

*На правах рукописи*

**Дзидзария Александр Гудисович**

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

3.1.6. – Онкология, лучевая терапия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор **Павлов Андрей Юрьевич**

**Официальные оппоненты:**

- академик РАН, доктор медицинских наук, профессор **Камалов Армаис Альбертович**, МГУ имени М.В. Ломоносова, Университетская клиника, директор; Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра урологии и андрологии, заведующий кафедрой

- член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор **Матвеев Всеволод Борисович**, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, заместитель директора по научной и инновационной работе; хирургическое отделение № 4 (онкоурологии), заведующий отделением

- доктор медицинских наук, профессор **Алексеев Борис Яковлевич**, заместитель генерального директора по науке ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России

**Ведущая организация:** ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского)

Защита диссертации состоится «27» февраля 2023 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.056.01 при ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Профсоюзная, д.86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Профсоюзная, д.86 ([www.rncrr.ru](http://www.rncrr.ru))

Автореферат разослан «\_\_\_» января 2023 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,  
д.м.н., профессор**

Цаллагова З.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Рак мочевого пузыря является наиболее распространенным видом рака мочевыводящих путей. Ежегодно диагностируется около 400 000 новых случаев заболевания [Antoni S. et al., 2017].

При первоначальном диагнозе 70-80% пациентов имеют мышечно-неинвазивную форму заболевания (Ta, Tis, T1). Основной проблемой МНИРМП является высокая частота рецидивов (до 40% в первый год наблюдения), риск перехода в мышечно-инвазивную форму – 21% [Martin-Doyle W. et al., 2015]. Механизмы резистентности МНИРМП к системному лечению неизвестны, в настоящее время существует проблема выявления молекулярных биомаркеров, позволяющих выбрать эффективное лечение.

Наращение количества молекулярно-генетических событий в клетках опухоли играет большую роль в прогрессировании злокачественного процесса, что подтверждается большим количеством публикаций [Wang L. et al., 2020]. Современные классификации не полностью отражают гетерогенность заболевания и не позволяют на раннем этапе определить оптимальный вариант лечения для конкретного пациента. EORTC, EAU разработаны прогностические таблицы для оценки краткосрочных и долгосрочных рисков рецидива, однако применение этих прогностических таблиц показало низкую прогностическую информативность в группах первичных пациентов после лечения МНИРМП, где большая часть рецидивов приходится на первый год наблюдений [Semeniuk-Wojtaś A. et al., 2020]. Осуществлялись неоднократные попытки улучшить эффективность применения номограмм через подготовку прогностических моделей для определенных когорт пациентов, в также путем оценки генного полиморфизма опухоли. [Cumberbatch M. G. et al., 2017].

Основной целью исследования молекулярного фенотипа является возможность оценить прогноз заболевания и улучшить процесс принятия клинических решений. Оптимальным методом прогнозирования и определения групп риска является многофакторный анализ, сочетающий как молекулярно-генетический анализ опухоли, так и клинико-морфологические характеристики РМП [Witjes J.A. et al., 2020]. 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. Применение широкой панели генов-маркеров может повысить точность прогнозирования [Passoni N et al., 2016].

На сегодняшний день существует неотложная необходимость в исследованиях молекулярно-генетического профиля РМП как гетерогенного заболевания с высоким злокачественным потенциалом, для создания эффективной модели прогноза рецидива.

Для солидных опухолей других локализаций (рак молочной железы, 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 молекулярно-генетических особенностей опухоли, патогенетических путей ее развития, что позволит выявить биомаркеры, влияющие на прогноз заболевания и определить тактику лечения. 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 специфическим, молекулярно-генетически обоснованным подтипам, что позволит повысить эффективность лечения через реализацию персонализированных протоколов лечения МНИРМП. Поиск генов-маркеров и их сочетаний для оценки прогноза заболевания и выбора тактики лечения является важнейшим направлением развития клинической онкологии.

### **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 факторов врожденного и приобретенного иммунитета, рецепторы эстрогенов и прогестерона, ароматазу): MGB1, CTSL2, BCL2, TERT, HER2, PTEN, BAG1, PGR, GREM1, MMP2, PAPPА, MMP7, IL2, MMP8, IL2Ra, IL6, IL12a, IL7, IL15, IL8, IL1b, IL10, TPA, IFN $\gamma$ , CD45, TNF- $\alpha$ , C-MYC, BIRC5, CCND1, NDRG1, CD68, Ki67, CD56, TGFb, CD69, VEGFA189, TLR4, HLA-G1, TLR-7, HLA-G5, GATA2, И-28a, LGALS1, И-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 характеристикам 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 внутривезузырной химиотерапии\иммуноотерапии 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 внутривезузырной 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 рентгенодиагностики» 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.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Характеристика пациентов**

В исследование вошло 308 пациентов, получивших специальное лечение в Российском Научном Центре Рентгенорадиологии за период с 2017 по 2020г, 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 внутрипузырной химиотерапией препаратом митомицин и в последующем выполнен полный курс индукционной

внутрипузырной 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 специализированное противоопухолевое лечение (ТУР мочевого пузыря + полный курс внутрипузырной 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.

Конечной точкой исследования являлось развитие рецидива или прогрессии РМП.

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

Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, методом сравнения индикаторных циклов ( $C_p$ ) 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  $C_p$  (crossing point).

Формулы расчета: Уровень экспрессии без учёта количества материала,  $[C_i]$ , определяли как  $[C_i] = 2^{C_p i - C_{p i \min}}$ , где  $C_{p i}$  – значение индикаторного цикла в исследуемом образце, а  $C_{p i \min}$  – 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:

$$NF = \sqrt[3]{NF_{b2m} \times NF_{gusb} \times NF_{hprr1}}$$

Уровень экспрессии с учётом нормировочного фактора рассчитывали как  $[CNF] = [Ci] / NF$  и использовали для определения относительного уровня экспрессии по формуле  $[CNF] / [CNF \text{ min}]$ , где  $CNF \text{ min}$  – 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 диагностикой.

### **Методика выполнения ТУР с ФДД.**

На первом этапе производилась катетеризация мочевого пузыря катетером Фоллея 14 Сн. По катетеру внутривпузырно 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.

### **Внутрипузырное введение Митомицина.**

На операционном столе, после удаления опухоли внутривпузырно 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 Митомицин использовалась при еженедельном внутривпузырном введении препарата. В послеоперационном периоде внутривпузырно химиопрепарат вводился в течение 6-8 недель 1 раз в неделю. Экспозиция химиопрепарата во всех случаях составляла 60 минут.

## Статистическая обработка материала

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

### Результаты собственных исследований

В исследование вошло 308 пациентов, из них 238 с МНИРМП. Возраст 234 человек включенных в три группы нашего исследования варьировал от 20 лет до 91 года, медиана составила 62 года, большинство пациентов были старше 44 лет (таблица 1). При сравнении групп по возрастному составу выявлено, что в 1 группу вошли более возрастные пациенты, различия достоверны. Морфологическое подтверждение диагноза имели все пациенты.

Гистологически рак мочевого пузыря был представлен уротелиальным раком различной степени дифференцировки (таблица 2)

**Таблица 1.**

**Распределение пациентов по возрастам в группах.**

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
<b>Всего</b>	234	62,0	0,91	20,0	91,0

**Таблица 2.**

**Распределение пациентов 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
<b>Всего</b>	85	5	74	166

При обращении пациентов картина первичной опухоли в мочевом пузыре оценивалась в зависимости от количества первичных очагов и размеров первичной опухоли (Таблица 3). 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 ( $p > 0,05$ ).

**Таблица 3.**

**Распределение пациентов в зависимости от количества первичных очагов в мочевом пузыре и размеров первичной опухоли.**

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

Из таблицы видно, что в 1 группе 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 различия отсутствовали, 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 4. Получены достоверные различия между количеством курящих пациентов в группах, с преобладанием курящих в первой группе, на основании чего можно смело говорить о наличии прямой корреляционной зависимости между курением и развитием рака мочевого пузыря.

**Таблица 4.**

**Характеристика пациентов с учетом данных анамнеза по курению.**

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

При сравнении по индексу массы тела (ИМТ) достоверных различий не получено, однако большая часть курящих пациентов имела тенденцию к увеличению ИМТ >20 (более чем в 60% наблюдений). При анализе по наследственной предрасположенности (рак в анамнезе у родственников до 2го колена родства) достоверных различий в наших группах не было ( $p > 0,05$ ).

Так как группы не различались по степени дифференцировки опухоли мочевого пузыря, по наличию гематурии, размеру первичной опухоли, питьевому режиму, встает закономерный вопрос о ведущей роли модифицируемых факторов жизни в онкогенезе и как следствие сомнительно формирование достоверных групп риска населения на их основании.

