

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Гильманова Рита Фларидовна

**Оценка диагностической значимости ассоциаций оптических
маркеров у больных немышечно–инвазивным раком мочевого пузыря**

3.1.13. – Урология и андрология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

академик РАН, профессор

Павлов Валентин Николаевич

Научный консультант:

член-корреспондент РАН, профессор

Иванов Сергей Анатольевич

Уфа – 2022

Оглавление	
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Современное состояние проблемы диагностики рака мочевого пузыря.....	10
1.1.1 Роль инструментальных методов исследования в диагностике рака мочевого пузыря	11
1.1.2 Роль гистологического исследования в диагностике рака мочевого пузыря	13
1.1.3 Роль онкомаркеров в диагностике рака мочевого пузыря	14
1.2 Современные методы прогнозирования клинического течения рака мочевого пузыря.....	17
1.3 Методы лечения мышечно–инвазивного и немышечно–инвазивного рака мочевого пузыря.....	18
1.4 Раман–спектроскопия как новый метод оптической диагностики опухолей	20
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	23
2.1 Материал исследования.....	23
2.2 Методы исследования.....	28
2.3 Раман– спектроскопия	29
2.4 Статистические методы исследования	31
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ.....	40
ГЛАВА 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ НЕМЫШЕЧНО–ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ.....	46
ГЛАВА 5 РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ МЫШЕЧНО–ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ	61
ГЛАВА 6 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОПТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ РЕЦИДИВНОМ И НЕ РЕЦИДИВНОМ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ.....	70
ГЛАВА 7 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	

.....	84
ВЫВОДЫ	100
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Разработка новых и усовершенствование существующих методов и технологий диагностики рака мочевого пузыря (РМП) является одним из приоритетных направлений современной урологии. Повышенный интерес к данной проблеме обусловлен ежегодным увеличением показателя заболеваемости.

В структуре онкологической заболеваемости населения России рак мочевого пузыря занимает девятое место среди мужчин и шестнадцатое – среди женщин. Показатель заболеваемости на 100 тыс. населения составил 13,2 для мужчин и 2,3 для женщин. Прирост заболеваемости для обоих полов за последние 10 лет составил 28,3 %. Стандартизованный показатель смертности для мужчин и женщин составил 4,7 и 0,5 соответственно (Каприн А.Д. и др., 2020).

Рак мочевого пузыря является агрессивным и часто рецидивирующим заболеванием. Эффективность лечения, как правило, зависит от следующих факторов: раннего выявления опухоли, выявления опухоли на неинвазивной стадии, радикальности оперативного вмешательства (Белякова Л.И. и др., 2021). Улучшение методов диагностики позволяет раньше начать эффективное лечение, снизить частоту рецидивов.

На сегодняшний день существует множество молекулярно–генетических маркеров первичного заболевания и рецидива рака мочевого пузыря: FGF, FGFR, VEGF, p53, Ki–67 и др., однако они имеют ряд недостатков: высокий уровень ложноположительных результатов, дороговизна, длительность тестирования, что не позволяет применять их в широкой клинической практике (Михайленко Д.С. и др., 2019; Jebar A.N. et al., 2005; Venyo A. et al., 2010; Moro F.D. et al., 2013; Papadogianni D. et al., 2014; Noel N. et al., 2015).

Среди современных методов, используемых в диагностике онкологических заболеваний, раман–спектроскопия в настоящее время

занимает особое место как чувствительный, неразрушающий, не требующий специальной пробоподготовки исследуемого материала, малоинвазивный аналитический метод (Глыбочко П.В. и др., 2009; Moreira L.M. et al., 2008).

Раман–спектроскопия (спектроскопия рассеяния света) является новым методом, способным идентифицировать и характеризовать патологические изменения в тканях человека на клеточном и субклеточном уровнях; он может быть использован для диагностики и обнаружения заболеваний, включая неинвазивный мониторинг ранних изменений в тканях человека, вызванных развитием рака (Тучин В.В., 2005). В последние два десятилетия в научных исследованиях данный метод использовали для *in vitro* и *in vivo* мониторинга и диагностики заболеваний, таких как катаракта, атеросклероз коронарных сосудов, меланома кожи, патологии костей и зубов (Тучин В.В., 2005). Метод рамановской спектроскопии позволяет определить молекулярный профиль исследуемого материала (Sodo A. et al., 2020).

Проблема разработки новых технологий ранней диагностики рака мочевого пузыря, дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований мочевого пузыря, выявления опухоли на неинвазивной стадии, диагностики рецидива и прогрессии, оценки эффективности лечения, является актуальной задачей. В связи с этим представляется актуальным проведение экспериментально–клинического исследования с целью определения спектральных характеристик инвазивных и неинвазивных форм рака мочевого пузыря, а так же изменений этих характеристик на фоне лечения, с целью оптимизации диагностики и уточнения спектральных характеристик опухоли и выбора оптимальной тактики лечения больных.

Цель исследования

Оценка перспективности использования молекулярных оптических маркеров в определении прогрессии и рецидива немышечно–инвазивного рака мочевого пузыря.

Задачи исследования

1. Разработать условия морфоспектроскопического исследования и определить оптические маркеры нормальной ткани мочевого пузыря методом раман-спектроскопии.
2. Определить ассоциации оптических маркеров и особенности молекулярного профиля немышечно-инвазивного и мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря методом раман-спектроскопии.
3. Определить особенности оптического молекулярного профиля ткани мочевого пузыря у пациентов с немышечно-инвазивным раком на фоне проведения внутривезикулярной БЦЖ-терапии, а также при рецидиве и прогрессии заболевания.
4. Оценить результаты лечения больных немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря и выявить характерные изменения оптических маркеров рецидива и мышечной инвазии в процессе лечения.

Научная новизна исследования

Впервые проведено исследование нормальной ткани мочевого пузыря с определением основных раман-спектроскопических характеристик с последующим анализом полученных спектров при помощи интеллектуальных методов обработки данных.

Впервые определены ассоциации оптических маркеров немышечно-инвазивного и мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря: $502 - 730 \text{ см}^{-1}$ – гидроксильный радикал, 725 см^{-1} – СН-группа аденина, 1031 см^{-1} – фенилаланин, 1558 см^{-1} триптофан, 850 см^{-1} , 1250 см^{-1} – связь С-NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина, 494 см^{-1} – L-аргинин, 589 см^{-1} – амид-VI, 639 см^{-1} – L-тирозин, 1654 см^{-1} – амид-I и α -спираль.

Впервые определены оптические маркеры, ассоциированные с рецидивом рака мочевого пузыря и мышечно-инвазивной прогрессией: 725 см^{-1} – гипоксантин, 1328 см^{-1} – основания ДНК/РНК, 1455 см^{-1} – дезоксирибоза, 1558 см^{-1} – триптофан.

Впервые с помощью метода раман–спектроскопии определены клинически значимые ассоциации оптических маркеров нормальной ткани мочевого пузыря, немышечно-инвазивного и мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря.

Практическая значимость

Совокупность полученных в данном исследовании данных может являться основой для создания модели оптической дифференцировки нормальной и патологически измененной ткани при раке мочевого пузыря на ранних стадиях.

В перспективе метод может применяться в режиме реального времени для оценки прогрессии опухоли по T (классификация TNM) и степени ее дифференцировки по градации G.

Основные положения, выносимые на защиту

1) Нормальная ткань мочевого пузыря характеризуется пиками, ассоциированными с нуклеиновыми кислотами, β -D-глюкопиранозой, липидами, коллагеном, белками.

2) Морфоспектроскопический паттерн немышечно–инвазивного рака мочевого пузыря ассоциируется пиками гидроксильного радикала, фенилаланина, липидов и белков, при этом паттерны, ассоциирующиеся с коллагеном, комплексами жирных кислот представлены пиками низкой интенсивности.

3) Пики, ассоциированные с гипоксантином, основаниями ДНК/РНК, дезоксирибозой, триптофаном, характерны для немышечно–инвазивного и мышечно–инвазивного рака и могут свидетельствовать о рецидиве опухоли.

Материалы диссертационного исследования представлены и обсуждены на:

1. XVIII Конгрессе РОУ и Российско-Китайского Форума урологов (Екатеринбург, 2018), XIII Международном Конгрессе Российского общества онкоурологов (Москва, 2018), XIII Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ - 2018», (Севастополь, 2018), Congress on Urological Cancers (EMUC19) (Vienna (Austria), 2019), Научно-практической конференции «Актуальные проблемы в урологии» (Москва, 2019), 26th Meeting of the EAU Section of Urological Research: In collaboration with the Society for Basic Urologic Research and the EAU Section of Uropathology (Vienna (Austria), 2019), Application of raman-spectroscopy in the diagnosis of bladder cancer in-vitro, XV Международном Конгрессе Российского общества онкоурологов (Москва, 2020), Третьем международном форуме онкологии и радиологии FORLIFE-2020 (Москва, 2020), XI Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Казань, 2020), XX Конгрессе РОУ (Москва, 2020), 1-st International Conference of Asian Oncology Society (Manila (Philippines), 2020), Международной научно-практической онлайн конференции «Реконструктивная урогинекология и хирургия тазового дна» (Уфа, 2021), VII Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи (Санкт-Петербург, 2021), Осеннем онлайн марафоне "ONLINE-ОСЕНЬ" (Москва, 2021), X Международном Конгрессе "Фотодинамическая Терапия и Фотодиагностика" (Москва, 2021), IV Международном Форуме онкологии и радиотерапии (Москва, 2021), III весеннем онкологическом онлайн - марафоне "ONLINE ВЕСНА" (Москва, 2022), V Юбилейном Невском урологическом форуме (Санкт-Петербург, 2022), Конкурсе молодых ученых в рамках XIII Съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Казахстан, 2022).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 114

страницах и иллюстрирована 36 рисунками и 21 таблицей. Библиографический указатель содержит 111 литературных источников, из которых 28 – отечественных и 83 – зарубежных авторов.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современное состояние проблемы диагностики рака мочевого пузыря

За 2021 год во всем мире было зарегистрировано 549 393 новых случаев рака мочевого пузыря, из которых погибло почти 200 000 человек [36, 63].

Рак мочевого пузыря на ранних стадиях в России диагностируется в 45% случаях. При этом доля немышечно–инвазивного рака (Ta, T1, карциномы *in situ* (CIS)) составляет 70–80 % случаев, мышечно–инвазивная форма составляет около 25% случаев. Наиболее распространенной гистологической формой рака является уротелиальная карцинома (переходно–клеточный рак). При выявлении признаков инвазии опухоли в мышечный слой повышается риск лимфогенного и гематогенного метастазирования опухоли.

На ранних стадиях рак мочевого пузыря может проявляться симптомами других заболеваний таких, как мочекаменная болезнь, воспалительные заболевания мочевыводящих путей и др. В связи с чем, большинство больных раком мочевого пузыря, особенно с немышечно-инвазивной формой, получают лечение в условиях урологического отделения. В связи с этим растет актуальность поиска новых методов ранней диагностики первичной опухоли, прогрессии по градации G и по T (по классификации TNM), методов контроля эффективности лечения, которые позволят оказать своевременную хирургическую помощь в объеме радикальной операции.

1.1.1 Роль инструментальных методов исследования в диагностике рака мочевого пузыря

Приоритетным методом диагностики новообразований мочевого пузыря является цистоскопия, трансуретральная резекция мочевого пузыря с последующим гистологическим исследованием материала.

Комплекс методов лучевой диагностики при раке мочевого пузыря включает ультразвуковое исследование, рентгенологические методики, компьютерную и магнитно–резонансную томографию [7, 60]. Среди мероприятий первичного обследования, на сегодняшний день, наиболее доступным методом является ультразвуковая диагностика.

Трансабдоминальное ультразвуковое исследование является одним из основных методов обследования по поводу рака мочевого пузыря. Это связано с безопасностью метода, способностью отчетливо визуализировать большинство опухолей, расположенных в области боковых стенок мочевого пузыря, а также оценивать состояние почек, верхних мочевых путей и зон метастазирования. Значительно хуже при трансабдоминальном исследовании выявляются опухоли, расположенные в области передней стенки, шейки мочевого пузыря и треугольника Льюто [10]. Режим доплерографии в рамках проводимого УЗИ помогает установить факт кровотока в пределах опухоли и дифференцировать его от возможного осадка или сгустка крови. При трансабдоминальном исследовании не может быть оценена степень инвазии стенки мочевого пузыря [34]. Отек подлежащей стенки пузыря, наличие внутрипузырных кровяных сгустков, иногда – кальциноз опухоли могут приводить к завышению стадии процесса [65]. Чувствительность УЗИ при определении стадии опухолевого процесса составляет при T1 – 80,6 %, при T2 – 91,2 %, при T3–4 – 93,3 % [7]. При этом выявляемость опухолей менее 0,5 см не превышает 38 %, что может быть связано с малой емкостью мочевого пузыря [7]. При всех видах ультрасонографии возможны ошибки в оценке местного распространения РМП. Они могут быть вызваны рубцовыми изменениями

стенок мочевого пузыря вокруг опухоли, их трабекулярностью, наличием цистита и многими другими причинами. Неправильная интерпретация данных, полученных при УЗИ мочевого пузыря, а также наличие выраженной дизурии в 15–30 % являются причиной диагностических ошибок в выявлении опухоли и, как следствие, выбора неправильной тактики лечения.

Магнитно–резонансная томография (МРТ) является диагностическим методом, позволяющим оценить размеры образований мочевого пузыря, глубину поражения стенки, тем самым разграничить инвазивную форму от неинвазивной формы рака [7]. При сохранной низкой интенсивности мышечного слоя предполагается наличие неинвазивной опухоли (стадии T_a или T₁). Исследователи сходятся во мнении, что по данным МРТ нет возможности дифференцировать эти две смежные стадии. Когда нормальный низкий сигнал мышечной стенки мочевого пузыря прерывается сигналом промежуточной интенсивности, предполагается мышечно–инвазивная форма. Поражение стенки мочевого пузыря с нечеткой, неровной внешней границей и наличием продолговатых участков интенсивности, идентичной сигналу опухоли в паравезикальной клетчатке, является признаком стадии T_{3b} [107]. В литературе отмечается распространенная ошибка в оценке местного распространения РМП, с завышением стадии заболевания из–за наличия признаков воспаления, фиброза и грануляций, имитирующих паравезикальную инвазию, особенно после трансуретральной резекции [107].

Спиральная компьютерная томография (СКТ) является одним из методов диагностики рака мочевого пузыря, чувствительность метода при определении инвазии в мышечный слой достигает 35 %, пораженных регионарных лимфатических узлов варьирует от 73 до 97 %, вовлечение соседних структур – 87 % [106]. После ТУР мочевого пузыря, ТУР–биопсии опухоли возникает линейное повышение плотности слизистой оболочки мочевого пузыря при контрастировании за счет участков фиброза, что ограничивает специфичность КТ [109]. Дифференцировать послеоперационное воспалительное утолщение стенки мочевого пузыря или мышечную гипертрофию, и инфильтративную

опухоль с помощью СКТ достаточно трудно, патологической может считаться толщина стенки более 5 мм [106, 107]. Точность метода в определении стадии РМП составляет примерно 60 %, с тенденцией к завышению стадии [109].

Вышеперечисленные диагностические методы являются звеньями диагностического алгоритма для постановки диагноза рака мочевого пузыря, контроля заболевания, оценки эффективности лечения.

1.1.2 Роль гистологического исследования в диагностике рака мочевого пузыря

Цистоскопия с последующей биопсией/трансуретральная резекция мочевого пузыря являются основными методами диагностики и мониторинга рака мочевого пузыря в современной клинической практике. Гистологическое исследование ткани с определением глубины инвазии опухоли, степени дифференцировки является стандартом верификации диагноза. С учетом данных гистологического заключения, данных инструментальных и лабораторных исследований, определяется метод лечения, возможно прогнозирование клинического течения заболевания [7, 24, 33, 53, 59].

В зависимости от глубины инвазии опухоли за пределы слизистой оболочки мочевого пузыря переходно–клеточный РМП делят на две группы: немышечно–инвазивный (Tis, Ta и T1) и мышечно–инвазивный (T2, T3 и T4) рак [7, 24, 53].

Согласно клиническим рекомендациям при немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря рекомендовано проведение ТУР мочевого пузыря с однократным немедленным внутрипузырным введением химиопрепарата (Доксорубицин, Митомицин) [47, 54, 109]. Пациентам группы высокого риска рекомендована адъювантная терапия – внутрипузырная БЦЖ–терапия [48, 57].

Радикальная цистэктомия с тазовой лимфодиссекцией в сочетании или без неоадъювантной химиотерапией является наиболее часто используемым во

многих странах вариантом лечения при T2–4aN0M0. Радикальная цистэктомия с сочетанной ХТ обеспечивают 5–летнюю выживаемость около 50 % [51].

По данным научных трудов частота рецидивов немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря после ТУР мочевого пузыря составляет 60–90% в течение 3–5 лет наблюдения: стадия Tа составляет 2–4%, T1 – 29–30%, для CIS около 54% [33, 101, 102]. Кроме высокой частоты рецидивов неинвазивного рака мочевого пузыря, отмечается прогрессирование процесса до распространения опухоли в мышечный слой мочевого пузыря (T), снижение степени дифференцировки (G). Основными причинами рецидива являются: наличие невидимых микроочагов *in situ*, пропущенные при первой ТУР, возможная имплантация раковых клеток на слизистой мочевого пузыря, не устраненные этиологические факторы [14, 70].

Степень дифференцировки опухоли (по G) напрямую связана со спецификой роста опухоли: соответственно G1 характеризуется экзофитным ростом, G3 – инфильтрирующим типом роста. Степень дифференцировки и наличие инвазивного роста опухоли определяют прогноз заболевания и клиническое течение, следовательно, и выбор методов лечения.

1.1.3 Роль онкомаркеров в диагностике рака мочевого пузыря

Определение сывороточных и уринарных онкомаркеров, являясь информативным и неинвазивным методом, на сегодняшний день, считается одним из перспективных направлений ранней диагностики РМП [4, 26, 58, 98].

При раке мочевого пузыря наблюдаются хромосомные изменения, которые возможно обнаружить с помощью теста флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) «UROVISION». Данный метод предназначен для обнаружения в клетках опухоли и в слущенных клетках осадка мочи увеличения числа копий 3-, 7- и 17-й хромосом (анеуплоидия) и потерю локуса p21 на 9-й хромосоме, где находится ген p16 – онкосупрессор. При использовании данного метода необходимо валидировать результаты теста

вторым морфологом (при пограничных абберациях), возможно получить ложноположительные результаты у больных с другими опухолями мочевыделительной системы, возможно получение некорректных данных при бактериурии. Чувствительность метода составляет от 69–85%, специфичность – 78–92%. В связи с дороговизной данный метод не используется в России в широкой клинической практике [35].

Белки ядерного матрикса (nuclear matrix proteins, NMPs) играют важную роль в структуре ядра и участвуют во всех этапах его функционирования, начиная от репликации ДНК и заканчивая регулированием экспрессии генов. Некоторые из NMPs сверхэкспрессируются в уротелиальные опухоли и высвобождаются в мочу при апоптозе опухолевых клеток. Из этих белков наиболее широко исследован NMP22; ИФА–тест на РМП NMP22 и тесты NMP22 BladderChek используются как при диагностике, так и при мониторинге рецидива рака. Эффективность анализов NMP22 была оценена в нескольких мета–анализах. R. Chou и соавт. [104] продемонстрировали чувствительность 69% и специфичность 77% для количественного теста ИФА. NMP22 остается одним из наиболее хорошо изученных биомаркеров на сегодняшний день. Однако большинство мета–анализов регистрируют недостаточную чувствительность теста на NMP22 при самостоятельном использовании. Как и многие доступные биомаркеры, тест обладает особенно низкой чувствительностью для выявления низкодифференцированной опухоли [104]. Ложноположительные результаты часто встречаются у пациентов с доброкачественными заболеваниями мочевого пузыря, такими как инфекции, камни, воспаление и гематурия.

Тесты ВТА Stat/ВТА ТРАК – это иммуноанализ *in vitro*, который выявляет наличие белка, связанного с человеческим фактором комплемента Н, в моче пациентов с РМП. ВТАstat – это качественный анализ у постели больного, результаты которого доступны в течение 5 минут, в то время как ВТА ТРАК – это специализированный количественный ИФА, используемый для мониторинга рецидива РМП в сочетании с цистоскопией. В мета–анализе

13 исследований ВТА stat теста была показана его более высокая чувствительность (67%, 95% доверительный интервал 64% – 69%) по сравнению с цитологическим исследованием мочи (43%, 95% доверительный интервал 40% – 46%), но специфичность была ниже [93]. Как и другие биомаркеры, ВТА Stat обладает гораздо более высокой чувствительностью к опухоли высокой степени злокачественности (74%), чем к опухоли с низкой степенью злокачественности (25%); специфичность теста при опухолях высокой степени злокачественности составляет 77% [93]. В целом, чувствительность ВТА stat колеблется в диапазоне 57% – 82%, специфичность – в диапазоне 68% – 93% [7, 22, 60]. ВТА ТРАК имеет чувствительность 66 – 77% и специфичность от 5% до 75% [93]. Эти цифры, как правило, указывают на более высокую чувствительность тестов, чем при цитологическом исследовании, но, как и в случае с NMP22, анализы ВТА имеют высокую частоту ложноположительных результатов у пациентов с воспалительными заболеваниями мочевыводящих путей.

