньше, чем в двух других группах: 40,2, 113,5 и 181,0, соответственно ($p < 0,0005$). Это дает нам основание продолжить анализ белка IFN γ и оценить его информативность при помощи построения ROC-кривой (рисунок 26).



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 26. ROC-кривая при экспрессии IFN γ

Площадь под кривой составила $0,76 \pm 0,04$. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности находится в районе 89. Чувствительность данного порога составила – 69%, специфичность во 2 группе – 60%, в 3 группе – 80% (таблица 121).

Таблица 121.

Данные чувствительности и специфичности показателя IFN γ .

Группы	IFN γ		Всего
	≥ 89	< 89	
1	22 (31%)	48 (69%)*	70
2	37 (60%)	25 (40%)	62
3	41 (80%)*	10 (20%)	51
Всего	100	83	183

*- $p < 0,0001$

Из таблицы видно, что для здоровых тканей мочевого пузыря более характерен уровень IFN $\gamma > 89$ о.е., в то время как для опухолевых тканей - ≤ 89 . Таким образом, IFN γ может обладать некоторой диагностической ценностью при МНИРМП.

При оценке экспрессии белка в зависимости от клинических и анамнестических данных достоверных взаимосвязей не выявлено (таблица 122).

Таблица 122.

Зависимость экспрессии IFN γ от клинических и анамнестических факторов.

Гематурия	IFN γ				p
	Кол-во пациентов	Q25	Медиана	Q75	
Есть	44	15,5	40,2	130,4	P=0,6
Нет	25	19,9	36,8	87,4	
Всего	69	15,5	36,8	119,4	
Размер опухоли					
<3см	45	15,5	51,1	123,0	P=0,6
\geq 3см	23	15,5	26,9	111,4	
Всего	69	15,5	36,7	119,4	
Степень дифференцировки опухоли					
G1	36	19,0	46,9	115,4	P=0,6
G2	20	3,2	17,6	32,0	
G3	30	15,5	44,4	174,9	
Всего	69	15,7	40,2	121,5	
Курение в анамнезе					
Есть	39	14,4	28,8	123,6	P=0,4
Нет	30	23,4	52,0	157,6	
Всего	69	16,0	43,7	1234,6	

TLR2, TLR4, TLR7.

Toll-подобные рецепторы (TLR) были идентифицированы как основные компоненты инфекционных заболеваний, врожденного иммунитета, воспалительные состояний и, что важно, онкогенеза, опосредованного воспалением. Все больше и больше данных появляется о том, что передача сигналов, опосредованная TLR4, может действовать как ключевой активированный патогенами сигнальный путь развития опухоли и важный канцерогенный механизм. Как ключевой ген семейства TLR и классический медиатор воспаления TLR4 действует как молекула – мост между врожденным и адаптивным иммунитетом [Jie Guo, Liao M, 2021].

Активация TLR в раковых клетках способна влиять на сигнальный каскад NF- κ B и индуцировать экспрессию антиапоптотических белков, что приводит к пролиферации раковых клеток. Напротив, функционирующие TLR также могут вызвать запрограммированную гибель клеток, усиливая иммунный надзор и повышая химиочувствительность. Эти результаты предполагают, что TLR могут оказывать двойное действие на раковые клетки и их роль может зависеть от происхождения опухоли и типа TLR.

TLR7 представляет собой эндосомальный TLR, его активация оказывает мощное противоопухолевое действие, например, при раке толстой кишки. Однако, роль TLR2, TLR4 и TLR7 при МНИРМП хорошо не изучена [Jiong Jiang, Lei Dong, 2016].

В нашей работе мы определили уровень экспрессии TLR2, TLR4, TLR7 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря и попытались оценить их связь с клинико-патологическими характеристиками опухоли (таблица 123).

Из таблицы видно, что медиана белка TLR2, TLR4 и TLR7 достоверно больше в 3 группе – 39,4 о.е. ($p=0,003$), 34,3 ($p=0,004$), 49,4 ($p=0,02$), соответственно.

Данные характеристик показателей исследуемых групп.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
TLR2									
1	73,8	83	0	2998,4	0	13,7	66,3	0	187,4
2	29,2	81	0	230,7	0	0*	48,5	0	137,2
3	74,0	70	0	922,9	0	39,4*	81,6	0	326,3
Всего		234				*_ P=0,003			
TLR4									
1	33,7	83	0	168,9	6,7	21,1	45,3	0	132,5
2	46,2	81	0	1260,7	10,2	21,1	45,3	0	107,6
3	43,5	70	0	304,4	19,0	34,3*	61,8	0	107,6
Всего		234				*-p=0,04			
TLR7									
1	45,9	83	0	326,3	0	24,7	68,6	0	222,9
2	37,0	81	0	174,9	0	0	68,6	0	137,2
3	65,1	70	0	430,5	0	49,4*	97,0	0	87,4
Всего		234				*-p=0,02			

Т.е. уровень экспрессии белков – рецепторов достоверно больше в контрольной группе, у пациентов без опухолевого поражения мочевого пузыря. Можно сделать вывод, что показатели TLR2, TLR4, TLR7 не обладают диагностической ценностью при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря.

CYP19A (CYP19A1).

Ароматаза рассматривается в нескольких исследованиях, как возможный кандидат, участвующий в развитии рака. Фермент находится в эстроген-продуцирующих клетках эндоплазматического ретикула и вызывает

превращение андрогенов С19: андростендиона в эстрон и тестостерона в эстрадиол. Он кодируется геном CYP19A (исследовался CYP19A1, член 1 подсемейства А семейства 19 цитохрома Р450), расположенным на хромосоме 15q21.2. Роль морфизма CYP19A1 была оценена при некоторых онкологических заболеваниях.

Мы оценили уровень экспрессии CYP19A1 при МНИРМП. Здесь сразу пациенты были разделены на две подгруппы: с экспрессией или без экспрессии мРНК гена CYP19A1.

Нами выявлено, что уровень экспрессии CYP19A1 сравним во всех трех группах, достоверных различий не выявлено (таблица 124).

Таблица 124.

Данные экспрессии CYP19A1 в исследуемых группах.

Группы	Нет экспрессии	Есть экспрессия	Всего
1	40 (48,2%)	43 (51,68%)	83
2	43 (53,1%)	38 (46,9%)	81
3	32 (45,7%)	38 (54,3%)	70
Всего	114	119	234

*-p=0,6

Далее мы проанализировали медианы, средние значения и квартили в подгруппе с экспрессией показателя (таблица 125).

Достоверных различий по медиане показателя в группах не получено, показатель располагается в широких пределах и не представляет какой-либо диагностической ценности при МНИРМП.

Данные экспрессии CYP19A1 в исследуемых группах.

Группы	Среднее значение	Кол-во пациентов	Мин. значение	Макс. значение	Q25	Медиана	Q75	Перцентиль	
								5,00	95,00
1	20761,7	43	1,0	45619	152,2	803,4	2797,7	27,9	75281
2	4169,7	38	132,5	18179	803,4	1911,9*	5404,7	132,6	16384
3	6244,8	38	181,0	167059	530,1	1136,2*	2797,7	207,9	6888
Всего		119							

*-p>0,05

COX2.

Было показано, что опухолевое воспаление и aberrantly экспрессируемые биомаркеры играют важную роль в опухолевом микроокружении. COX2 высвобождается клетками макрофагов II типа, ассоциированными с раком фибробластами и клетками рака в опухолевом микроокружении. Гиперэкспрессия COX2 может быть объяснена механизмами транскрипционной и/или посттранскрипционной регуляции. Экспериментальные результаты на клеточных линиях и животных моделях продемонстрировали, что гиперэкспрессия COX2 может ингибировать апоптоз опухолевых клеток, усиливать клеточную адгезию для достижения инвазивного фенотипа и способствовать опухолевому ангиогенезу. Эти теории были подтверждены для различных типов опухолей, включая рак желудка, легких, поджелудочной железы, мочевого пузыря, головы шеи и рака молочной железы [Gong Z, Huang W, 2021].

Здесь также решено сразу разделить пациентов на две подгруппы по наличию или отсутствию экспрессии COX2 в исследуемых тканях (таблица 126).

Таблица 126.

Данные экспрессии COX2 в исследуемых группах

Группы	Нет экспрессии	Есть экспрессия	Всего
1	40 (48,2%)	43 (51,8%)	83
2	43 (53,1%)	38 (46,9%)	81
3	32 (45,7%)	38 (54,3%)	70
Всего	114	119	234

*- $p=0,2$

Из таблицы видно, что достоверных различий по уровню экспрессии показателя в исследуемых группах не выявлено ($p=0,2$).

При оценке медианы, средних значений, квартилей у пациентов с экспрессией COX2 статистически значимых различий не отмечено, так медиана показателя в 1 группе составила 861,1 о.е., во 2 группе – 1176,3, в 3 группе – 1116,8 ($p=0,4$). Следовательно, можно сделать вывод, что белок COX2 не обладает диагностической ценностью при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря по полученным нами данным.

Также были проанализированы следующие гены: MGB1, CTSL2v, TERT, HER2, PTEN, GREM1, MMP8, IL2Ra, IL6, IL8, IL1b, IL10, NDRG1, CD56, TGFb, HLA-G1, HLA-G5, GATA2, Il-28a, LGALS1, Il-29, LIF, LIFR, STK15, BAX, MMP9, GSTM1, GNLY, P14ARF (P19ARF), IGF1, IGF2. Все они оказались неинформативными при данной стадии рака мочевого пузыря.

ГЛАВА 4. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ, КЛИНИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе молекулярно-генетического исследования мы определили и сравнили уровень экспрессии мРНК, панели раннее перечисленных генов в опухолевых тканях мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря, в слизистой оболочке мочевого пузыря без признаков заболевания у пациентов, находящихся под динамическим наблюдением после лечения МНИРМП и у пациентов с условно «здоровым» мочевым пузырем, имеющих онкологические заболевания других локализаций.

При сравнении экспрессии мРНК ряда генов, ассоциированных с пролиферацией, получены данные, свидетельствующие о повышенной пролиферативной активности опухоли. В частности, нами получено достоверное повышение экспрессии мРНК маркеров пролиферации: Ki67, CCNB1, MYBL2, TPA, и маркера ингибитора апоптоза BIRC5 в ткани мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря. Полученные данные согласуются со значительным количеством публикаций по молекулярно-генетическим особенностям рака мочевого пузыря.

В исследовании была произведена оценка безрецидивной выживаемости в группе 1, куда входили пациенты с МНИРМП по методу пропорционального риска Коха. На рисунке 27 представлена безрецидивная выживаемость в общей группе. Медиана безрецидивной выживаемости составила 23,7 месяца.

Произведена оценка безрецидивной выживаемости в зависимости от уровня экспрессии мРНК генов. На рисунке 28 представлен график безрецидивной выживаемости в зависимости от уровня пороговой экспрессии мРНК BIRC5.

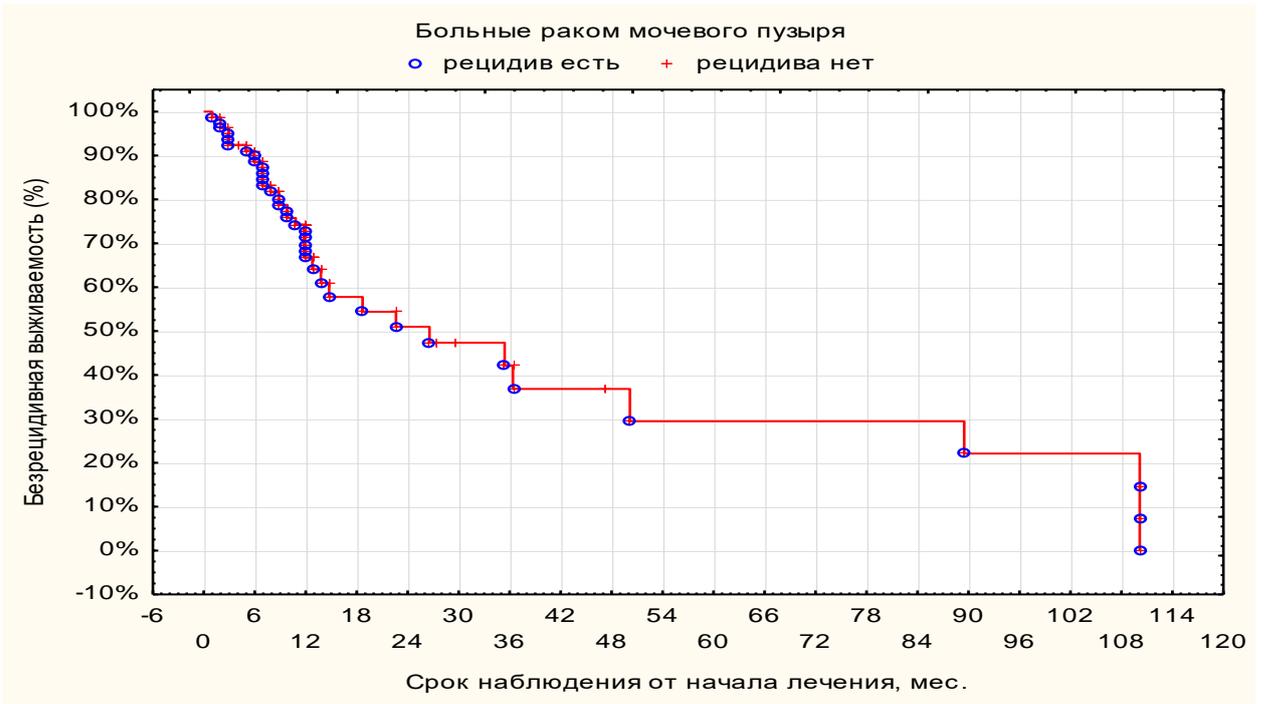


Рис. 27 Безрецидивная выживаемость в общей группе.

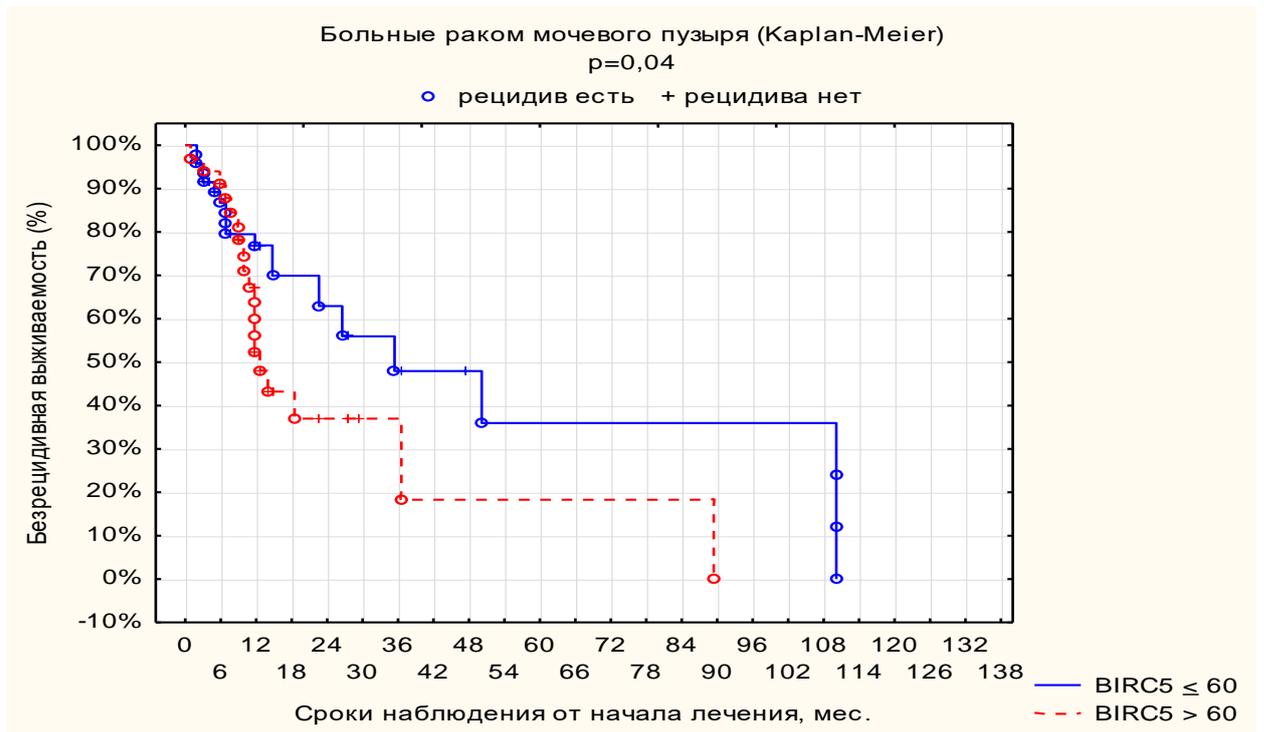


Рис. 28 Безрецидивная выживаемость в зависимости от уровня экспрессии BIRC5.

Медиана безрецидивной выживаемости составила 33 месяца при уровне экспрессии $BIRC5 \leq 60$ о.е., 3-летняя прогнозируемая безрецидивная

выживаемость составила $47,9 \pm 12,2\%$. При уровне экспрессии показателя > 60 о.е. медиана БРВ равна 12,3 месяцам, 3-летняя прогнозируемая БРВ – $18,5 \pm 14,0\%$ ($p=0,041$).

На рисунке 29 – график безрецидивной выживаемости в зависимости от уровня экспрессии TLR2 при пороге показателя 70 о.е. Медиана выживаемости при TLR2 >70 о.е. составила 41,1 месяц, 1-летняя БРВ – $73,8 \pm 6,2\%$, 2-летняя БРВ – $67,2 \pm 8,4\%$. При TLR2 < 70 медиана равна 11,8 месяцев, 1-летняя безрецидивная выживаемость – $65,7 \pm 12,5\%$, 2-летняя – $24,4 \pm 16,3\%$ ($p=0,021$). Различия проявляются после 1 года наблюдения.