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%).

**Результаты молекулярно-генетического исследования тканей**

На основании анализа результатов молекулярно-генетического профиля тканей были определены три группы генов: гены, показавшие чувствительность

и специфичность 75% и выше, отнесены к высокоинформативным. Гены с чувствительностью и специфичностью от 50% до 75% отнесены к группе с средним уровнем, а с чувствительностью и специфичностью до 50% - к неинформативным генам. 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). Была оценена информативность повышенных уровней генов-маркеров при помощи построения ROC-кривых (зависимость количества верно классифицируемых положительных примеров от количества неверно классифицируемых отрицательных примеров. Идеальный классификатор график ROC-кривой проходит через верхний левый угол).

### Высокочувствительные гены-маркеры МНИРМП.

#### Кi-67

Кi-67 представляет собой ядерный белок, связанный с транскрипцией рибосомной РНК и является маркером клеточной пролиферации. Результаты нашего исследования показали, что наилучшее соотношение чувствительности и специфичности, разделяющее группы контроля от группы больных с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря, находится в районе Кi-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%). Расчеты показателей чувствительности (т.е. вероятность наличия рака) и показателей специфичности (т.е. пациент находится в ремиссии или мочевого пузыря без онкологии) представлены в Таблице 5.

На основании наших данных и роли Кi-67 (прямой маркер пролиферации) следует вывод о более высокой пролиферативной активности в ткани опухоли в сравнении со здоровой слизистой мочевого пузыря и слизистой после специализированного противоопухолевого лечения. При построении ROC-кривых для показателя Кi-67 площадь под кривой составила  $0,81 \pm 0,04$  (рисунок 1).

Таблица 5.

#### Данные чувствительности и специфичности показателя Кi-67.

Группы	Кi-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
<b>Всего</b>	<b>79</b>	<b>65</b>	<b>144</b>

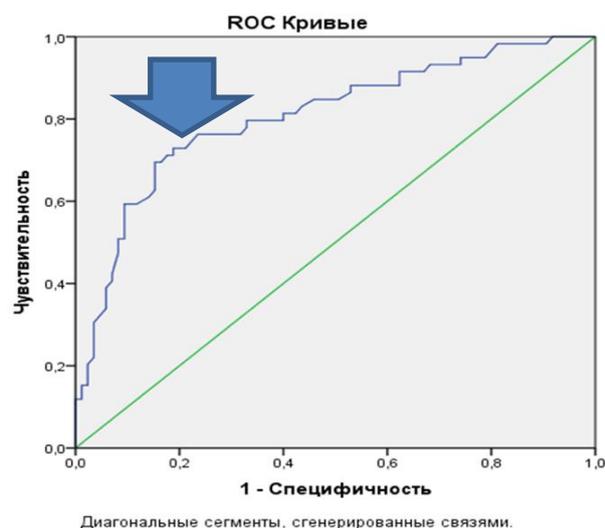


Рис. 1 ROC-кривые при экспрессии Ki-67.

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  $\geq 3$  см, но при курении в анамнезе, полученные различия недостоверны. Следуя логике это можно трактовать как возможное следствие нарушения микроциркуляции и неоангиогенеза на фоне курения сигарет (таблица 6).

Таблица 6.

**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					P=0,08
<3см	45	24,3	71,0	132,5	
$\geq 3$ см	14	87,4	144,7	215,3	
Всего	59	32,0	76,1	157,6	
Курение в анамнезе					P=0,17
Есть	53	32,0	93,7	215,6	
Нет	26	32,0	60,6	128,0	
Всего	59	32,0	76,1	157,6	

**CCNB1 (Циклин B1)**

Расчеты показателя чувствительности и специфичности CCNB1 представлены в таблице 7.

## 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

Также нами оценена информативность экспрессии показателя при помощи построения ROC – кривой (рисунок 2). Площадь показателя под кривой составила  $0,79 \pm 0,03$

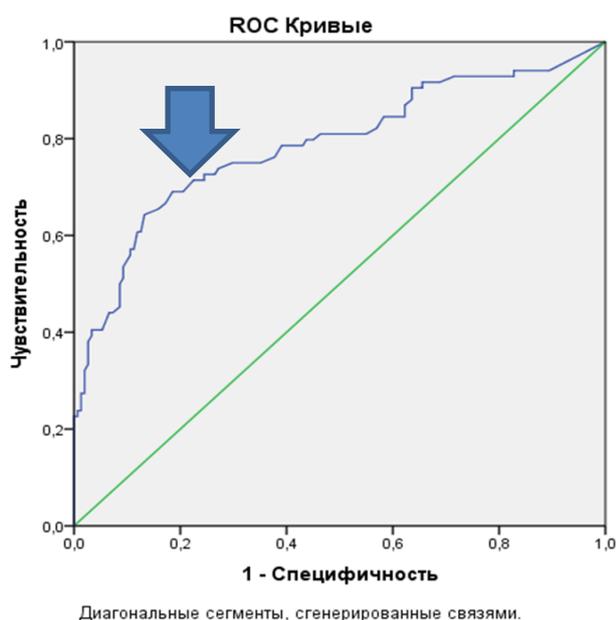


Рис.2 ROC-кривые при экспрессии CCNB1.

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%. Эти данные для наглядности проиллюстрированы на рисунке 3.

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 м-РНК гена CCNB1 при размере опухоли  $\geq 3$ см (Таблица 8). Медиана показателя при размере  $< 3$ см составила – 137,2 о.е., при  $\geq 3$ см – 284,0 ( $p=0,09$ ).

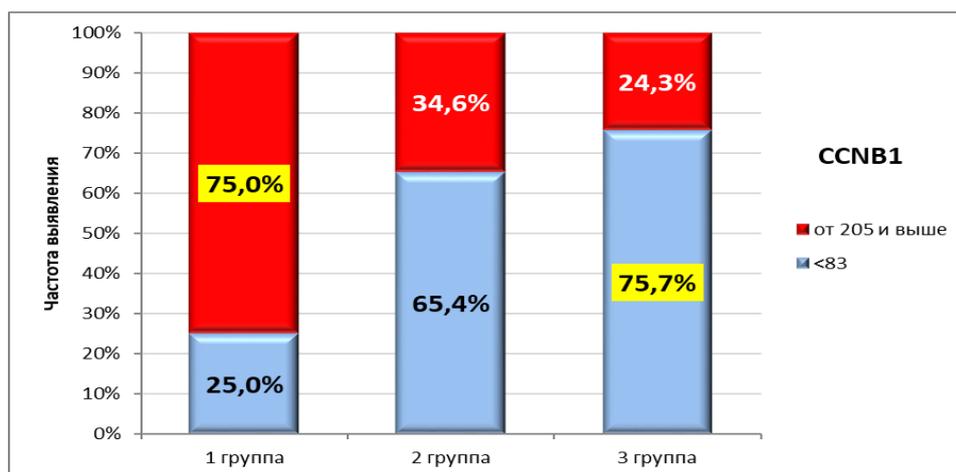


Рис. 3. Данные чувствительности и специфичности показателя CCNB1.

Таблица 8.

**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					P=0,08
<3см	45	24,3	71,0	132,5	
≥3см	14	87,4	144,7	215,3	
Всего	59	32,0	76,1	157,6	
Курение в анамнезе					P=0,17
Есть	53	32,0	93,7	215,6	
Нет	26	32,0	60,6	128,0	
Всего	59	32,0	76,1	157,6	

## MYBL2

Нами оценена экспрессия белка при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря, а также в неопухолевых тканях мочевого пузыря.

Произведена оценка информативности экспрессии MYBL2 при помощи ROC – кривых (рисунок 4). Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности, разделяющее группы контроля от группы с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря находится в районе 60, площадь под кривой составила  $0,83 \pm 0,0$ .

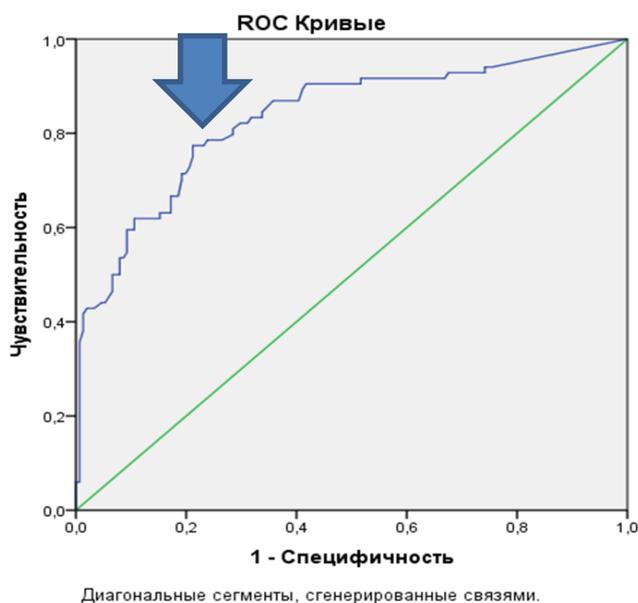


Рис. 4 ROC-кривые при экспрессии MYBL2.