UBC – urinary bladder cancer (цитокератины 8, 18) – белковые фрагменты промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток, обладающие тканевой специфичностью, число которых увеличивается при раковых процессах. Чувствительность метода = 67–81%, специфичность = 78–90% в диагностике РМП. Возможно получение ложноположительного результата теста при бактериальных инфекциях мочевыделительной системы и мочекаменной болезни [39].

Большинство исследователей биомаркеров РМП отмечают высокую долю ложноположительных результатов при их применении. Некоторые биомаркеры могут давать ложноположительные результаты у 12% – 26% пациентов без РМП. Это, в сочетании с их ограниченной чувствительностью при самостоятельном использовании, приводит к ошибочному диагнозу до 43% [4, 35, 93, 98, 104, 107]. Низкая специфичность является основным ограничением для использования биомаркеров мочи в клинической практике.

Исследование и апробация новых онкомаркеров рака мочевого пузыря является актуальной задачей современной онкоурологии.

1.2 Современные методы прогнозирования клинического течения рака мочевого пузыря

Для оценки риска развития рецидива опухоли и прогрессии Европейской организацией по исследованию и лечению рака (EORTC) разработана классификация опухолевых процессов по группам риска, ставшей стандартным методом оценки прогноза пациентов после макроскопически радикальной ТУР [14, 21].

В основе классификации лежат индивидуальные данные 2596 пациентов с диагностированными опухолями T_a и T₁ (исключены T_{is}). 78% пациентов получали внутривезикулярную химиотерапию, без проведения повторной ТУР, без поддерживающей BCG терапии. Система оценок включает следующие данные: возраст, пол, наличие выявленного ранее рецидива, число опухолей, категорию T, сопутствующий CIS и степень дифференцировки опухоли. Каждый показатель суммируется и полученной суммой баллов по системе оценки выявляется группа риска [14, 21].

Группа низкого риска – уровень инвазии pT_a, дифференцировка G1, единичная опухоль менее 3 см, отсутствие CIS. Риск рецидива и прогрессирования опухоли в данной группе за 5 лет – до 37 и 1,7 % соответственно. Смертность за 10 лет – 4,3 %. Группа высокого риска – уровень инвазии pT₁, дифференцировка G3, множественные и рецидивные опухоли; CIS, а также большие опухоли (более 3 см), pT_aG1– 2 при возникновении рецидива в течение 6 мес. после операции. Эта группа прогностически неблагоприятная. Риск рецидива и прогрессирования опухоли за 5 лет – до 84 и 55 % соответственно. Смертность за 10 лет – 36,1 %. Группа высочайшего риска – уровень инвазии pT₁G3 с CIS; множественные, рецидивные опухоли больших размеров; pT₁G3 с CIS в простатическом отделе уретры; опухоли T₁ с

лимфоваскулярной инвазией. Эта группа прогностически наиболее неблагоприятная [14, 21].

1.3 Методы лечения мышечно–инвазивного и немышечно–инвазивного рака мочевого пузыря

Выбор метода лечения уротелиального рака, прежде всего, определяется наличием метастазов, глубиной инвазии первичной опухоли, ее грейдом и сопутствующей CIS. Важными факторами, влияющими на лечебную тактику, являются локализация и количество опухолевых очагов. При индивидуальном выборе метода лечения больных уротелиальным раком также принимаются во внимание функциональная сохранность пораженного участка мочевыводящих путей, коморбидный фон и ожидаемая продолжительность жизни [28, 47].

При немышечно-инвазивном раке лечение проводится в объеме радикального удаления опухоли мочевого пузыря (за исключением пациентов с тотальным поражением мочевого пузыря – таким пациентам показана цистэктомия) [21, 47, 54].

Лечение немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря направлено на радикальное удаление новообразования, снижение риска рецидива и предотвращение опухолевой прогрессии в мышечно–инвазивный уротелиальный рак.

При ТУР мочевого пузыря удаляют все видимые опухоли. Проведение трансуретральной резекции мочевого пузыря с последующим гистологическим исследованием материала является основным в алгоритме лечения больных. Важным моментом является возможность радикального удаления опухоли с целью профилактики рецидивирования заболевания и перехода его в инвазивную форму.

Повторная ТУР выполняется через 2–6 недель после первичной ТУР для верификации диагноза при неполной первоначальной ТУР – для исключения опухолей TaG1 и первичного РМП, если после первоначальной резекции в

образце не было мышечной ткани; во всех случаях опухолей T1; при всех опухолях G3 [45, 48, 56, 91, 100].

Согласно клиническим рекомендациям по лечению рака мочевого пузыря, с целью снижения рецидивов, в послеоперационном периоде пациентам с радикально удаленными опухолями мочевого пузыря при ТУР, проводится адьювантное лечение в виде внутривезикулярных инстилляций препарата вакцины БЦЖ [30, 22, 69].

БЦЖ - терапия – это иммунотерапия неактивными бактериями туберкулеза. Механизм противоопухолевого эффекта БЦЖ- иммунный, при котором в ответ на микобактериальную стимуляцию клетки уротелия выделяют цитокины, включая интерлейкины ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8 и фактор некроза опухолей α , интерферон (ИФН) γ . Через несколько часов после инстилляции БЦЖ развивается сложный каскад провоспалительных реакций. Стенку мочевого пузыря инфильтрирует большое количество нейтрофилов, моноцитов — макрофагов, которые выделяют свои характерные цитокины и хемокины. Это вызывает приток различных подвидов лимфоцитов, например, CD4+-Т-лимфоцитов, и баланс выделяемых цитокинов смещается в сторону цитокинов Т-хелперов 1-го типа [77].

При немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря выполняется срочная (незамедлительная) радикальная ЦЭ в случаях: наличия pT1G3 с CIS, при множественных, рецидивных опухолях больших размеров, pT1G3 с CIS в простатическом отделе уретры; редких гистологических вариантах опухолях с плохим прогнозом; опухолях T1 с лимфоваскулярной инвазией; при неэффективной БЦЖ–терапии, так как ретроспективно показано, что пациентам РМП с высоким риском развития рецидива лучше провести раннюю, чем отсроченную, ЦЭ при выявлении рецидива опухоли после первоначального лечения с использованием ТУР и БЦЖ–терапии, тем самым улучшая результаты выживаемости [28, 46, 94, 96].

Целью лечения мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря является радикальное удаление опухоли, снижение риска метастазирования и

поддержание качества жизни за счет сохранения пораженного органа. Органосохраняющее лечение возможно только в случаях, когда это не приведет к снижению выживаемости. В зависимости от индивидуального риска диссеминации мышечно–инвазивного уротелиального рака принимается решение о необходимости назначения системной противоопухолевой терапии [28].

Стандартным методом лечения локализованного мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (T2–4aN0M0) является радикальная цистэктомия [28, 46, 84]. У мужчин, как правило, проводят удаление мочевого пузыря, простаты с семенными пузырьками и висцеральной брюшины, регионарных л/у. При опухолевом поражении простатической части уретры рекомендовано выполнение уретерэктомии [28, 79, 85]. У женщин в объем удаляемой ткани входит: мочевой пузырь, висцеральная брюшина, паравезикальная клетчатка, матка, придатки, резекция стенки влагалища, регионарная лимфодиссекция [28, 85].

1.4 Раман–спектроскопия как новый метод оптической диагностики опухолей

Трудности ранней диагностики РМП, выявления рецидива опухоли – являются стимулом для разработки и внедрения в широкую клиническую практику высокотехнологичных диагностических методов.

В настоящее время в мировой литературе появляются исследования об использовании оптической спектроскопии в диагностике заболеваний [83, 95]. Спектральные показатели основываются на биохимических и морфологических изменениях ткани; путем настройки соответствующей длины волны света и изменения параметров детектора возможно исследование тканей на разной глубине (от нескольких сотен микрометров до нескольких см) [31].

Эффект комбинационного рассеяния возникает, когда свет попадает в молекулу и взаимодействует с электронным облаком и связями этой молекулы.

Когда молекула расслабляется, она возвращается в другое колебательное состояние и испускает фотон. Из-за разницы между энергией исходного состояния и энергией нового состояния испускаемый фотон имеет частоту отличающуюся (смещенную) от длины волны возбуждения. Разность частот между рассеянным и рамановским рассеянием называется рамановским сдвигом, который уникален для отдельных молекул и измеряется детектором и представлен как $1/\text{см}$.

Рамановские пики спектрально узкие и во многих случаях могут быть связаны с вибрацией определенной химической связи (или одной функциональной группы) в молекуле. Поскольку эти колебательные переходы связаны с соответствующими молекулярными связями, они уникальны для молекулы и генерируют четкие спектры комбинационного рассеяния [82, 86].

Впервые эффект комбинационного рассеяния света (рамановского рассеяния света) был описан в 1928 году Г.С. Ландсбергом и Л.И. Мандельштамом, а также независимо Ч.В. Раманом, получившим Нобелевскую премию два года спустя за его работу в этой области (Mahadevan–Jansen A., 1997; Hanlon E.B., 2000; Dukor R.K. 2002).

Раман – спектроскопия обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами диагностики: нет необходимости в специальной подготовке исследуемого материала; большой объем получаемой информации (как количественной, так и качественной); неразрушающий характер анализа; высокая скорость анализа и возможность проводить исследование без прямого физического контакта с биологическим агентом. Всё, что требуется для сбора спектра – это направить падающий луч точно на образец, а затем собрать рассеянный свет [8].

Кроме того, не существует двух молекул, которые имеют одинаковые раман – спектры [71, 95]. Происходит своеобразная регистрация «отпечатков пальцев» исследуемой субстанции, поиск и сравнение этих «отпечатков» со спектральной базой данных известных объектов [68]. Цель метода – анализ

микроскопических структур и выявление интересующего вещества в его окружении [9].

Возможности использования раман–спектроскопии для диагностики опухолей различных локализаций (молочной железы, шейки матки, опухолей кожи, головного мозга) так же отражены в работах многих специалистов [9, 15, 83, 90, 95].

С помощью раман–спектроскопии были проведены исследования по выявлению предраковых изменений шейки матки (чувствительность метода составила 81,0%, специфичность –87,1%) [49]. Были проведены исследования по выявлению внутриэпителиальной неоплазии (дисплазии) пищевода Барретта: чувствительность – от 73% до 100% и специфичность от 90 до 100% [12]; дисплазии желудка: чувствительность 94,4% и специфичность 96,3% [88]. Так же были проведены исследования по определению рамановских спектров при опухолях почек [50, 97].

С помощью раман–спектроскопии возможно выявление предопухолевых изменений простаты, рака простаты, определить оптические маркеры [42].

Раман–спектроскопия является новым методом, способным идентифицировать и характеризовать патологические изменения в тканях человека на клеточном и субклеточном уровнях и может быть использован для диагностики и обнаружения заболеваний, включая неинвазивный мониторинг ранних изменений в тканях человека, вызванных развитием рака (Тучин В.В., 2005).

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

Для проведения исследования нами был изучен материал, полученный у 150 больных раком мочевого пузыря (из них мужчин – 135 (90%), женщин – 15 (10%)), без отдаленных метастазов, находившихся на обследовании и лечении в урологическом отделении Клиники БГМУ («Башкирского государственного медицинского университета») и 23 образца условно нормальной ткани мочевого пузыря (Таблица 1, Рисунок 1, 2, 3, 4). Забор послеоперационного материала разрешен и утвержден локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО БГМУ (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации).

Таблица 1 – Количество образцов мочевого пузыря, собранных для исследования, и раман–спектры, связанные с каждой группой патологии

	Нормальная ткань мочевого пузыря	Мышечно-инвазивный рак	Немышечно-инвазивный рак
Образцы	23	23	127
Спектры	460	460	2540

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Подписанное пациентом информированное добровольное согласие на забор материала, раман–исследование, дальнейшее лечение согласно клиническим рекомендациям;

2. Возраст 18–79 лет;

3. Впервые выявленный гистологически верифицированный рак мочевого пузыря (немышечно-инвазивный, мышечно-инвазивный), переходноклеточный тип;

4. ECOG 0–2;

5. отсутствие признаков гематогенной и лимфогенной диссеминации опухоли;

6. отсутствие соматических противопоказаний к проведению оперативного лечения и химиотерапии.

Критерии исключения пациентов из исследования:

1. Отказ пациента участвовать в исследовании;

2. Наличие тяжелой сопутствующей патологии, печеночной и почечной недостаточности;

3. Статус пациента по шкале EGOC > 2;

4. Предшествующее химио– или лучевое лечение;

5. Онкологическое заболевание другой локализации.

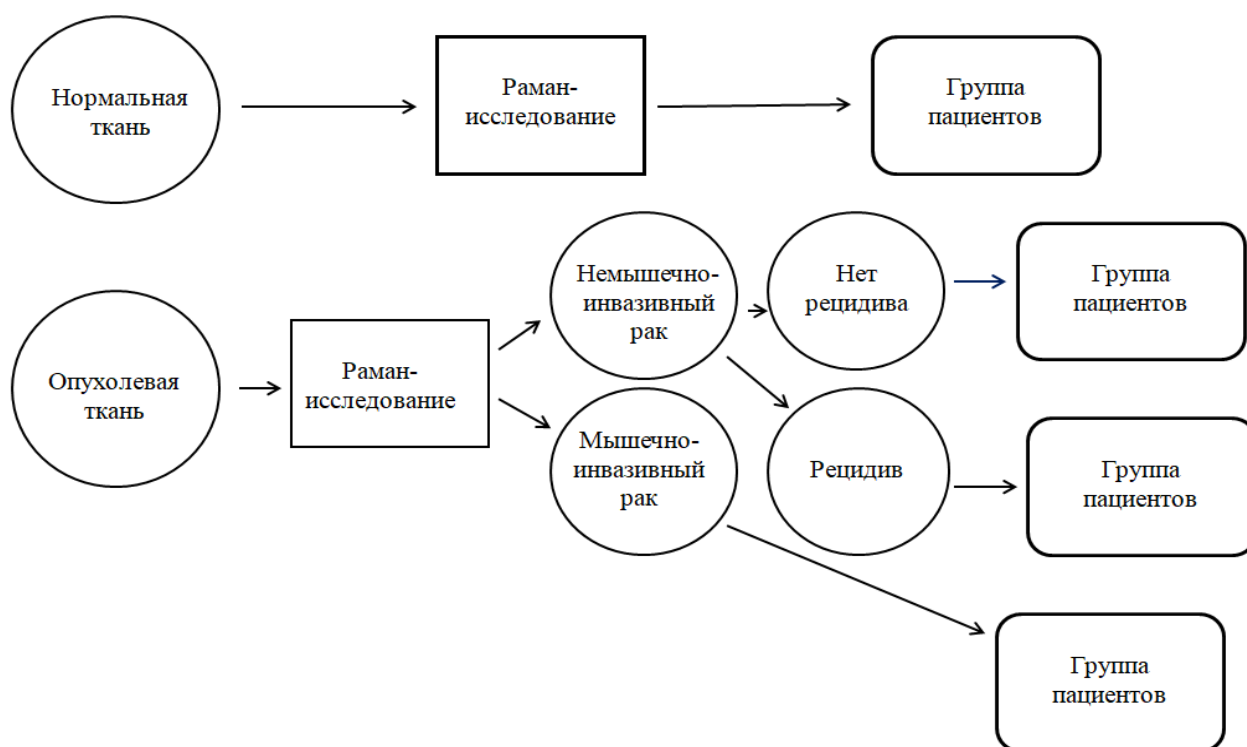


Рисунок 1 – Алгоритм формирования групп пациентов.



Рисунок 2 - Количество пациентов, вошедших в исследование. Их распределение по группам.

На догоспитальном этапе были проведены следующие лабораторные и инструментальные обследования: общий анализ крови, биохимический анализ крови, коагулограмма, гепатиты В и С, сифилис, ВИЧ, ФГС, ЭКГ, ЭХО-КГ (при необходимости), УЗИ мочевыделительной системы, МРТ и КТ (в основном Т3-4N1-3M0-1).

Бессимптомное течение заболевания было выявлено у 42 (28%) пациентов. У 108 (72%) больных были симптомы в виде гематурии, дизурические расстройства отмечали 84 (77,77%) пациентов, болезненность при акте мочеиспускания испытывали 13 пациентов (12,03%), слабость, общее нарушение самочувствия – 11 пациентов (10,18%).

В соответствии с классификацией TNM, образцы тканей рака мочевого пузыря были группированы по факту гистологически подтвержденной инвазии на мышечно–инвазивный (23 чел, 15.3%) и немышечно–инвазивный рак (127 чел, 84.6%). Средний возраст больных составил 63 года. Динамическое наблюдение за пациентами осуществлялось в течение 12 месяцев с использованием стандартных методов обследования.

Образования мочевого пузыря были представлены размерами от 10 мм до 95 мм (Таблица 2).

Таблица 2 – Распределение больных в зависимости от первичных размеров опухоли

Размер опухоли, см	Количество пациентов абс. ч. (%) n=150
До 2.0	84 (56%)
2.1–3.0	24 (16%)
3.1–4.0	16 (10.6%)
4.1–5.0	7 (4.6%)
5.1–6.0	9 (6%)
6.0 и более	10 (6.6%)

Образцы тканей были получены в ходе операций: ТУР мочевого пузыря (первичного и повторного через 3 месяца, при выявлении во время цистоскопии second look рецидива на фоне лечения внутривезикулярной БЦЖ–терапии), ТУР–биопсии, радикальной цистпростатвезикулэктомии и тазовой эквисцерации после проведения 4 курсов химиотерапии по схеме Гемцитабин–Цисплатин. Совместно с морфологическим исследованием проводилось раман–исследование (Рисунок 3).

Был отобран образец ткани размерами 10 x 10 x 10 мм. Без дополнительной пробоподготовки материалы были доставлены в течение двух часов после завершения операции в лабораторию оптической спектроскопии.

От материала каждого пациента на раман–спектрометре было получено 20 спектрограмм, что составляет около 3500 раман–спектрограмм.

Забор материала проводился в условиях операционной под внутривенной анестезией с помощью резектоскопов Olympus и Karl Storz, в условиях монополярной (использование 5 % раствора глюкозы) или биполярной (использование 0,9% NaCl) электрорезекции. Для электрорезекции были использованы электрод–петля угловая/прямая, для электрокоагуляции были применены шариковые электроды. Положение пациента – литотомическое.

По окончании оперативного вмешательства резектоскоп извлекался из мочевого пузыря. Устанавливался уретральный катетер Фолея на 2 ч.

После гистологического подтверждения диагноза рак мочевого пузыря пациентам был проведен курс внутрипузырной БЦЖ–терапии (еженедельно, в течение 6 недель) с поддерживающим курсом (ежемесячно на протяжении 1 года) [96], с последующим проведением раман–спектроскопии материала, через 3 месяца после первичного ТУР – повторный ТУР с забором материала с послеоперационного рубца+раман–исследование.

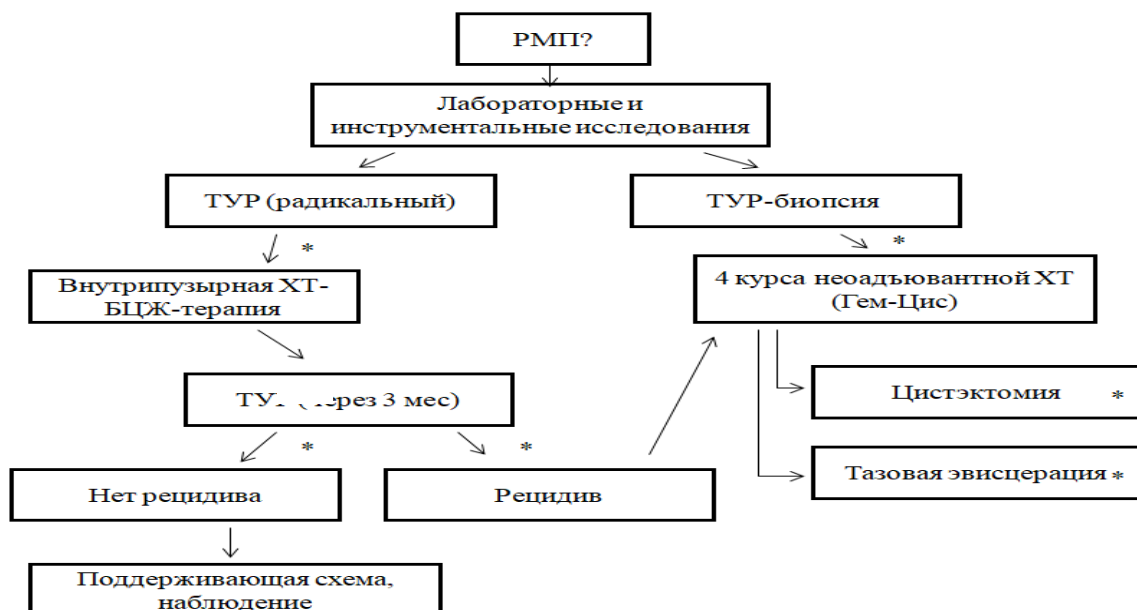


Рисунок 3 – Схема исследования. Алгоритм обследования и лечения пациентов с немышечно–инвазивным и мышечно–инвазивным раком мочевого пузыря.