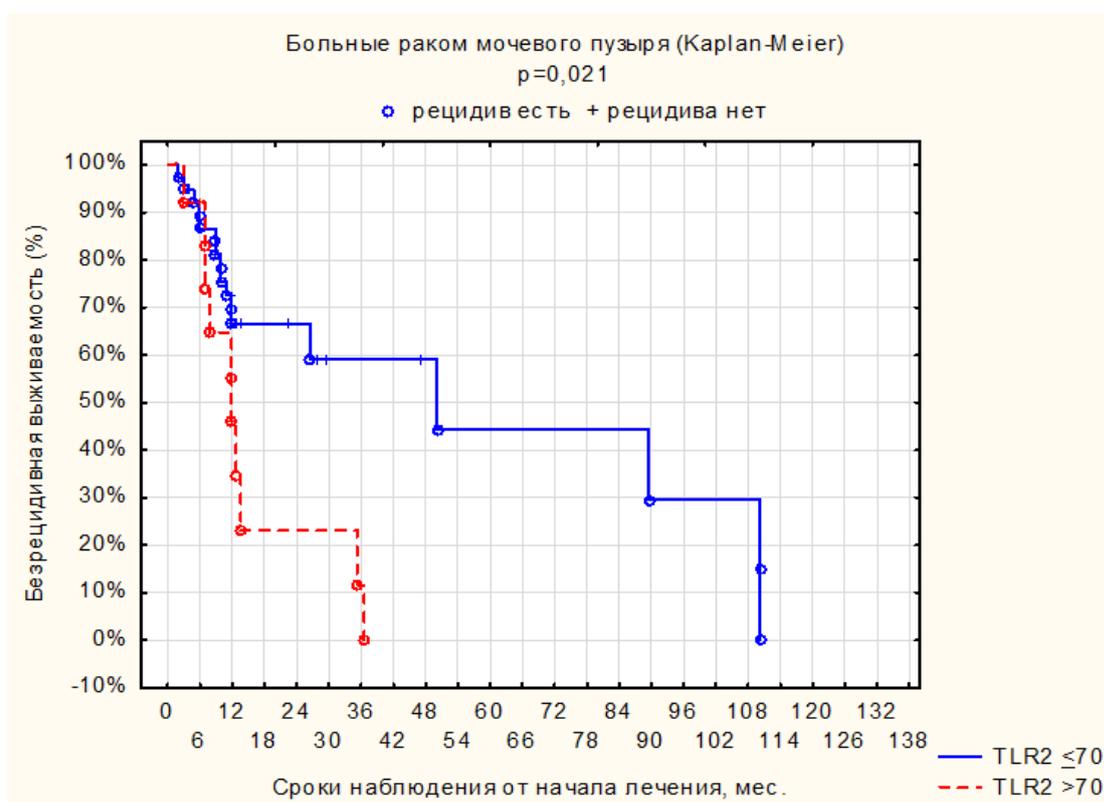


Рис.29 Безрецидивная выживаемость в зависимости от уровня экспрессии TLR2.

На рисунке 30 представлен график безрецидивной выживаемости в зависимости от уровня экспрессии Ki67. При $Ki67 \leq 35$ о.е. – медиана БРВ составила 13 месяцев, 1-летняя безрецидивная выживаемость – $57,7 \pm 8,1\%$, 2-хлентя – $39,8 \pm 9,4\%$ ($p=0,02$).

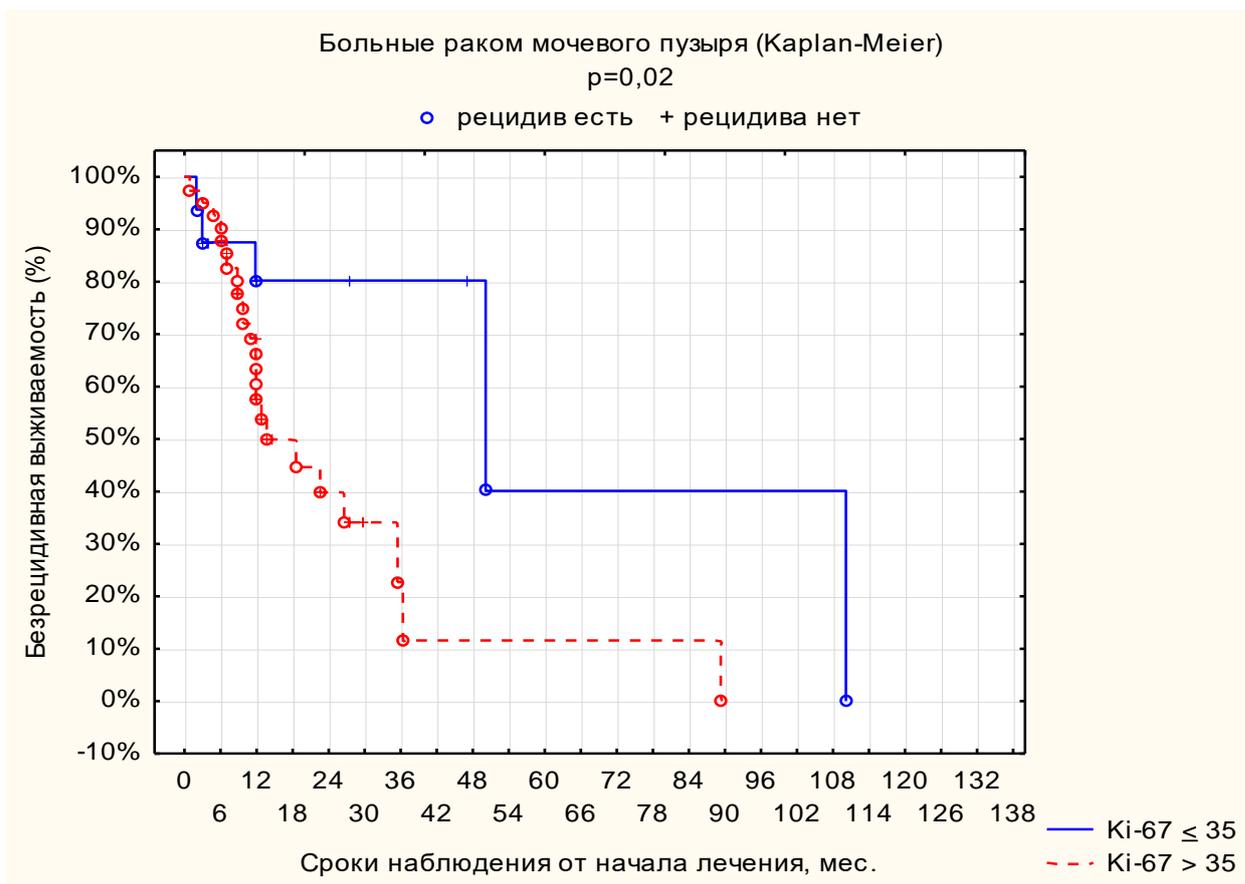


Рис. 30 Безрецидивная выживаемость в зависимости от уровня экспрессии Ki67.

Далее представлен график зависимости безрецидивной выживаемости от CCNB1 (рисунок 31). При экспрессии $CCNB1 \leq 110$ о.е. медиана безрецидивной выживаемости – 40 месяцев, при $CCNB1 > 110$ о.е. медиана составила 11 месяцев ($p=0,045$).

На рисунке 32 представлены данные по БРВ в зависимости от уровня экспрессии MMP11. При $MMP11 > 20$ о.е. безрецидивная выживаемость – 14 месяцев, 1-летняя БРВ – $59\% \pm 8,1\%$, 2-хлетняя – $28 \pm 9,5\%$. При $MMP11 \leq 20$ о.е. медиана составила 35 месяцев, 1-летняя БРВ – $78 \pm 9,6\%$, 2-хлетняя – $78 \pm 8,7\%$ ($p=0,008$).

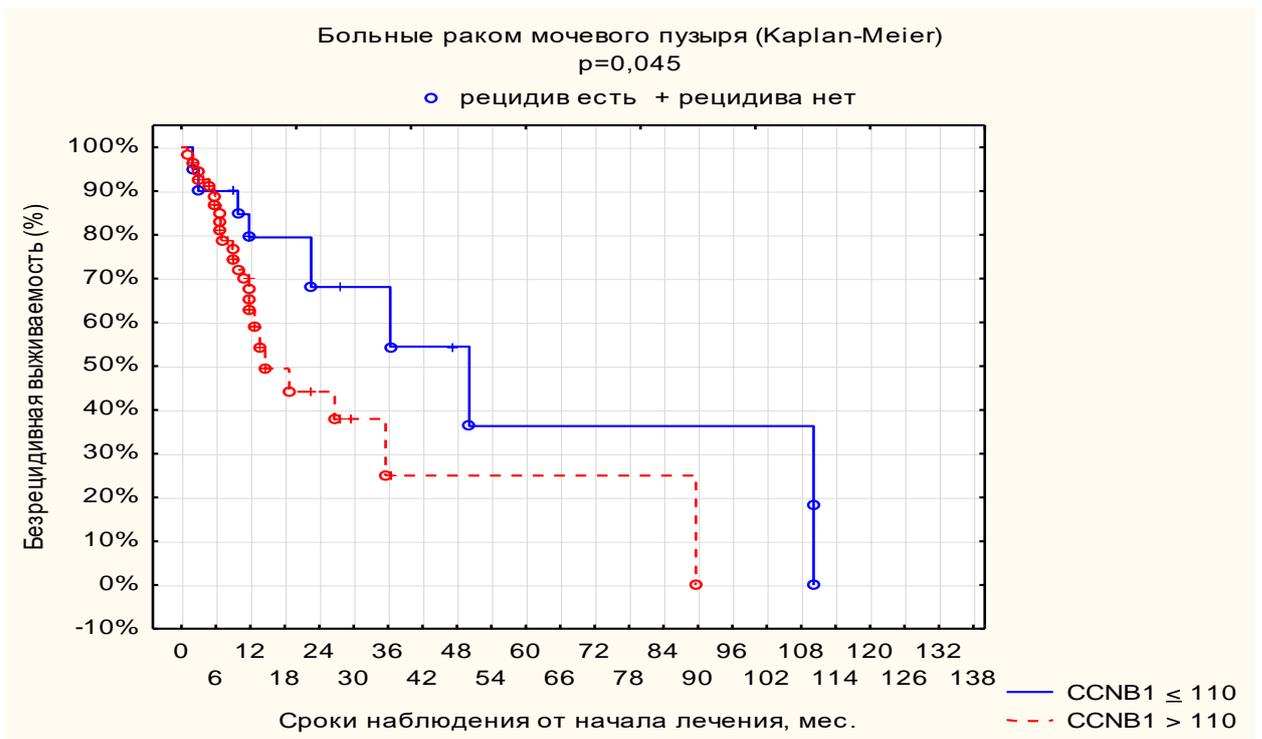


Рис.31 Безрецидивная выживаемость в зависимости от CCNB1.



Рис.32 Безрецидивная выживаемость в зависимости от MMP11.

На рисунке 33 представлен график безрецидивной выживаемости в зависимости от уровня экспрессии MYBL2. При MYBL2 ≤ 80 о.е. медиана составила 42,2 месяца, 1-летняя БРВ – 88 ± 9,1%. При MYBL2 > 80 о.е.

медиана равна 14 месяцев, 1-летняя БРВ – $57 \pm 9,1\%$, 2-хлетняя – $38 \pm 10,2\%$ ($p=0,01$).

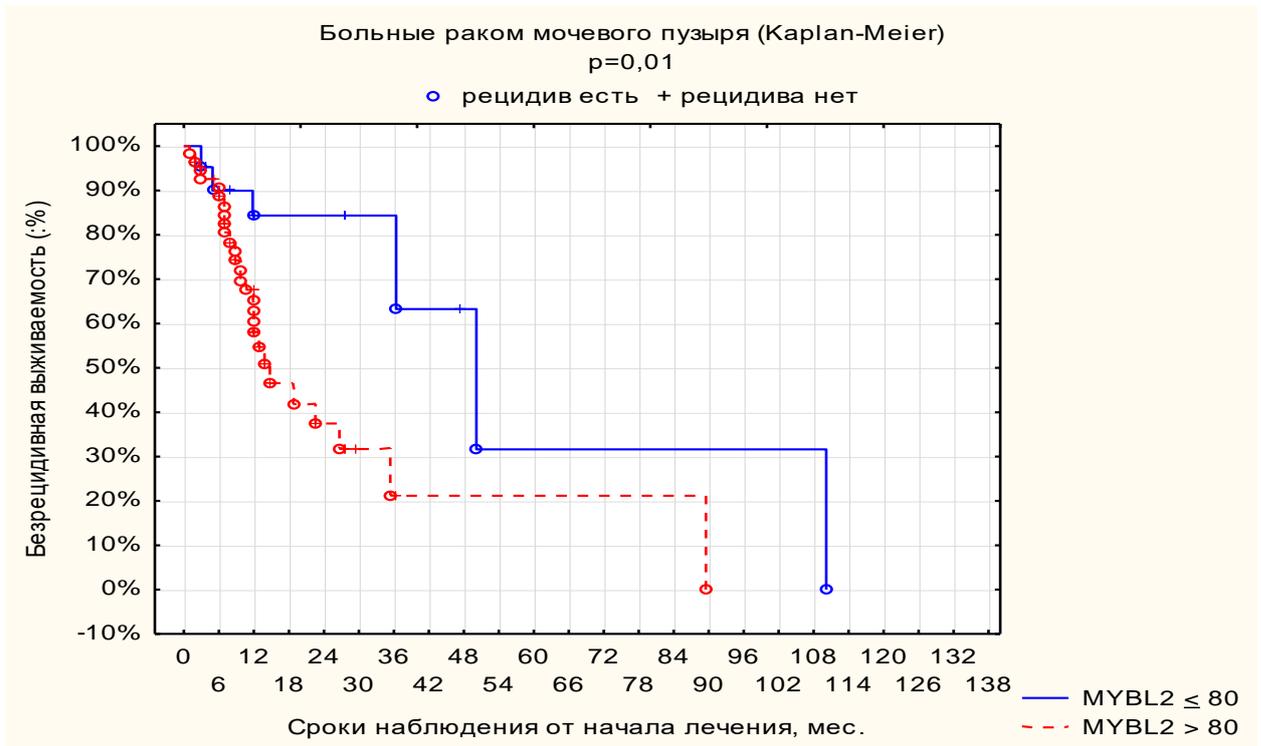


Рис.33 Безрецидивная выживаемость в зависимости от MYBL2.

Ниже представлена сводная таблица по всем изученным генам с данными по медианам показателей и безрецидивной выживаемостью в 1 группе (Таблица 127). Из таблицы видно, что 7 генов достоверно влияют на безрецидивную выживаемость: BIRC5, Ki67, CCNB1, MYBL2, MMP11, TLR2, STK15. К генам-маркерам при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря по данным нашей работы отнесены – Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5.

Таблица 127.

Данные по медианам и безрецидивной выживаемости по изученным генам.