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 9.

Таблица 9.

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
<b>Всего</b>	<b>139</b>	<b>95</b>	<b>234</b>

\*-p < 0,0001

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. 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 10).

**Таблица 10.**

**Зависимость MYBL2 от клинических и анамнестических факторов.**

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

**ТРА**

Произведена оценка информативности тканевого полипептидного антигена при помощи ROC-кривых (рисунок 5). 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 11.

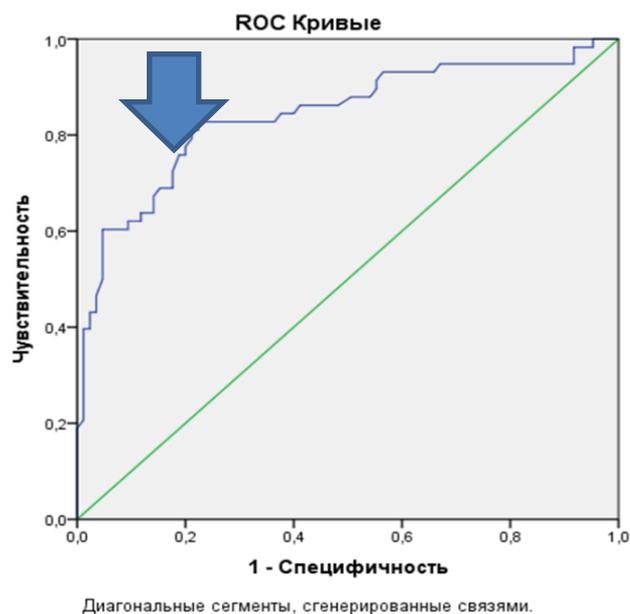


Рис. 5 ROC-кривые при экспрессии ТРА

Таблица 11.

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
<b>Всего</b>	<b>78</b>	<b>65</b>	<b>143</b>

\* -p <0,0001

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 12).

Таблица 12.

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	
<b>Всего</b>	<b>58</b>				

Из таблицы видно, что значение медианы ТРА напрямую зависит от размера опухоли (p=0,006).

## BIRC5

Нами построена ROC-кривая, позволяющая оценить информативность экспрессии BIRC5 при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря (рисунок 6). 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 13.

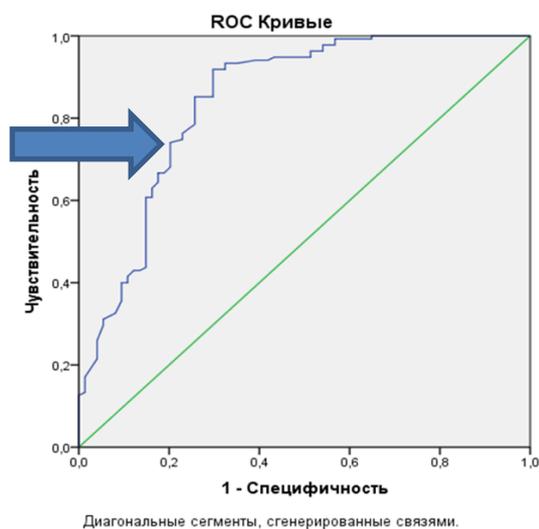


Рис. 6 ROC-кривые при экспрессии BIRC5.

Таблица 13.

### Данные чувствительности и специфичности показателя BIRC5.

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

\* - $p < 0,0001$

При рассмотрении взаимосвязи с клиническими и анамнестическими факторами нами отмечены достоверные различия медианы экспрессии м-РНК гена BIRC5 – у пациентов при наличии гематурии (128 о.е.) и ее отсутствии (66,9 о.е.) ( $p=0,04$ ). 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 ( $p=0,08$ ) (таблица 14).

Таблица 14.

**Зависимость экспрессии VIRC5 от клинических и анамнестических факторов.**

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

**Гены с средней чувствительностью и специфичностью при МНИРМП (от 50% до 75%)**

PGR, ESR1, BCL2, CD45, GRB7, IL-2, IL-12, IL-15, IL-7, p16INK4A, PAPPA, SCUBE2, TNF- $\alpha$ , VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, MMP2, MMP7, MMP11, CD68, CD69, CCND1, C-MYC, BAG1, IFN $\gamma$ , TLR2, TLR4, TLR7, CYP19A (CYP19A1), COX2.

**Неинформативные гены при МНИРМП**

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.

**Прогностическое значение результатов молекулярно-генетического исследования**

На первом этапе молекулярно-генетического исследования мы определили и сравнили уровень экспрессии мРНК, панели ранее 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, МКБ, ДГПЖ.

При сравнении экспрессии мРНК ряда генов, ассоциированных с пролиферацией, получены данные свидетельствующие о повышенной пролиферативной активности в опухоли. В частности, нами получено достоверное повышение экспрессии мРНК маркеров пролиферации: Ki67, CCNB1, MYBL2, TPA и маркера ингибитора апоптоза BIRC5 в ткани мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря.

В исследовании была произведена оценка безрецидивной выживаемости в группе 1 (Рисунок 7). Медиана безрецидивной выживаемости составила 23,7 месяца.

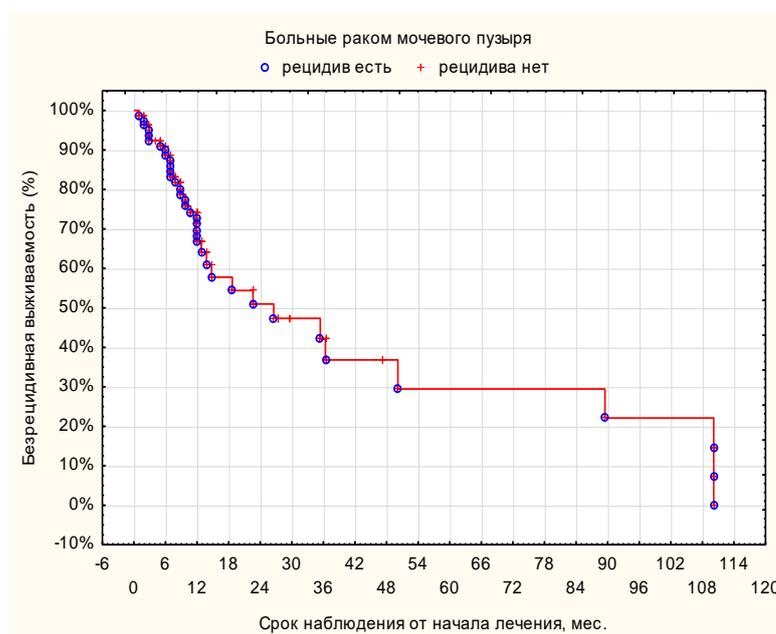


Рис. 7 Безрецидивная выживаемость в 1 группе.

На рисунке 8 представлен график безрецидивной выживаемости в зависимости от уровня пороговой экспрессии мРНК 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 –  $18,5 \pm 14,0\%$  ( $p=0,041$ ).

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

апоптоза, что по всей видимости и становится причиной рецидива и прогрессии, что отражено в полученных нами результатах БРВ. Наше исследование показало значимую взаимосвязь уровня экспрессии сурвивина с БРВ, что так же прослеживается в ряде других исследований [Jean C, Kim M, Kvak C, 2013].