Примечание: * – проведено морфологическое исследование + рамановская спектроскопия.

По локализации опухолей верхушка мочевого пузыря была поражена у 6 (4%), боковые стенки – 88 (58,66%), передняя стенка – у 14 (9,33%), задняя стенка – у 27 (18%), шейка мочевого пузыря – у 2 (1,33%), дно мочевого пузыря – у 6 (4%), тотальное поражение мочевого пузыря у 7 (4,66%) (Рисунок 4).

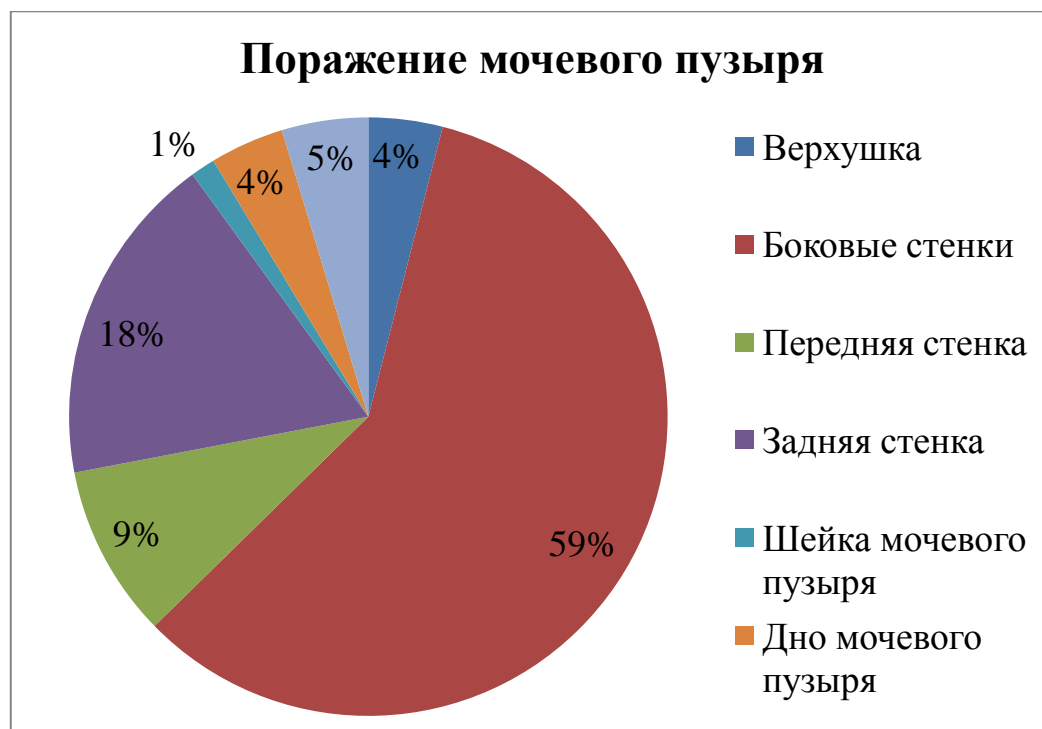


Рисунок 4 – Диаграмма локализации опухолей мочевого пузыря.

Единичные образования отмечались у 127 пациентов (84,66%), в остальных случаях определялось 2 и более образования.

2.2 Методы исследования

Полученный послеоперационный материал был отправлен на гистологическое исследование. Образца тканей фиксировали в 10% растворе формалина, заливали в парафин. Далее проводился морфологический анализ: оценка гистологического типа опухоли, степени дифференцировки, наличие инвазии в мышечный слой.

2.3 Раман– спектроскопия

Рамановское исследование материала было проведено с помощью спектрометра Horiba XploRA plus (HORIBA Scientific, Япония) (Рисунок 5), в состав которого входит:

- Встроенный спектрометр с 4 решетками, установленными на моторизованной турели (решетки: 600gr, 1200gr, 1800gr и 2400gr), гарантирующие высокую точность измерения в спектральном диапазоне до 4000 см⁻¹;
- Микроскоп Olympus Microscope BX 41 с 10X и 100X кратным увеличением;
- Моторизованный переключатель «визуализация/исследование», контролируется программным обеспечением LabSpec6;
- Последующий графический анализ проводился с применением программного обеспечения Spectragryph (<https://www.ffmpeg2.de/spectragryph/>);
- CCD–детектор HORIBA Scientific: низкошумное термоэлектрическое воздушное охлаждение, температурный режим работы до – 60°C, разрешение 1024x256 пикселей, Размер пикселя – 26 мкм.

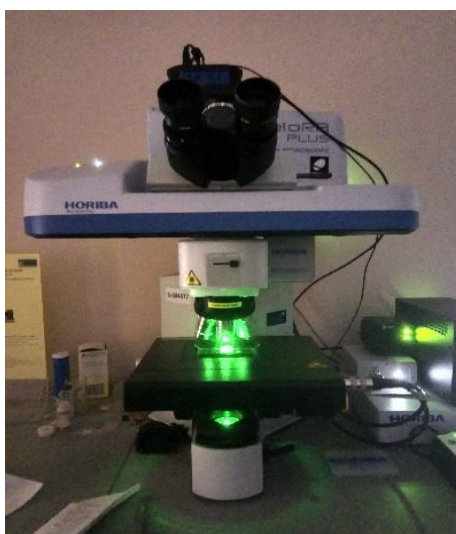


Рисунок 5 – Раман–спектрометр Horiba XploRA plus (HORIBA Scientific, Япония).

Для исследования биологических тканей мы использовали лазер с длиной волны 785 нм, мощностью до 100 мВт. Интегрированный спектрограф представляет собой асимметричную конструкцию Черни–Тернера с фокусным расстоянием $F = 200$ мм, которая оптимизирована для выхода плоского поля и с минимальными оптическими аберрациями.

Этапы исследования (Рисунок б):

1. исследуемый операционный образец без пробоподготовки располагается на предметном стекле, локализованном на движущейся подложке спектрометра;
2. установка параметров спектрометра: длина волны 785 нм со всей площади образца;
3. запись и анализ полученных раман–спектров с помощью специального программного обеспечения (регистрация спектров, автоматическое сравнение с эталонными спектрами веществ, хранящимися в базе данных);
4. исследуемый объект в неизменном виде направляется на последующее морфологическое исследование.

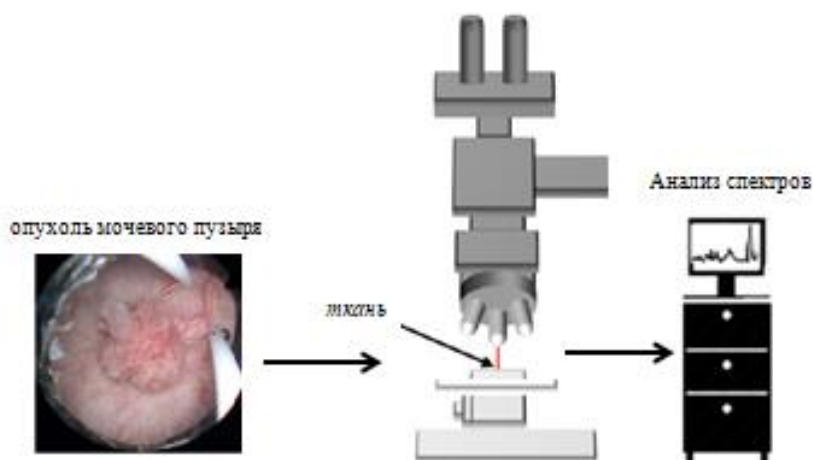


Рисунок б – Алгоритм проведения исследования.

2.4 Статистические методы исследования

Для решения задачи распознавания в редуцированном признаковом пространстве использовались современные вычислительные технологии и технологии искусственного интеллекта deep learning, основанные на методах машинного обучения и глубокого анализа обучающих выборок. Выявление принадлежности спектра к той или иной группе проводилось на основе интеллектуальных методов анализа данных.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью Microsoft Excel, LabSpec6 и Spectragryph. Все полученные количественные, анамнестические, клинические, лабораторные и инструментальные данные обработаны с помощью метода вариационной статистики.

Полученные данные анализировали с использованием методов обработки сигналов, таких как метод главных компонент (PCA), линейный дискриминантный анализ (LDA), искусственная нейронная сеть (ANN), логистический регрессионный анализ (LRA) или их комбинацию.

Обработка сигналов проводилась по следующему алгоритму (Рисунок 7):

- предварительная обработка сигнала,
- представление сигнала в требуемом виде,
- выявление особенностей,
- удаление ошибок,
- отбор и классификация особенностей.



Рисунок 7 – Предлагаемый алгоритм идентификации раман-спектров.

Предварительная обработка сигнала подразумевает выравнивание спектра путем удаления базовой линии. Любой сигнал в общем виде представляет собой сумму полезного сигнала, шума и некоторой системной ошибки (медленно меняющимся искажением, соответствующим падению интенсивности сигнала по мере удаления от частоты возбуждающего излучения). Этот дефект часто называют базовой линией (baseline) (Рисунок 8). Он затрудняет процесс идентификации и сравнения спектров, поэтому во многих работах перед началом анализа его рекомендуют устранить (Рисунок 9).

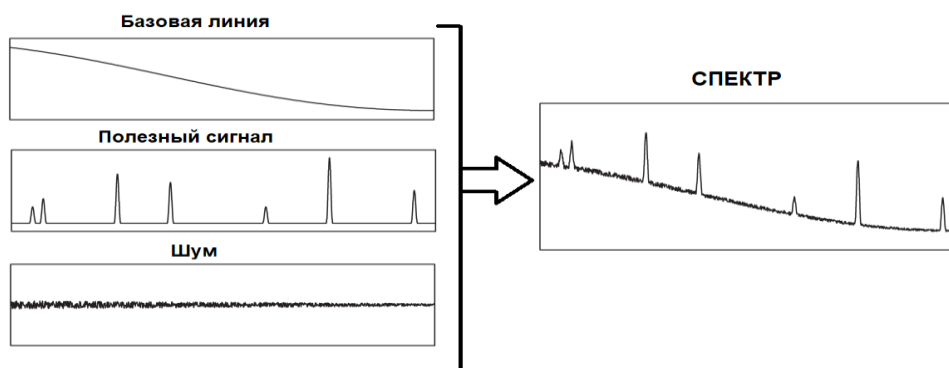


Рисунок 8 – Составляющие типичного спектра.

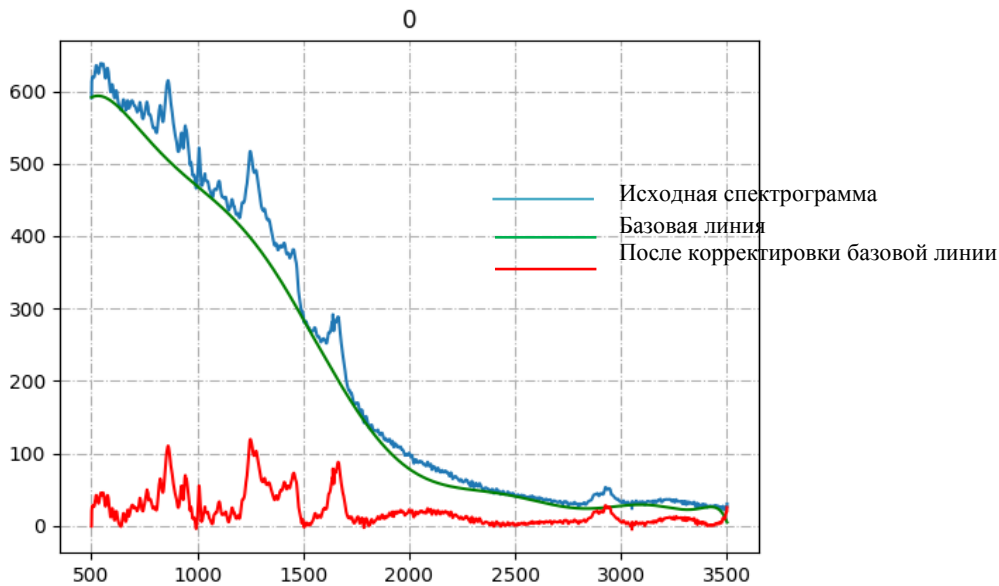


Рисунок 9 – Определение и коррекция базовой линии спектра, устранение фона.

В работе были использованы следующие алгоритмы определения базовой линии спектра.

Метод асимметричных наименьших квадратов (Asymmetric Least Squares)

Данный метод был описан в работе Н.С. Paul (2004). Ниже представлена спектрограмма в виде суммы следующих векторов:

$$\mathbf{x} = \mathbf{b} + \mathbf{I} + \mathbf{s} \quad (1)$$

\mathbf{x} – набор значений, полученных при спектрометрии, \mathbf{b} – базовая линия спектра, \mathbf{I} – полезный сигнал, \mathbf{s} – шум, присутствующий в измерениях. Таким образом, нашей задачей становится определение компонент вектора \mathbf{b} . Затем этот вектор следует вычесть из результатов спектрометрии \mathbf{x} . Полученные данные представляют собой полезный сигнал с некоторым количеством шума. Поскольку шум носит стохастический характер, то он не будет влиять значительным образом на результаты идентификации спектров.

Метод локальной медианы (Local Median)

Данный метод используется для выделения нескольких участков с различным характером изменения базовой линии, так же для исправления спектров, в которых базовая линия является практически полностью горизонтальной и лишь на отдельных участках отходит от нее (Рисунок 10).

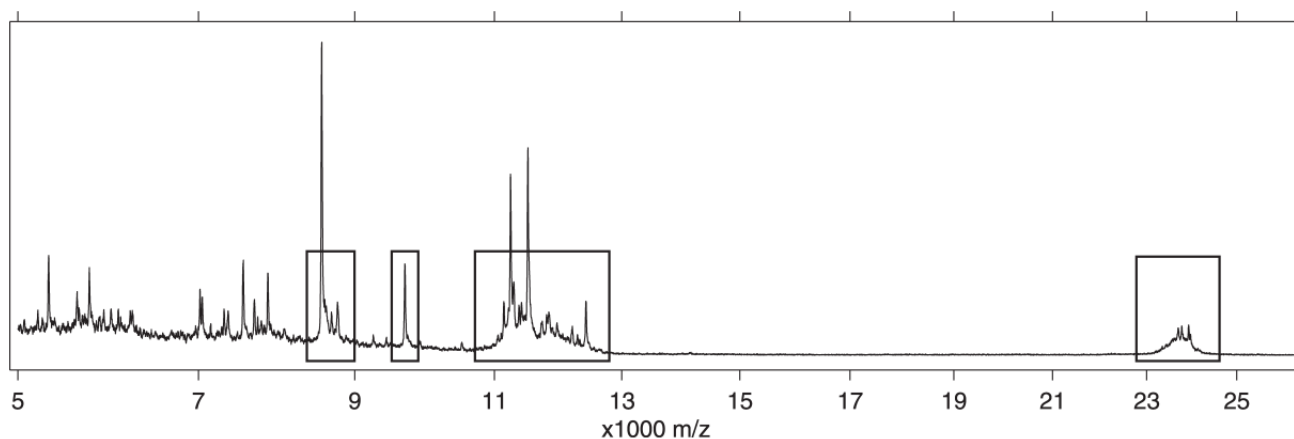


Рисунок 10 – Пример спектра с выделенными участками отклонения базовой линии от горизонтали.

Для применения данного метода следует разбить всю спектрограмму на отдельные участки, а затем найти медиану на каждом отдельном участке.

Точность метода во многом зависит от выбора размера отдельного участка, желательно, чтобы на каждом отдельном участке не было большого перепада между начальной и конечной интенсивностью излучения.

Итерационная полиномиальная аппроксимация (Iterative Polynomial Fitting)

Суть данного метода заключается в том, что в качестве базовой линии выбирается полином n -ой степени:

$$\mathbf{b} = a_0 + a_1 \mathbf{x} + a_2 \mathbf{x}^2 + \dots + a_n \mathbf{x}^n, (2)$$

а затем, в ходе итерационного процесса определяются неизвестные коэффициенты a_i выбранного полинома.

В отличие от полиномиальной аппроксимации, в которой график полинома должен пройти так, чтобы сумма квадратов отклонений экспериментальных данных от полинома была минимальной, при определении базовой линии спектра используются только те значения спектрограммы, которые лежат ниже значения полинома в данной точке, те же значения, которые лежат выше графика полинома отбрасываются и заменяются на значения самого полинома.

Обычно для нахождения полинома, аппроксимирующего базовую линию спектра с точностью $\varepsilon=0.1$ достаточно 5–10 итераций. Увеличение порядка точности приводит к росту числа итераций, необходимых для достижения сходимости.

У данного метода есть два недостатка:

1. для точного представления, спектр должен обладать достаточно гладкой базовой линией, а кроме того необходимо угадать лучшую степень полинома, что затрудняет автоматическую обработку спектров;
2. метод плохо обрабатывает спектры, у которых есть лишь незначительные «всплески» отклонений от горизонтальной линии, для которых хорошо подходит метод локальной медианы.

Выявление ключевых особенностей подразумевает процесс выделения пиков и фильтрации шумов (Рисунок 10). Для выявления особенностей спектра был использован метод вейвлетов. Сигнал, получаемый с установки является дискретным, поэтому был использован дискретный вейвлет Добеши, наиболее часто используемый для анализа дискретных данных.

Вейвлет–преобразование сигнала позволяет разделить его на различные составляющие: высокочастотную и низкочастотную составляющие.

В нашем случае высокочастотной частью сигнала является шум (Рисунок 11).

Детализация алгоритма идентификации

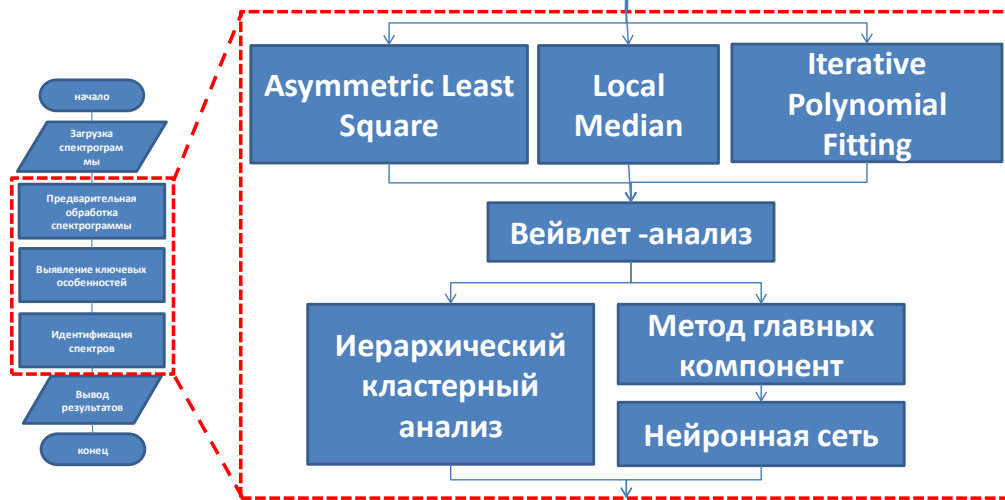


Рисунок 11 – Алгоритм обработки раман–спектрограмм.

На рисунке 12 показано графическое представление разложения спектрограмм по вейвлетам Добеши после корректировки базовой линии. Видно, что низкочастотные составляющие (расположены в самом низу картинке) имеют значительные отличия, одна в средней части спектра можно наблюдать повторяющиеся картины. То есть на основе анализа средней части вейвлет–разложения можно осуществить классификацию спектров различными методами идентификации.