Ген	Медианы в группах			p		Связь с безрецидивной выживаемостью	
	1	2	3			Порог	p
MNGBL1	52,9 ↓	158	175	0,0006	0,02	нет	>0,05
CTSL2	14,4	8,0	8,9	0,06	0,1	≥15	0,34
BCL2	92,1 ↓	304	304	0,0003	<0,0001	нет	>0,05
C-MYC	10,2	8,0	6,1	>0,5	0,04	нет	>0,05
BIRC5	108 ↑	27,9	36,3	0,002	0,002	>60	0,04
CCND1	46,9 ↓	28,8	34,9	0,0004	0,08	>95	0,1 тенд
NDRG1	991 ↓	3214	3822	0,1	0,2	нет	>0,05
CD68	6,5	6,7	7,0	>0,05	>0,05	нет	>0,05
Ki-67 порог 30	76,1 ↑	10,6	14,7	<0,0001	<0,0001	>30	0,024
TERT	16,0	17,1	12,1	0,5	>0,5	нет	>0,05
HER2	16,8	12,6	16,6	0,2	>0,5	≥20	0,09тенд
PTEN	3,7	4,8	4,5	0,3	0,4	нет	>0,05
BAG1	7,6	8,0	7,2	>0,05	>0,05	нет	>0,05
PGR порог 270	66,3 ↓	665	530	<0,0001	<0,0001	нет	>0,05
CCNB1 порог 205	172 ↑	55,7	53,0	<0,0001	<0,0001	>205	0,045
ESR1	71,1 ↓	416	332	<0,0001	<0,0001	нет	0,05
GRB7	4390 ↓	1911	1722	0,0003	<0,0001	нет	>0,05
MMP11	56,8 ↓	73,5	38,7	>0,5	0,1	>20	0,025
STK15	117	83,0	80,2	0,09	0,3	>120	0,027
MYBL2 порог 60	256 ↑	17,5	25,6	<0,0001	<0,0001	>80	0,01
P16INK4A	39,4 ↓	24,3	25,1	<0,0001	0,0001	нет	>0,05
SCUBE 2	388 ↓	588	1176	0,4	0,0006	нет	>0,05
MMP9	907 ↓	2358	1305	0,05	0,8	нет	>0,05
GSTM1	5599 ↓	1881	3566	>0,5	>0,5	>5600	0,1 тенд
GNLY	280 ↓	539	972	0,19	0,0006	нет	>0,05
PI4ARF	65,6 ↓	71,0	62,9	>0,5	>0,5	нет	>0,05
IGF1	53,8 ↓	294	265	<0,0001	<0,0001	нет	>0,05
COX2	861 ↓	1176	1116	0,4	>0,5	нет	>0,05
IGF2	478	402	803	>0,5	0,3	нет	>0,05
CYP19A	803 ↓	1912	1136	0,05	0,8	нет	>0,05
GREM1	270 ↓	928	955	0,008	0,3	нет	>0,05
MMP2	163 ↓	270	431	0,2	0,03	нет	>0,05
PAPPA	235 ↓	1526	1117	<0,0001	0,0003	нет	>0,05
MMP7	84,4 ↓	64,0	90,5	>0,05	>0,5	нет	>0,05
IL2	50,2 ↓	204	160	<0,0001	<0,0001	нет	>0,05
MMP8	40,2 ↓	73,5	115	0,5	0,2	нет	>0,05
IL2Ra	138 ↓	247	239	0,8	>0,5	нет	>0,05
IL6	24,3 ↓	452	89,6	0,0001	0,049	нет	>0,05
IL12a	8,1 ↓	19,7	20,4	<0,0001	0,0005	нет	>0,05
IL7	13,5 ↓	28,8	30,9	0,0004	<0,0001	нет	>0,05
IL15	15,5 ↓	27,9	28,3	0,0006	0,0003	нет	>0,05
IL8	928 ↓	431	344	0,07	0,002	нет	>0,05
IL1b	212 ↓	256	216	0,4	>0,5	нет	>0,05
IL10	59,7 ↓	108	72,3	0,1	>0,5	нет	>0,05
TPA порог 300	1177 ↑	142	114	<0,0001	<0,0001	>400	0,18 тенд
IFNγ	40,2 ↓	114	181	<0,0001	<0,0001	≤40	0,18 тенд
CD45	95,4 ↓	304	284	0,0002	<0,0001	нет	>0,05
TNFα	68,6 ↓	142	111	<0,0001	0,002	нет	>0,05
CD56	326 ↓	3446	1526	<0,0001	0,001	нет	>0,05
TGFb	445 ↓	750	763	0,0004	0,002	нет	>0,05
CD69	558 ↓	989	1261	0,009	0,008	нет	>0,05
VEGFA121	13,7 ↓	8,0	7,5	0,0003	<0,0001	нет	>0,05
BAX	71,0 ↓	169	147	0,002	0,09	нет	>0,05
VEGFA165	20,0 ↓	12,1	11,3	0,004	0,001	нет	>0,05
TLR2	55,7 ↓	57,7	61,8	>0,5	0,08	>70	0,02
VEGFA189	92,1 ↓	55,7	55,7	0,005	0,005	нет	>0,05
TLR4	25,1 ↓	23,4	38,1	>0,5	0,005	нет	>0,05
HLA-G1	69,6 ↓	402	750	0,6	0,03	нет	>0,05
TLR7	50,2 ↓	73,5	90,5	0,1	0,002	нет	>0,05
HLA-G5	175 ↓	187	461	0,4	0,005	нет	>0,05
GATA3	972 ↓	61,8	599	0,008	>0,5	нет	>0,05
IL28	0	0	0	-	-	-	
LGALS1	1097 ↓	2048	2896	0,049	0,0001	-	
IL29	0	0	0	-	-	-	
LIF	0	0	0	-	-	-	
LIFR	1305 ↓	4624	11585	0,013	<0,0001	нет	>0,05

С учетом данных по безрецидивной выживаемости нами проанализированы сочетания факторов прогноза для выявления групп больных с высоким риском раннего рецидива (таблица 128).

Таблица 128.

Данные по безрецидивной выживаемости в исследуемых группах с учетом сочетания некоторых прогностически значимых генов.

Сочетания генов	Количество сочетаний	Медиана	Безрецидивная выживаемость			p
			1-летняя	2-хлетняя	3-хлетняя	
MYBL2 \leq 80+TRL2 \leq 70	12	Не достигнут а.	90,9 \pm 8,7	90,9 \pm 8,7	90,9 \pm 8,7	0,05 1
MYBL2 $>$ 80+TRL2 $>$ 70	9	11,8 мес.	37,5 \pm 17,1	12,5 \pm 12,0	0	
Прочие их сочетания	29	17,8 мес.	54,4 \pm 9,9	54,4 \pm 9,9	21,8 \pm 16,6	
MYBL2 \leq 80+MMP11 \leq 20	8	Не достигнута.	85,7 \pm 13,2	85,7 \pm 13,2	85,7 \pm 13,2	0,02 5
MYBL2 $>$ 80+MMP11 $>$ 20	42	11,9 мес.	50,7 \pm 8,5	18,8 \pm 10,7	9,4 \pm 8,5	
Прочие их сочетания	24	35,6 мес.	81,5 \pm 8,4	72,5 \pm 11,3	36,2 \pm 19,0	
TRL2 \leq 70+MMP11 \leq 20	13	Не дост.	83,3 \pm 10,8	83,3 \pm 10,8	83,3 \pm 10,8	0,16
(TRL2 $>$ 70+MMP11 $>$ 20) или (TRL2 $>$ 70+MMP11 \leq 20)	14	11,8 мес.	42,2 \pm 14,3	21,1 \pm 12,7	10,6 \pm 9,8	
TRL2 \leq 70+MMP11 $>$ 20	24	17,3 мес.	55,2 \pm 10,7	55,2 \pm 10,7	41,4 \pm 14,4	

Из таблицы видно, что благоприятный прогноз безрецидивной выживаемости может быть у пациентов с экспрессией MYBL2 \leq 80 + TLR2 \leq 70 о.е., 1-летняя, 2-хлетняя и 3-хлетняя БРВ составляет 90,9 \pm 8,7%, при этом медиана безрецидивной выживаемости еще не достигнута (p=0,051). Также благоприятный прогноз БРВ может наблюдаться у пациентов с экспрессией

$MYBL2 \leq 80 + MMP11 \leq 20$, при этом 3-хлетняя БРВ составляет $85,7 \pm 13,2$:
 $(p=0,025)$. Неблагоприятный прогноз безрецидивной выживаемости прогнозируется у пациентов при сочетании белков с экспрессией $MYBL2 > 80 + TLR2 > 70$, в этом случае 1-летняя БРВ – $37,5 \pm 17,1\%$, 2-хлетняя – $12,5 \pm 12,0\%$, 3-хлетняя – 0 ($p=0,051$), медиана – 11,8 месяцев. При сочетании экспрессии белков $MYBL2 > 80 + MMP11 > 20$ получена 1-летняя БРВ – $50,7 \pm 8,5\%$, 2-хлетняя – $18,8 \pm 10,7\%$, 3-хлетняя – $9,4 \pm 8,5\%$ ($p=0,005$). Медиана БРВ при данном сочетании экспрессии белков составляет 11,9 месяцев. Графики по БРВ также представлены на рисунках 34 и 35. Нами выполнен анализ сочетаний прогностических генов-маркеров с учетом данных многофакторного анализа. Оценена БРВ сочетания VIRC5 и Ki67. Распределение пациентов с учетом уровня экспрессии белков относительно пороговых значений выглядело следующим образом: У 11-ти больных при $VIRC5 \leq 60 + Ki67 \leq 35$, т.е. уровни экспрессии ниже пороговых значений, медиана БРВ составила 40,7 месяцев, при 1-2-3-хлетней безрецидивной выживаемости – $80,2 \pm 10,3\%$, 5-тилетняя БРВ – $40,1 \pm 28,8\%$.



Рис. 34 Безрецидивная выживаемость в зависимости от сочетания экспрессии MYBL2+TLR2.

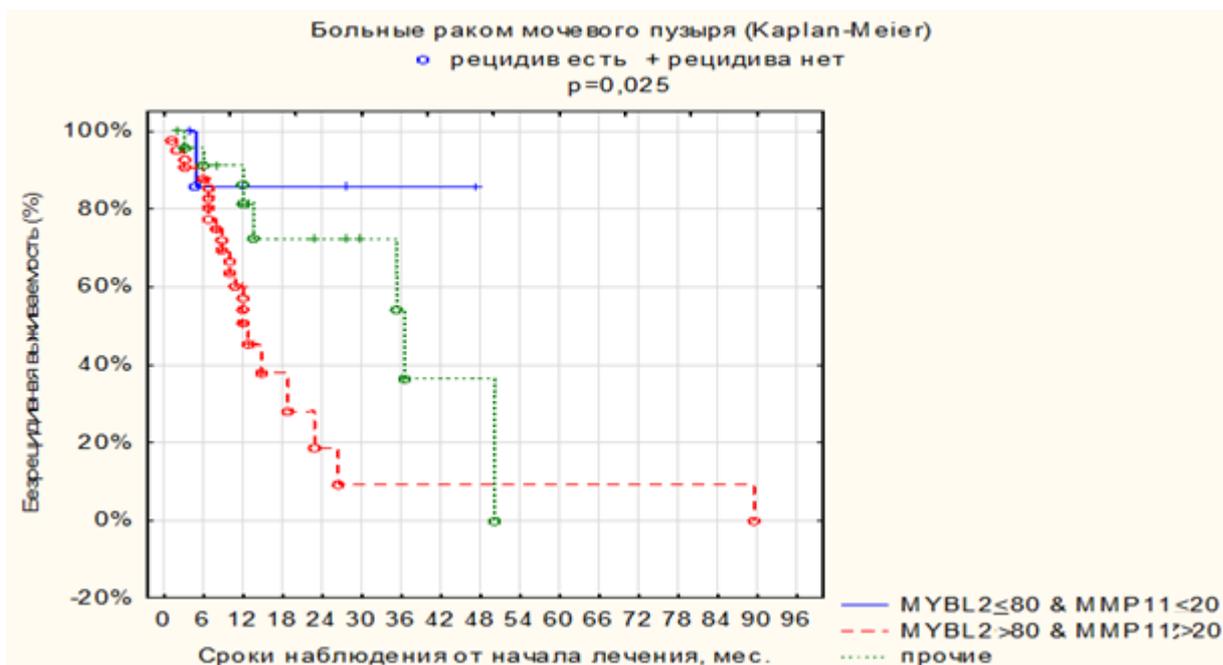


Рис. 35. Безрецидивная выживаемость в зависимости от сочетания экспрессии MYBL2+MMP11.

У 22 больных $VIRC5 > 60 + Ki67 > 35$, т.е. имеет место высокий уровень экспрессии белков, медиана БРВ составила 12,7 месяцев, 1-летняя безрецидивная выживаемость – $54,2 \pm 9,5\%$, 3-хлетняя – $19,2 \pm 14,5\%$.

При повышении уровня экспрессии хотя бы одного из белков выше пороговых значений медиана БРВ – 18,7 месяцев. Эти данные представлены на рисунке 36, здесь пациенты разделены на 2 группы, в 1-ую вошли больные с низким уровнем экспрессии мРНК обоих генов-маркеров, во 2-ую - все остальные пациенты: $VIRC5$ высокий + $Ki67$ низкий; $VIRC5$ высокий + $Ki67$ высокий; $VIRC5$ низкий + $Ki67$ высокий.

Медиана БРВ в первой группе составила 40,7 месяцев, во 2-ой – 13,7 месяцев ($p=0,024$), 1-летняя БРВ – $55,1 \pm 8,5\%$, т.е. у каждого второго больного через 1 год следует ожидать рецидив заболевания.

Для определения группы пациентов с самым высоким риском рецидива была создана модель на основе уровня экспрессии мРНК 4-х генов-маркеров, которые показали статистически значимую корреляцию с рецидивом

заболевания: Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5. В этой модели на основании данных многомерного анализа представлена безрецидивная выживаемость при различных сочетаниях экспрессии мРНК генов.

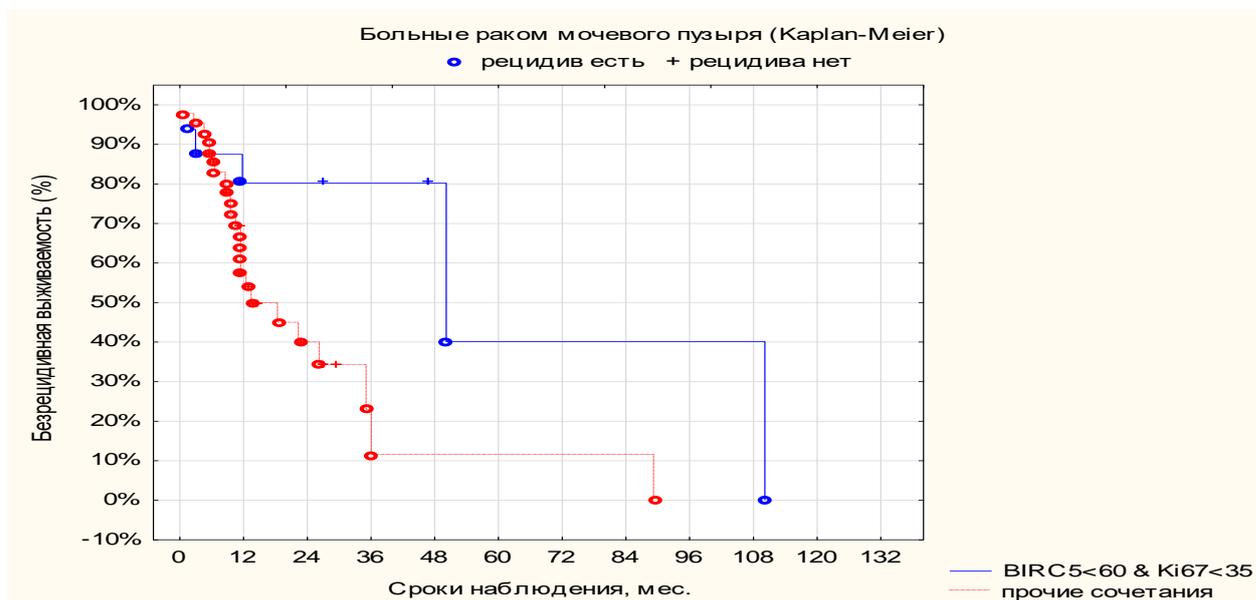


Рис.36 Безрецидивная выживаемость при сочетании экспрессии BIRC5 + Ki67.

Для определения группы пациентов с самым высоким риском рецидива была создана модель на основе уровня экспрессии мРНК 4-х генов-маркеров, которые показали статистически значимую корреляцию с рецидивом заболевания: Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5. В этой модели на основании данных многомерного анализа представлена безрецидивная выживаемость при различных сочетаниях экспрессии мРНК генов. Пациенты были разделены на 3 группы:

Группа А – все генов-маркеров низкие. Медиана БРВ – 41,6 месяцев.

Группа В – все генов-маркеров высокие. Медиана БРВ – 13 месяцев.

Группа С – различные сочетания генов-маркеров, не вошедших в группы А и В. Медиана БРВ – 22,9 месяцев.

При сравнении полученных медиан безрецидивной выживаемости видно, что наихудший прогноз по рецидиву заболевания получен в группе с высоким

уровнем экспрессии мРНК всех 4-х генов-маркеров, медиана БРВ – 13 месяцев, при наличии высокого уровня хотя бы одного из маркеров медиана БРВ – 22,9 месяцев, при низком уровне всех генов-маркеров медиана БРВ – 41,6 месяцев. ($p=0,024$) (таблица 129, рисунок 37).

Таблица 129.

Данные по безрецидивной выживаемости групп прогноза.

Группы	Период (годы)	Безрецидивная выживаемость	Медиана БРВ
А Все гены-маркеры низкие	1	82,2 ±10,3%	41,6 месяцев
	2		
	3		
	4		
	5	40,1 ±28,8%	
В Все гены-маркеры высокие	1	55,2 ±9,5%	13 месяцев
	2	39,1 ±10,3%	
	3	20,2 ± 14,5%	
С Все сочетания генов-маркеров не вошедших в группы А и В	1	78,3 ± 12,3%	22,9 месяцев
	2	46,1 ± 10,1%	
	3	23,2 ± 14,7%	

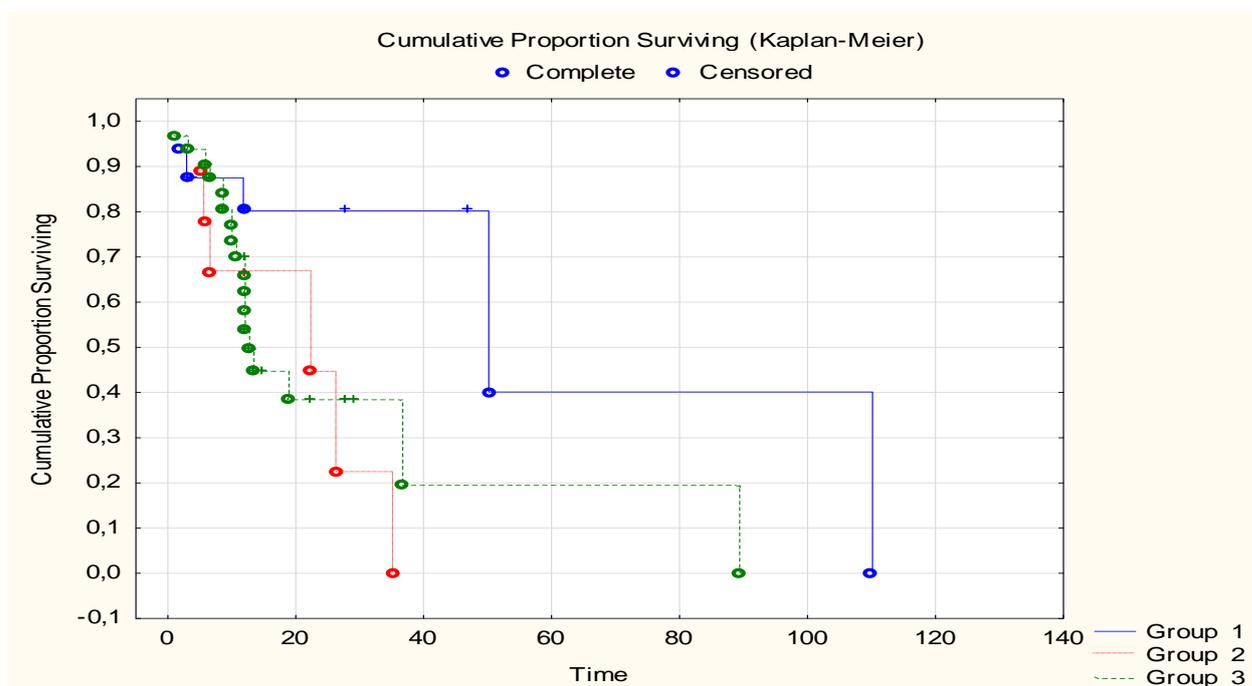


Рис.37 Данные по безрецидивной выживаемости при различных сочетаниях экспрессии мРНК генов-маркеры.