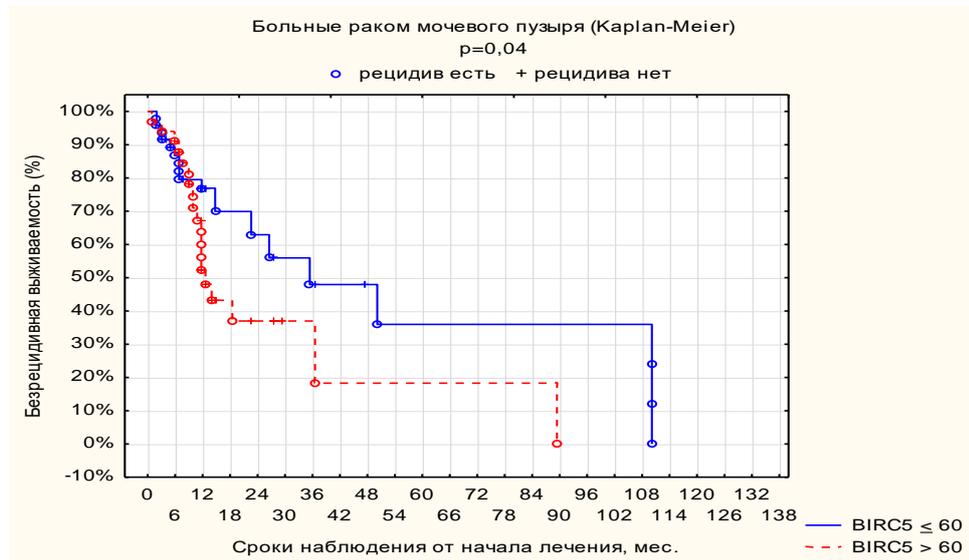


Рис. 8 Безрецидивная выживаемость в зависимости от уровня экспрессии BIRC5.

На рисунке 9 представлен график безрецидивной выживаемости в зависимости от уровня экспрессии Ki67.

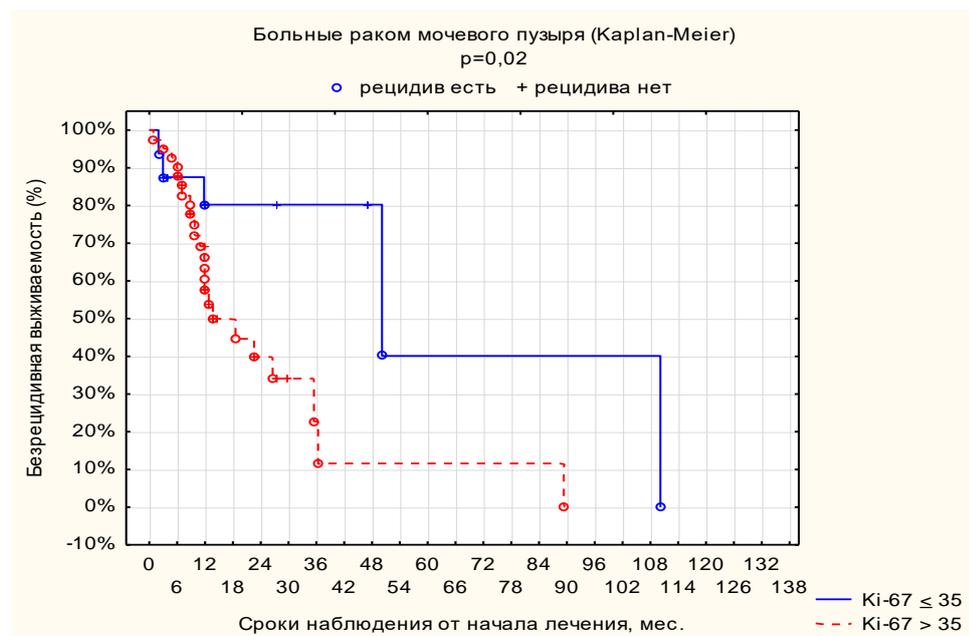
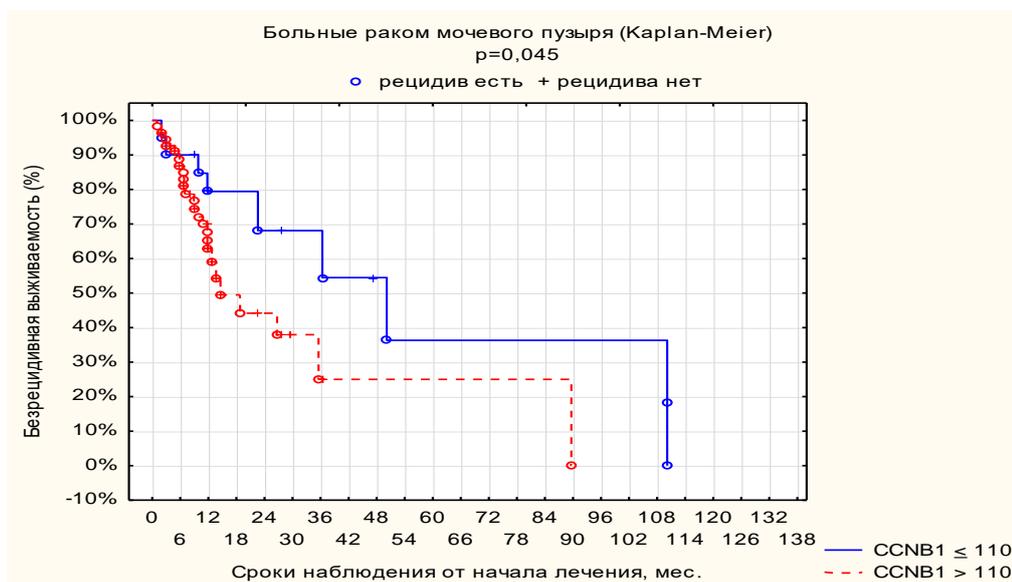


Рис.9 Безрецидивная выживаемость в зависимости от уровня экспрессии Ki67.

При Ki67 > 35 о.е. – медиана БРВ составила 13 месяцев, 1-летняя безрецидивная выживаемость –  $57,7 \pm 8,1\%$ , 2-хлетняя –  $39,8 \pm 9,4\%$  ( $p=0,02$ ).

Экспрессия Ki-67 выявляется во всех пролиферирующих клетках мочевого пузыря, 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 по данным нашего исследования, что совпадает с данными мировой литературы. Функция белка Ki-67 в МНИРМП, вероятно, зависит от организации гетерохроматина и предотвращения агрегации митотических хромосом, что приводит к их соответствующему распределению в дочерних клетках [Sobecki M., et al 2016]. Белок Ki-67 является маркером ростовой фракции клеток и, следовательно, также может быть признан маркером биологической агрессивности рака.

На рисунке 10 представлен график зависимости безрецидивной выживаемости от CCNB1. При экспрессии  $CCNB1 \leq 110$  о.е. медиана безрецидивной выживаемости – 40 месяцев, при  $CCNB1 > 110$  о.е. медиана составила 11 месяцев ( $p=0,045$ ).



Патогенез рецидива может быть опосредован путями FOXM1-CCNB1-Fanconi как у 2/3 больных остеосаркомой, у половины пациентов с колоректальным раком и у трети больных раком желудка [Lu C.D., Altiori D.C., 1998].

На рисунке 11 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 ± 9,1%, 2-хлетняя – 38 ± 10,2% (p=0,01).

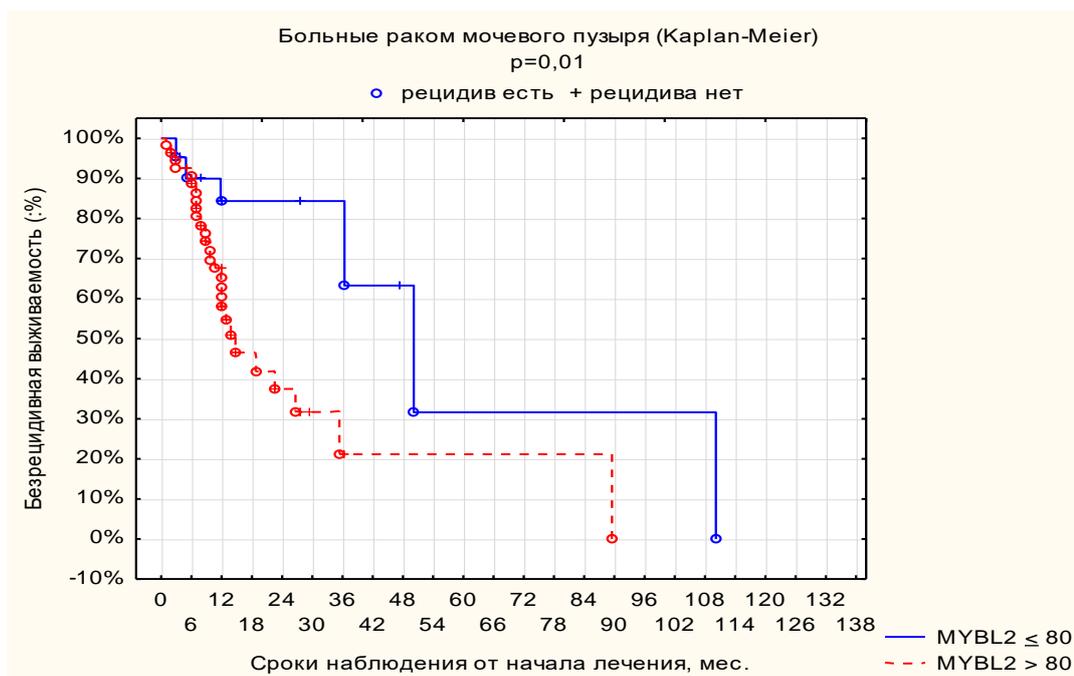


Рис.11 Безрецидивная выживаемость в зависимости от MYBL2.