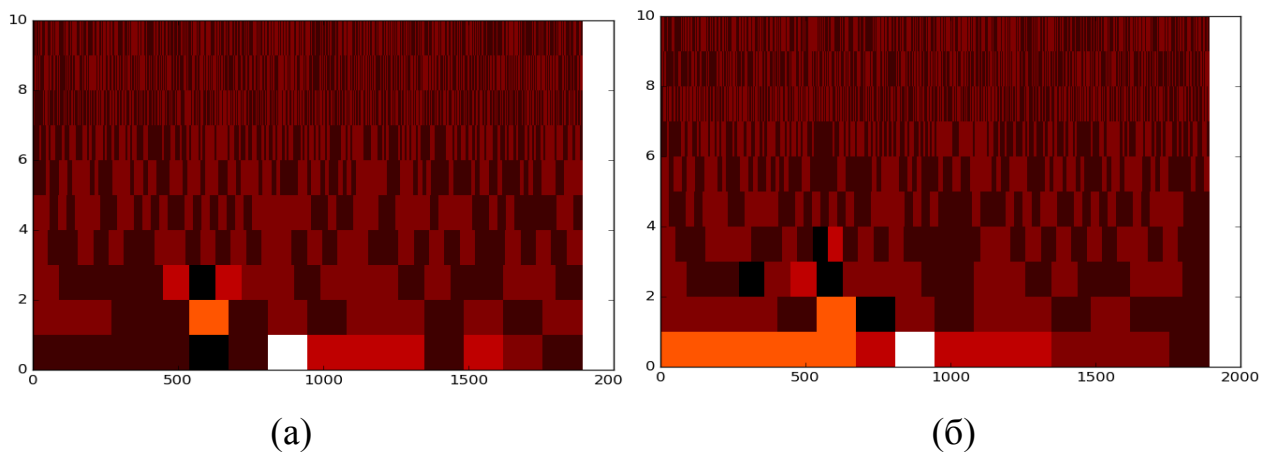


Рисунок 12 – Графическое представление спектрограмм по вейвлетам Добеши.

Для классификации данных, полученных в результате предварительной обработки спектрограмм, использованы следующие методы: метод главных компонент и нейронные сети.

Метод главных компонент

Анализ основных компонент (PCA) – это метод многомерного анализа для неконтролируемого уменьшения размеров и/или классификации. Он преобразует большой объем данных в несколько новых вариантов, уменьшая избыточность и минимизируя шум. После преобразования форма и расположение исходных спектров изменяются по мере того, как они мигрируют в другое пространство. Это делает его полезным для анализа раман-спектров, полученных из биологических образцов, которые содержат большой объем данных со сложной характеристикой. PCA уменьшает высокий объем спектральных данных до нескольких основных компонент.

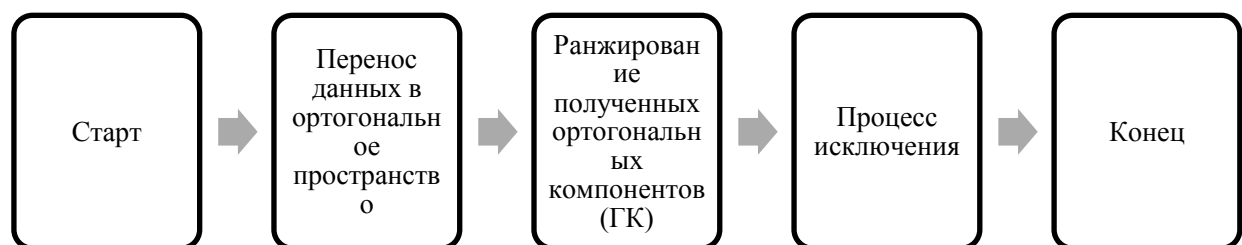


Рисунок 13 – Алгоритм метода анализа главных компонент.

На рисунке 13 описаны этапы разработки алгоритма PCA. Во-первых, PCA преобразует данные входных функций в ортогональное пространство с использованием ортогонального линейного преобразования. Результатом являются ортогональные компоненты, известные как главные компоненты. Во-вторых, главные компоненты организованы в соответствии с их дисперсией. Разница является мерой вариабельности распределения выборок.

Искусственная нейронная сеть (ANN — artificial neural network)

Нейроны искусственной нейронной сети функционируют как переключатели для приема сигналов от других нейронов (Рисунок 14).

Состояние выхода нейрона либо «активировано», либо «неактивно», в зависимости от суммы умножения входов и весов, подающих нейрон. Вес, при котором умножается вход, соответствует силе синапса. Было найдено, что ANN успешно решает проблемы, начиная от распознавания речи, кластеризации, системы прогнозирования, распознавания образов и классификации заболеваний.

А.Т. Harris и соавт. [82] исследовали возможность использования ANN для идентификации раковых и нормальных клеток из раман-спектров комбинационного рассеяния, сообщая о специфичности 95% и чувствительности 92%.

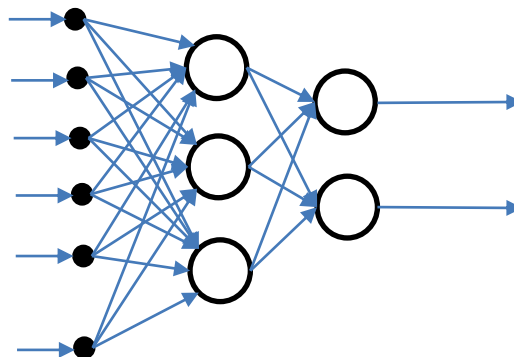


Рисунок 14 – Архитектура нейронной сети (А.Т. Harris и соавт. [82]).

Линейный дискриминантный анализ. Линейный дискриминантный анализ является методом многомерного анализа для уменьшения размерности данных и / или классификации. Он может использоваться для различения двух или более групп данных после определения подходящего линейного преобразования. Он включает в себя методы классификации многомерных наблюдений по принципу максимального сходства при наличии обучающих

признаков. Задачи дискриминантного анализа во многом схожи с задачами логистической регрессии (LRA) – классификация наблюдений на группы на основе прогностической модели. Смысл дискриминантного анализа – на основании обучающих выборок преобразовать многомерный массив в одномерный показатель для прогнозирования принадлежности наблюдений к группам, т. е. построить новый обобщенный показатель, значения которого максимально различаются для объектов, отнесенных к разным группам. Обучающая выборка – это множество объектов, заданных значениями признаков и принадлежность которых к тому или иному классу достоверно известна. Исследование различий между группами – основа концепции дискриминантного анализа [5].

Все методы предобработки и многомерный анализ были реализованы в программном обеспечении Spectragryph.

Методика проведения раман-спектроскопического исследования послеоперационного материала разрешена и утверждена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО БГМУ (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Для получения результатов нормальной ткани мочевого пузыря нами была сформирована группа пациентов, которые поступили в урологическое отделение с незначимыми изменениями слизистой мочевого пузыря при следующих клинических ситуациях: при реконструктивных оперативных вмешательствах при стенозе нижней трети мочеточника, при отошедшем камне почки. Эти больные были сформированы в группу для проведения спектроскопического исследования. Средний возраст больных составил 63 года. Мужчин в исследовании было 15, женщин – 8. Все пациенты дали информированное согласие на исследование. Всем пациентам была проведена диагностическая цистоскопия с забором материала, который в последующем был исследован с помощью раман–спектрометра.

Забор материала проводился в условиях операционной под внутривенной анестезией с помощью резектоскопов Olympus и Karl Storz, в условиях монополярной (использование 5 % раствора глюкозы) или биполярной (использование 0,9% NaCl) электрорезекции. Для электрорезекции были использованы электрод–петля угловая/прямая, для электрокоагуляции были применены шариковые электроды. Положение пациента – литотомическое.

По окончанию оперативного вмешательства резектоскоп извлекался из мочевого пузыря. Устанавливался уретральный катетер Фолея на 2 ч.

В послеоперационном периоде осложнений не выявлено. В первые сутки пациентам проводилась обезболивающая терапия (Sol.Ketonalі 30 mg в/м 2 раза в день). Пациенты были выписаны на вторые сутки.

По результатам исследования раман–спектры образцов нормальной ткани мочевого пузыря (n=23) имеют характерные особенности в виде набора пиков в диапазоне от 502 до 3380 см⁻¹ (Рисунок 15, 16).

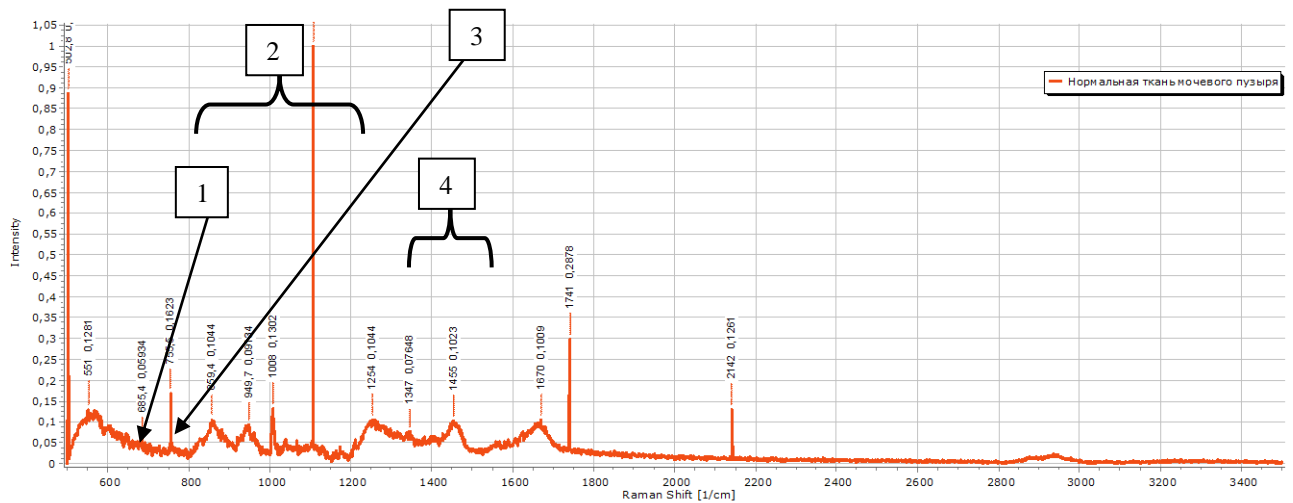


Рисунок 15 – Спектрограмма нормальной ткани мочевого пузыря Пациента А, 54 лет: Диагноз: Стеноз нижней трети правого мочеточника. Ассоциации пиков: 1 - коллаген, 2 – нуклеиновые кислоты, 3 - полисахариды, 4 – липиды [28].

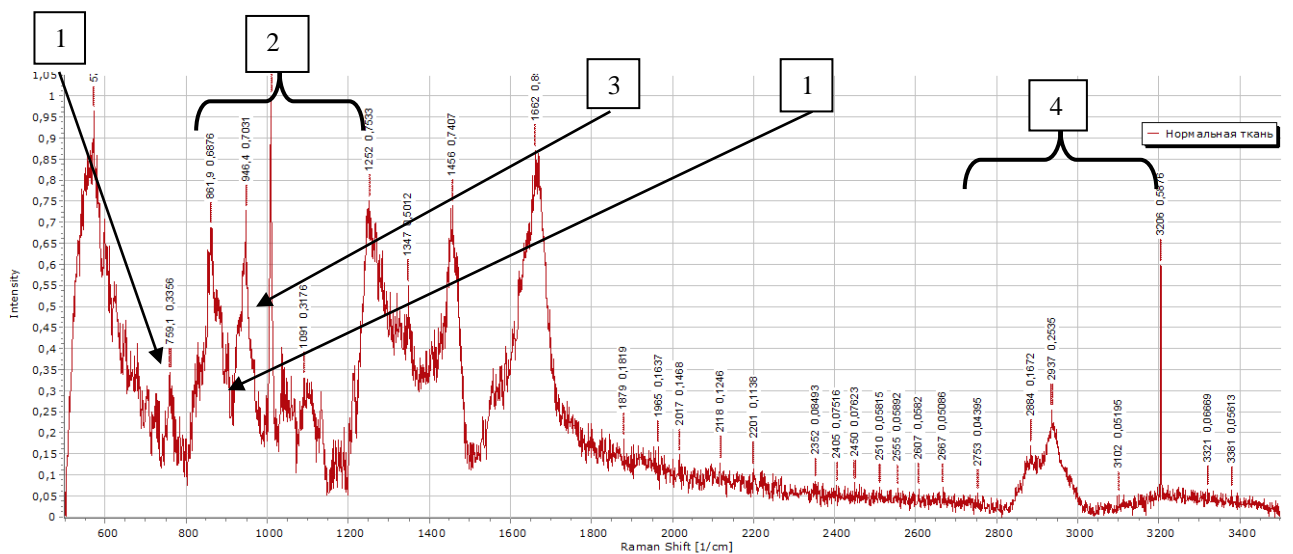


Рисунок 16 – Спектрограмма нормальной ткани мочевого пузыря Пациента Б, 62 лет: Диагноз: Стеноз нижней трети правого мочеточника. Ассоциации пиков: 1 - коллаген, 2 – нуклеиновые кислоты, 3 - β -D-глюкопираноза, 4 - CH_2 -группа.

При анализе спектрограмм были определены клинически значимые диапазоны пиков по интенсивности и частотному сдвигу. В данном случае была выбрана медиана показателя интенсивности 0.10. Пики выше данного значения считались положительными, ниже данного значения отрицательными.

Положительные пики у Пациента А были выявлены в диапазонах от 502 до 550 см^{-1} , 755 – 860 см^{-1} (белки, полисахариды, коллаген), 1008 – 1245 см^{-1} (гликозидная связь), 1455 – 2140 см^{-1} , отрицательные пики были выявлены в диапазонах 645–740 см^{-1} , 950 – 1000 см^{-1} .

Положительные пики у Пациента Б были выявлены в диапазонах от 570 до 2200 см^{-1} (белки, полисахариды, коллаген), 2884 – 3206 см^{-1} (характерны для С–Н колебаний липидов), отрицательные пики были выявлены в диапазонах 2352–2667 см^{-1} (белки), 3320 – 3380 см^{-1} (О–Н колебания).

Таким образом, анализ неизменной слизистой мочевого пузыря пациентов контрольной группы показал что:

Положительные пики (оптические маркеры) образцов нормальной ткани выявлены в диапазонах, характерных для нуклеиновых кислот (1297–1284 см^{-1} , 1207–1193 см^{-1} и 1124–1111 см^{-1}), β -D-глюкопиранозы (989 см^{-1}), липидов (1456–1428 см^{-1} , 1065–1047 см^{-1} (С–С связь), 2884 – 3206 см^{-1} (CH₂ группа)), гидроксипролина (коллагена) – 875 см^{-1} , коллагена ((С–С–связь пролина) 729 см^{-1})), белков (1248–1213 см^{-1} , 775–502 см^{-1}), полисахаридов (840 см^{-1}), гликозидной связи (1104 см^{-1}) (Рисунок 15, 16, Таблица 3).

При анализе 23 образцов нормальной ткани мочевого пузыря больных были получены следующие пики:

Таблица 3 – Пики, полученные при рамановской спектроскопии нормальной ткани мочевого пузыря (n=23)

Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity
566,46	0,66868	551,99	0,28939	858,41	0,18315
761,82	0,2147	570,94	0,9091	939,94	0,1531
857,61	0,49799	759,11	0,29457	1009	0,1674
943,39	0,38647	861,88	0,64649	1097,5	0,069439
1009,1	0,60753	946,43	0,66207	1132,1	0,066712
1102,2	0,2855	1008,9	0,91027	1259,1	0,18758

Продолжение таблицы 3					
Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity
1254,1	0,52988	1091,5	0,27649	1347,6	0,12998
1323,9	0,36426	1252,4	0,7122	1397,9	0,094588
1383	0,92832	1347,4	0,4601	1464,3	0,15537
1458,2	0,42269	1456,5	0,69965	1555,5	0,10555
1580,6	0,81475	1878,8	0,14086	1861,3	0,047627
1662,2	0,59474	1964,7	0,12264	1914,4	0,041176
1921,4	0,11483	2017	0,10569	2082	0,029287
1964,7	0,11115	2118,5	0,083514	2138,5	0,02436
2079,7	0,078293	2200,6	0,072739	2204,2	0,018017
2129,6	0,069287	2352,1	0,043855	2329	0,012196
2214,6	0,057254	2405,4	0,034083	2392,5	0,010564
2280,5	0,041781	2449,6	0,035155	2452,5	0,005481
2347,4	0,023484	2509,5	0,017067	2569,9	0,26712
2450,3	0,0265	2555,1	0,017844	2882,8	0,020955
2541	0,02435	2606,6	0,017118	2938,1	0,03684
2629,8	0,02759	2667	0,009778	3182,7	0,012061
2937,8	0,15033	2752,8	0,002872	3253,5	0,37822
3170,6	0,031174	2884,1	0,12615	2936,6	0,21246
564,01	0,42884	3101,6	0,010871	502,83	0,88142
760,46	0,13176	3206,3	0,54652	550,96	0,1239
866,3	0,32698	3320,8	0,025607	685,42	0,055098
943,05	0,2288	3380,6	0,015056	755,53	0,15801
1009,1	0,28824	550,4	0,41143	859,37	0,10016
1108,9	0,13253	865,04	0,27649	949,65	0,087098
1258,6	0,33107	947,39	0,23625	1008,4	0,12594
1464,3	0,2785	1008,4	0,28818	1107,7	0,99415

Продолжение таблицы 3					
Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity
1536,7	0,53457	1108,5	0,12233	1254,2	0,10012
1670	0,3337	1167,6	0,083784	1346,6	0,072231
1892	0,085866	1246,2	0,30738	1455,1	0,09809
2018,6	0,057215	1461,8	0,24355	1669,5	0,096647
2070,3	0,053146	1664,3	0,2873	1741,5	0,2836
2140	0,041075	1753	0,10373	2141,6	0,1219
2186,8	0,042373	1953,4	0,97531	571,23	0,56955
2926,2	0,057659	1998,2	0,050121	730,95	0,18587
3132,7	0,72601	2061,1	0,045073	858,22	0,45104
3231,1	0,94517	2105,9	0,045052	943,98	0,37556
1860,3	0,11705	2139,5	0,043626	1008,1	0,45286
1926,1	0,086814	2186,9	0,03814	1106,1	0,21481
1967,5	0,082195	2968,5	0,6135	1250,8	0,47349
2041,6	0,92565	2221,2	0,054706	1461,9	0,37111
2083,8	0,06278	2271,9	0,58622	1662,3	0,492
2654,2	0,02247	2339,4	0,028211	2436,6	0,024035
2715,5	0,019991	2391,2	0,032754	2530,7	0,027919

Таким образом, наиболее вариабельными и значимыми пиками являются пики в области нуклеиновых кислот ($1297-1284\text{ см}^{-1}$, $1207-1193\text{ см}^{-1}$ и $1124-1111\text{ см}^{-1}$), β -D-глюкопиранозы (989 см^{-1}), липидов ($1456-1428\text{ см}^{-1}$, $1065-1047\text{ см}^{-1}$ (C-C связь), $2884 - 3206\text{ см}^{-1}$ (CH₂ группа)), гидроксипролина (коллагена) – 875 см^{-1} , коллагена ((C-C-связь пролина) 729 см^{-1})), белков ($1248-1213\text{ см}^{-1}$, $775-502\text{ см}^{-1}$), полисахаридов (840 см^{-1}), гликозидной связи (1104 см^{-1}). Пики, находящиеся в диапазонах $2650\text{ см}^{-1} - 2860\text{ см}^{-1}$, $1050\text{ см}^{-1} - 1100\text{ см}^{-1}$, $1900\text{ см}^{-1} - 2200\text{ см}^{-1}$, $2654\text{ см}^{-1} - 2715\text{ см}^{-1}$ встречались редко, и в дальнейших исследованиях не включались в расчет.

Наиболее вариабельные пики были выявлены в диапазонах 1100 см^{-1} – 1300 см^{-1} , характерных для нуклеиновых кислот, 1420 см^{-1} – 1460 см^{-1} , характерных для липидов, 502 см^{-1} – 775 см^{-1} характерных для белков. Наименее вариабельные пики были выявлены в диапазонах 2082 см^{-1} – 2400 см^{-1} , $2352\text{--}2667\text{ см}^{-1}$ (белки), $3320\text{ -- }3380\text{ см}^{-1}$ (O—H колебания).