Таким образом, в нашей работе на основании сопоставления профиля экспрессии мРНК изученных генов в опухолевой и неопухолевой ткани у пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря с данными безрецидивной выживаемости пришли к следующему заключению:

Нами получено достоверное повышение экспрессии мРНК маркеров пролиферации опухолевой ткани при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря: Ki67, CCNB1, MYBL2, TP, маркера ингибитора апоптоза - BIRC5, нами впервые определены пороги чувствительности и специфичности вышеуказанных маркеров. Для всех вышеперечисленных маркеров выявлена приемлемая для медицинских исследований информативность > 75%, что позволяет признать гены Ki67, CCNB1, MYBL2, TPA, BIRC5 маркерами мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря с высокой чувствительностью и специфичностью. Также нами была выявлена группа генов, которые могут указывать на предрасполагающий к прогрессированию профиль опухоли: MMP11, TLR2, BCL2, CD45, CD56, GRB7, IL-2, IL-12, IL-15, IL-7, P16NK4A, SCUBE, TNF- α .

Оценена зависимость безрецидивной выживаемости от уровня экспрессии мРНК генов, выявлено, что экспрессия 7 белков коррелирует с БРВ: Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5, MMP11, TLR2, STK15.

Нами впервые определены пороги соотношения чувствительности и специфичности вышеуказанных маркеров пролиферации при МНИРМП, так для Ki67 он составил 30 о.е., при уровне экспрессии мРНК Ki67 >30 отмечается ухудшение прогноза заболевания.

Для маркера пролиферации CCNB1 (Циклин 1) порог составил 83 о.е.. Отмечается тенденция к повышению уровня экспрессии мРНК гена CCNB1 в зависимости от размера опухоли, так медиана показателя при размере опухоли < 3см составила – 137,1 о.е., при размере ≥ 3 см – 284,4 (p=0,09).

Для маркера MYBL2 порог составил 60 о.е., при пороге >60 можно с большей долей вероятности говорить о неблагоприятном прогнозе развития заболевания. Выявлена статистически достоверная корреляция увеличения экспрессии маркера при гематурии и размере опухолевого узла ≥ 3 см.

Для маркера TPA (тканевой полипептидный антиген, который является маркером пролиферации из группы цитокератинов) порог соотношения чувствительности и специфичности составил 300 о.е. При пороге > 300 о.е. можно говорить об ухудшении прогноза заболевания. Также отмечена достоверная взаимосвязь увеличения уровня экспрессии мРНК TPA при увеличении размеров опухолевого узла ($p=0,006$).

Для маркера BIRC5 порог соотношения чувствительности и специфичности составил 16 о.е., экспрессии показателя > 16 о.е. нами отмечено ухудшение прогноза заболевания. Отмечено достоверное увеличение экспрессии мРНК BIRC5 при гематурии ($p=0,04$).

У всех вышеперечисленных маркеров выявлена приемлемая для медицинских исследований информативность > 75%.

Также нами были изучены ген экспрессии рецепторов прогестерона – PGR и ген экспрессии рецепторов эстрогена – ESR1. Мы определили порог соотношения чувствительности и специфичности, для PGR – он составил 270 о.е., для ESR1 – 200 о.е., при уровне экспрессии мРНК < 270 о.е. и 200 о.е., соответственно, прогноз заболевания достоверно ухудшается, что соотносится с данными других исследований при МНИРМП [173].

Нами выделена группа генов, которые могут быть вспомогательными при оценке прогноза заболевания, однако их нельзя отнести к генам-маркерам. Уровень экспрессии мРНК BCL2 < 170 о.е., CD45 < 200 о.е., CD45 < 900 о.е., GRB7 > 2900 о.е., IL-2 < 100 о.е., IL-12 < 14 о.е., IL-15 < 25 о.е., IL-7 < 20 о.е.,

P16INK4A > 29 о.е., SCUBE2 < 650 о.е., TNF- α < 95 о.е., TLR2 , MMP11 может указывать на неблагоприятный прогноз заболевания.

При анализе сочетаний факторов прогноза выявлена корреляция экспрессии мРНК генов и БРВ при сочетании MYBL2>80 + TLR2 >70 (медиана безрецидивной выживаемости – 11,8 месяцев) и MYBL2 >80 + MMP11>20 (медиана безрецидивной выживаемости – 11,9 месяцев), а также при сочетании прогностических маркеров с высоким уровнем экспрессии мРНК BIRC5 >60 + Ki67> 35 (медиана БРВ - 12,7 месяцев).

Выполнен анализ сочетаний факторов прогноза для выявления группы больных с высоким риском рецидива.

На основании уровня экспрессии мРНК 4-х генов-маркеров (Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5) и их сочетания с прогностически-значимыми генами MYBL2+TLR2, BIRC5 + Ki67, MYBL2+MMP11, которые показали статистически значимую корреляцию с рецидивом заболевания создана модель оценки прогноза заболевания, которая подразумевает разделение пациентов на 4 группы в зависимости от уровня экспрессии мРНК генов-маркеров и их сочетаний, что позволяет нам более точно осуществлять стратификацию пациентов и определять алгоритм их лечения. Таким образом, пациентам группы с низкой экспрессией мРНК генов-маркеров (группа I) рекомендуется выполнение ТУР + 1 интраоперационная внутрипузырная ХТ с последующим динамическим наблюдением (контрольное обследование первый год каждые 3 месяца). Пациентам с повышением от 1 до 3-х генов-маркеров (группа II) - выполнение ТУР + химиотерапии (6-8 введений) с последующим динамическим наблюдением. Пациентам группы IIIa (все гены-маркеры повышены и/или высокий уровень экспрессии мРНК MYBL2 + TLR2, MYBL2 + MMP11 или BIRC5 + Ki67) при отсутствии неблагоприятных клиничко-морфологических факторов прогноза - выполнение ТУР с последующей внутрипузырной БЦЖ терапией или химиотерапией (6-8

введений). Поддерживающая терапия 12 месяцев. У пациентов группы Шб - решение вопроса о цистэктомии. Алгоритм лечения представлен на рисунке 38.

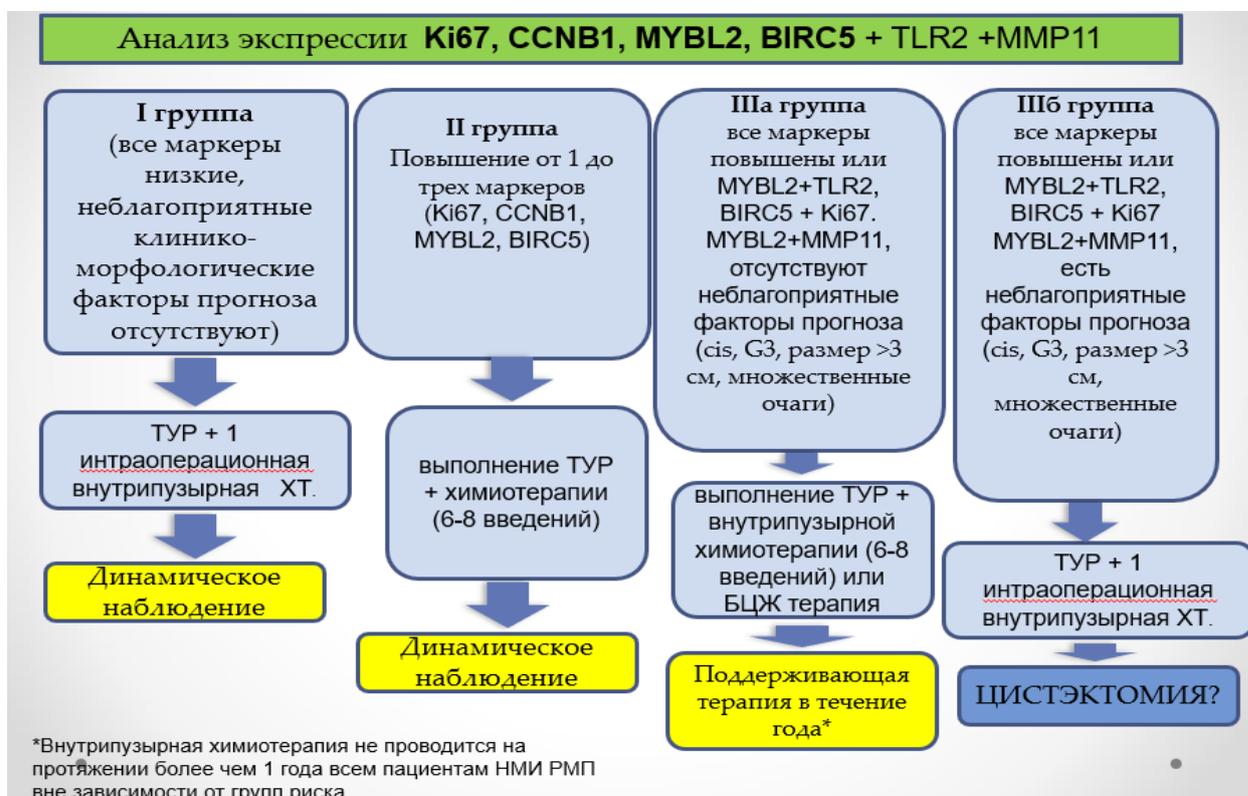


Рис.38 Алгоритм лечения с использованием молекулярно-генетических исследований

Преимуществом предложенного разделения пациентов на группы является возможность отобрать пациентов для выполнения адъювантной внутрипузырной БЦЖ или химиотерапии, что важно в связи с потенциально возможным возникновением побочных эффектов, а также позволяет выделить группу больных, которые могут являться кандидатами на выполнение цистэктомии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

По существующим на данное время данным основополагающим фактором в классификации рака мочевого пузыря является вовлечение мышечного слоя в патологический процесс. Так различают мышечно-неинвазивный (Tis, Ta, T1) и мышечно-инвазивный (T2, T3, T4) рак мочевого пузыря в зависимости от глубины инвазии. У большинства пациентов, у которых изначально диагностируют мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря, случается рецидив в будущем. Хорошо известные факторы риска развития рецидива мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря включают в себя количество и размер опухолевых очагов, стадию T, степень дифференцировки опухоли, пол, возраст. В мировой и отечественной литературе существует не очень много работ, посвященных молекулярно-генетическим особенностям мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря. Иногда при схожих патоморфологических характеристиках опухоли могут иметь разное клиническое течение, в связи с этим, важнейшим направлением клинической онкологии является выявление генов-маркеров неблагоприятного прогноза, коррелирующих с прогнозом заболевания, для стратификации пациентов в группы с различными вариантами лечения.

Анализ, проведенный многими исследователями, позволил разработать прогностические модели для оценки краткосрочного и долгосрочного риска рецидива опухоли. Среди них наиболее важными являются таблицы, разработанные Европейской организацией по исследованию и лечению рака (EORTC) и Испанским урологическим клубом по лечению рака (CUETO).

По данным [131] риск рецидива мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря высокой степени злокачественности составляет 40% при периоде наблюдения 5 лет, риск перехода в мышечно-инвазивную форму – 21%. Опухоли высокой степени злокачественности T1 могут иметь схожие патоморфологические характеристики, но разное клиническое течение.

Анализ опубликованных исследований опухолей T1 высокой степени злокачественности [13], в которых изучались патоморфологические факторы прогноза рецидива/прогрессирования заболевания, а также выживаемости, показал, что инвазия глубокой собственной пластины (стадия pT1a против pT1b) оказала наибольшее негативное влияние на исход заболевания.

Рекомендации по лечению варьируются от внутривезикулярной БЦЖ терапии / химиотерапии до повторной трансуретральной резекции мочевого пузыря и немедленной радикальной цистэктомии. К сожалению, прогностические модели и алгоритмы EORTC, разработанные для мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря не были выверены для опухолей высокой степени злокачественности T1. Точность прогноза результатов для этой группы пациентов остается неопределенной [131]. Решение предложить консервативное местное лечение с тщательным наблюдением вместо выполнения радикальной цистэктомии в настоящее время принимается в отсутствие подтвержденных прогностических биомаркеров.

Было предпринято несколько попыток найти причины прогрессирования рака мочевого пузыря T1 стадии высокой степени злокачественности на основе генетических мутаций, были оценены экспрессии генов в разных исследованиях [87]. Целевое секвенирование дало некоторые предварительные результаты при ретроспективном анализе [110].

При мышечно-инвазивных опухолях мочевого пузыря радикальная цистэктомия является стандартом лечения [56] и есть данные, показывающие, что даже 12-недельная отсрочка хирургического лечения может ухудшить прогноз заболевания [66]. Точно также отложенная цистэктомия у пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря может повлиять негативно на выживаемость, хотя на данный момент этот вопрос является спорным.

В некоторых случаях пациентам, которые относятся к группе высокого риска прогрессирования (опухоли Ta и T1 высокой степени

злокачественности), предлагают первичную цистэктомию при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря [19].

Есть несколько преимуществ в выполнении первичной цистэктомии у пациентов с опухолями T1G3. Во-первых, это позволяет урологу определить патоморфологическую стадию опухоли и оценить статус лимфатических узлов [212]. Кроме того, выполнение цистэктомии на ранней стадии позволяет выполнить нервосберегающую операцию с реконструктивным компонентом, что дает высокую вероятность восстановления половой и мочевыделительной функции, снижается риск рецидива. Однако, выполнение цистэктомии может сопровождаться развитием осложнений и летальными исходами, что побуждает многих пациентов склоняться в пользу сохранения мочевого пузыря. Если учесть тот факт, что у 30% пациентов с опухолями T1G3 после трансуретральной резекции мочевого пузыря не выявляется рецидивов заболевания [156], то необходимо проявлять осторожность при выборе тактики лечения. В настоящее время не хватает биомаркеров для стратификации пациентов в группы проведения цистэктомии или трансуретральной резекции. В связи с этим многие прибегают к цистэктомии только при выявлении рецидива или прогрессирования рака мочевого пузыря [199].

Таким образом, для выявления пациентов с высоким риском требуется определение дополнительных маркеров неблагоприятного прогноза заболевания. Факторами прогностической значимости на данный момент являются: p53, Ki67, VIRC5 (сурвивин), β -катенин, E-кадгерин и N-кадгерин.

Нарастание количества молекулярно-генетических событий в клетках опухоли играет большую роль в прогрессировании злокачественного процесса, что подтверждается большим количеством публикаций. Поиск специфических генов-маркеров неблагоприятного прогноза заболевания, их сочетаний и клинически значимых уровней экспрессии для определения

групп риска и последующего персонифицированного определения тактики лечения является важнейшим направлением развития клинической онкологии.

Целью нашей работы явилось улучшение результатов лечения пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря с учетом клинико-морфологических и молекулярно-генетических характеристик опухоли. Для достижения этой цели были сформулированы задачи, направленных на изучение молекулярно-генетического профиля опухолевой ткани МНИРМП, в слизистой оболочке мочевого пузыря после специализированного лечения, а так же в неизменной слизистой мочевого пузыря у больных с другими заболеваниями (пациенты с онкологическими болезнями иной локализации, ДГПЖ, МКБ) с последующим проведением сравнительного анализа молекулярно-генетического профиля в ткани первичной опухоли мочевого пузыря и слизистой оболочки мочевого пузыря без морфологического признака опухолевого роста у пациентов с МНИРМП и у других групп пациентов. Определить на основании проведения сравнительного анализа экспрессии генов специфические для МНИРМП маркеры с высокой чувствительностью и специфичностью, изучив их прогностическую значимость во взаимосвязи с количеством, размером и дифференцировкой опухоли, гематурией, ИМТ, возрастом, полом, курением, наследственностью пациентов. Проанализировать безрецидивную выживаемость после комбинированного лечения МНИРМП (ТУР + внутрипузырная химиотерапия) в первые 12 месяцев во взаимосвязи с разным уровнем экспрессии наиболее информативных генов и выделить прогностические группы риска рецидива МНИРМП. Разработать и обосновать оптимальный алгоритм лечения и обследования пациентов с МНИРМП с учетом выявленных молекулярно-генетических особенностей опухолевой ткани.

В исследование вошли 308 пациентов, получавших лечение и находящихся под динамическим наблюдением в ФГБУ РНЦРР МЗ России. 238 пациентов с МНИРМП. 125 первичных пациентов и 113 после специализированного лечения МНИРМП. После исключения пациентов не подходящих под критерии проводимого исследования (заключительное морфологическое исследование выявило мышечную инвазию или отсутствие злокачественной опухоли, незавершенная индукционная терапия или интраоперационная химиотерапия по причине возникших противопоказаний или не выполнения предписаний пациентом, неполноценное динамическое наблюдение) было выделено 3 группы пациентов: в 1 группу вошли больные (n=83) с диагнозом мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря, у которых производился забор тканей из опухоли, в последующем выполнялась ТУР и внутрипузырная химиотерапия докорубицином или митомицином. В качестве контроля взяты группы 2 и 3: группа 2 (n=81), пациенты, которым до момента включения в исследование было выполнено специальное лечение и на стадии динамического наблюдения производился забор тканей мочевого пузыря для выполнения молекулярно-генетического исследования; группа 3 (n=70) состояла из пациентов с онкологическими заболеваниями других локализаций, а также пациентов с гиперплазией и/или аденомой предстательной железы, которым при цистоскопии производился забор тканей мочевого пузыря и выполнялось молекулярно-генетическое исследование.