Белок, кодируемый этим геном – член семейства транскрипционных факторов MYB, это – 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 Д1 и белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста. Исходя из результатов нашего исследования следует вывод, что при гиперэкспрессии в ткани МНИРМП MYBL2 ухудшается прогноз заболевания у пациентов, что наблюдается при картине рака молочной железы, колоректального рака, гепатоцеллюлярного рака [R. Baycley, F Ren, M. Zhang et al.].

На рисунке 12 – 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 ± 6,2%, 2-хлетняя БРВ – 67,2 ± 8,4%.

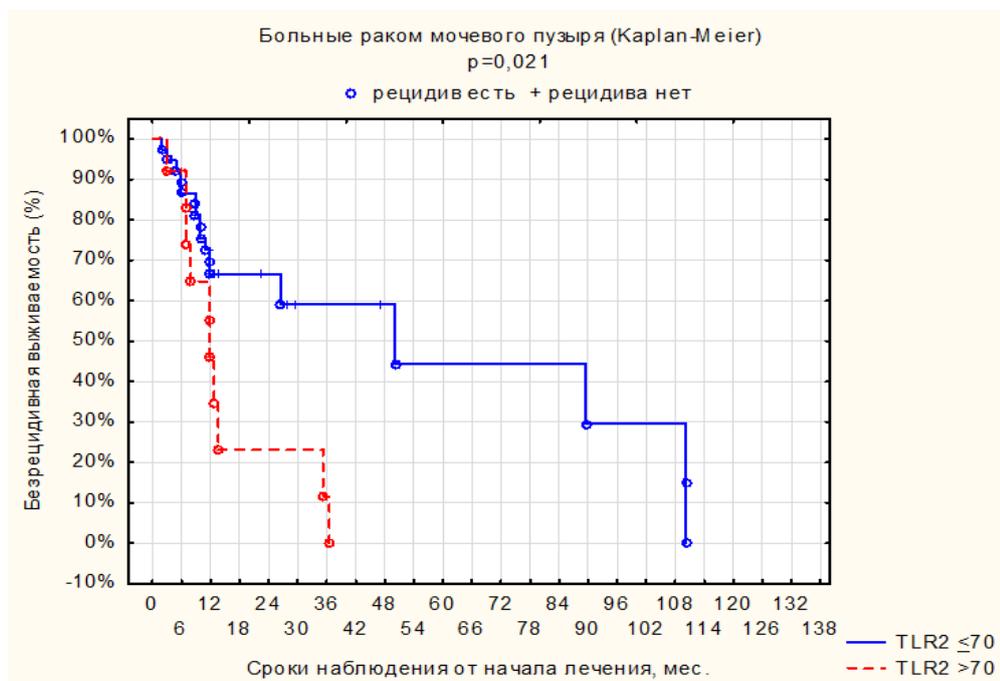


Рис. 12. Безрецидивная выживаемость в зависимости от уровня экспрессии TLR.

При TLR2 > 70 медиана равна 11,8 месяцев, 1-летняя безрецидивная выживаемость –  $65,7 \pm 12,5\%$ , 2-хлетняя –  $24,4 \pm 16,3\%$  ( $p=0,021$ ). Различия проявляются после 1 года наблюдения. Следует вывод, что передача сигналов TLR в микроокружении опухоли РМП сопровождается сложными взаимодействиями между клетками РМП и PAMP. Скорее всего TLR могут способствовать выживанию раковых клеток и ангиогенезу посредством воздействия цитокинов и хемокинов. Экспрессия TLR на опухолевых клетках может запускать сигнальный каскад NF- $\kappa$ 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. Характеристика иммунной микросреды опухоли, включая противоопухолевые иммунные субпопуляции и противоопухолевый профиль МНИРМП, может быть полезной для прогнозирования клинического исхода.

На рисунке 13 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 ≤ 20 о.е. медиана составила 35 месяцев, 1-летняя БРВ –  $78 \pm 9,6\%$ , 2-хлетняя –  $78 \pm 8,7\%$  ( $p=0,008$ ).

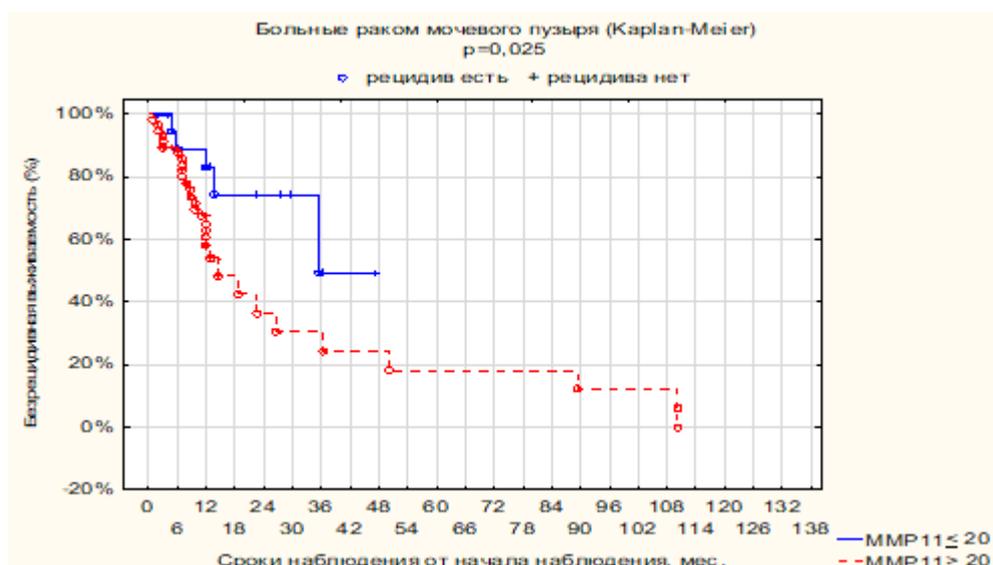


Рис. 13 Безрецидивная выживаемость в зависимости от MMP11.

С учетом данных по безрецидивной выживаемости проанализированы сочетания факторов прогноза для выявления групп больных с высоким риском раннего рецидива (таблица 16).

Таблица 16

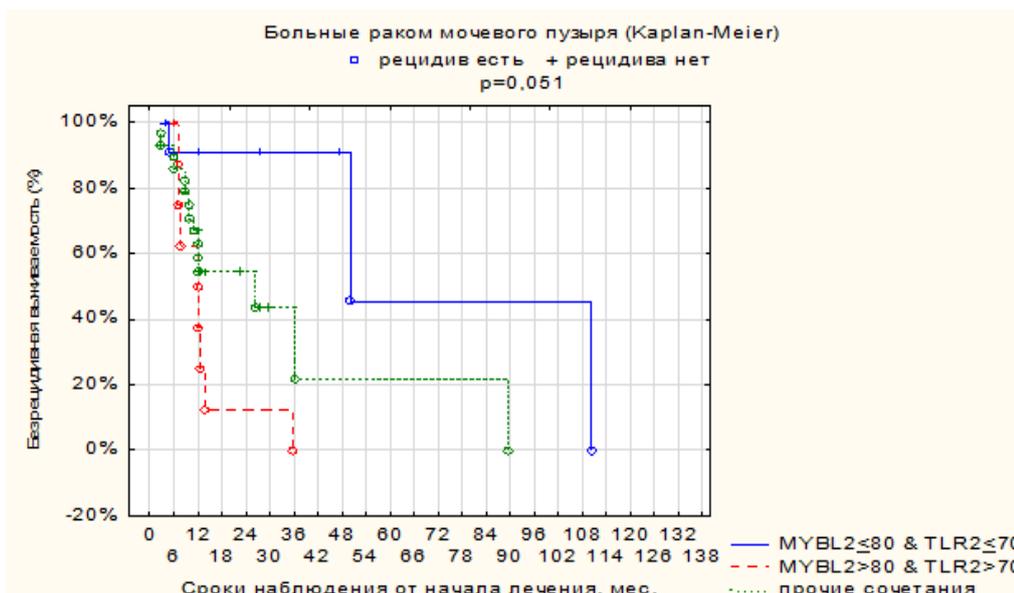
**Данные по безрецидивной выживаемости с учетом сочетания некоторых прогностически значимых генов.**