Таблица 4 – Наиболее значимые оптические маркеры молекулярного профиля нормальной ткани мочевого пузыря

Рамановский пик	Значение
$1297\text{--}1284\text{ см}^{-1}$	Нуклеиновые кислоты
$1207\text{--}1193\text{ см}^{-1}$	Нуклеиновые кислоты
$1124\text{--}1111\text{ см}^{-1}$	Нуклеиновые кислоты
$1456\text{--}1428\text{ см}^{-1}$	Липиды
$1060\text{--}1047\text{ см}^{-1}$	Липиды
$2884\text{ -- }3206\text{ см}^{-1}$	C—H колебаний липидов
$1248\text{--}1213\text{ см}^{-1}$	Белки
$775\text{--}502\text{ см}^{-1}$	Белки
875 см^{-1} , 729 см^{-1}	Гидроксипролин (коллаген)
840 см^{-1}	полисахариды
989 см^{-1}	$\beta\text{-D}$ -глюкопираноза
1104 см^{-1}	гликозидная связь

Использованная методика позволяет стандартизировать показатели рамановских пиков нормальной ткани мочевого пузыря – они легко воспроизводимы, стабильны. Таким образом, нами были выявлены наиболее стабильные спектральные характеристики молекулярного профиля нормальной ткани мочевого пузыря.

ГЛАВА 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ НЕМЫШЕЧНО–ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ

Больные, поступившие в урологическое отделение, с диагнозом немышечно–инвазивный рак сформировали группу из 127 пациентов. Средний возраст больных составил 63 года. Всего в исследовании количество мужчин составило 120, женщин – 7. Срок наблюдения составил 12 месяцев. Все пациенты дали информированное согласие на исследование.

Всем пациентам была выполнена трансуретральная резекция мочевого пузыря. Из них у 7 пациентов было выявлено тотальное поражение мочевого пузыря – данные пациенты были переведены в группу пациентов с мышечно–инвазивным раком, и рассматриваются в соответствующей главе, так как тактика лечения была следующей: комбинированное лечение (неoadъювантная химиотерапия + цистэктомия (2) / тазовая экзисцирация (5)) с последующим проведением раман–спектроскопии материала.

Таким образом, первую основную группу составили 120 пациентов. В данной группе проведена ТУР мочевого пузыря (радикальное удаление опухоли) с последующим однократным внутривезикулярным введением Доксорубицина 50 мг в 50 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Согласно клиническим рекомендациям по лечению пациентов с диагнозом рак мочевого пузыря после гистологического подтверждения диагноза пациентам был проведен курс внутривезикулярной БЦЖ–терапии (еженедельно, в течение 6 недель) с поддерживающим курсом (ежемесячно на протяжении 1 года) [96], с последующим проведением раман–спектроскопии материала, через 3 месяца после первичного ТУР – повторный ТУР с забором материала с послеоперационного рубца+раман–исследование.

Методика выполнения трансуретральной резекции мочевого пузыря

ТУР мочевого пузыря проводилась в условиях операционной, с помощью резектоскопов Olympus и Karl Storz, в условиях монополярной (использование 5 % раствора глюкозы) или биполярной (использование 0,9% NaCl) электрорезекции (Рисунок 17, 18). Для электрорезекции были использованы электрод–петля угловая/прямая, для электрокоагуляции были применены шариковые электроды. Хирургическое лечение проводилось под спинальной анестезией, положение пациента – литотомическое.



Рисунок 17 – Эндоскопическая стойка Olympus.



Рисунок 18 – Используемые электроды во время трансуретральной резекции мочевого пузыря: электрод–петля (а), шариковый электрод (б).

При опухолях до 2 см на тонкой ножке проводилась резекция опухоли единым блоком (*en bloc*), при опухолях на широком основании – сегментарное удаление - с использованием моно– или биполярного тока с обязательным удалением экзофитного компонента и основания опухоли с подлежащим мышечным слоем (Рисунок 19). При опухолях размерами от 3 см до 5 см, преимущественно внутрисветного типа роста, резекцию начинали с электрокоагуляции основания, прилежащей стенки мочевого пузыря, с целью профилактики кровотечения. Отдельно проводился забор основания опухоли. Ложе удаленной опухоли во всех случаях дополнительно коагулировалось. С помощью электрокоагуляции прижигались кровеносные сосуды, с целью остановки кровотечения во время этапа фрагментации, шариковыми электродами (Рисунок 19, 20, 21).

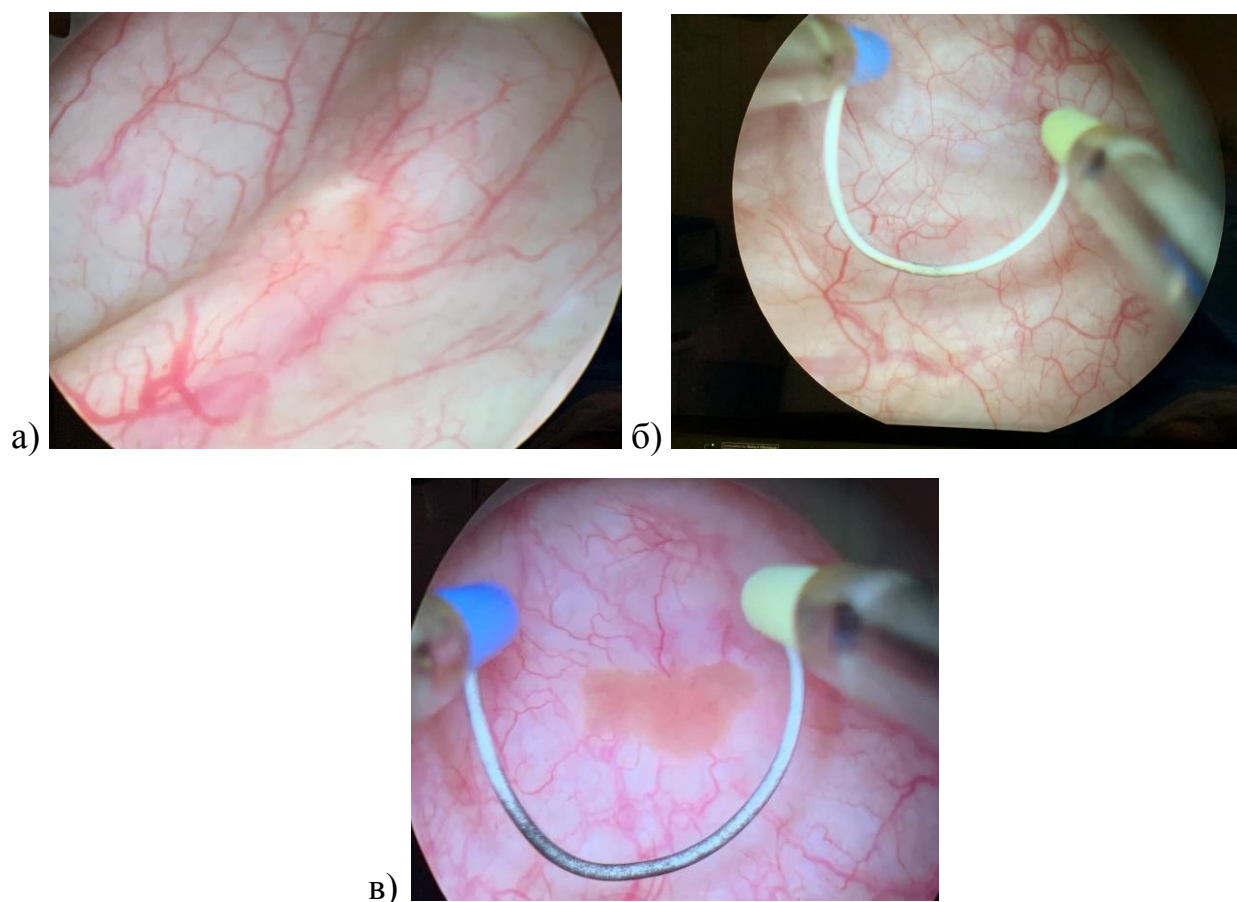


Рисунок 19 – Этапы цистоскопии: а) оценка состояния устьев мочеточников; б) оценка состояния слизистой мочевого пузыря; в) визуализация опухоли мочевого пузыря.

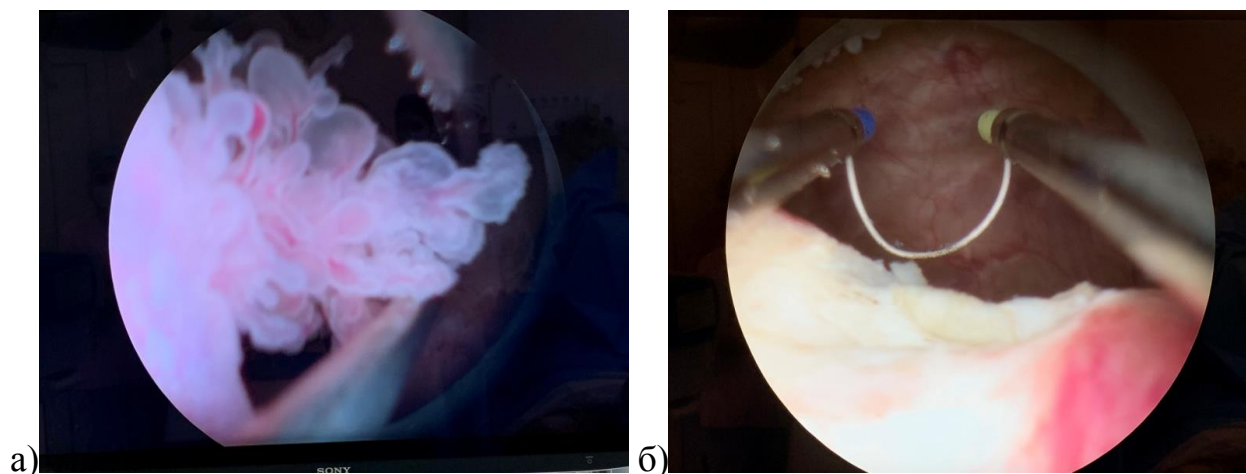


Рисунок 20 – Этапы удаления опухоли: а) en-bloc – резекция; б) коагуляция ложа удаленной опухоли.



Рисунок 21 – Удаленная опухоль мочевого пузыря методикой en-bloc – резекцией.

При опухолях более 5 см с подтвержденным фактом инвазии паравезикальной клетчатки (Т3), местно-распространенным процессом (Т2-4N1-3M0-1) по КТ/МРТ, проводилась ТУР-биопсия опухоли: трансуретральное удаление части опухоли мочевого пузыря с подлежащим мышечным слоем и последующей оценкой глубины инвазии (Рисунок 22).

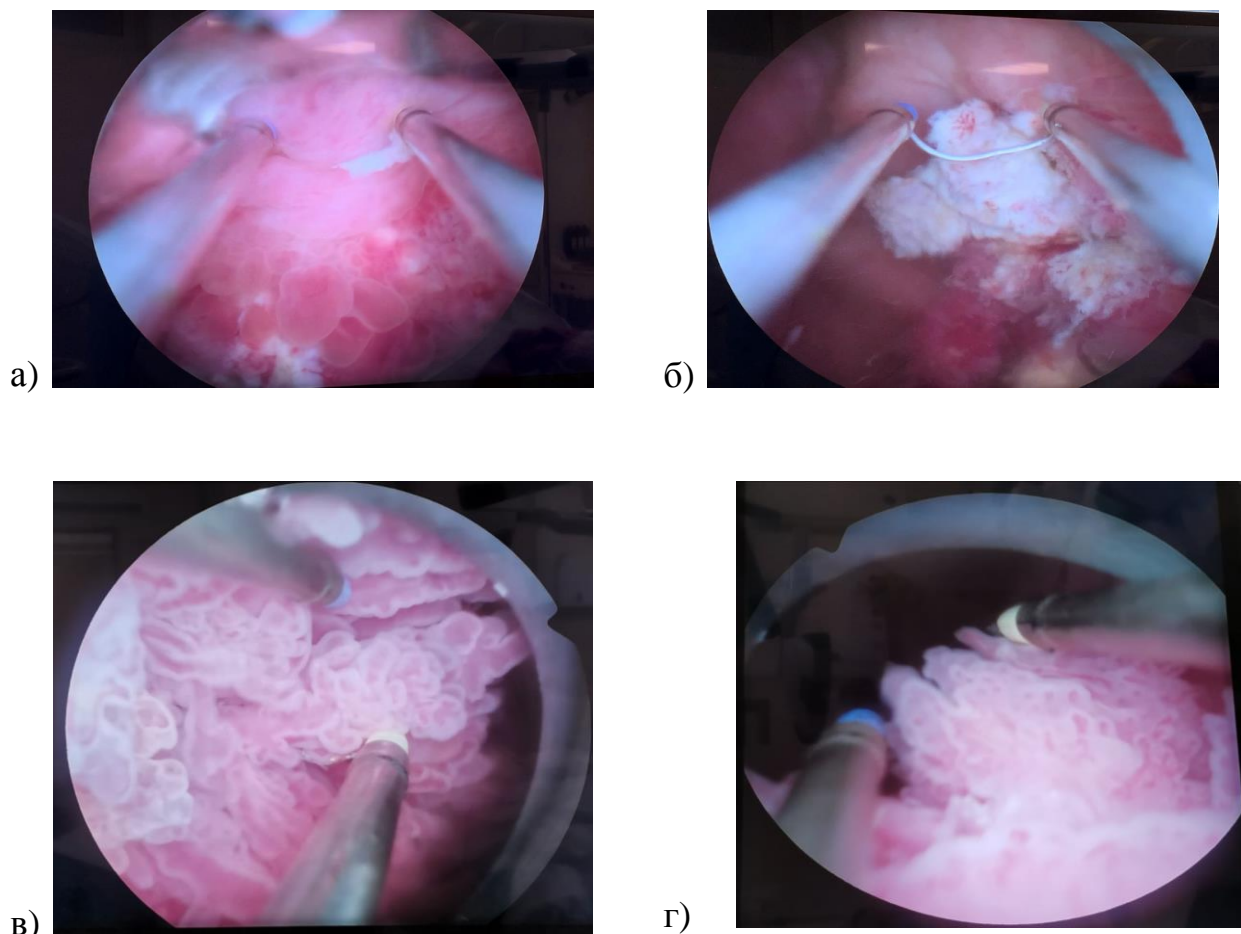


Рисунок 22 – Выполнение трансуретральной биопсии опухоли мочевого пузыря (при тотальном поражении мочевого пузыря, при опухолях более 5 см) (а)–г)).

По окончании оперативного вмешательства резектоскоп извлекался из мочевого пузыря. Устанавливался уретральный катетер Фолея на период от одного до трех дней. При радикальном удалении опухоли проводилась однократная немедленная (в первый час после ТУР) внутрипузырная инстилляция химиопрепарата Доксорубин 50 мг в 50 мл 0,9 % раствора натрия хлорида с экспозицией 60 мин. Опухолевый материал был отправлен на морфологическое и спектроскопическое исследования.

В послеоперационном периоде после ТУР мочевого пузыря пациенты получали гемостатические (в основном Sol.Tranexami в различных дозировках по показаниям) и обезболивающие препараты (Sol.Ketonalі 30 mg в/м 2 раза в день в течение трех суток при болях). Послеоперационный период без осложнений наблюдался у 137 пациентов (91,33%). У 13 пациентов (8,67%) в

послеоперационном периоде отмечалась макрогематурия, купированная консервативной терапией.

С учетом данных результатов гистологического заключения, характеристик опухолей по инструментальным обследованиям, цистоскопической картине, пациенты были определены по группам риска развития рецидива и прогрессии. Проведено соответствующее лечение согласно стандартам лечения РМП.

Методика проведения адьювантной БЦЖ – терапии

Согласно клиническим рекомендациям по лечению рака мочевого пузыря, с целью снижения рецидивов, в послеоперационном периоде всем пациентам с радикально удаленными опухолями мочевого пузыря при ТУР, было проведено адьювантное лечение в виде внутрипузырных инстилляций препарата вакцины БЦЖ [30, 22, 69]. Перед проведением БЦЖ–терапии всем пациентам в противотуберкулезном диспансере г. Уфы проводилась внутрикожная проба Манту с 2ТЕ туберкулина (или диаскин–тест). По результатам пробы Манту у пациентов с наличием папулы менее 17 мм или диаскин–теста, при размере папулы не более 5 мм, проводилась внутрипузырная инстиляция. Лечение было начато через 3 недели после радикального ТУР. Индукционный курс вакциной БЦЖ проводился на протяжении 6 недель с интервалом между введениями 7 дней, далее проводились курсы поддерживающей терапии по схеме ежемесячно, в течение 12 мес. [40, 57, 73, 76, 106].

Данные раман–спектроскопии в сравнении с гистологическим заключением выявили пациентов T1G1 соответственно 17 / 20, T1G2 23 / 31, T1G3 87 / 69 (Таблица 5).

Таблица 5 – Результаты сравнения патоморфологического заключения и раман-исследования

Гистологическое заключение (по T)	Спектроскопическое исследование
T1G1 = 20	T1G1 = 17
T1G2 = 31	T1G2 = 23
T1G3 = 69	T1G3 = 87

При анализе спектрограмм были определены клинически значимые диапазоны пиков по интенсивности и частотному сдвигу.

По результатам исследования раман-спектры образцов немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря имеют характерные особенности в виде набора пиков в диапазоне от 502 до 3460 см^{-1} (Рисунок 23).

Спектральный анализ немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря характеризуется наличием рамановских пиков, характерных для гидроксильного радикала (502 до 730 см^{-1}), 725 см^{-1} (СН-группе аденина), триптофана, фенилаланина (1031 см^{-1}), связь С-NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина (850 см^{-1} , 1250 см^{-1}), β-D-глюкопиранозы (989 см^{-1}), α-спиральной конформации, С = С-связи липидов (1450 –1660 см^{-1}), снижение интенсивности пика коллагена (820 см^{-1} (коллаген 1 типа)), пиков комплексов жирных кислот (1100 см^{-1}).

Выявлено, что спектры немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря совпадают со спектрами нормальной ткани мочевого пузыря по значениям пиков, характерных для коллагена (820 см^{-1}), для комплексов жирных кислот (1100 см^{-1}), но низкой интенсивностью.

Данные немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря распределены по степени дифференцировки: G1, G2, G3.

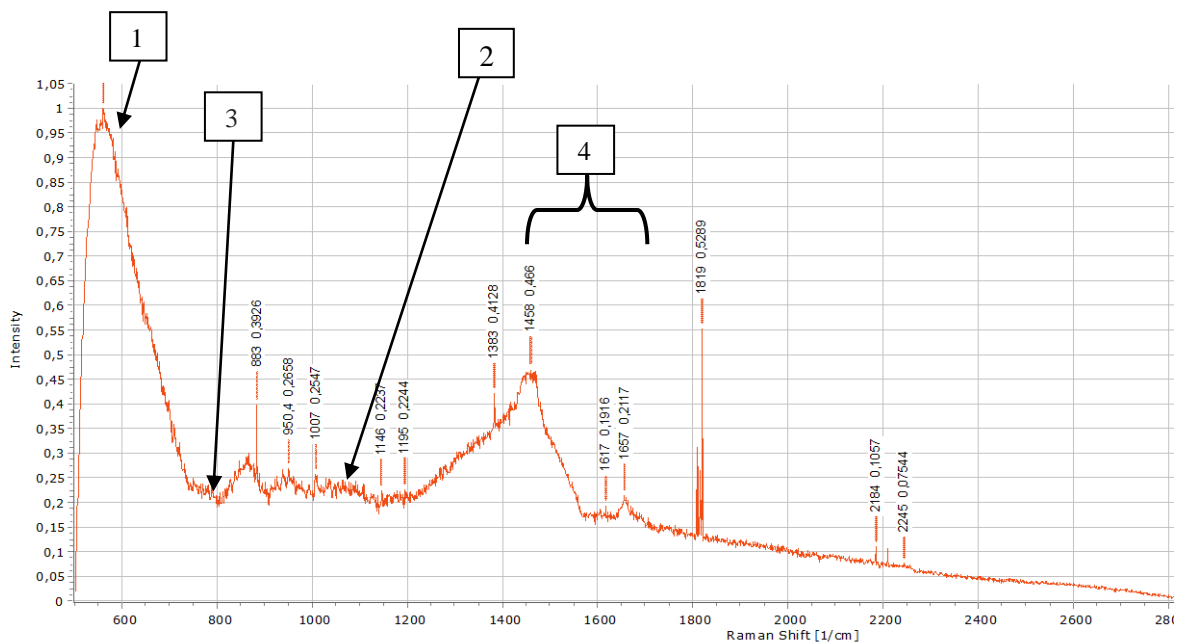


Рисунок 23 – Спектрограмма первичной опухоли больного Пациента В, 53 года, с диагнозом: Немышечно–инвазивный рак мочевого пузыря T1G1 после ТУР мочевого пузыря. Ассоциации пиков: 1- гидроксильный радикал, 2 - фенилаланин, 3 - СН группа аденина, 4 – липиды.