Методом полимеразной цепной реакции исследована экспрессия мРНК следующих генов: MGB1, CTSL2, BCL2, TERT, HER2, PTEN, BAG1, PGR, GREM1, MMP2, PAPPA, MMP7, IL2, MMP8, IL2Ra, IL6, IL12a, IL7, IL15, IL8, IL1b, IL10, TPA, IFN γ , CD45, TNF- α , C-MYC, BIRC5, CCND1, NDRG1, CD68, Ki67, CD56, TGFb, CD69, VEGFA189, TLR4, HLA-G1, TLR-7, HLA-G5, GATA2, Il-28a, LGALS1, Il-29, LIF, LIFR, CCNB1, ESR1, GRB7, MMP11, STK15, MYBL2, VEGFA121, BAX, VEGFA165, TLR2, P16INK4A, SCUBE2, MMP9, GSTM1, GNLV, P14ARF (P19ARF), IGF1, COX-2, IGF-2, CYP19A.

Подробно были рассмотрены клинические и анамнестические характеристики пациентов.

Согласно нашим данным при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря получено достоверное повышение экспрессии маркеров пролиферации: Ki67, CCNB1, MYBL2, TPA и маркеры ингибитора апоптоза - BIRC5. Ki-67 представляет собой ядерный белок, связанный с транскрипцией рибосомной РНК и является маркером клеточной пролиферации. Ki-67 гиперэкспрессируется в растущих раковых клетках, а наличие Ki-67 – позитивных опухолевых клеток указывает на плохой прогноз заболевания. Высокие уровни циклина B1 также могут быть связаны с со степенью инвазии и агрессивности опухоли, поэтому концентрацию циклина B1 можно использовать для определения прогноза онкологического заболевания (Митотический специфический циклин B1 у человека кодируется геном CCNB1). MYBL2 – ядерный белок, участвующий в поддержании клеточного цикла. На сегодняшний день выявлено, что при гиперэкспрессии MYBL2 ухудшается прогноз заболевания в том числе у пациентов с раком мочевого пузыря. TPA – это тканевой полипептидный антиген, используется как маркер пролиферации и дифференцировки неплоскоклеточных опухолей. Гиперэкспрессия TPA, BIRC5 наблюдается, по данным исследований, при раке мочевого пузыря.

Анализ выполнен на основе оценки информативности при помощи построения ROC-кривых и определения порога чувствительности и специфичности. У всех вышеуказанных маркеров уровень информативности был выше 75%, что позволило их отнести к высокоинформативным генам-маркерам мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря. На основании проведенных вычислений была выявлена группа маркеров, информативность которых была близка к 75% и которые, возможно, при большем количестве наблюдений могли бы считаться генами-маркерами. Эта группа получила название – маркеры, имеющие диагностическую ценность: PGR, ESR1, BCL2,

CD45, GRB7, IL-2, IL-12, IL-15, IL-7, p16INK4A, PAPPА, SCUBE2, TNF- α , VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, MMP2, MMP7, MMP11, CD68, CD69, CCND1, C-MYC, BAG1, IFN γ , TLR2, TLR4, TLR7, CYP19A (CYP19A1), COX2

Также была проанализирована экспрессия следующих генов: MGB1, CTSL2v, TERT, HER2, PTEN, GREM1, MMP8, IL2Ra, IL6, IL8, IL1b, IL10, NDRG1, CD56, TGFb, HLA-G1, HLA-G5, GATA2, IL-28a, LGALS1, IL-29, LIF, LIFR, STK15, BAX, MMP9, GSTM1, GNLY, P14ARF (P19ARF), IGF1, IGF2.

. Все они оказались неинформативными при данной стадии рака мочевого пузыря.

Выполнена оценка безрецидивной выживаемости в группе МНИРМП в зависимости от уровня экспрессии мРНК генов. Определено, что уровень экспрессии 7 белков достоверно коррелируют с выживаемостью: BIRC5, Ki67, CCNB1, MYBL2, MMP11, TLR2, STK15, четыре из которых отнесены к генам-маркерам (Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5) по данным нашего исследования.

При анализе зависимости экспрессируемых генов от клинических и анамнестических данных выявлено достоверная корреляция размера опухолевого узла и экспрессии MYBL2, TPA, p16INK4A и PAPPА ($p < 0,03$).

При анализе сочетаний факторов прогноза впервые в нашей работе установлена корреляция неблагоприятного прогноза с уровнем экспрессии сочетания генов MYBL2 >80 + TLR2 >70 (медиана безрецидивной выживаемости – 11,8 месяцев) и MYBL2 >80 + MMP11 >20 (медиана безрецидивной выживаемости – 11,9 месяцев), а также при сочетании прогностических онкобелков с высоким уровнем экспрессии BIRC5 >60 + Ki67 >35 (медиана БРВ - 12,7 месяцев) и безрецидивной выживаемости.

Анализ, проведенный многими исследователями, позволил разработать прогностические модели для оценки риска рецидива опухоли при МНИРМП. Среди них наиболее важными являются таблицы, разработанные European

Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) и Испанским Урологическим Обществом Лечения Рака (CUETO). Однако, факторами, ограничивающими использование этих моделей, являлось то, что пациенты, включенные в анализ, получали внутривезикулярную терапию различными препаратами, что могло оказать влияние на возникновение рецидива. Кроме того, в имеющихся моделях оценки риска развития рецидива опухоли, количество рецидивов в год имело высокую прогностическую значимость, но данный параметр не мог быть оценен у пациентов, у которых рак был диагностирован впервые. Также прогностические модели и алгоритмы EORTC, разработанные для мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря не были выверены для опухолей высокой степени злокачественности T1. Эти факторы дали основание для разработки новой прогностической модели, которая более точно может стратифицировать риск развития заболевания у пациентов с первичным раком мочевого пузыря и выработать правильный алгоритм лечения.

Таким образом, на основании данных нашей работы при помощи многомерного анализа экспрессии 4-х генов-маркеров (Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5 (сурвивин), а также на основании сочетаний гиперэкспрессии генов-маркеров (MYBL2 + TLR2, MYBL2 + MMP11 или BIRC5 + Ki67) и факторов неблагоприятного прогноза (cis, G3, размер >3 см, множественные очаги) выявлена корреляция гиперэкспрессии генов с рецидивом заболевания и безрецидивной выживаемостью. На основании данных публикаций за последние годы можно говорить о том, что впервые в нашей работе выполнен анализ экспрессии 66 генов при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря, выделены 5 высокоспецифичных и высокочувствительных генов с уровнем экспрессии достоверно выше в опухолевых тканях ($p < 0,05$) МНИРМП. На основании полученных нами данных пациенты были разделены на 4 группы, что позволило более точно определять тактику лечения больных мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря. Пациентам группы с низкой

экспрессией генов-маркеров (группа I) рекомендуется выполнение ТУР + 1 интраоперационная внутрпузырная ХТ с последующим динамическим наблюдением (контрольное обследование первый год каждые 3 месяца). Пациентам с повышением от 1 до 3-х генов-маркеров (группа II) - выполнение ТУР + химиотерапии (6-8 введений) с последующим динамическим наблюдением. Пациентам группы IIIa (все гены-маркеры повышены и/или высокий уровень экспрессии MYBL2 + TLR2, MYBL2 + MMP11 или BIRC5 + Ki67) при отсутствии неблагоприятных клинико-морфологических факторов прогноза - выполнение ТУР с последующей внутрпузырной БЦЖ терапией или химиотерапией (6-8 введений). Поддерживающая терапия 12 месяцев. У пациентов группы IIIb - решение вопроса о цистэктомии.

Впервые в нашей работе была изучена экспрессия 66 генов при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря, выявлена достоверная экспрессия группы генов, которые по результатам анализа БРВ признаны нами генами-маркерами неблагоприятного прогноза. Определены белки, которые не являются маркерами, но могут указать на предполагающий к прогрессированию профиль опухоли. Оценено влияние сочетаний генов-маркеров и факторов прогноза на безрецидивную выживаемость. На основании полученных данных предложен алгоритм лечения пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря.

Выводы

1. На основании выполненного анализа экспрессии мРНК 66 генов: MGB1, CTSL2, BCL2, TERT, HER2, PTEN, BAG1, PGR, GREM1, MMP2, PAPPА, MMP7, IL2, MMP8, IL2Ra, IL6, IL12a, IL7, IL15, IL8, IL1b, IL10, TPA, IFN γ , CD45, TNF- α , C-MYC, BIRC5, CCND1, NDRG1, CD68, Ki67, CD56, TGF β , CD69, VEGFA189, TLR4, HLA-G1, TLR-7, HLA-G5, GATA2, Il-28a, LGALS1, Il-29, LIF, LIFR, CCNB1, ESR1, GRB7, MMP11, STK15, MYBL2, VEGFA121, BAX, VEGFA165, TLR2, P16INK4A, SCUBE2, MMP9, GSTM1, GNLY, P14ARF (P19ARF), IGF1, COX-2, IFG-2, CYP19A получено достоверное повышение в опухолевой ткани МНИРМП экспрессии мРНК маркеров пролиферации: Ki67, CCNB1, MYBL2, TPA ($p < 0,0001$) и маркера ингибитора апоптоза BIRC5 ($p < 0,02$)
2. На основании проведенного сравнительного анализа молекулярно-генетического профиля опухолевой ткани МНИРМП, слизистой оболочки мочевого пузыря после специализированного лечения и других групп пациентов (онкологические болезни иной локализации, ДГПЖ, МКБ) определены пороги соотношения чувствительности и специфичности маркеров Ki67, CCNB1, MYBL2, TPA ($p < 0,0001$) и BIRC5 ($p < 0,02$). Информативность и специфичность составила свыше 75%, что позволяет считать их высокоинформативными генами-маркерами мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря.
3. Выявлена группа генов с средним уровнем информативности (более 50%): PGR, ESR1, BCL2, CD45, GRB7, IL-2, IL-12, Il-15, IL-7, p16INK4A, PAPPА, SCUBE2, TNF- α , VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, MMP2, MMP7, MMP11, CD68, CD69, CCND1, C-MYC, BAG1, IFN γ , TLR2, TLR4, TLR7, CYP19A (CYP19A1), COX2 Уровень экспрессии достоверно выше в опухолевых тканях

($p < 0,05$). Они могут иметь диагностическую ценность при формировании прогноза заболевания.

4. Обнаружена связь безрецидивной выживаемости с уровнем экспрессии мРНК 7 генов: BIRC5, Ki67, CCNB1, MYBL2, MMP11, TLR2, STK15 и сочетания генов MYBL2+TLR2, BIRC5 + Ki67, MYBL2+MMP11 ($p < 0,05$); К высокочувствительным маркерам негативного прогноза должны быть отнесены: Ki67, CCNB1, MYBL2 ($p < 0,0001$) и BIRC5 ($p < 0,02$).

5. На основании результатов анализа уровня экспрессии мРНК 4-х генов-маркеров (Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5) и сочетания MYBL2+TLR2, BIRC5 + Ki67, MYBL2+MMP11 пациенты были разделены на 4 группы по риску возникновения рецидива заболевания:

Группа I – все маркеры низкие. Медиана БРВ – 41,6 месяцев.

Группа II – Повышение от 1 до трех маркеров (Ki67, CCNB1, MYBL2, BIRC5) Медиана БРВ – 22,9 месяцев.

Группа IIIа – гиперэкспрессия мРНК всех генов-маркеров или сочетание гиперэкспрессии мРНК MYBL2+TLR2, BIRC5+Ki67, MYBL2+MMP11. Факторы неблагоприятного прогноза отсутствуют (cis, g3, более 3 очагов, опухоль >3см)

Группа IIIб - гиперэкспрессия мРНК или сочетание гиперэкспрессии мРНК MYBL2+TLR2, BIRC5+Ki67, MYBL2+MMP11 в сочетании с неблагоприятными факторами прогноза. Медиана БРВ – 13 месяцев.

6. На основании разделения пациентов на группы прогноза рецидива заболевания разработан алгоритм лечения:

I – ТУР + 1 интраоперационная внутривузырная ХТ с последующим динамическим наблюдением.

II - выполнение ТУР + химиотерапии (6-8 введений)

с последующим динамическим наблюдением

Ша – выполнение ТУР с последующей внутрипузырной БЦЖ терапией или химиотерапией (6-8 введений). Поддерживающая терапия 12 мес.

Шб – решение вопроса о цистэктомии

Практические рекомендации

1. Для оценки рисков прогрессии и рецидива МНИРМП, целесообразно дополнить морфологическое исследование удаленных тканей при ТУР мочевого пузыря молекулярно-генетическим исследованием для определения экспрессии генов: BIRC5, Ki67, CCNB1, MYBL2, MMP11, TLR2.
2. Учитывая данные нашего исследования, выявившего корреляцию безрецидивной выживаемости с уровнем экспрессии мРНК генов-маркеров и их сочетаний, в том числе у пациентов из благоприятной группы прогноза (по данным клинико-морфологических характеристик), молекулярно-генетическое исследование опухоли должно выполняться всем первичным больным с МНИРМП, вне зависимости от предполагаемой группы риска.
3. Сочетание гиперэкспрессии мРНК MYBL2+TLR2 ($p=0,051$), BIRC5 + Ki67 ($p=0,024$), MYBL2+MMP11 ($p=0,025$) определяет группу неблагоприятного прогноза МНИРМП, с самой низкой медианой БРВ. В связи с чем определение молекулярно-генетического профиля МНИРМП по генам-маркерам должно быть дополнено прогностически-значимыми генами MMP11, TLR2.
4. Пороговые значения генов-маркеров неблагоприятного прогноза МНИРМП (наилучшее соотношение чувствительности и специфичности):
Ki-67 – 30; CCNB1- 83; MYBL2 – 60; TPA – 300; BIRC5 – 16;
5. Распределение пациентов в группы неблагоприятного прогноза выполняется по сочетаниям пороговых значений генов:
MYBL2 >80 + TLR2 > 70; MYBL2 > 80 + MMP11 > 20;
BIRC5 >60 + Ki67 > 35

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башкатов С.В., Немцова М.В., Карякин О.Б. Клиническое значение молекулярно-генетических изменений в клетках уротелия при раке мочевого пузыря. *Онкоурология*. 2006;3:54-8.
2. Котенко Д.В. Применение иммуноонкологических препаратов в лечении местно-распространенного и метастатического рака мочевого пузыря в качестве моно- и комбинированной терапии (обзор клинических исследований). *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2019;8(6):466-470.
3. Кочан Е.А. Молекулярно-генетические основы канцерогенеза. *Российский журнал гастроэнтерологии, колопроктологии*. 2002;3: 32-36.
4. Немцова М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярный патогенез рака мочевого пузыря. *Альманах клинической медицины*. 2015;41: 79-88.
5. Олейник Е.К., Шibaев М.И., Игнатъев К.С. и др. Микроокружение опухоли: формирование иммунного профиля. *Медицинская иммунология*. 2020;22(2): 207-220.
6. Рак мочевого пузыря. 2-е издание под редакцией М.И. Кочана. 2019, Издательство Медконгресс.
7. Слепов Е.В., Башмакова Е.Е., Панамарев Н.С. и др. Белок сурвивин как перспективный маркер диагностики и лечения злокачественных новообразований. *Эффективная фармакотерапия*. 2021;2: 58-63.
8. Цеденова К.О., Комаров М.И., Панахова А.Д. и др. Мелкоклеточный рак мочевого пузыря. Обзор литературы. *Онкоурология* 2018;14(4): 103-9.
9. Abraham SN, Miao Y. The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(10): 655-663.
10. Ajili F, Kaabi B, Darouiche A, Tounsi H, Kourda N, Chebil M, et al. Prognostic value of Bcl-2 and Bax tumor cell expression in patients with non muscle-invasive bladder cancer receiving bacillus Calmette–Guerin immunotherapy. *Ultrastruct Pathol*. 2012;36: 31–39.

11. An, Y. et al. Meta-analysis of the relationship between slow acetylation of N-acetyl transferase 2 and the risk of bladder cancer. *Genet. Mol. Res.* 2015;14: 16896–16904.
12. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *Eur Urol* 2017;71: 96–108.
13. Apollo A, Ortenzi V, Scatena C et al. Molecular characterization of low grade and high grade bladder cancer. *PLoS ONE* 2019;14(1): e0210635.
14. Arends, T.J.H.; Nativ, O.; Maffezzini, M.; de Cobelli, O.; Canepa, G.; Verweij, F.; Moskovitz, B.; van der Heijden, A.G.; Witjes, J.A. Results of a Randomised Controlled Trial Comparing Intravesical Chemohyperthermia with Mitomycin C Versus Bacillus Calmette-Guérin for Adjuvant Treatment of Patients with Intermediate- and High-Risk Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur. Urol.* 2016;69: 1046–1052.
15. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ* 2018;25(1): 104–113.
16. Aveyard, J.S.; Skilleter, A.; Habuchi, T.; Knowles, M.A. Somatic Mutation of PTEN in Bladder Carcinoma. *Br. J. Cancer* 1999;80: 904–908.
17. Ayari C, Bergeron A, LaRue H, Ménard C, Fradet Y. Toll-like receptors in normal and malignant human bladders. *J Urol.* 2011;185(5): 1915-1921.
18. Babjuk, M.; Böhle, A.; Burger, M.; Capoun, O.; Cohen, D.; Compérat, E.M.; Hernández, V.; Kaasinen, E.; Palou, J.; Rouprêt, M.; et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur. Urol.* 2017;71: 447–461.
19. Babjuk, M.; Burger, M.; Compérat, E.M.; Gontero, P.; Mostafid, A.H.; Palou, J.; van Rhijn, B.W.G.; Rouprêt, M.; Shariat, S.F.; Sylvester, R.; et al. European Association of Urology Guidelines on Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ)—2019 Update. *Eur. Urol.* 2019;76: 639–657.