Сочетания генов	Количество сочетаний	Медиана	Бзрецидивная выживаемость			p
			1-летняя	2-хлетняя	3-хлетняя	
MYBL2≤80+TRL2≤70	12	Не достигнута	90,9±8,7	90,9±8,7	90,9±8,7	0,051
MYBL2>80+TRL2>70	9	11,8 мес.	37,5±17,1	12,5±12,0	0	
Прочие их сочетания	29	17,8 мес.	54,4±9,9	54,4±9,9	21,8±16,6	
MYBL2≤80+MMP11≤20	8	Не достигнута	85,7±13,2	85,7±13,2	85,7±13,2	0,025
MYBL2>80+MMP11>20	42	11,9 мес.	50,7±8,5	18,8±10,7	9,4±8,5	
Прочие их сочетания	24	35,6 мес.	81,5±8,4	72,5±11,3	36,2±19,0	
TRL2≤70+MMP11≤20	13	Не дост.	83,3±10,8	83,3±10,8	83,3±10,8	0,16
(TRL2>70+MMP11>20) или (TRL2>70+MMP11≤20)	14	11,8 мес.	42,2±14,3	21,1±12,7	10,6±9,8	
TRL2≤70+MMP11>20	24	17,3 мес.	55,2±10,7	55,2±10,7	41,4±14,4	

Из таблицы видно, что благоприятный прогноз безрецидивной выживаемости может быть у пациентов с экспрессией MYBL2 ≤ 80 + TLR2 ≤ 70 о.е., 1-летняя, 2-хлетняя и 3-хлетняя БРВ составила 90,9 ± 8,7%, при этом медиана безрецидивной выживаемости еще не достигнута (p=0,051). Также благоприятный прогноз БРВ может наблюдаться у пациентов с экспрессией MYBL2 ≤ 80 + MMP11 ≤ 20, при этом 3-хлетняя БРВ составила 85,7 ± 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 1-летняя БРВ составила –  $50,7 \pm 8,5\%$ , 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 14 и 15.



Оценена БРВ при сочетании VIRC5 и Ki67. VIRC5 >60 + Ki67 > 35, т.е. имеет место высокий уровень экспрессии белков, медиана БРВ составила 12,7 месяцев, 1-летняя безрецидивная выживаемость – 54,2 ± 9,5%, 3-хлетняя – 19,2 ± 14,5%.(рисунок 16)

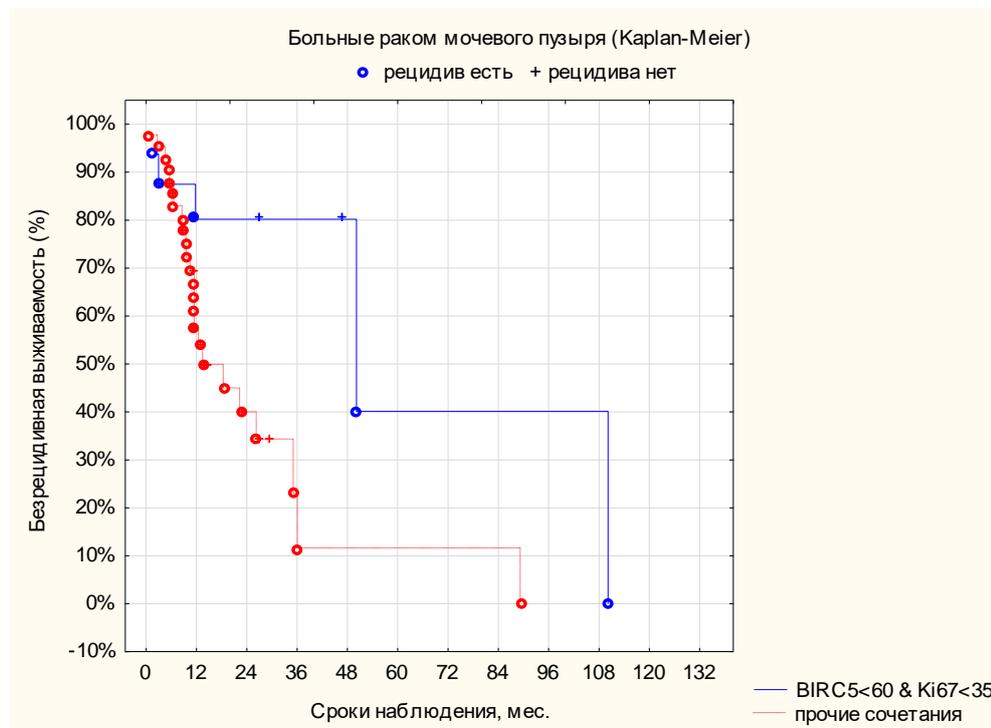


Рис.16 Безрецидивная выживаемость при сочетании экспрессии VIRC5 + Ki67.

Ниже представлена сводная таблица показателей экспрессии изучаемых в исследовании генов и безрецидивной выживаемости в 1 группе (Таблица 16).

Из таблицы 16 видно, что 7 генов достоверно влияют на безрецидивную выживаемость, это: VIRC5, Ki67, CCNB1, MYBL2, MMP11, TLR2, STK15.

К генам-маркерам при мышечно-неинвазивном раке мочевого пузыря отнесены – Ki67, CCNB1, MYBL2, VIRC5.

Таблица 16.

## Данные по медианам и БРВ 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
<b>BIRC5</b>	<b>108 ↑</b>	<b>27,9</b>	<b>36,3</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>&gt;60</b>	<b>0,04</b>
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
<b>Ki-67 порог 30</b>	<b>76,1 ↑</b>	<b>10,6</b>	<b>14,7</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&gt;30</b>	<b>0,024</b>
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
<b>CCNB1 порог 205</b>	<b>172 ↑</b>	<b>55,7</b>	<b>53,0</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&gt;205</b>	<b>0,045</b>
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
<b>MYBL2 порог 60</b>	<b>256 ↑</b>	<b>17,5</b>	<b>25,6</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&gt;80</b>	<b>0,01</b>
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
GPLY	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
<b>TPA порог 300</b>	<b>1177 ↑</b>	<b>142</b>	<b>114</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&gt;400</b>	<b>0,18 тенд</b>
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
<b>TLR2</b>	<b>55,7 ↓</b>	<b>57,7</b>	<b>61,8</b>	<b>&gt;0,5</b>	<b>0,08</b>	<b>&gt;70</b>	<b>0,02</b>
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 17).

**Таблица 17**

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

Сочетания генов	Количество сочетаний	Медиана	Бзрецидивная выживаемость			p
			1-летняя	2-хлетняя	3-хлетняя	
MYBL2 $\leq$ 80+TRL2 $\leq$ 70	12	Не достигнута.	90,9 $\pm$ 8,7	90,9 $\pm$ 8,7	90,9 $\pm$ 8,7	0,051
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	0,025
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 17 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 17 и 18.

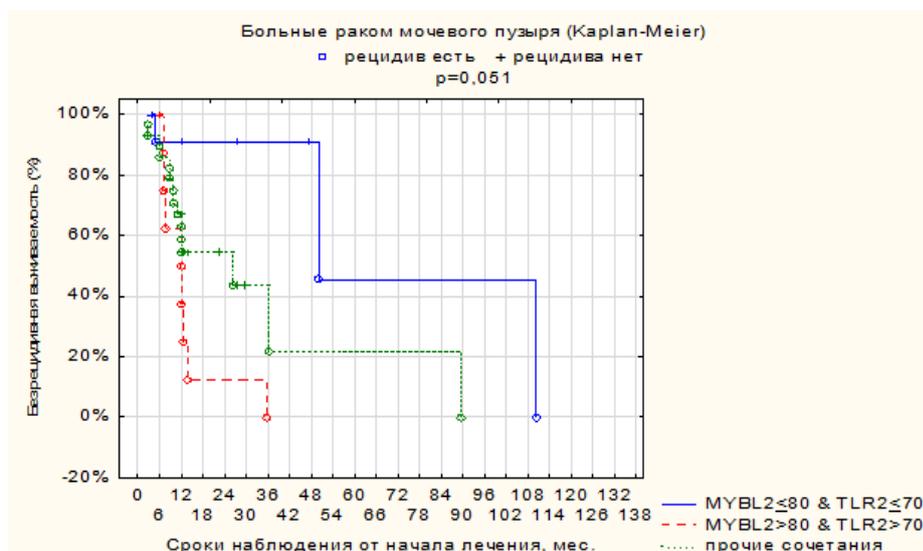


Рис. 17 Безрецидивная выживаемость в зависимости от сочетания экспрессии MYBL2+TLR2.