Положительные пики немышечно–инвазивного рака степени дифференцировки G1 отмечаются в диапазоне спектров от 566 до 3460,5 см^{-1} : от 560 до 730 см^{-1} – гидроксильный радикал, 755 – 860 см^{-1} (белки, полисахариды, коллаген – соответствуют пикам нормальной ткани), с 805 до 1100 см^{-1} – наличие нуклеиновых кислот, от 1230 до 2300 см^{-1} – белки, 1100 см^{-1} (комплекс жирных кислот), 850 см^{-1} и 1250 см^{-1} (связь C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450–1660 см^{-1} (α -спиральная конформация, C=C–связь липидов), 989 см^{-1} (β -D-глюкопираноза), отмечается снижение интенсивности пиков, характерных для коллагена (820 см^{-1} (коллаген 1 типа)), комплексов жирных кислот.

В таблице 6 представлены пики, полученные при рамановском исследовании пациентов с немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря.

Таблица 6 – Пики, полученные при рамановском исследовании пациентов с немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря

Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity
570,43	0,99899	548,04	0,99994	573,23	0,99414
860,81	0,28428	858,1	0,29907	863,6	0,32218
943,77	0,26315	947,42	0,26843	945,82	0,3008
1008,7	0,26751	1008,1	0,25843	1008,3	0,30262
1176,9	0,21826	1180,6	0,22881	1177,5	0,23814
1460,9	0,35696	1336,5	0,26423	1468,8	0,44201
1657,2	0,17063	1450,4	0,27309	1663,2	0,21848
1921,4	0,11127	1532,2	0,20419	1905,4	0,14023
2020,3	0,097654	1665,3	0,19499	2462,8	0,048991
2057,6	0,090103	1949,4	0,12574	3460,5	0,083978
2095	0,11188	1981,8	0,12622	2695,9	0,060864
2338	0,10607	2161,7	0,089936	2345,6	0,073884
2976	0,065497	2484	0,081079	3311,2	0,12894

Таким образом, у пациентов с немышечно–инвазивным раком мочевого пузыря T1G1 наиболее вариабельные пики встречались в диапазонах спектров от 560 до 730 см^{-1} – гидроксильный радикал, 755 – 860 см^{-1} (белки, полисахариды, коллаген), 1008 – 1245 см^{-1} (гликозидная связь), с 805 до 1100 см^{-1} – нуклеиновые кислоты, от 1230 до 2300 см^{-1} – белки, 1100 см^{-1} (комплекс жирных кислот), 850 см^{-1} и 1250 см^{-1} (связь C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450 –1660 см^{-1} (α -спиральная конформация, C = C–связь липидов), 989 см^{-1} (β -D–глюкопираноза). Отмечается снижение интенсивности пиков, ассоциированных с коллагеном (820 см^{-1} (коллаген 1 типа)), комплексами жирных кислот.

При этом пики, соответствующие пикам нормальной ткани, выявлялись у всех пациентов в диапазоне пиков от 755 см^{-1} – 860 см^{-1} (белки, полисахариды,

коллаген), 1008 – 1245 cm^{-1} (гликозидная связь), 989 cm^{-1} (β -D-глюкопираноза), но данные пики были низкой интенсивности.

Наиболее высокая интенсивность пиков в области гидроксильного радикала (560 – 730 cm^{-1}), фенилаланина (1031 cm^{-1}), 850 cm^{-1} и 1250 cm^{-1} (связь C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450 –1660 cm^{-1} (α -спиральная конформация, C = C–связь липидов) отмечается у пациентов с немышечно–инвазивным раком мочевого пузыря G2. Данные представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Пики, полученные при рамановском исследовании пациентов с немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря T1G2

Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity
530,43	0,99899	550,04	0,99994	573,23	0,99545
880,81	0,38428	858,1	0,29907	863,6	0,43218
943,77	0,66315	967,42	0,26843	945,82	0,4002
1009,7	0,35671	1018,1	0,25843	1008,3	0,30262
1176,9	0,34326	1180,6	0,22881	1177,5	0,23814
1460,9	0,35696	1336,5	0,26423	1468,8	0,44201
1670,2	0,23663	1450,4	0,27309	1663,2	0,21848
1931,4	0,32127	1532,2	0,20419	1905,4	0,1233
2020,3	0,67654	1667,3	0,19499	2462,8	0,2431
2057,3	0,14201	1949,4	0,12574	3200,0	0,14365
2095	0,21348	1981,8	0,12622	2793,2	0,060864
2338	0,30409	2161,7	0,089936	2484	0,081079
2976	0,065497	2345,6	0,073884	3311,2	0,12894

Следовательно, переход прогрессии от G1 к G2 характеризуется следующими характеристиками: высокая интенсивность пиков, характерных

для фенилаланина, гидроксильного радикала, связи C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина, α–спиральная конформация, C = C–связь липидов.

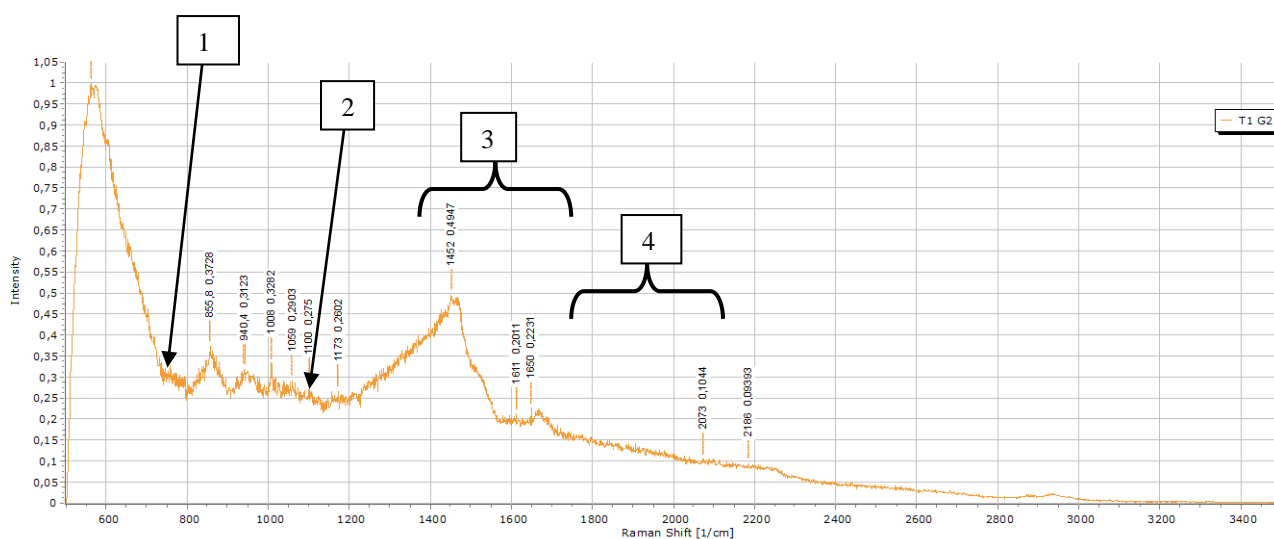


Рисунок 24 – Спектрограмма первичной опухоли Пациента Д, 57 лет, с диагнозом: Немышечно–инвазивный рак мочевого пузыря T1G2 после ТУР мочевого пузыря. Ассоциации пиков: 1 – гидроксильный радикал, 2 – фенилаланин, 3 – C=C – связь, 4 – белки.

Положительные пики, характерные для немышечно–инвазивного рака, степени дифференцировки G2 отмечаются в диапазоне спектров от 530 до 3200 см⁻¹: от 560 до 730 см⁻¹ – гидроксильный радикал; 755 – 860 см⁻¹ (белки, полисахариды, коллаген), 1008 – 1245 см⁻¹ (гликозидная связь), с 805 до 1100 см⁻¹ – наличие нуклеиновых кислот (фенилаланин, триптофан), от 1230 до 2300 см⁻¹ – белки, 1100 см⁻¹ (комплекс жирных кислот), 850 см⁻¹ и 1250 см⁻¹ (связь C–NH₂), 1450 – 1660 см⁻¹ (α–спиральная конформация, C = C–связь липидов), 989 см⁻¹ (β–D–глюкопираноза), отмечается снижение интенсивности пика коллагена (820 см⁻¹ (коллаген 1 типа)), пика комплексов жирных кислот (Рисунок 24).

Отрицательные пики были выявлены в диапазоне от 530–560 см⁻¹, 2186 до 2210 см⁻¹, что характерно для липидов.

Исследования спектров пациентов с немышечно–инвазивным раком G3 показали более высокие интенсивности пиков по сравнению с T1G2 в диапазонах, характерных для амид–I и α–спирали, триптофана, низкие

интенсивности пиков, характерных для комплекса жирных кислот. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Пики, полученные при рамановском исследовании пациентов с немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря T1G3

Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity
548,47	0,83062	725,72	0,50528	502,87	0,91287
699,23	0,62469	858,95	0,57205	549,18	0,99956
756,78	0,68674	965,68	0,51526	591,26	0,94745
859,81	0,78624	1061	0,509	730,44	0,90488
948,01	0,72162	1110,1	0,53399	856,89	0,9378
1007,8	0,97794	1180,9	0,55867	948,85	0,90124
1103,7	0,61512	1421,5	1	1008,6	0,86828
1263,8	0,79298	1567,9	0,43758	1112	0,85315
1352	0,93468	1681,4	0,40042	1181,4	0,8093
1447,3	0,98491	1838,6	0,34488	1257,5	0,91143
1590,1	0,5699	1975,4	0,31032	1325,5	0,84532
1663,8	0,72165	2175,9	0,38367	1453,5	0,77321
1785,5	0,39976	2352,6	0,13301	1560,9	0,86434
1872,6	0,36082	2608,9	0,084772	1672,4	0,8614
1907,6	0,35477	2380,6	0,15149	1940,4	0,55612
1957,2	0,27486	2544,7	0,11299	1996,8	0,52542
1994,5	0,27245	2606,2	0,098455	2251,2	0,33222
2100,6	0,26989	2926	0,13264	2874,8	0,086883

Положительные пики, характерные для немышечно-инвазивного рака, степени дифференцировки G3 отмечаются в диапазоне спектров от 502,87 до 3460 см^{-1} . Ассоциация пиков: от 560 до 730 см^{-1} – гидроксильный радикал; 755 – 860 см^{-1} (белки, полисахариды, коллаген), 1008 – 1245 см^{-1} (гликозидная

связь) – соответствуют пикам нормальной ткани мочевого пузыря; с 805 до 1100 см^{-1} – наличие нуклеиновых кислот (фенилаланин, триптофан), от 1230 до 2300 см^{-1} – белки, 1100 см^{-1} (комплекс жирных кислот), 850 см^{-1} и 1250 см^{-1} (связь C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450–1660 см^{-1} (α -спиральная конформация, C = C–связь липидов), 989 см^{-1} (β -D-глюкопираноза), амид–VI (589 см^{-1}), L-тирозин (639 см^{-1}), амид–I и α -спираль (1654 см^{-1}), отмечается снижение интенсивности пика, характерного для коллагена (820 см^{-1} (коллаген 1 типа)), пика комплексов жирных кислот (Рисунок 25, Таблица 8).

Отрицательные пики были выявлены в диапазоне от 2327 до 2929 см^{-1} , ассоциирующихся с белками, липидами.

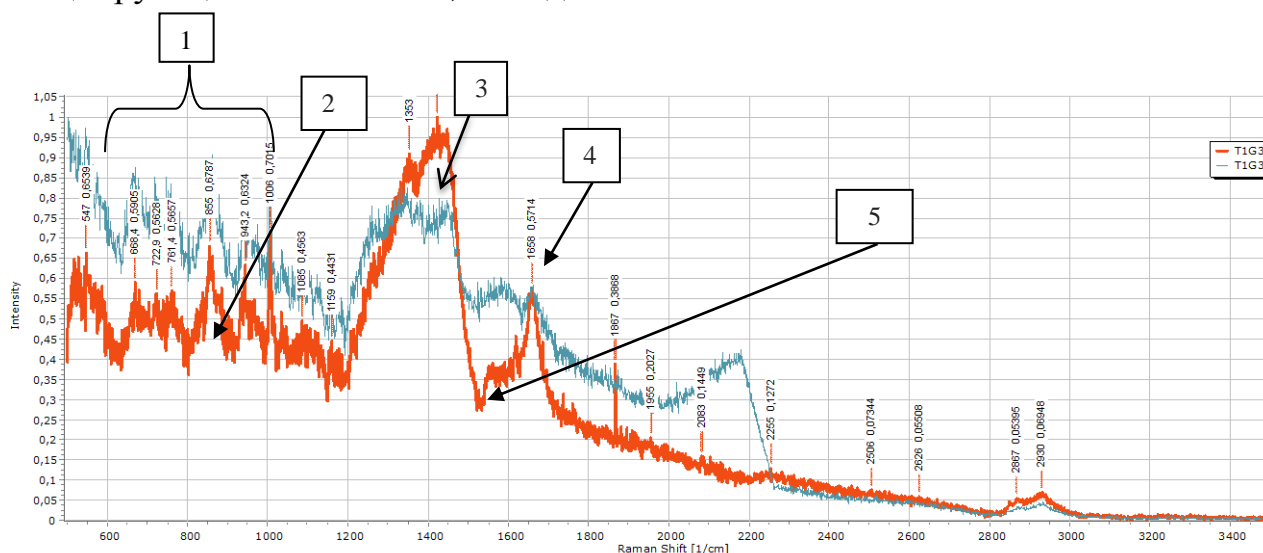


Рисунок 25 – Спектрограмма первичной опухоли Пациента К, 49 лет, с диагнозом: Немышечно–инвазивный рак мочевого пузыря T1G3 после ТУР мочевого пузыря. Ассоциации пиков: 1 - гидроксильный радикал, 2 –коллаген, 3 – белки, 4 - амид–I, 5 - комплексы жирных кислот.

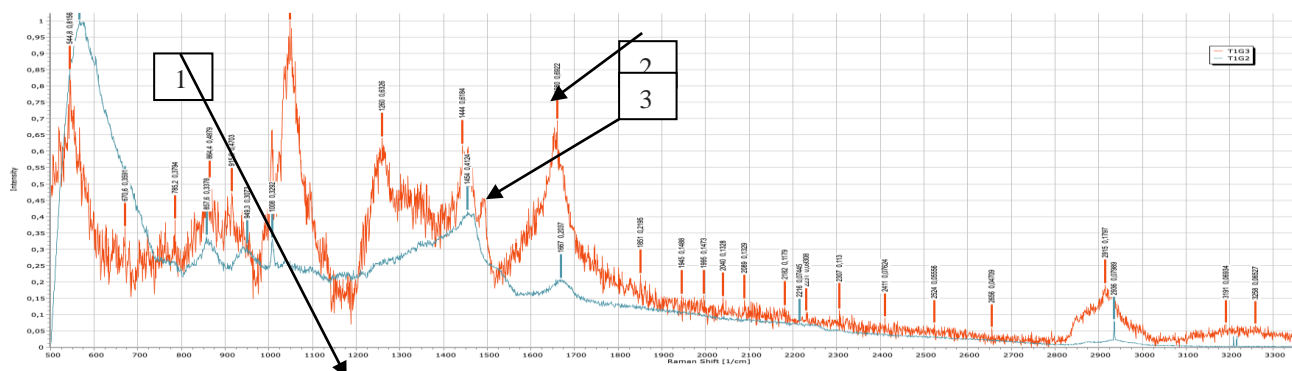


Рисунок 26 – Корреляция интенсивности раман-спектров в зависимости от степени дифференцировки, сравнение T1G2 и T1G3. Красный спектр: Пациент П, 64 года, диагноз: Немышечно–инвазивный рак мочевого пузыря T1G3 (отмечаются более высокие интенсивности пиков по сравнению с T1G2 в диапазонах, характерных для амид–I и α –спирали, триптофана, низкие интенсивности пиков, характерных для комплекса жирных кислот). Синий спектр: Пациент У, 62 лет, диагноз: Немышечно–инвазивный рак мочевого пузыря T1G2. Ассоциации пиков: 1 - комплексы жирных кислот, 2 – амид–I и α –спираль, 3 – триптофан.

Анализ рамановских пиков немышечно-инвазивного рака показал, что интенсивность пиков рамановских спектров низкодифференцированного рака мочевого пузыря имеют высокую интенсивность пиков. Отмечается увеличение интенсивности пиков от G1 к G3 (Рисунок 26, Таблица 9).

Таблица 9 – Наиболее значимые оптические маркеры молекулярного профиля немышечно–инвазивного рака мочевого пузыря

Рамановский пик	Значение
502 до 730 см^{-1}	гидроксильный радикал
1031 см^{-1}	фенилаланин
1558 см^{-1}	триптофан
725 см^{-1}	CН-группа аденина
850 см^{-1} и 1250 см^{-1}	связи C–NH ₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина
1450 –1660 см^{-1}	C = C–связи липидов

Продолжение таблицы 9	
Рамановский пик	Значение
1450 –1660 см ⁻¹	α -спиральная конформации
989 см ⁻¹	β -D-глюкопираноза

Таким образом, исследование раман-спектров является перспективным методом диагностики немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря, показывая достаточно высокий процент чувствительности его определения.

ГЛАВА 5 РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ МЫШЕЧНО–ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ

Прогрессия немышечно–инвазивного рака в мышечно–инвазивный рак может быть связана теоретически с изменением молекулярного профиля опухоли в связи с вовлечением в процесс мышечной ткани. Для подтверждения данной гипотезы нами было проведено исследование молекулярного профиля методом рамановской спектроскопии пациентов с мышечно–инвазивным раком мочевого пузыря с целью сопоставления группы больных с мышечно–инвазивным раком с группой больных немышечно–инвазивным раком, у которых на фоне БЦЖ–терапии был выявлен рецидив.

Больные, поступившие в урологическое отделение с диагнозом мышечно–инвазивный рак, сформировали группу из 23 пациентов. Средний возраст больных составил 63 года. Срок наблюдения составил 12 месяцев.

В данной группе пациентам первоначально была проведена ТУР–биопсия опухоли мочевого пузыря с проведением раман–спектроскопии послеоперационного материала. Далее пациентам было проведено комбинированное лечение: неoadъювантная химиотерапия (4 курса) по схеме Гемцитабин–Цисплатин (гемцитабин – 1000 мг/м² в/в в первый, восьмой и пятнадцатый день, цисплатин – 70 мг/м² в/в в первый (второй) день; цикл каждые 4 нед). После завершения 4 курсов химиотерапии пациентам было выполнено оперативное лечение: тазовая эквисцерация (n=8) и цистэктомия (n=15) с последующим проведением раман–спектроскопии удаленного материала.

ТУР–биопсия мочевого пузыря проводилась в условиях операционной, с помощью резектоскопов Olympus и Karl Storz, в условиях монополярной или биполярной электрорезекции. Для электрорезекции были использованы электрод–петля угловая/прямая, для электрокоагуляции были применены

шариковые электроды. Хирургическое лечение проводилось под спинальной анестезией, положение пациента – литотомическое.

Во время ТУР–биопсии с помощью электрод–петли проводилась резекция опухоли, далее с помощью шарикового электрода проводилась коагуляция резецированной зоны.

По окончанию оперативного вмешательства резектоскоп извлекался из мочевого пузыря. Устанавливался уретральный катетер Фолея на период от одного до трех дней. Опухолевый материал в день оперативного вмешательства в течение двух часов был отправлен на морфологическое и спектроскопическое исследования.

В послеоперационном периоде после ТУР мочевого пузыря пациенты получали гемостатические (в основном Sol.Tranexami в различных дозировках по показаниям) и обезболивающие препараты (Sol.Ketonalі 30 mg в/м 2 раза в день в течение трех суток при болях). Послеоперационный период – без осложнений.

После проведения 4 курсов неоадьювантной терапии по схеме Гемцитабин–Цисплатин пациентам было проведено оперативное лечение в объеме радикальной цистэктомии или тазовой эквисцерации.

Методика выполнения радикальной цистэктомии, тазовой эквисцерации

Радикальная цистэктомия и тазовая эквисцерация выполнялись по общепринятой методике, согласно стандартам лечения пациентов РМП. В нашем центре данные оперативные вмешательства были выполнены с помощью роботической системы DaVinciSi (Рисунок 27). Наркоз – эндотрахеальный.

Согласно клиническим рекомендациям, объем удаляемых тканей у мужчин: мочевой пузырь с участком висцеральной брюшины и паравезикальной клетчаткой, простата и семенные пузырьки, у женщин: мочевой пузырь с участком висцеральной брюшины и паравезикальной

клетчаткой, матка с придатками, резекция передней стенки влагалища. У всех пациентов была выполнена двусторонняя тазовая лимфаденэктомия.