20. Balbás-Martínez, C. et al. Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. *Nat. Genet.* 2013;45: 1464–1469.
21. Basith S, Manavalan B, Yoo TH, Kim SG, Choi S. Roles of toll- like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Arch Pharm Res.* 2012;35(8): 1297-1316.
22. Bayley R., C. Ward, P. Garcia, MYBL2 amplification in breast cancer: Molecular mechanisms and therapeutic potential, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, 2020;(2020): 188407.
23. Bennink R, H Van Poppel, J Billen et al. Serum tissue polypeptide antigen (TPA): monoclonal or polyclonal radioimmunometric assay for the follow-up of bladder cancer. *Anticancer Res.* 1999;19: 2609-2614.
24. Berdik, C. Unlocking Bladder Cancer. *Nature* 2017, 551, S34–S35.
25. Bessa M., M. Joaquin, F. Tavner, M. K. Saville, R. J. Watson, Regulation of the cell cycle by B-Myb, *Blood Cells Mol. Dis.*, 2001;2: 416–421.
26. Billerey, C.; Chopin, D.; Aubriot-Lorton, M.H.; Ricol, D.; Gil Diez de Medina, S.; Van Rhijn, B.; Bralet, M.P.; Lefrere-Belda, M.A.; Lahaye, J.B.; Abbou, C.C.; et al. Frequent FGFR3 Mutations in Papillary Non-Invasive Bladder (PTa) Tumors. *Am. J. Pathol.* 2001;158: 1955–1959.
27. Blaveri, E.; Simko, J.P.; Korkola, J.E.; Brewer, J.L.; Baehner, F.; Mehta, K.; DeVries, S.; Koppie, T.; Pejavar, S.; Carroll, P.; et al. Bladder Cancer Outcome and Subtype Classification by Gene Expression. *Clin. Cancer Res.* 2005;11: 4044–4055.
28. Boehringer Ingelheim. LUX-Bladder 1: Phase II Open Label Single Arm Exploratory Trial of Oral Afatinib Monotherapy Following Platinum Failure for Patients with Advanced/Metastatic Urothelial Tract Carcinoma with Genetic Alterations in ERBB Receptors.; Boehringer Ingelheim: Ingelheim am Rhein, Germany, 2019; Clinical trial registration NCT02780687; clinicaltrials.gov.
29. Bosschieter, J.; Nieuwenhuijzen, J.A.; van Ginkel, T.; Vis, A.N.; Witte, B.; Newling, D.; Beckers, G.M.A.; van Moorselaar, R.J.A. Value of an Immediate Intravesical Instillation of Mitomycin C in Patients with Non–Muscle-Invasive

- Bladder Cancer: A Prospective Multicentre Randomised Study in 2243 Patients. *Eur. Urol.* 2018;73: 226–232.
30. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll- like receptors. *Structure.* 2011;19(4): 447-459.
 31. Boulay A, Masson R, Chenard MP, et al. High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer Res.* 2001;61(5):2189–2193.
 32. Brandt WD, Matsui W, Rosenberg JE, et al. Urothelial carcinoma: stem cells on the edge. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(3-4):291–304.
 33. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016;39(1): 98-106.
 34. Burger, M. et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur. Urol.* 2013;63: 234–241.
 35. Byrne RR, Shariat SF, Brown R, Kattan MW, Morton RAJR, Wheeler TM, et al. E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term follow up. *J Urol.* 2001;165: 1473–1479.
 36. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014;507: 315–322.
 37. Carlsson, J.; Wester, K.; De La Torre, M.; Malmström, P.-U.; Gårdmark, T. EGFR-Expression in Primary Urinary Bladder Cancer and Corresponding Metastases and the Relation to HER2-Expression. On the Possibility to Target These Receptors with Radionuclides. *Radiol. Oncol.* 2015, 49, 50–58.
 38. Chan K.S, Espinosa I, Chao M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(33):14016–14021.
 39. Chang, M.T.; Penson, A.; Desai, N.B.; Socci, N.D.; Shen, R.; Seshan, V.E.; Kundra, R.; Abeshouse, A.; Viale, A.; Cha, E.K.; et al. Small Cell Carcinomas of the Bladder and Lung Are Characterized by a Convergent but Distinct Pathogenesis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2018;24: 1965–1973.

40. Chaturvedi V, Li L, Hodges S, et al. Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 17 alterations in human urinary bladder neoplasia. *Oncogene*. 1997;14(17):2059–2070.
41. Chen C, Liu X, Jiang J et al. Matrix Metalloproteinase 11 is a Potential Biomarker in Bladder Cancer Diagnosis and Prognosis. *OncoTargets and Therapy* 2020;13:9059–9069.
42. Choi, W.; Czerniak, B.; Ochoa, A.; Su, X.; Siefker-Radtke, A.; Dinney, C.; McConkey, D.J. Intrinsic Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Nat. Rev. Urol.* 2014;11: 400–410.
43. Choi, W.; Porten, S.; Kim, S.; Willis, D.; Plimack, E.R.; Hoffman-Censits, J.; Roth, B.; Cheng, T.; Tran, M.; Lee, I.-L.; et al. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell* 2014;25: 152–165.
44. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 1999;274(16): 10689-10692.
45. Chu P.G., L.M. Weiss. Keratin expression in human tissue and neoplasms. *Histopathology*. 2002;40: 403-439.
46. Clark, P.E.; Agarwal, N.; Biagioli, M.C.; Eisenberger, M.A.; Greenberg, R.E.; Herr, H.W.; Inman, B.A.; Kuban, D.A.; Kuzel, T.M.; Lele, S.M.; et al. Bladder Cancer. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2013;11: 446–475.
47. Coogan, C.L.; Estrada, C.R.; Kapur, S.; Bloom, K.J. HER-2/Neu Protein Overexpression and Gene Amplification in Human Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Urology* 2004;63: 786–790.
48. Cordon-Cardo, C.; Zhang, Z.-F.; Dalbagni, G.; Drobnjak, M.; Charytonowicz, E.; Hu, S.-X.; Xu, H.-J.; Reuter, V.E.; Benedict, W.F. Cooperative Effects of P53 and PRB Alterations in Primary Superficial Bladder Tumors. *Cancer Res.* 1997, 57, 1217–1221.

49. Cui J, Chen S, Bo Q et al. Preoperative prognostic nutritional index and nomogram predicting recurrence-free survival in patients with primary non-muscle-invasive bladder cancer without carcinoma in situ. *Onco Targets Ther* 2017;10: 5541–5550.
50. Cumberbatch, M. G., Windsor-Shellard, B. & Catto, J. W. F. The contemporary landscape of occupational bladder cancer within the United Kingdom: a meta-analysis of risks over the last 80 years. *BJU Int.* 2017;119: 100–109.
51. Czerniak B, Chaturvedi V, Li L, et al. Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 9 in progression of human urinary bladder neoplasia: implications for a genetic model of multistep urothelial carcinogenesis and early detection of urinary bladder cancer. *Oncogene.* 1999;18(5):1185–1196.
52. Dalbagni, G.; Vora, K.; Kaag, M.; Cronin, A.; Bochner, B.; Donat, S.M.; Herr, H.W. Clinical Outcome in a Contemporary Series of Restaged Patients with Clinical T1 Bladder Cancer. *Eur. Urol.* 2009;56: 903–910.
53. Damrauer, J.S.; Hoadley, K.A.; Chism, D.D.; Fan, C.; Tiganelli, C.J.; Wobker, S.E.; Yeh, J.J.; Milowsky, M.I.; Iyer, G.; Parker, J.S.; et al. Intrinsic Subtypes of High-Grade Bladder Cancer Reflect the Hallmarks of Breast Cancer Biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014;111: 3110–3115.
54. Ding W, Gou Y, Sun C et al. Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC. *Urol Oncol* 2014;32(1): 42.e13–19.
55. Douillard, J.-Y.; Oliner, K.S.; Siena, S.; Tabernero, J.; Burkes, R.; Barugel, M.; Humblet, Y.; Bodoky, G.; Cunningham, D.; Jassem, J.; et al. Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. Available online: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1305275?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov (accessed on 16 April 2020).

56. Du J, Wang S, Yang Q, Chen Q, Yao X. p53 status correlates with the risk of progression in stage T1 bladder cancer: a meta-analysis. *World J Surg Oncol.* 2016;14: 137.
57. Dutta, P.R.; Maity, A. Cellular Responses to EGFR Inhibitors and Their Relevance to Cancer Therapy. *Cancer Lett.* 2007;254: 165–177.
58. Efsthathiou, J.A.; Mouw, K.W.; Gibb, E.A.; Liu, Y.; Wu, C.-L.; Drumm, M.R.; da Costa, J.B.; du Plessis, M.; Wang, N.Q.; Davicioni, E.; et al. Impact of Immune and Stromal Infiltration on Outcomes Following Bladder-Sparing Trimodality Therapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur. Urol.* 2019;76: 59–68.
59. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med.* 1994;331: 1259–1264.
60. Esteller, M. Epigenetics in Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008;358: 1148–1159.
61. Fahmy, N.M.; Mahmud, S.; Aprikian, A.G. Delay in the Surgical Treatment of Bladder Cancer and Survival: Systematic Review of the Literature. *Eur. Urol.* 2006;50: 1176–1182.
62. Farsund T. Cell kinetics of mouse urinary bladder epithelium, II: changes in proliferation and nuclear DNA content during necrosis regeneration, and hyperplasia caused by a single dose of cyclophosphamide. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1976;21(4):279–298.
63. Ferlay, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 2015;136: E359–E386.
64. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E et al. Predicting non-muscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmetie–Guerin: the CUETO scoring model. *J Urol* 2009;182(5): 2195–2203.
65. Filella X.. V. Menendez, R. Molina et al. TPA prognostic value in superficial bladder. *Anticancer Res.* 1996;16: 2173-2175.
66. Fleischmann, A.; Rotzer, D.; Seiler, R.; Studer, U.E.; Thalmann, G.N. Her2 Amplification Is Significantly More Frequent in Lymph Node Metastases from

- Urothelial Bladder Cancer than in the Primary Tumours. *Eur. Urol.* 2011;60: 350–357.
67. Freedman, N. D., Silverman, D. T., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A. & Abnet, C. C. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 2011;306: 737–745.
68. Friedman GD, Hiatt RA, Quesenberry CP, Jr, Selby JV, Weiss NS. Problems in assessing screening experience in observational studies of screening efficacy: example of urinalysis screening for bladder cancer. *J Med Screen.* 1995;2: 219–223.
69. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994;124(4): 619–626.
70. Frstrup N, Ulhøi BP, Birkenkamp-Demtröder K, Mansilla F, Sanchez-Carbayo M, Segersten U, et al. Cathepsin E, maspin, Plk1, and survivin are promising prognostic protein markers for progression in non-muscle invasive bladder cancer. *Am J Pathol.* 2012;180: 1824–1834.
71. Fritsche H-M, Burger M, Svatek RS, Jeldres C, Karakiewicz PI, Novara G, et al. Characteristics and outcomes of patients with clinical T1 grade 3 urothelial carcinoma treated with radical cystectomy: results from an international cohort. *Eur Urol.* 2010;57: 300–309.
72. Fuster O., M. Llop, S. Dolz, P. Garcíab, E. Suchc, M. Ibáñez, et al., Adverse prognostic value of MYBL2 overexpression and association with microRNA-30 family in acute myeloid leukemia patients, *Leuk. Res.* 2013;12: 1690–1696.
73. Garcia, J.A.; Danielpour, D. MTOR Inhibition as a Therapeutic Strategy in the Management of Urologic Malignancies. *Mol. Cancer Ther.* 2008;7: 1347–1354.
74. Ghervan, L.; Zaharie, A.; Ene, B.; Elec, F.I. Small-Cell Carcinoma of the Urinary Bladder: Where Do We Stand? *Clujul Med.* 2017;90: 13–17.
75. Gildea, J.J.; Harding, M.A.; Seraj, M.J.; Gulding, K.M.; Theodorescu, D. The Role of Ral A in Epidermal Growth Factor Receptor-Regulated Cell Motility. *Cancer Res.* 2002;62: 982–985.

76. Gildea, J.J.; Herlevsen, M.; Harding, M.A.; Gulding, K.M.; Moskaluk, C.A.; Frierson, H.F.; Theodorescu, D. PTEN Can Inhibit in Vitro Organotypic and in Vivo Orthotopic Invasion of Human Bladder Cancer Cells Even in the Absence of Its Lipid Phosphatase Activity. *Oncogene* 2004;23: 6788–6797.
77. Gion M, P. Boracchi, R. Dittadi et al. Quantitative measurement of soluble cytokeratin fragments in tissue cytosol of 599 node negative breast cancer patients: a prognostic marker possibly associated with apoptosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;59: 211-221.
78. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The global burden of cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015;1: 505–527.
79. Gopalakrishnan D, Koshkin VS, Ornstein MC, Papatsoris A, Grivas P. Immune checkpoint inhibitors in urothelial cancer: recent updates and future outlook. *Ther Clin Risk Manag.* 2018;14: 1019-1040.
80. Grossman, H.B.; Liebert, M.; Antelo, M.; Dinney, C.P.; Hu, S.X.; Palmer, J.L.; Benedict, W.F. P53 and RB Expression Predict Progression in T1 Bladder Cancer. *Clin. Cancer Res.* 1998, 4, 829–834.
81. Guan Z., W. Cheng, D. Huang, A. Wei, High MYBL2 expression and transcription regulatory activity is associated with poor overall survival in patients with hepatocellular carcinoma, *Curr. Res. Transl. Med.* 2018;1: 27–32.
82. Guey, L. T. et al. Genetic susceptibility to distinct bladder cancer subphenotypes. *Eur. Urol.* 2010; 57: 283–292.
83. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5): 646-674.
84. Hargadon, K.M.; Johnson, C.E.; Williams, C.J. Immune Checkpoint Blockade Therapy for Cancer: An Overview of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors. *Int. Immunopharmacol.* 2018;62: 29–39.
85. Hashim, D. & Boffetta, P. Occupational and environmental exposures and cancers in developing countries. *Ann. Glob. Health* 2014;80: 393–411.

86. He X, Marchionni L, Hansel DE, et al. Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma. *Stem Cells*. 2009; 27(7):1487–1495.
87. Hedegaard, J.; Lamy, P.; Nordentoft, I.; Algaba, F.; Høyer, S.; Ulhøi, B.P.; Vang, S.; Reinert, T.; Hermann, G.G.; Mogensen, K.; et al. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell* 2016; 30: 27–42.
88. Hemmi H, Akira S. TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy*. 2005;86: 120-135.
89. Herrmann E, Eltze E, Bierer S, Köpke T, Gorge T, Neumann J, et al. VEGF-C, VEGF-D and Flt-4 in transitional bladder cancer: relationships to clinicopathological parameters and long-term survival. *Anticancer Res*. 2007;27: 3127–3133.
90. Hosen, I.; Rachakonda, P.S.; Heidenreich, B.; de Verdier, P.J.; Ryk, C.; Steineck, G.; Hemminki, K.; Kumar, R. Mutations in TERT Promoter and FGFR3 and Telomere Length in Bladder Cancer. *Int. J. Cancer* 2015;137: 1621–1629.
91. Huang, L.; Fu, L. Mechanisms of Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B* 2015;5: 390–401.
92. Hussain, M.; Daignault, S.; Agarwal, N.; Grivas, P.D.; Siefker-Radtke, A.O.; Puzanov, I.; MacVicar, G.R.; Levine, E.G.; Srinivas, S.; Twardowski, P.; et al. Randomized Phase 2 Trial of Gemcitabine/Cisplatin with or without Cetuximab in Patients with Advanced Urothelial Carcinoma. *Cancer* 2014;120: 2684–2693.
93. Hussain, T.A.; Akhtar, M. Molecular Basis of Urinary Bladder Cancer. *Adv. Anat. Pathol.* 2013, 20, 53–60.
94. Ieda T, Muto S, Shimizu F et al. Development and validation of a novel recurrence risk stratification for initial non-muscle invasive bladder cancer in Asia. *EBioMedicine* 2016;12: 98–104.
95. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: a molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res* 2015; 141(4): 389–397.
96. Jeon C., Kim M., Kwak C. et al. Prognostic role of survivin in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis // *PLoS One*. 2013;8(10): e76719.

97. Kamat AM, Gee JR, Dinney CP, Grossman HB, Swanson DA, Millikan RE, Detry MA, Robinson TL, Pisters LL: The case for early cystectomy in the treatment of nonmuscle invasive micropapillary bladder carcinoma. *J Urol* 2006;175: 881–885.
98. Kamat, A.M.; Flaig, T.W.; Grossman, H.B.; Konety, B.; Lamm, D.; O'Donnell, M.A.; Uchio, E.; Efstathiou, J.A.; Taylor, J.A. Consensus Statement on Best Practice Management Regarding the Use of Intravesical Immunotherapy with BCG for Bladder Cancer. *Nat. Rev. Urol.* 2015;12: 225–235.
99. Kamat, A.M.; Hahn, N.M.; Efstathiou, J.A.; Lerner, S.P.; Malmström, P.-U.; Choi, W.; Guo, C.C.; Lotan, Y.; Kassouf, W. Bladder Cancer. *Lancet* 2016;388: 2796–2810.
100. Kamoun, A.; de Reyniès, A.; Allory, Y.; Sjö Dahl, G.; Robertson, A.G.; Seiler, R.; Hoadley, K.A.; Groeneveld, C.S.; Al-Ahmadie, H.; Choi, W.; et al. A Consensus Molecular Classification of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur. Urol.* 2019.
101. Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Roehrborn CG, et al. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. *Lancet Oncol.* 2007;8: 128–136.
102. Kardos, J.; Chai, S.; Mose, L.E.; Selitsky, S.R.; Krishnan, B.; Saito, R.; Iglesia, M.D.; Milowsky, M.I.; Parker, J.S.; Kim, W.Y.; et al. Claudin-Low Bladder Tumors Are Immune Infiltrated and Actively Immune Suppressed. *JCI Insight* 1 2016;1: e85902.
103. Kassouf, W.; Agarwal, P.K.; Grossman, H.B.; Leibovici, D.; Munsell, M.F.; Siefker-Radtke, A.; Pisters, L.L.; Swanson, D.A.; Dinney, C.P.N.; Kamat, A.M. Outcome of Patients with Bladder Cancer with PN+ Disease after Preoperative Chemotherapy and Radical Cystectomy. *Urology* 2009;73: 147–152.
104. Kates, M.; Matoso, A.; Choi, W.; Baras, A.S.; Daniels, M.J.; Lombardo, K.; Brant, A.; Mikkilineni, N.; McConkey, D.J.; Kamat, A.M.; et al. Adaptive Immune Resistance to Intravesical BCG in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: Implications for Prospective BCG Unresponsive Trials. *Clin. Cancer Res.* 2019.