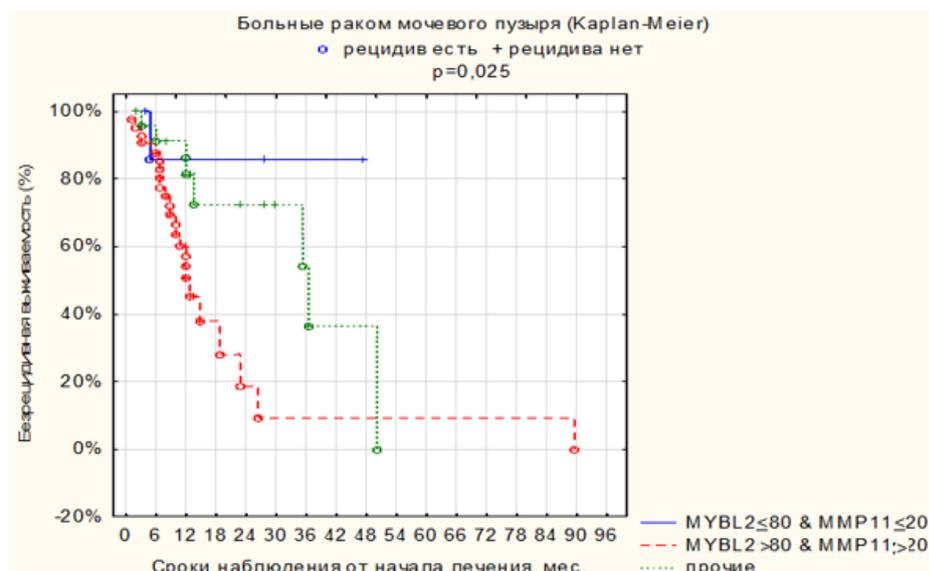


Рис. 18 Безрецидивная выживаемость в зависимости от сочетания экспрессии MYBL2+MMP11

Нами выполнен анализ сочетаний прогностических генов-маркеров с учетом данных многофакторного анализа. Оценена БРВ сочетания VIRC5 и Ki67 (рисунок 19). 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 –  $40,1 \pm 28,8\%$ .

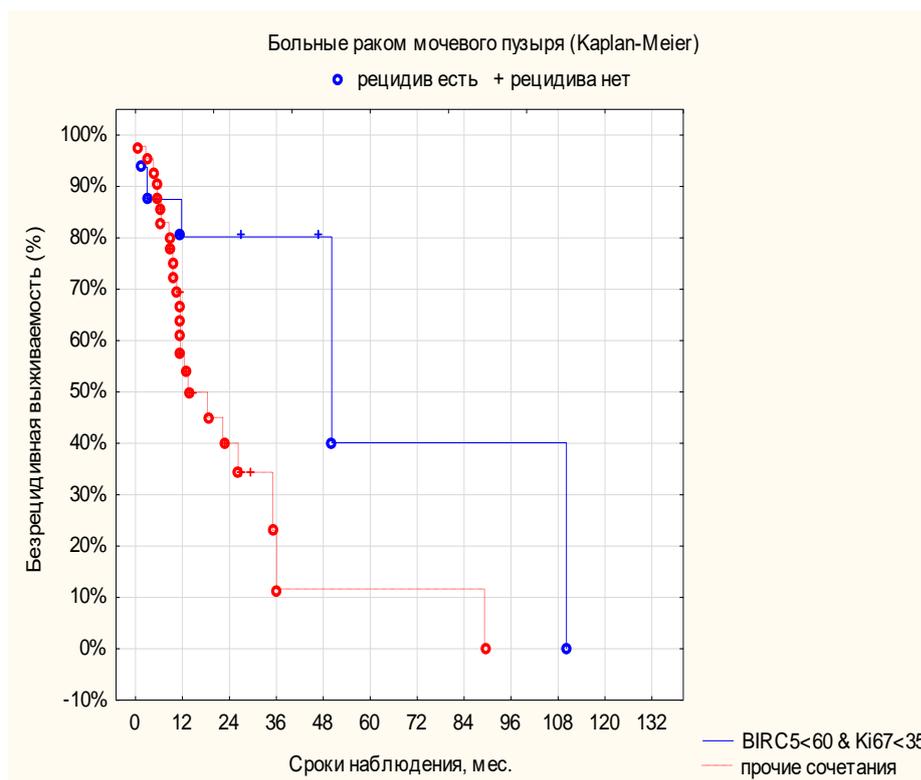


Рис.19 Безрецидивная выживаемость при сочетании экспрессии BIRC5 + Ki67.

У 22 больных BIRC5 >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.

Пациенты разделены на 2 группы, в 1-ую вошли больные с низким уровнем экспрессии мРНК обоих генов-маркеров, во 2-ую - все остальные пациенты: BIRC5 высокий + Ki67 низкий; BIRC5 высокий + Ki67 высокий; BIRC5 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 (таблица 18, рисунок 20).

## 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%	

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 гены-маркеры низкие. Медиана БРВ – 41,6 месяцев.

Группа В – все гены-маркеры высокие. Медиана БРВ – 13 месяцев.

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

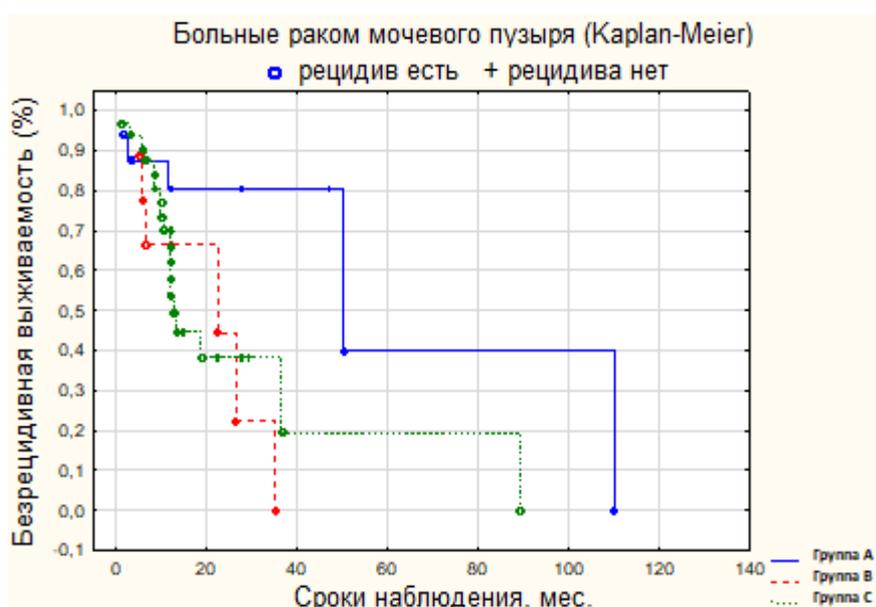


Рис.20 Данные по безрецидивной выживаемости при различных сочетаниях экспрессии мРНК генов-маркеры.

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. ( $p=0,024$ ).

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  $< 3$  см составила – 137,1 о.е., при размере  $\geq 3$  см – 284,4 о.е. ( $p=0,09$ ).

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  $\geq 3$  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 пяти вышеперечисленных маркеров выявлена приемлемая для медицинских исследований информативность  $> 75\%$ . У четырех из них обнаружена корреляция с БРВ: Ki67, CCNB1, MYBL2, и BIRC5.

Определена 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- $\alpha$   $< 95$  о.е., TLR2  $> 70$ , MMP11  $> 20$  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 создана модель оценки прогноза заболевания, которая подразумевает разделение пациентов на 4 группы в зависимости от уровня экспрессии мРНК генов-маркеров и их сочетаний. 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 IIIа (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 IIIб - решение вопроса о цистэктомии. Алгоритм лечения представлен на рисунке 21.