В положении Тренделенбурга под углом 30–45° были установлены роботические и ассистентские троакары. Первым этапом выполнялась цистэктомия с расширенной тазовой лимфодиссекцией, вторым этапом формирование мочевого резервуара (по Бриккеру, Штудеру). В малый таз устанавливали страховой дренаж (от двух до пяти суток). В послеоперационном периоде проводилась инфузионная терапия (Sol.NaCl 0,9% 400 ml в/в кап., Sol.Metoclopramidi 2.0 ml в/в кап, Sol.Glucosae 5% 400 ml в/в кап, Sol KCl 30 mg в/в кап), профилактика тромбоэмболических осложнений (Sol.Енохарагiни 0.4 ml п/к). На десятые сутки пациентов выписывали под амбулаторное наблюдение.

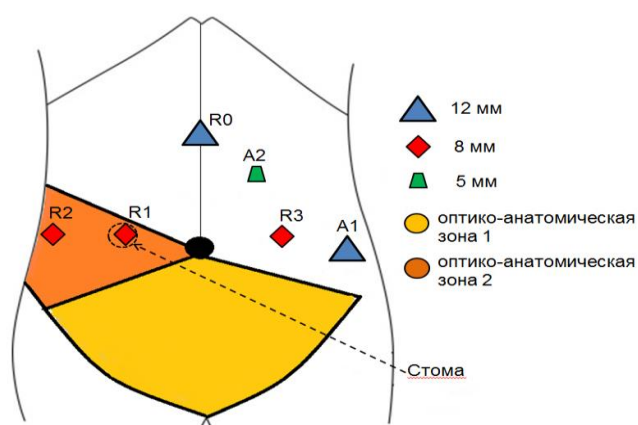


Рисунок 27 – Положение троакаров при робот-ассистированной цистэктомии.

Наиболее распространенными ранними послеоперационными осложнениями были лимфорей – у 16 пациентов (53%), кишечная непроходимость – у 8 пациентов (26%).

В послеоперационном периоде проводилась инфузионная терапия (Sol.NaCl 0,9% 400 ml в/в кап., Sol.Metoclopramidi 2.0 ml в/в кап, Sol.Glucosae 5% 400 ml в/в кап , Sol KCl 30 mg в/в кап), профилактика тромбоэмболических осложнений (Sol.Енохарани 0.4 ml п/к).

Данные раман–спектроскопии в сравнении с гистологическим заключением выявили пациентов T2G3 соответственно 13 / 11, T3G3 7 / 7, T4G3 3 / 5 (Таблица 10).

Таблица 10 – Результаты сравнения патоморфологического заключения и раман–исследования

Гистологическое заключение	Раман–спектроскопическое исследование
T2G3 = 13	T2G3 = 11
T3G3 = 7	T3G3 = 7
T4G3 = 3	T4G3 = 5

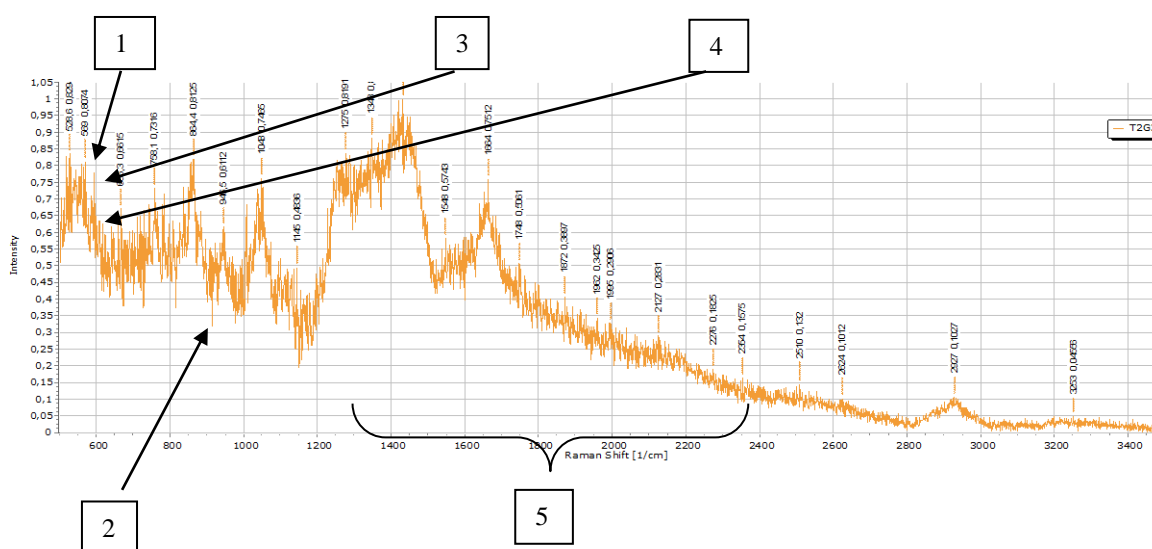


Рисунок 28 – Спектрограмма пациента с мышечно–инвазивным раком. Пациент В., 67 лет, Диагноз: Рак мочевого пузыря T2N0M0G3. Состояние после ТУР–биопсии мочевого пузыря. Ассоциации пиков: 1 - гидроксильный радикал, 2 - комплексы коллагена, 3 - L-аргинин, 4 - L-тирозин, 5 – белки.

По результатам исследования раман-спектры образцов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря имеют характерные особенности в виде набора пиков в диапазоне от 503 до 3476 см^{-1} (Рисунок 28).

Результаты спектроскопического исследования мышечно-инвазивного и немышечно-инвазивного рака характеризуются так же наличием пиков, полученных при исследовании нормальной ткани.

Спектральный анализ мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря характеризуется наличием рамановских пиков, характерных для гидроксильного радикала (503 до 830 см^{-1}), 725 см^{-1} (СН-группа аденина), нуклеиновых кислот (815 до 1480 см^{-1}), фенилаланина (1031 см^{-1}), белков (1230 до 2370 см^{-1}), α -спиральной конформации, С = С-связи липидов (1450 –1660 см^{-1}), L-аргинин (494 см^{-1}), амид-VI (589 см^{-1}), L-тирозин (639 см^{-1}), амид-I и α -спираль (1654 см^{-1}). Выявлены сниженные интенсивности пиков, характерных для коллагена (933 см^{-1} , 1035 см^{-1} , 1401 см^{-1} , 1488 см^{-1}), β -D-глюкопиранозы (989 см^{-1}), гликогена (484–490 см^{-1}), СН₂-СН₃-связи молекул коллагена, эластина и фосфолипидов, снижение (в некоторых спектрах исчезновение пиков), характерных для жирных кислот (1100 – 1443 см^{-1}) (Рисунок 29).

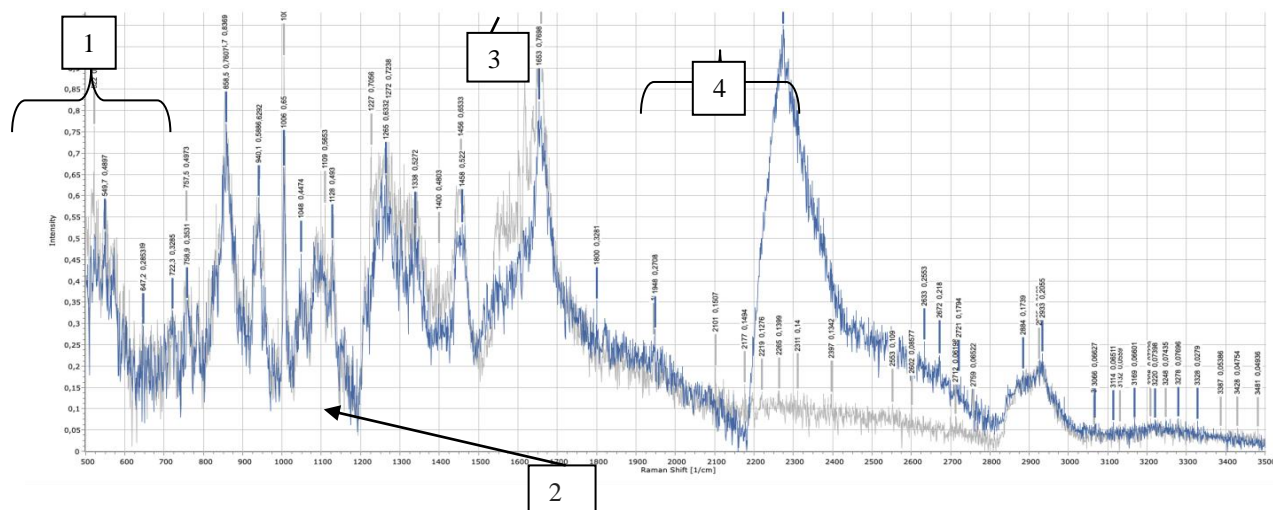


Рисунок 29 – Спектрограмма пациента с мышечно-инвазивным раком. Пациент Д., 51 лет, Диагноз: Рак мочевого пузыря Т3N0M0G3. Состояние после ТУР-биопсии мочевого пузыря. Отмечается высокая интенсивность пиков, ассоциированных с гидроксильным радикалом, связью С-NH₂, белками, низкая интенсивность пиков, характерных для комплексов жирных

кислот. Ассоциации пиков: 1 - гидроксильный радикал, 2 - комплексы жирных кислот, 3 - связь C–NH₂, 4 – белки.

Мышечно–инвазивный рак Т3G3 характеризуется наличием высоких интенсивностей пиков в диапазоне от 503 до 830 см⁻¹ – гидроксильный радикал, 815 до 1480 см⁻¹ – наличие нуклеиновых кислот, от 1230 до 2370 см⁻¹ – белки, 850 см⁻¹ и 1750 см⁻¹ (связь C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450–1660 см⁻¹ (связь амидов I: C = O белков, α–спиральная конформация, C = C–связь липидов). Отрицательные пики выявлены в диапазоне 3050 – 3500 см⁻¹, 2200 – 2800 см⁻¹. Спектрограммы представлены низкими пиками, характерными для коллагена, CH₂–CH₃–связи молекул коллагена, эластина и фосфолипидов, гликогена (484–490 см⁻¹), снижение (в некоторых спектрах исчезновение пиков), характерных для жирных кислот (1100 – 1443 см⁻¹) (Рисунок 30).

В данной группе появились рамановские пики с высокой интенсивностью, характерные для L–аргинина (494 см⁻¹), амид–VI (589 см⁻¹), L–тирозина (639 см⁻¹), амид–I и α–спирали (1654 см⁻¹) (Рисунок 31).

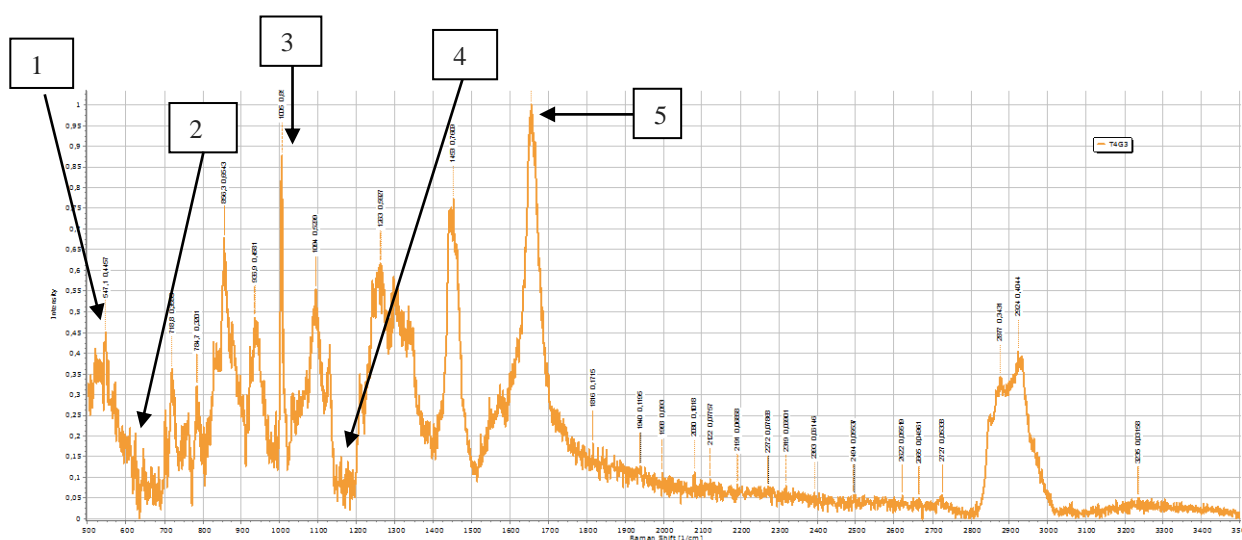


Рисунок 30 –Спектрограмма пациента с мышечно–инвазивным раком мочевого пузыря. Пациент В., 72 года, Диагноз: Рак мочевого пузыря Т4N0M0G3. Состояние после ТУР–биопсии мочевого пузыря. Высокие интенсивности пиков, характерных для фенилаланина, амид–VI, L–тирозина, снижение пика

комплексов жирных кислот. Ассоциации пиков: 1 - амид-VI, 2 - L-тирозин, 3 - фенилаланин, 4 - комплексы жирных кислот, 5 - амид-I и α -спирали.

Рамановские пики мышечно-инвазивного рака T4G3 характеризуются наличием высоких интенсивностей пиков в диапазоне от 503 до 830 см^{-1} – гидроксильный радикал, 815 до 1480 см^{-1} – нуклеиновые кислоты, 840–850 см^{-1} – лактат, от 1230 до 2370 см^{-1} – белки, 850 см^{-1} и 1750 см^{-1} (связь C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450–1660 см^{-1} (связь амидов I: C = O белков, α -спиральная конформация, C = C-связь липидов). Так же отмечается преобладанием пиков низкой интенсивности, ассоциированных с молекулами коллагена (1035 см^{-1}), гликогена (484–490 см^{-1}), пики, характерные для L-аргинин (494 см^{-1}), амид-VI (589 см^{-1}), L-тирозин (639 см^{-1}), амид-I и α -спираль (1654 см^{-1}) проявляют более интенсивные сигналы комбинационного рассеяния в данной группе, чем в группе немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (Таблица 11).

Таблица 11 – Пики, полученные при раман-спектроскопическом исследовании пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря T4G3

Raman shift [1/cm]	intensity
539,47	0,84571
642,08	0,52713
758,34	0,516
840,37	0,58047
923,35	0,5009
1048,6	0,99569
1250,1	0,56914
1351,5	0,45769
1454,7	0,4649
1489,7	0,4749
1553,4	0,40946

Продолжение таблицы 11	
Raman shift [1/cm]	intensity
1652,7	0,54172
1946,1	0,19679
2015	0,16074
2107,7	0,14458
2155,5	0,13768
1262,9	0,59271
1452,7	0,76093
1655,9	0,99891
1815,9	0,17154
1940,3	0,1195
1997,6	0,092999
2079,8	0,10179
2726,5	0,053384
2877	0,34314

Таблица 12 – Наиболее значимые оптические маркеры молекулярного профиля мышечно–инвазивного рака мочевого пузыря

Рамановский пик	Значение
503 до 830 см^{-1}	гидроксильный радикал
815 до 1480 см^{-1}	нуклеиновые кислоты
1230 до 2370 см^{-1}	белки
1558 см^{-1}	триптофан
1031 см^{-1}	фенилаланин
850 см^{-1} и 1250 см^{-1}	связи C–NH ₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина
1450 –1660 см^{-1}	C = C–связи липидов

Продолжение таблицы 12	
Рамановский пик	Значение
1450 –1660 см ⁻¹	связи амидов I: C = O белков, α-спиральной конформации
820 см ⁻¹	Коллаген (снижение пиков)
494 см ⁻¹	L-аргинин
589 см ⁻¹	амид-VI
639 см ⁻¹	L-тирозин
1654 см ⁻¹	амид-I и α-спираль

Ассоциации пиков мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря представлены пиками большей интенсивности в диапазонах от 503 до 830 см⁻¹ – гидроксильного радикала, 815 до 1480 см⁻¹ – нуклеиновые кислоты, 840–850 см⁻¹ – лактат, от 1230 до 2370 см⁻¹ – белки, 850 см⁻¹ и 1750 см⁻¹ (связь C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450 –1660 см⁻¹ (связь амидов I: C = O белков, α-спиральная конформация, C = C–связь липидов). Так же отмечается преобладанием пиков низкой интенсивности, характерных для молекул коллагена (1035 см⁻¹), гликогена (484–490 см⁻¹), пики, ассоциированные с L-аргонином (494 см⁻¹), амид-VI (589 см⁻¹), L-тиозином (639 см⁻¹), амид-I и α-спираль (1654 см⁻¹) проявляют более интенсивные сигналы комбинационного рассеяния в данной группе, чем в группе немышечно-инвазивного рака.

Мы можем гипотетически говорить о том, что для мышечно-инвазивной прогрессии вышеперечисленные пики могут быть характерными маркерами, и их раннее выявление у больных в группе немышечно-инвазивного рака может быть применено в качестве диагностики мышечно-инвазивной прогрессии и рецидива.

ГЛАВА 6 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОПТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ РЕЦИДИВНОМ И НЕ РЕЦИДИВНОМ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

В процессе динамического наблюдения на фоне проводимого лечения были выявлены пациенты с рецидивом опухоли рака мочевого пузыря. Данные пациенты сформировали отдельную исследовательскую группу.

Рецидив в группе немышечно–инвазивного рака мочевого пузыря

В динамике на фоне внутривезикулярной химиотерапии через три месяца был выявлен местно–распространенный рецидив, поражение регионарных лимфатических лимфоузлов у 5 пациентов, через шесть месяцев – 7 пациентов, через двенадцать месяцев наблюдения – у 6 пациентов. Всего 18 пациентов за период наблюдения, что составляет 15%.

Отмечено, что у 5 пациентов (рецидив через три месяца) после первичного оперативного лечения гистология соответствовала T1G1, при этом раман–спектры соответствовали T2G3. Исследованные спектры рецидива опухоли показали гистологическое заключение и раман–спектроскопическое исследование, соответствующие T2G3. Выявлена высокая интенсивность пиков комбинационного рассеяния 725 см^{-1} , 1328 см^{-1} и 1455 см^{-1} , ассоциированных с основаниями нуклеиновых кислот, гипоксантином, основаниями ДНК/РНК и дезоксирибозой, триптофаном.

Через шесть месяцев рецидив и прогрессия были установлены у 7 пациентов, при этом у 2 пациентов после первичного оперативного лечения гистологический тип опухоли соответствовал T1G1, раман–спектры соответствовали T2G1, у 5 пациентов первичный гистологический тип опухоли T1G1, раман–спектры – T2G2. Выявлена высокая интенсивность пиков комбинационного рассеяния 568 см^{-1} , 725 см^{-1} , 1031 см^{-1} , 1328 см^{-1} , 1330 см^{-1} и 1455 см^{-1} , ассоциированных с основаниями нуклеиновых кислот,

фенилаланином, триптофаном, гипоксантином, основаниями ДНК/РНК и дезоксирибозой.

Через двенадцать месяцев рецидив и прогрессия были выявлены у 6 пациентов, при этом у 3 пациентов после первичного оперативного лечения гистологический тип опухоли соответствовал T1G1, раман–спектры соответствовали T2G1, у 3 пациентов гистологический тип опухоли после первичного оперативного лечения T1G1, раман–спектры – T2G3. Пациентам в последующем была выполнена неoadьювантная химиотерапия (4 курса GemCis), радикальная цистэктомия.

Следовательно, данная группа пациентов изначально имела более высокий риск развития рецидива и прогрессии.

Клинический пример 1

Пациент 48 лет. Поступил в урологическое отделение с жалобами на кровь в моче. Обследован амбулаторно: УЗИ: в полости мочевого пузыря по правой боковой стенке образование размерами 33x17 мм на широком основании, в режиме ЦДК с кровотоком. Выполнена ТУР мочевого пузыря в условиях стационара. При цистоскопии: устья без особенностей, на 5 часах условного циферблата визуализируется ворсинчатое образование на ножке размерами до 40 мм на широком основании. Выполнено радикальное удаление опухоли мочевого пузыря, установлен уретральный катетер (на трое суток), в мочевой пузырь интраоперационно введен препарат Доксорубин с экспозицией 60 мин. Послеоперационный материал отправлен на гистологическое и раман–спектроскопическое исследование (Рисунок 31, Таблица 13). Гистологическое заключение: уротелиальная карцинома G3, без прорастания в мышечный слой стенки мочевого пузыря.

Диагноз: Рак мочевого пузыря T1N0M0G3 ст 1 гр 3. Через 2 недели после первичного ТУР пациенту был проведен индукционный 6–недельный курс БЦЖ–терапии, с последующим поддерживающим курсом по схеме, далее через

три месяца повторная ТУР с резекцией послеоперационного рубца. Гистологически рецидив не установлен (Рисунок 32, Таблица 13, 14).