105. Kiemeny, L. A. et al. A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat. Genet.* 2010;42: 415–419.
106. Kiemeny, L. A. et al. Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat. Genet.* 2008;40: 1307–1312.
107. Kim HS, Ku JH, Kim SJ et al. Prognostic Factors for recurrence and progression in Korean non-muscle-invasive bladder cancer patients: a retrospective, multi-institutional study. *Yonsei Med J* 2016;57(4): 855–864.
108. Kim MS, Jeong J, Majewski T, et al. Evidence for alternative candidate genes near RB1 involved in clonal expansion of in situ urothelial neoplasia. *Lab Invest.* 2006;86(2):175–190.
109. Kim S-K, Roh Y-G, Park K, Kang T-H, Kim W-J, Lee J-S, Leem S-H, Chu I-S. Expression signature defined by FOXM1-CCNB1 activation predicts disease recurrence in non-muscle-invasive bladder cancer. *Clinical Cancer Research* 2014;20(12): 3233–3243.
110. Kim, J.; Kwiatkowski, D.; McConkey, D.J.; Meeks, J.J.; Freeman, S.S.; Bellmunt, J.; Getz, G.; Lerner, S.P. The Cancer Genome Atlas Expression Subtypes Stratify Response to Checkpoint Inhibition in Advanced Urothelial Cancer and Identify a Subset of Patients with High Survival Probability. *Eur. Urol.* 2019;75: 961–964.
111. Kiss, B.; Wyatt, A.W.; Douglas, J.; Skuginna, V.; Mo, F.; Anderson, S.; Rotzer, D.; Fleischmann, A.; Genitsch, V.; Hayashi, T.; et al. Her2 Alterations in Muscle-Invasive Bladder Cancer: Patient Selection beyond Protein Expression for Targeted Therapy. *Sci. Rep.* 2017, 7.
112. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(1): 25-41.
113. Knowles, M.A.; Hurst, C.D. Molecular Biology of Bladder Cancer: New Insights into Pathogenesis and Clinical Diversity. *Nat. Rev. Cancer* 2015, 15, 25–41.

114. Koshkin, V.S.; O'Donnell, P.; Yu, E.Y.; Grivas, P. Systematic Review: Targeting HER2 in Bladder Cancer. *Bladder Cancer* 2019;5: 1–12.
115. Kurzrock EA, Lieu DK, Degraffenried LA, Chan CW, Isseroff RR. Label retaining cells of the bladder: candidate urothelial stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(6): F1415–F1421.
116. Lambert EH, Pierorazio PM, Olsson CA, Benson MC, McKiernan JM, Poon S: The increasing use of intravesical therapies for stage T1 bladder cancer coincides with decreasing survival after cystectomy. *BJU Int* 2007;100: 33–36.
117. Lammers RJM, Hendriks JCM, Rodriguez FO et al. Prediction model for recurrence probabilities after intravesical chemotherapy in patients with intermediate-risk non-muscle-invasive bladder cancer, including external validation. *World J Urol* 2016;34: 173–180.
118. Lane, C.M. Alexander. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Cancer Biol.* 1990;2707-2714.
119. Lee S, Jeong J, Majewski T, et al. Forerunner genes contiguous to RB1 contribute to the development of in situ neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(34):13732–13737.
120. Li S, Liu X, Liu T, et al. Identification of Biomarkers Correlated with the TNM Staging and Overall Survival of Patients with Bladder Cancer. *Front Physiol.* 2017;8: 94.
121. Li WM, Wei YC, Huang CN, et al. Matrix metalloproteinase-11 as a marker of metastasis and predictor of poor survival in urothelial carcinomas. *J Surg Oncol.* 2016;113(6): 700–707.
122. Lindman H, T. Jansson, H. Arnberg et al. Serum Markers TPs, TPA and CF 15-3 as monitors of chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *J, Tumor Marker Oncol.* 2000;15: 177-186.
123. Loriot, Y.; Necchi, A.; Park, S.H.; Garcia-Donas, J.; Huddart, R.; Burgess, E.; Fleming, M.; Rezazadeh, A.; Mellado, B.; Varlamov, S.; et al. Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2019;381: 338–348.

124. Lu C.D., Altieri D.C., Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas // *Cancer Res.* 1998;58(9): 1808–1812.
125. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single- stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(15): 5598-5603.
126. Maida, F.D.; Mari, A.; Gesolfo, C.S.; Cangemi, A.; Allegro, R.; Sforza, S.; Cocci, A.; Tellini, R.; Masieri, L.; Russo, A.; et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Cell Expression During Adjuvant Treatment After Transurethral Resection for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A New Potential Tool to Identify Patients at Higher Risk of Disease Progression. *Clin. Genitourin. Cancer* 2019;17: e751–e758.
127. Majewski T, Lee S, Jeong J, et al. Understanding the development of human bladder cancer by using a whole-organ genomic mapping strategy. *Lab Invest.* 2008;88(7):694–721.
128. Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Capitanio U, et al. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101: 114–119.
129. Margulis V, Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease. *Clin Cancer Res.* 2006;12: 7369–7373.
130. Mariathasan, S.; Turley, S.J.; Nickles, D.; Castiglioni, A.; Yuen, K.; Wang, Y.; Kadel, E.E.; Koeppen, H.; Astarita, J.L.; Cubas, R.; et al. TGF- β Attenuates Tumour Response to PD-L1 Blockade by Contributing to Exclusion of T Cells. *Nature* 2018, 554, 544–548.
131. Martin-Doyle W, Leow JJ, Orsola A, Chang SL, Bellmunt J. Improving selection criteria for early cystectomy in high-grade t1 bladder cancer: a meta-analysis of 15,215 patients. *J Clin Oncol* 2015;33: 643–50.

132. Martinez, V.G.; Munera-Maravilla, E.; Bernardini, A.; Rubio, C.; Suarez-Cabrera, C.; Segovia, C.; Lodewijk, I.; Dueñas, M.; Martínez-Fernández, M.; Paramio, J.M. Epigenetics of Bladder Cancer: Where Biomarkers and Therapeutic Targets Meet. *Front. Genet.* 2019; 10.
133. Marzouka, N.; Eriksson, P.; Rovira, C.; Liedberg, F.; Sjö Dahl, G.; Höglund, M. A Validation and Extended Description of the Lund Taxonomy for Urothelial Carcinoma Using the TCGA Cohort. *Sci. Rep.* 2018;8: 1–12.
134. Matziari M, Dive V, Yiotakis A. Matrix metalloproteinase 11 (MMP-11; stromelysin-3) and synthetic inhibitors. *Med Res Rev.* 2007;27(4): 528–552.
135. Maulard C, ME Toubert, Y. Chretien et al. Serum Tissue polypeptide antigen (S-TPA) in bladder cancer as a tumor marker. A prospective study. *Cancer.* 1994;73: 394-398.
136. Maulard-Durdux C, ME Toubert, C. Hennquin et al. Serum tissue polypeptide antigen in bladder cancer as a tumor marker: a prospective study. *J. Clin Oncol.* 1997;15: 3446-3450.
137. McConkey, D.J.; Choi, W.; Marquis, L.; Martin, F.; Williams, M.B.; Shah, J.; Svatek, R.; Das, A.; Adam, L.; Kamat, A.; et al. Role of Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Drug Sensitivity and Metastasis in Bladder Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28: 335–344.
138. McConkey, D.J.; Choi, W.; Shen, Y.; Lee, I.-L.; Porten, S.; Matin, S.F.; Kamat, A.M.; Corn, P.; Millikan, R.E.; Dinney, C.; et al. A Prognostic Gene Expression Signature in the Molecular Classification of Chemotherapy-Naïve Urothelial Cancer Is Predictive of Clinical Outcomes from Neoadjuvant Chemotherapy: A Phase 2 Trial of Dose-Dense Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin with Bevacizumab in Urothelial Cancer. *Eur. Urol.* 2016;69: 855–862.
139. Meeks, J.J.; Carneiro, B.A.; Pai, S.G.; Oberlin, D.T.; Rademaker, A.; Fedorchak, K.; Balasubramanian, S.; Elvin, J.; Beaubier, N.; Giles, F.J. Genomic

- Characterization of High-Risk Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. *Oncotarget* 2016, 7, 75176–75184.
140. Memon, A.A.; Sorensen, B.S.; Melgard, P.; Fokdal, L.; Thykjaer, T.; Nexø, E. Expression of HER3, HER4 and Their Ligand Heregulin-4 Is Associated with Better Survival in Bladder Cancer Patients. *Br. J. Cancer* 2004, 91, 2034–2041.
141. Mitra AP, Lerner SP. Potential role for targeted therapy in muscle-invasive bladder cancer: lessons from the cancer genome atlas and beyond. *Urol Clin North Am.* 2015;42: 201–215.
142. Mo, Q.; Nikolos, F.; Chen, F.; Tramel, Z.; Lee, Y.-C.; Hayashi, K.; Xiao, J.; Shen, J.; Chan, K.S. Prognostic Power of a Tumor Differentiation Gene Signature for Bladder Urothelial Carcinomas. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2018;110: 448–459.
143. Montazeri, K.; Bellmunt, J. Erdafitinib for the Treatment of Metastatic Bladder Cancer. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 2020, 13, 1–6.
144. Moolgavkar, S. H. & Stevens, R. G. Smoking and cancers of bladder and pancreas: risks and temporal trends. *J. Natl Cancer Inst.* 1981;67: 15–23.
145. Morrison, C.D.; Liu, P.; Woloszynska-Read, A.; Zhang, J.; Luo, W.; Qin, M.; Bshara, W.; Conroy, J.M.; Sabatini, L.; Vedell, P.; et al. Whole-Genome Sequencing Identifies Genomic Heterogeneity at a Nucleotide and Chromosomal Level in Bladder Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014; 111: E672–E681.
146. Murad YM, Clay TM. CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic applications in cancer. *BioDrugs.* 2009;23(6): 361-375.
147. Necchi, A.; Raggi, D.; Gallina, A.; Ross, J.S.; Farè, E.; Giannatempo, P.; Marandino, L.; Colecchia, M.; Lucianò, R.; Bianchi, M.; et al. Impact of Molecular Subtyping and Immune Infiltration on Pathological Response and Outcome Following Neoadjuvant Pembrolizumab in Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur. Urol.* 2020;77: 701–710.
148. Nicolini A., M. Caciagli, F. Zampieri et al. Usefulness of CEA, TPA, GICA, CF 72-4 and CF 195 in the diagnosis of primary colorectal cancer and its relapse. *Cancer Detect Prev.* 1995;19: 183-195.

149. Nordentoft, I. et al. Mutational context and diverse clonal development in early and late bladder cancer. *Cell Rep.* 7, 2014;1649–1663.
150. Nurieva R, Wang J, Sahoo A. T-cell tolerance in cancer. *Immunotherapy.* 2013;5(5): 513-531.
151. Oudard, S.; Culine, S.; Vano, Y.; Goldwasser, F.; Théodore, C.; Nguyen, T.; Voog, E.; Banu, E.; Vieillefond, A.; Priou, F.; et al. Multicentre Randomised Phase II Trial of Gemcitabine+platinum, with or without Trastuzumab, in Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma Overexpressing Her2. *Eur. J. Cancer* 2015;51: 45–54.
152. Parkin, D. M. The global burden of urinary bladder cancer. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 2008;42: 12–20.
153. Passoni N, Gayed B, Kapur P, Sagalowsky AI, Shariat SF, Lotan Y. Cell-cycle markers do not improve discrimination of EORTC and CUETO risk models in predicting recurrence and progression of non–muscle-invasive high-grade bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2016;34: 485.e7–485.e14.
154. Pelucchi, C. & La Vecchia, C. Alcohol, coffee, and bladder cancer risk: a review of epidemiological studies. *Eur. J. Cancer Prev.* 2009;18: 62–68.
155. Pembrolizumab and BCG Solution in Treating Patients with Recurrent Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer—Full Text View—ClinicalTrials.gov. Available online: [https://clinicaltrials.gov/ct2/show/ NCT02808143](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02808143) (accessed on 10 July 2020).
156. Perlis, N.; Zlotta, A.R.; Beyene, J.; Finelli, A.; Fleshner, N.E.; Kulkarni, G.S. Immediate Post–Transurethral Resection of Bladder Tumor Intravesical Chemotherapy Prevents Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer Recurrences: An Updated Meta-Analysis on 2548 Patients and Quality-of-Evidence Review. *Eur. Urol.* 2013;64: 421–430.
157. Petrylak, D.P.; Tangen, C.M.; Van Veldhuizen Jr, P.J.; Goodwin, J.W.; Twardowski, P.W.; Atkins, J.N.; Kakhil, S.R.; Lange, M.K.; Mansukhani, M.; Crawford, E.D. Results of the Southwest Oncology Group Phase II Evaluation

- (Study S0031) of ZD1839 for Advanced Transitional Cell Carcinoma of the Urothelium. *BJU Int.* 2010;105: 317–321.
158. Pietzak, E.J.; Bagrodia, A.; Cha, E.K.; Drill, E.N.; Iyer, G.; Isharwal, S.; Ostrovnaya, I.; Baez, P.; Li, Q.; Berger, M.F.; et al. Next-Generation Sequencing of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Reveals Potential Biomarkers and Rational Therapeutic Targets. *Eur. Urol.* 2017;72: 952–959.
159. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 2004;431: 461-466.
160. Power, C.A.; Wei, G.; Bretscher, P.A. Mycobacterial Dose Defines the Th1/Th2 Nature of the Immune Response Independently of Whether Immunization Is Administered by the Intravenous, Subcutaneous, or Intradermal Route. *Infect. Immun.* 1998;66: 5743–5750.
161. Powles, T.; Huddart, R.A.; Elliott, T.; Sarker, S.-J.; Ackerman, C.; Jones, R.; Hussain, S.; Crabb, S.; Jagdev, S.; Chester, J.; et al. Phase III, Double-Blind, Randomized Trial That Compared Maintenance Lapatinib Versus Placebo After First-Line Chemotherapy in Patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor 1/2–Positive Metastatic Bladder Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2016;35: 48–55.
162. Pruthi, R.S.; Nielsen, M.; Heathcote, S.; Wallen, E.M.; Rathmell, W.K.; Godley, P.; Whang, Y.; Fielding, J.; Schultz, H.; Grigson, G.; et al. A Phase II Trial of Neoadjuvant Erlotinib in Patients with Muscle-Invasive Bladder Cancer Undergoing Radical Cystectomy: Clinical and Pathological Results. *BJU Int.* 2010;106: 349–354.
163. Purdue, M. P., Hutchings, S. J., Rushton, L. & Silverman, D. T. The proportion of cancer attributable to occupational exposures. *Ann. Epidemiol.* 2015;25: 188–192.
164. Puzio-Kuter, A.M.; Castillo-Martin, M.; Kinkade, C.W.; Wang, X.; Shen, T.H.; Matos, T.; Shen, M.M.; Cordon-Cardo, C.; Abate-Shen, C. Inactivation of P53 and Pten Promotes Invasive Bladder Cancer. *Genes Dev.* 2009;23: 675–680.

165. Raschellà G., V. Cesi, R. Amendola, A. Negroni, B. Tanno, P. Altavista, et al., Expression of Bmyb in neuroblastoma tumors is a poor prognostic factor independent from MYCN amplification, *Cancer Res.* 1999;14: 3365–3368.
166. Rebouissou, S.; Bernard-Pierrot, I.; de Reyniès, A.; Lepage, M.-L.; Krucker, C.; Chapeaublanc, E.; Hérault, A.; Kamoun, A.; Caillault, A.; Letouzé, E.; et al. EGFR as a Potential Therapeutic Target for a Subset of Muscle-Invasive Bladder Cancers Presenting a Basal-like Phenotype. *Sci. Transl. Med.* 2014;6: 244ra91.
167. Ren F., L. Wang, X. Shen, X. Xiao, Z. Liu, P. Wei, et al., MYBL2 is an independent prognostic marker that has tumor-promoting functions in colorectal cancer, *Am. J. Cancer Res.* 2015;4: 1542.
168. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105–111.
169. Rhijn, B.W.G.v.; Burger, M.; Lotan, Y.; Solsona, E.; Stief, C.G.; Sylvester, R.J.; Witjes, J.A.; Zlotta, A.R. Recurrence and Progression of Disease in Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer: From Epidemiology to Treatment Strategy. *Eur. Urol.* 2009, 56, 430–442.
170. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010;26(1): 139–140.
171. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet.* 2016;387: 1909–1920.
172. Rosenberg, J.E.; O’Donnell, P.H.; Balar, A.V.; McGregor, B.A.; Heath, E.I.; Yu, E.Y.; Galsky, M.D.; Hahn, N.M.; Gartner, E.M.; Pinelli, J.M.; et al. Pivotal Trial of Enfortumab Vedotin in Urothelial Carcinoma After Platinum and Anti-Programmed Death 1/Programmed Death Ligand 1 Therapy. *J. Clin. Oncol.* 2019;37: 2592–2600.