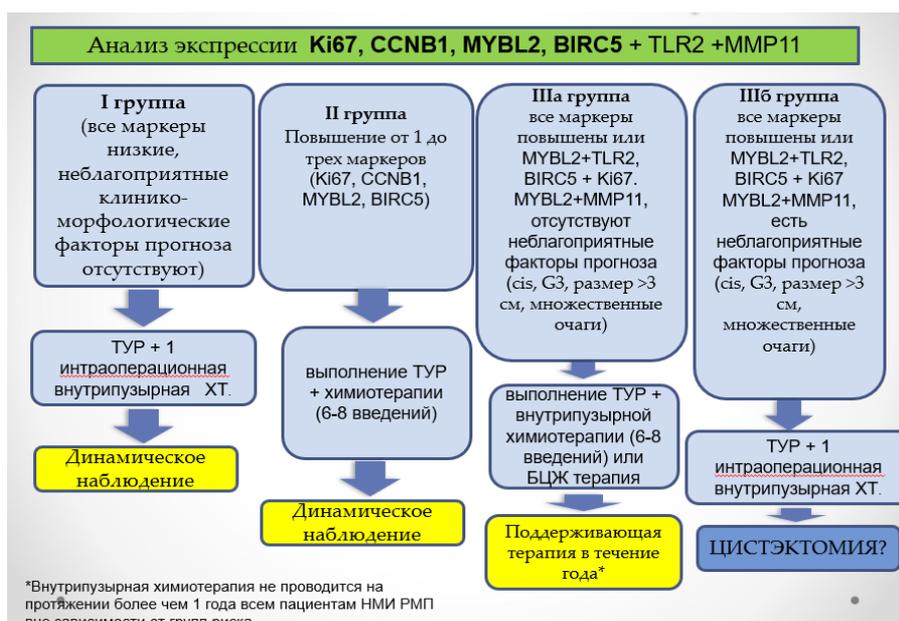


Рис. 21 – Алгоритм лечения МНИРМП с использованием молекулярно-генетических исследований

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.

## 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 $\gamma$ , CD45, TNF- $\alpha$ , C-MYC, BIRC5, CCND1, NDRG1, CD68, Ki67, CD56, TGFb, CD69, VEGFA189, TLR4, HLA-G1, TLR-7, HLA-G5, GATA2, И-28a, LGALS1, И-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, ИL-2, ИL-12, ИL-15, ИL-7, p16INK4A, PAPPА, SCUBE2, TNF- $\alpha$ , VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, MMP2, MMP7, MMP11, CD68, CD69, CCND1, C-MYC, BAG1, IFN $\gamma$ , 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 IIIa – 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 IIIb - 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 внутрипузырная ХТ с последующим динамическим наблюдением.

II - выполнение ТУР + химиотерапии (6-8 введений) с последующим динамическим наблюдением

IIIa – выполнение ТУР с последующей внутрипузырной БЦЖ терапией или химиотерапией (6-8 введений). Поддерживающая терапия 12 мес.

IIIb – 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; 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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

- 1) Системная терапия метастатического уротелиального рака: современные стандарты и рекомендации по лечению / Р. А. Гафанов, А. Г. Дзидзария, И. Б. Кравцов, С. В. Фастовец // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. – 2018. – Т. 2. – № 6. – С. 28-35. – EDN XZRSNF.
- 2) Оценка эффективности и безопасности внутривезикулярной БЦЖ терапии / А. Ю. Павлов, А. Г. Дзидзария, И. Б. Кравцов [и др.] // XVIII конгресс российского общества урологов и российско-китайский форум по урологии : Материалы конгресса, Екатеринбург, 08–10 ноября 2018 года. – Екатеринбург: Российское общество урологов, 2018. – С. 176. – EDN YQCLED.
- 3) Опыт использования атезолизумаба в 1-й линии терапии при метастатическом уротелиальном раке / Р. А. Гафанов, А. Г. Дзидзария, В. А. Ребрикова // Онкоурология. – 2019. – Т. 15. – № 3. – С. 113-119. – DOI 10.17650/1726-9776-2019-15-3-113-119. – EDN QIWPTY.
- 4) Современные вопросы молекулярной диагностики рака мочевого пузыря / А. Г. Дзидзария, А. Ю. Павлов, Р. А. Гафанов [и др.] // РМЖ. – 2019. – Т. 27. – № 2. – С. 56-60. – EDN JARYVS.
- 5) Ингибиторы иммунных контрольных точек в лечении рака мочевого пузыря / В. А. Солодкий, А. Ю. Павлов, А. Г. Дзидзария [и др.] // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. – 2020. – Т. 4. – № 2. – С. 111-117. – EDN PKUIZV.
- 6) Рак мочевого пузыря: роль модифицируемых факторов риска / В. А. Солодкий, А. Ю. Павлов, А. Г. Дзидзария, Р. А. Гафанов // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. – 2020. – Т. 4. – № 2. – С. 105-110. – EDN WRDCPF.
- 7) Лапароскопическая цистпростатвезикушктомия с формированием илеокондуита при тазовой дистопии почек при мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря / А. Ю. Павлов, А. Г. Дзидзария, И. Б. Кравцов [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2020. – № 4. – С. 24-29. – DOI 10.29188/2222-8543-2020-13-4-24-29. – EDN BPMWYP.
- 8) Long non-coding RNAs in oncurology / I. Gareev, Y. Gileva, DZIDZARIA A., O. Beylerli [et al.] // Non-coding RNA Research. – 2021. – Vol. 6. – No 3. – P. 139-145. – DOI 10.1016/j.ncrna.2021.08.001. – EDN WYCBQM.
- 9) Химиоиммунотерапия при уротелиальном раке: параллельная или последовательная? / А. Ю. Павлов, А. Г. Дзидзария, Р. А. Гафанов [и др.] // Онкоурология. – 2021. – Т. 17. – № 4. – С. 124-128. – DOI 10.17650/1726-9776-2021-17-4-124-128. – EDN OCHOAY.
- 10) Биомаркеры мочи при раке мочевого пузыря: обзор текущего состояния и будущих направлений / В. А. Солодкий, А. Ю. Павлов, А. Г. Дзидзария [и др.] // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. – 2021. – Т. 21. – № 3. – С. 37-62. – EDN QVUFNB.
- 11) Ki-67 и Сурвивин (BIRC5) как биомаркеры прогрессии и рецидивирования мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря // А. Ю. Павлов, А. Г. Дзидзария, В.К. Боженко [и др.] // Вестник Российского научного

- центра рентгенорадиологии. – 2022. – Т. 22. – № 4.  
[www.vestnik.ncrr.ru/vestnik/v22/docs/dzidzaria\\_t2.pdf](http://www.vestnik.ncrr.ru/vestnik/v22/docs/dzidzaria_t2.pdf)
- 12) Роль экспрессии мРНК генов MYB2, TLR2 в рецидивировании мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря // А. Ю. Павлов, А. Г. Дзидзария, В.К. Боженко [и др.] // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. – 2022. – Т. 22. – № 4.  
[www.vestnik.ncrr.ru/vestnik/v22/docs/dzidzaria\\_t2\\_2.pdf](http://www.vestnik.ncrr.ru/vestnik/v22/docs/dzidzaria_t2_2.pdf)
- 13) Мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря: лечение тулиевым лазером в сравнении с трансуретральной электрорезекцией. Солодкий В.А., Павлов А.Ю., Дзидзария А.Г., Гафанов Р.А., Абдирахимов Л.А., Халиль И.И. ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, г. Москва. [http://vestnik.ncrr.ru/vestnik/v22/docs/dzidzariya\\_t3.pdf](http://vestnik.ncrr.ru/vestnik/v22/docs/dzidzariya_t3.pdf)
- 14) Мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря: современный взгляд на биомаркеры. Солодкий В.А., Павлов А.Ю., Дзидзария А.Г., Гафанов Р.А., Абдирахимов Л.А., Боженко В.К., Цаллагова З.С. ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, г. Москва. [http://vestnik.ncrr.ru/vestnik/v22/docs/dzidzariya\\_t3\\_1.pdf](http://vestnik.ncrr.ru/vestnik/v22/docs/dzidzariya_t3_1.pdf)
- 15) Высокочувствительные и высокоспецифичные гены-маркеры мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря: Ki67, CCNB1, MYBL2, TPA, BIRC5. Павлов А.Ю., Дзидзария А.Г., Боженко В.К., Гафанов Р.А., Солодкий В.А. ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, г. Москва. [http://vestnik.ncrr.ru/vestnik/v22/docs/dzidzariya\\_t3\\_2.pdf](http://vestnik.ncrr.ru/vestnik/v22/docs/dzidzariya_t3_2.pdf)

## **ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ДГПЖ – Доброкачественная гиперплазия предстательной железы

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

МКБ – мочекаменная болезнь

МНИРМП- мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря

МИРМП- мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря

РМП – рак мочевого пузыря

РНК - рибонуклеиновая кислота

СМА- спинальная анестезия

ТУР\TUR\TURB – трансуретральная резекция

ФДД – фотодинамическая диагностика

БЦЖ - bacillus Gelmette-Guerin бацилла Кальметта-Герена

(противотуберкулёзная вакцина)

Cis – carcinoma in situ

EAU- European Association of Urology (Европейская ассоциация урологов)

EORTC – European Organisation for Research and Treatment of Cancer

(Европейская организация по лечению рака)

РАМР- молекулярные паттерны ассоциированные с патогенами