173. Ross, J.S.; Wang, K.; Al-Rohil, R.N.; Nazeer, T.; Sheehan, C.E.; Otto, G.A.; He, J.; Palmer, G.; Yelensky, R.; Lipson, D.; et al. Advanced Urothelial Carcinoma: Next-Generation Sequencing Reveals Diverse Genomic Alterations and Targets of Therapy. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 2014;27: 271–280.
174. Rothman, N. et al. A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci. *Nat. Genet.* 2010;42: 978–984.
175. Sala A., Watson R., B-Myb protein in cellular proliferation, transcription control, and cancer: Latest developments, *J. Cell. Physiol.* 1999;3: 245–250.
176. Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon DS. Cancer cells expressing toll-like receptors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2009;2: 205-214.
177. Schmidt A., P. Bud, U. Ruther et al. Tissue polypeptide antigen for monitoring of advanced bladder cancer after NVEC chemotherapy. *Eur Urol.* 1992;21: 10-12.
178. Seiler, R.; Ashab, H.A.D.; Erho, N.; van Rhijn, B.W.G.; Winters, B.; Douglas, J.; van Kessel, K.E.; Fransen van de Putte, E.E.; Sommerlad, M.; Wang, N.Q.; et al. Impact of Molecular Subtypes in Muscle-Invasive Bladder Cancer on Predicting Response and Survival after Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur. Urol.* 2017;72: 544–554.
179. Seiler, R.; Gibb, E.A.; Wang, N.Q.; Oo, H.Z.; Lam, H.-M.; van Kessel, K.E.; Voskuilen, C.S.; Winters, B.; Erho, N.; Takhar, M.M.; et al. Divergent Biological Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2019;25: 5082–5093.
180. Semeniuk-Wojtaś A, Lubas A, Cierniak S et al. Selected protein expression in a new prognostic model for patients with non-muscle-invasive bladder cancer. 2020;146: 2099–2108.
181. Seshacharyulu, P.; Ponnusamy, M.P.; Haridas, D.; Jain, M.; Ganti, A.p.a.r.K.; Batra, S.K. Targeting the EGFR Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 2012;16: 15–31.

182. Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saeedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer*. 2007;109: 1106–1113.
183. Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Predictive value of cell cycle biomarkers in nonmuscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *J Urol*. 2007;177: 481–487.
184. Shariat SF, Chade DC, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Isbarn H, Fradet Y, et al. Combination of multiple molecular markers can improve prognostication in patients with locally advanced and lymph node positive bladder cancer. *J Urol*. 2010;183: 68–75.
185. Shariat SF, Gust KM. Immune therapy meets precision medicine. *Lancet Oncol*. 2017;18: 271–273.
186. Shariat SF, Karakiewicz PI, Godoy G, Karam JA, Ashfaq R, Fradet Y, et al. Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: a multicenter external validation study. *Clin Cancer Res*. 2009;15: 7012–7019.
187. Shariat SF, Kim J, Raptidis G, Ayala GE, Lerner SP. Association of p53 and p21 expression with clinical outcome in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder. *Urology*. 2003;61: 1140–1145.
188. Shariat SF, Lotan Y, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Isbarn H, Fradet Y, et al. p53 predictive value for pT1-2 N0 disease at radical cystectomy. *J Urol*. 2009;182: 907–913.
189. Shariat SF, Lotan Y, Saboorian H, Khoddami SM, Roehrborn CG, Slawin KM, et al. Survivin expression is associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma. *Cancer*. 2004;100: 751–757.
190. Shariat SF, Lotan Y, Vickers A, Karakiewicz PI, Schmitz-Drager BJ, Goebell PJ, et al. Statistical consideration for clinical biomarker research in bladder cancer. *Urol Oncol*. 2010;28: 389–400.

191. Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J, Kim J, Ayala GE, Benedict WF, et al. p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22: 1014–1024.
192. Shariat SF, Weizer AZ, Green A, Laucirica R, Frolov A, Wheeler TM, et al. Prognostic value of P53 nuclear accumulation and histopathologic features in T1 transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urology.* 2000;56: 735–740.
193. Shariat SF, Zlotta AR, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Cooperative effect of cell-cycle regulators expression on bladder cancer development and biologic aggressiveness. *Mod Pathol.* 2007;20: 445–459.
194. Shariat, S.F.; Tokunaga, H.; Zhou, J.; Kim, J.; Ayala, G.E.; Benedict, W.F.; Lerner, S.P. P53, P21, PRB, and P16 Expression Predict Clinical Outcome in Cystectomy With Bladder Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2004;22: 1014–1024.
195. Sharma P, Callahan MK, Bono P, Kim J, Spiliopoulou P, Calvo E, et al. Nivolumab monotherapy in recurrent metastatic urothelial carcinoma (CheckMate 032): a multicentre, open-label, two-stage, multi-arm, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17: 1590–1598.
196. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18: 312–322.
197. Sharma, P.; Callahan, M.K.; Bono, P.; Kim, J.; Spiliopoulou, P.; Calvo, E.; Pillai, R.N.; Ott, P.A.; de Braud, F.; Morse, M.; et al. Nivolumab Monotherapy in Recurrent Metastatic Urothelial Carcinoma (CheckMate 032): A Multicentre, Open-Label, Two-Stage, Multi-Arm, Phase 1/2 Trial. *Lancet Oncol.* 2016;17: 1590–1598.
198. Shcheblyakov DV, Logunov DY, Tukhvatulin AI, Shmarov MM, Naroditsky BS, Gintsburg AL. Toll-Like Receptors (TLRs): The role in tumor progression. *Acta Naturae.* 2010;2(3): 21-29.
199. Sherr, C.J.; McCormick, F. The RB and P53 Pathways in Cancer. *Cancer Cell* 2002;2: 103–112.

200. Sjö Dahl, G.; Eriksson, P.; Liedberg, F.; Höglund, M. Molecular Classification of Urothelial Carcinoma: Global mRNA Classification versus Tumour-Cell Phenotype Classification. *J. Pathol.* 2017, 242, 113–125.
201. Sjö Dahl, G.; Lauss, M.; Lövgren, K.; Chebil, G.; Gudjonsson, S.; Veerla, S.; Patschan, O.; Aine, M.; Fernö, M.; Ringnér, M.; et al. A Molecular Taxonomy for Urothelial Carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2012;18: 3377–3386.
202. Slusarczyk, A.; Zapała, P.; Zapała, Ł.; Piecha, T.; Radziszewski, P. Prediction of BCG Responses in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer in the Era of Novel Immunotherapeutics. *Int. Urol. Nephrol.* 2019;51: 1089–1099.
203. Smith SG, Zaharoff DA. Future directions in bladder cancer immunotherapy: towards adaptive immunity. *Immunotherapy.* 2016;8(3): 351-365.
204. Smith, N. D. et al. Bladder cancer mortality in the United States: a geographic and temporal analysis of socioeconomic and environmental factors. *J. Urol.* 2016;195: 290–296.
205. Sobecki M, Mrouj K, Camasses A et al. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *eLife* 2016;5: e13722.
206. Solomon, D.A.; Kim, J.-S.; Bondaruk, J.; Shariat, S.F.; Wang, Z.-F.; Elkahloun, A.G.; Ozawa, T.; Gerard, J.; Zhuang, D.; Zhang, S.; et al. Frequent Truncating Mutations of STAG2 in Bladder Cancer. *Nat. Genet.* 2013;45: 1428–1430.
207. Song J, Abraham SN. TLR-mediated immune responses in the urinary tract. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(1): 66-73.
208. Sonpavde, G.; Watson, D.; Tourtellott, M.; Cowey, C.L.; Hellerstedt, B.; Hutson, T.E.; Zhan, F.; Vogelzang, N.J. Administration of Cisplatin-Based Chemotherapy for Advanced Urothelial Carcinoma in the Community. *Clin. Genitourin. Cancer* 2012;10: 1–5.
209. Soria F, Krabbe LM, Todenhöfer T et al. Molecular markers in bladder cancer. *World J Urol.* 2019; 37(1): 31–40.

210. Soukup, V.; Capoun, O.; Cohen, D.; Hernández, V.; Babjuk, M.; Burger, M.; Compérat, E.; Gontero, P.; Lam, T.; MacLennan, S.; et al. Prognostic Performance and Reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization Grading Classification Systems in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A European Association of Urology Non-Muscle Invasive Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur. Urol.* 2017;72: 801–813.
211. Stadler WM, Lerner SP, Groshen S, Stein JP, Shi SR, Raghavan D, et al. Phase III study of molecularly targeted adjuvant therapy in locally advanced urothelial cancer of the bladder based on p53 status. *J Clin Oncol.* 2011;29: 3443–3449.
212. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner DG: Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* 2001; 19:666–675.
213. Steinberg, R.L.; Thomas, L.J.; O'Donnell, M.A. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Treatment Failures in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: What Truly Constitutes Unresponsive Disease. *Bladder Cancer* 2015;1: 105–116.
214. Stephenson, J.J.; Gregory, C.; Burris, H.; Larson, T.; Verma, U.; Cohn, A.; Crawford, J.; Cohen, R.B.; Martin, J.; Lum, P.; et al. An Open-Label Clinical Trial Evaluating Safety and Pharmacokinetics of Two Dosing Schedules of Panitumumab in Patients with Solid Tumors. *Clin. Colorectal Cancer* 2009;8: 29–37.
215. Sundararajan S, Vogelzang NJ. Anti-PD-1 and PD-L1 therapy for bladder cancer: what is on the horizon? *Future Oncol.* 2015;11(16): 2299-2306.
216. Suresh MV, Thomas B, Machado-Aranda D, et al. Double-stranded RNA interacts with toll-like receptor 3 in driving the acute inflammatory response following lung contusion. *Crit Care Med.* 2016;44(11): e1054-e1066.
217. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol Eur Urol.* 2006;49(3):466–477.

218. Sylvester, R.J.; Oosterlinck, W.; Holmang, S.; Sydes, M.R.; Birtle, A.; Gudjonsson, S.; de Nunzio, C.; Okamura, K.; Kaasinen, E.; Solsona, E.; et al. Systematic Review and Individual Patient Data Meta-Analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa–pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur. Urol.* 2016;69: 231–244.
219. Sylvester, R.J.; van der Meijden, A.P.M.; Lamm, D.L. Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Reduces the Risk of Progression in Patients with Superficial Bladder Cancer: A Meta-Analysis of the Published Results of Randomized Clinical Trials. *J. Urol.* 2002;168: 1964–1970.
220. Sylvester, R.J.; van der Meijden, A.P.M.; Oosterlinck, W.; Witjes, J.A.; Bouffieux, C.; Denis, L.; Newling, D.W.W.; Kurth, K. Predicting Recurrence and Progression in Individual Patients with Stage Ta T1 Bladder Cancer Using EORTC Risk Tables: A Combined Analysis of 2596 Patients from Seven EORTC Trials. *Eur. Urol.* 2006, 49, 466–477.
221. Takehara M, Seike S, Takagishi T, Kobayashi K, Nagahama M. Peptidoglycan accelerates granulopoiesis through a TLR2- and MyD88-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;487(2): 419-425.
222. Tarasov K. V., Y. S. Tarasova, W. L. Tam, D. R. Riordon, S. T. Elliott, G. Kania, et al. B-MYB is essential for normal cell cycle progression and chromosomal stability of embryonic stem cells, *PloS one.* 2008;6: e2478.
223. Tetu B, Fradet Y, Allard P, Veilleux C, Roberge N, Bernard P. Prevalence and clinical significance of HER/2neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. *J Urol.* 1996;155: 1784–1788.
224. Theodorescu, D.; Laderoute, K.R.; Gulding, K.M. Epidermal Growth Factor Receptor-Regulated Human Bladder Cancer Motility Is in Part a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Process. *Cell Growth Differ.* 1998, 9, 919.

225. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF- kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2009;27: 693-733.
226. Van Poppel H, J. Billen, H. Goetheugs et al. Serum tissue polypeptide antigen (TPA) as tumor marker for bladder cancer. *Anticancer Res.* 1996;16: 205-207.
227. van Rhijn, B.W.G.; Lurkin, I.; Radvanyi, F.; Kirkels, W.J.; van der Kwast, T.H.; Zwarthoff, E.C. The Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) Mutation Is a Strong Indicator of Superficial Bladder Cancer with Low Recurrence Rate. *Cancer Res.* 2001;61: 1265–1268.
228. Varca V, Simonato A, Esposito M, Curotto A, Orlandini M, Rikani E: Early vs delayed radical cystectomy compared in highgrade superficial bladder tumors. *Urologia* 2009;76: 83–86.
229. Wang, L.; Smith, B.A.; Balanis, N.G.; Tsai, B.L.; Nguyen, K.; Cheng, M.W.; Obusan, M.B.; Esedebe, F.N.; Patel, S.J.; Zhang, H.; et al. A Genetically Defined Disease Model Reveals That Urothelial Cells Can Initiate Divergent Bladder Cancer Phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2020;117: 563–572.
230. Witjes, J.A.; Bruins, H.M.; Cathomas, R.; Compérat, E.M.; Cowan, N.C.; Gakis, G.; Hernández, V.; Linares Espinós, E.; Lorch, A.; Neuzillet, Y.; et al. European Association of Urology Guidelines on Muscle-Invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *Eur. Urol.* 2020.
231. Włodarczyk J, Stolte M, Mueller J. E-cadherin, beta-catenin and stromelysin-3 expression in de novo carcinoma of the colorectum. *Pol J Pathol.* 2001;52(3): 119–124.
232. Wong, Y.-N.; Litwin, S.; Vaughn, D.; Cohen, S.; Plimack, E.R.; Lee, J.; Song, W.; Dabrow, M.; Brody, M.; Tuttle, H.; et al. Phase II Trial of Cetuximab With or Without Paclitaxel in Patients With Advanced Urothelial Tract Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2012;30: 3545–3551.
233. Wu, X. et al. Genetic variation in the prostate stem cell antigen gene PSCA confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat. Genet.* 2009;41: 991–995.

234. Xi RC, Sheng YR, Chen WH, Sheng L, Gang JJ, Tong Z, et al. Expression of survivin and livin predicts early recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. *J Surg Oncol*. 2013;107: 550–554.
235. Xin Z, Li Y, Meng L et al. Elevated expression of the MYB proto-oncogene like 2 (MYBL2)- encoding gene as a prognostic and predictive biomarker in human cancers. *Mathematical Biosciences and Engineering/* 2021;19(2): 1825–1842.
236. Xu ZC, Cai HZ, Li X, Xu WZ, Xu T, Yu B, et al. ERCC1 C118T polymorphism has predictive value for platinum-based chemotherapy in patients with late-stage bladder cancer. *Genet Mol Res*. 2016.
237. Xylinas E, Kluth LA, Lotan Y, Daneshmand S, Rieken M, Karakiewicz PI, et al. Blood- and tissue-based biomarkers for prediction of outcomes in urothelial carcinoma of the bladder. *Urol Oncol*. 2014;32: 230–242.
238. Yang, L.; Taylor, J.; Eustace, A.; Irlam, J.J.; Denley, H.; Hoskin, P.J.; Alsner, J.; Buffa, F.M.; Harris, A.L.; Choudhury, A. Gene Signature for Selecting Benefit from Hypoxia Modification of Radiotherapy for High-Risk Bladder Cancer Patients. *Clin. Cancer Res*. 2017;23: 4761–4768.
239. Yee, D. S., Ishill, N. M., Lowrance, W. T., Herr, H. W. & Elkin, E. B. Ethnic differences in bladder cancer survival. *Urology*. 2011;78: 544–549.
240. Yoon DS, Li L, Zhang RD, et al. Genetic mapping and DNA sequence-based analysis of deleted regions on chromosome 16 involved in progression of bladder cancer from occult preneoplastic conditions to invasive disease. *Oncogene*. 2001;20(36):5005–5014.
241. Zargar, H.; Espiritu, P.N.; Fairey, A.S.; Mertens, L.S.; Dinney, C.P.; Mir, M.C.; Krabbe, L.-M.; Cookson, M.S.; Jacobsen, N.-E.; Gandhi, N.; et al. Multicenter Assessment of Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur. Urol*. 2015;67: 241–249.
242. Zhang M., H. Li, D. Zou, J. Gao, Ruguo key genes and tumor driving factors identification of bladder cancer based on the RNA-seq profile, *Onco Targets Ther*. 2016;9: 2717.

243. Zhou X, Zhang G, Tian Y. p53 status correlates with the risk of recurrence in non-muscle invasive bladder cancers treated with bacillus Calmette–Guérin: a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10: e0119476.
244. Zieger, K.; Marcussen, N.; Borre, M.; Ørntoft, T.F.; Dyrskjøt, L. Consistent Genomic Alterations in Carcinoma in Situ of the Urinary Bladder Confirm the Presence of Two Major Pathways in Bladder Cancer Development. *Int. J. Cancer* 2009;125: 2095–2103.
245. Zlotta A, Alkhateeb S, Neill M, Bar-Moshe S, Rhijn B, Kakiashvili D, et al. Long-term prognostic value of the combination of EORTC risk group calculator and molecular markers in non-muscle-invasive bladder cancer patients treated with intravesical bacille Calmette–Guérin. *Urol Ann*. 2011;3: 119.
246. Zlotta, A.R.; Fleshner, N.E.; Jewett, M.A. The Management of BCG Failure in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: An Update. *Can. Urol. Assoc. J.* 2009;3 (Suppl. 4): S199–S205.
247. Zu X, Tang Z, Li Y, Gao N, Ding J, Qi L. Vascular endothelial growth factor-C expression in bladder transitional cell cancer and its relationship to lymph node metastasis. *BJU Int*. 2006;98: 1090–1093.