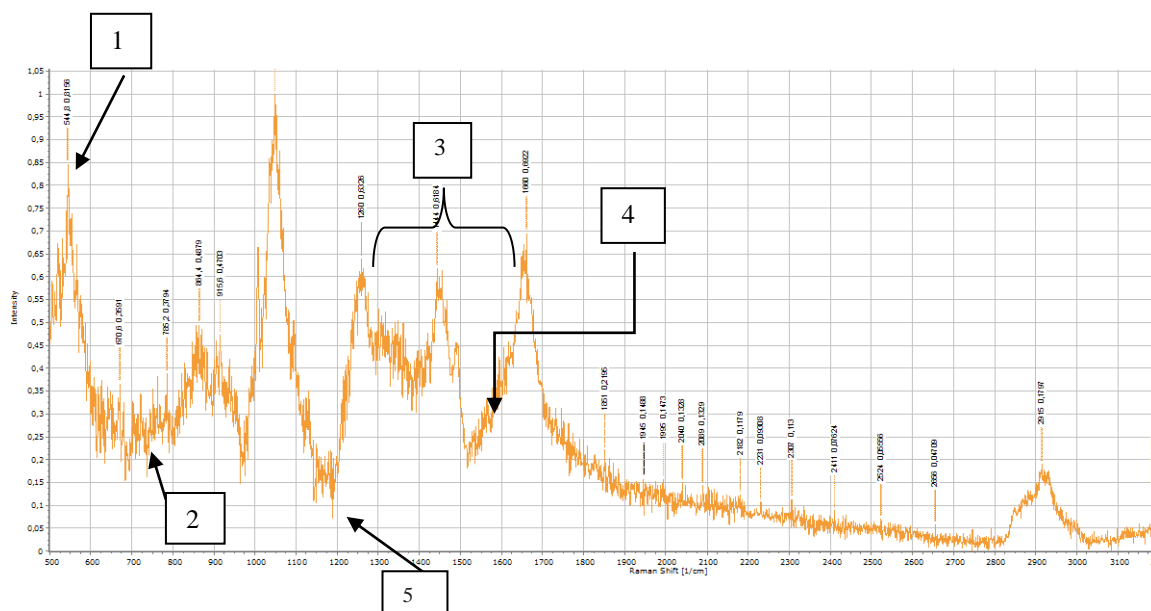


Рисунок 31 – Спектрограмма первичного опухолевого материала. Пациент Е,48 лет. Диагноз: Рак мочевого пузыря T1N0M0G3 ст 1 гр 3. Низкие пики, характерные для коллагена, комплексов жирных кислот, высокие пики триптофана, гидроксильного радикала. Ассоциации пиков: 1 - Гидроксильный радикал, 2 – коллаген, 3 - C = C-связи липидов, 4 - триптофан, 5 - Комплексы жирных кислот.

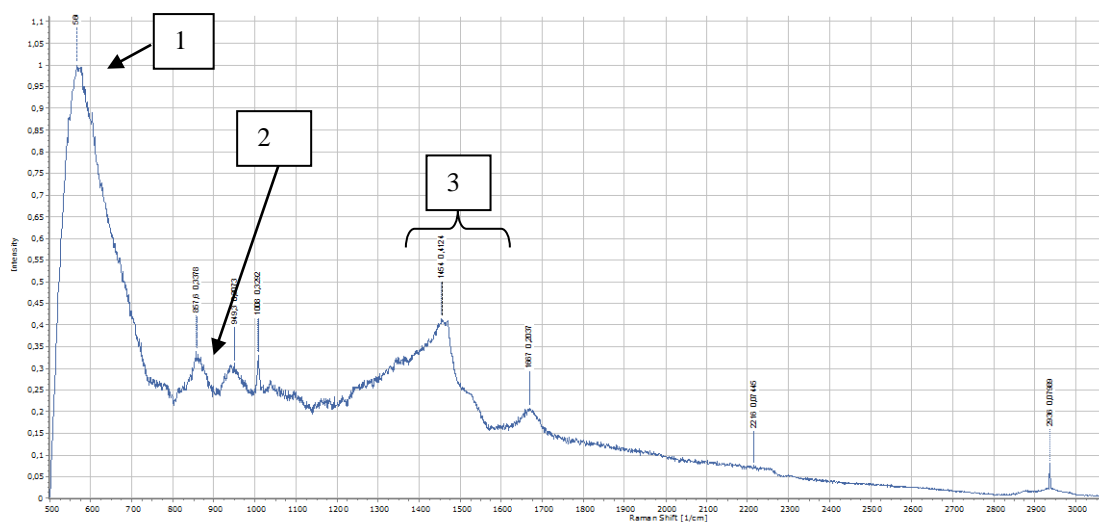


Рисунок 32 – Спектрограмма послеоперационного рубца, полученного после повторной ТУР на фоне БЦЖ-терапии. Гистологически рецидив не был подтвержден. Пациент Е,48 лет. Диагноз: Рак мочевого пузыря T1N0M0G3 ст 1 гр 3. Сохраняется пик гидроксильного радикала, появление пиков, соответствующих пикам нормальной ткани мочевого пузыря (липидов, коллагена). Ассоциации пиков: 1- гидроксильный радикал, 2 – гидроксипролин, 3 – липиды.

Таблица 13 – Пики, полученные при рамановском исследовании первичной опухоли

Raman shift [1/cm]	intensity
544,8	0,81565
730,6	0,3591
785,2	0,37936
864,41	0,48793
915,57	0,47035
1048,3	0,9913
1259,6	0,63262
1443,8	0,6184
1659,8	0,69217
1850,7	0,2195
1944,6	0,1488
1995	0,14731
2040	0,13275
2089,2	0,13285
2181,7	0,11788
2230,8	0,093085
2306,6	0,11298
2410,9	0,076236
2523,8	0,055563
2655,6	0,047094
2914,5	0,1797
3190,8	0,069341
3258,1	0,065266

Таблица 14 – Пики, полученные при раман-спектроскопическом исследовании ткани мочевого пузыря (послеоперационного рубца) на фоне лечения БЦЖ

Raman shift [1/cm]	intensity
566,23	0,99896
857,57	0,33776
949,34	0,30734
1008,3	0,32915
1454,3	0,41243
1667,2	0,20371
2215,7	0,074453
2935,8	0,079894

На фоне БЦЖ–терапии раман–пики, полученные при первичном ТУР и гистологически соответствующие РМП T1G3, изменились: отмечается снижение интенсивности пиков (545 см⁻¹, 730 см⁻¹, 785 см⁻¹, 1050 см⁻¹, 1259 см⁻¹, 2230 см⁻¹, 2306 см⁻¹), так же появление пиков, соответствующих пикам нормальной ткани мочевого пузыря (566 см⁻¹, 857 см⁻¹, 950 см⁻¹, 1008 см⁻¹, 1454 см⁻¹, 1667 см⁻¹, 2215 см⁻¹) (Рисунок 34).

Данный клинический пример демонстрирует возможности метода раман–спектроскопии в оценке эффективности лечения немышечно–инвазивного рака на фоне БЦЖ–терапии.

Клинический пример 2

Пациент 53 лет. Поступил в урологическое отделение с жалобами на кровь в моче. Обследован амбулаторно: УЗИ: в полости мочевого пузыря по передней стенке на 5 ч условного циферблата ворсинчатое образование размерами 25x30 мм, в режиме ЦДК с кровотоком. Выполнена ТУР мочевого пузыря в условиях стационара. При цистоскопии: устья без особенностей, на 5 часах условного циферблата визуализируется ворсинчатое образование на ножке размерами до 30 мм на широком основании. Выполнено радикальное

удаление опухоли мочевого пузыря, установлен уретральный катетер (на трое суток), в мочевой пузырь интраоперационно введен препарат Доксорубин с экспозицией 60 мин. Материал отправлен на гистологическое исследование и раман–спектроскопическое. Гистология: уротелиальная карцинома G3, без прорастания в мышечный слой стенки мочевого пузыря.

Диагноз: Рак мочевого пузыря T1N0M0G3 ст 1 гр 3.

Через 2 недели после первичного ТУР пациенту был проведен индукционный 6–недельный курс БЦЖ–терапии, далее через три месяца повторная ТУР с резекцией послеоперационного рубца. Гистологически установлен рецидив. При раман–исследовании после первичной ТУР пики соответствовали раман–пикам T2G3 (Рисунок 33, Таблица 15). После трех месяцев на фоне БЦЖ–терапии был получен рецидив опухоли, раман–пики материала повторной ТУР соответствовали пикам T2G3 (Рисунок 34, Таблица 16). Выявлена высокая интенсивность пиков комбинационного рассеяния 725 см^{-1} , 1328 см^{-1} и 1455 см^{-1} , ассоциированных с основаниями нуклеиновых кислот, включая гипоксантин, основания ДНК/РНК и дезоксирибозу.

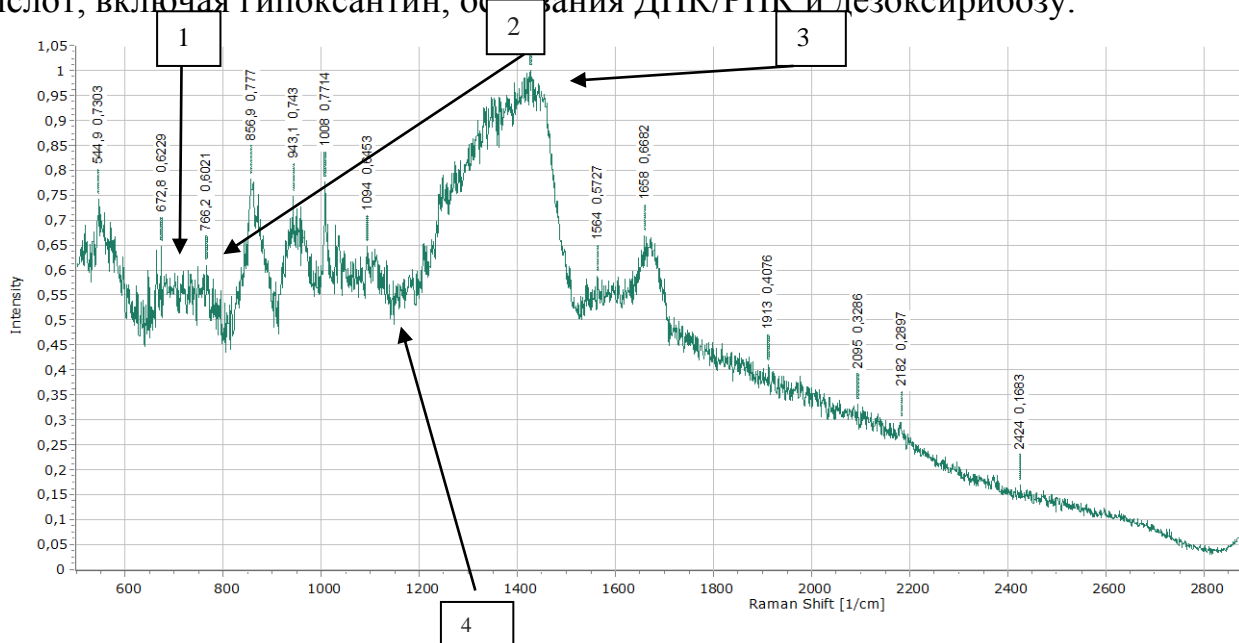


Рисунок 33 – Спектрограмма первичного опухолевого материала. Пациент T,53 лет. Диагноз: Рак мочевого пузыря T1N0M0G3 ст 1 гр 3. Низкие пики, характерные для коллагена, комплексов жирных кислот, высокие пики гидроксильного радикала, СН-группы аденина, С = С–связи липидов. Ассоциация пиков: 1 - Гидроксильный радикал, 2 - СН группа аденина, 3 - С = С–связи липидов, 4 - Комплексы жирных кислот.

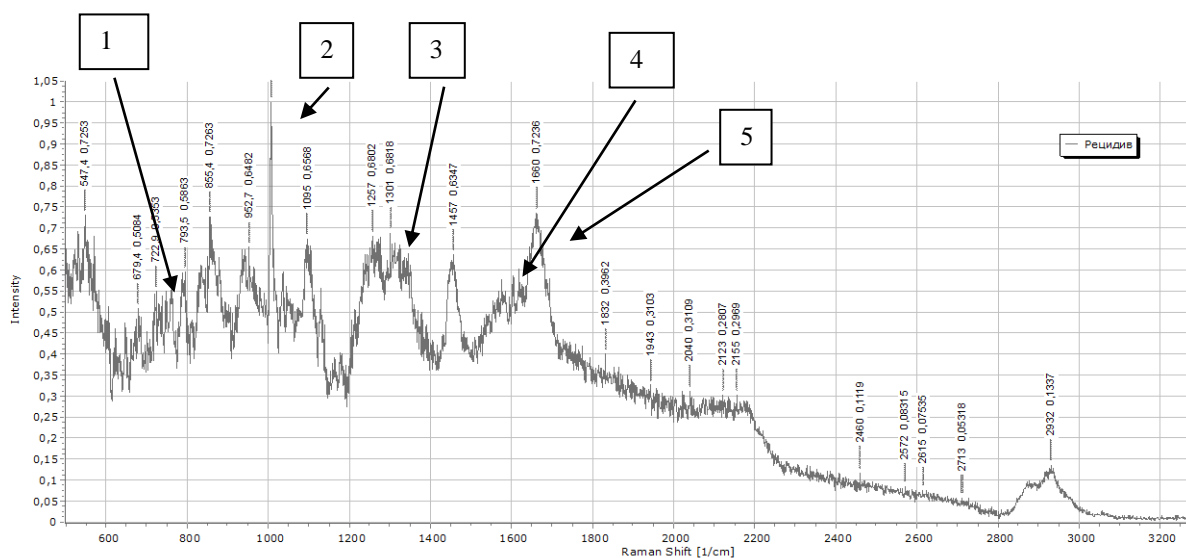


Рисунок 34 – Спектрограмма рубцовой ткани мочевого пузыря. Пациент Т,53 лет. Диагноз: Рак мочевого пузыря T1N0M0G3. Рецидив. Низкие пики, ассоциированные с коллагеном, комплексом жирных кислот, высокие пики, ассоциированные с гидроксильным радикалом, гипоксантином, фенилаланином, основаниями ДНК, РНК, триптофаном, дезоксирибозой. Ассоциация пиков: 1 - гипоксантин, 2 - фенилаланин, 3 - ДНК, РНК, 4 – Триптофан, 5- Дезоксирибоза.

Анализ спектрограммы пациента рецидивным раком мочевого пузыря выявил следующие особенности: появление в структуре спектрограмм пиков, характерных для гипоксантина (1328 см^{-1}), дезоксирибозы (1455 см^{-1}), пиков, характерных для триптофана (1558 см^{-1}), оснований ДНК (725 см^{-1}). При этом выявлены пики низкой интенсивности, ассоциированные с коллагеном, комплексом жирных кислот (Таблица 16).

Таблица 15 – Пики, полученные при рамановском исследовании первичной опухоли

Raman shift [1/cm]	intensity
725,67	0,22331
844,4	0,45069
940,28	0,85222
1020,5	0,80437

Продолжение таблицы 15	
Raman shift [1/cm]	intensity
1145,5	0,83627
1171,3	0,83131
1428,8	0,36728
1455,9	0,56143
1543,9	0,78143
1590	0,58103
1660,1	0,76206
2290,8	0,39584
2881,2	0,088792

Таблица 16 – Пики, полученные при рамановском исследовании ткани мочевого пузыря (послеоперационного рубца) на фоне лечения БЦЖ

Raman shift [1/cm]	intensity
725,0	0,92311
854,7	0,93069
940,28	0,85222
1040,5	0,80437
1125,5	0,83627
1161,8	0,83131
1328,01	0,96847
1349,4	0,99641
1455,9	0,97761
1540,3	0,93478
1594	0,87865
1660,1	0,83976
2287,8	0,81276
2881,2	0,16890

Таким образом, прогрессия и рецидив характеризуются выявлением пиков, характерных для гипоксантина (1328 см^{-1}), дезоксирибозы (1455 см^{-1}), триптофана (1558 см^{-1}), оснований ДНК (725 см^{-1}), низкой интенсивности пиков, характерных для коллагена, комплексов жирных кислот. Данные пики могут быть диагностическими маркерами рецидива и прогрессии (Таблица 17).

Таблица 17 – Оптические маркеры, характерные для рецидива немышечно-инвазивного рака

Рамановский пик	Значение
725 см^{-1}	С–Н аденина (ДНК)
1328 см^{-1}	Гипоксантин (РНК)
1455 см^{-1}	дезоксирибоза
1558 см^{-1}	триптофан

Рецидив и прогрессия в группе мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря

При раман-исследовании материала на фоне химиотерапии после оперативного вмешательства у группы пациентов с T2G3, T3G3, T4G3 отмечается снижение интенсивности пиков в диапазоне от $560\text{--}805\text{ см}^{-1}$, с 820 до 1230 см^{-1} , СН₂–СН₃–связи молекул коллагена, эластина, фенилаланина (1031 см^{-1}). Так же отмечается уменьшение интенсивности пиков в диапазоне 494 см^{-1} (L-аргинин), 589 см^{-1} (амид-VI), 639 см^{-1} (L-тирозин), 725 см^{-1} , 1328 см^{-1} и 1455 см^{-1} (Рисунок 36).

При дальнейшем наблюдении данной группы было установлено, что у пациентов с мышечно-инвазивным раком T2G3 (n=11) в течение года рецидива опухоли не выявлено. У пациентов с T3G3 прогрессия была установлена через шесть месяцев, в виде поражения парааортальных и паракавальных лимфатических узлов. Пациентам была показана иммунотерапия (Пембролизумаб по схеме). У группы с T4G3 прогрессия по КТ в виде поражения парааортальных лимфатических узлов была выявлена у 1 пациента –

проведена иммунотерапия, через шесть месяцев – смерть пациента по сопутствующей патологии, через двенадцать месяцев – прогрессия у 2 пациентов в виде метастатического поражения печени, легких, костей.

Клинический пример 3

Пациент 69 лет. Поступил в урологическое отделение с жалобами на кровь в моче, боли при мочеиспускании, беспокоящих около 1 мес. Обследован амбулаторно: УЗИ: в полости мочевого пузыря по задней стенке образование размерами 66x45 мм на широком основании, в режиме ЦДК с кровотоком. Выполнена ТУР биопсия мочевого пузыря в условиях стационара. При цистоскопии: устья без особенностей, по задней стенке определяется ворсинчатое образование размерами до 70 мм, так же по правой боковой стенке аналогичные образования размерами до 10 мм в количестве 3 штук. Выполнена ТУР–биопсия опухоли, установлен уретральный катетер (на трое суток), материал отправлен на гистологическое исследование и раман–спектроскопическое исследование (Рисунок 35, Таблица 18). По КТ: отдаленных метастазов не выявлено. Гистология: инвазивная уротелиальная карцинома G3.

Диагноз: Рак мочевого пузыря T2N0M0G3 ст 2 гр 3.

Пациент был направлен на неoadьювантную химиотерапию по схеме 4 курса Гемцитабин–Цисплатин с последующим оперативным лечением в объеме радикальной цистэктомии. Послеоперационный материал после ЦЭ был исследован на раман–спектрометре (Рисунок 36, Таблица 19), были получены следующие результаты.

Таблица 18 - Пики, полученные при рамановском исследовании первичной опухоли

Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity
549,71	0,48974	546,97	0,93236
647,23	0,28528	700,03	0,78562

Продолжение таблицы 18			
Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity
722,27	0,32846	858,64	0,89709
758,88	0,95311	940,43	0,84384
858,53	0,96073	1005,6	0,83125
940,14	0,88862	1048,4	0,7688
1005,5	0,94999	1092,9	0,78401
1048,3	0,70044	1134,2	0,78294
1127,7	0,99302	1259,6	0,87532
1265,4	0,93256	1344	0,99372
1338,2	0,81236	1391,8	0,95728
1457,9	0,82176	1441,3	0,97663
1652,9	0,76984	1553,3	0,69427
1800,3	0,72806	1658,2	0,80524
1948	0,57082	1842,6	0,56771
2274,3	0,99507	1961,8	0,44847
2633,1	0,65526	2077	0,4166
2672,4	0,61798	2443,4	0,18644
2721,4	0,57944	2627	0,1311
2883,6	0,67387	2916,7	0,10287
2932,7	0,20551	3114,3	0,065111
3065,9	0,066274	3169	0,066007
3220,2	0,073981	3278,2	0,076959

Таблица 19 – Пики, полученные при рамановском исследовании опухолевой ткани на фоне неoadьювантной химиотерапии+цистэктомия

Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity
527,81	0,43268	668,08	0,28542
672,93	0,25938	722,4	0,35481

Продолжение таблицы 19			
Raman shift [1/cm]	intensity	Raman shift [1/cm]	intensity
720,27	0,29235	760,29	0,42115
761,81	0,33753	857,11	0,68051
854,47	0,40918	944,59	0,57784
948,41	0,32547	1007,3	0,985
1007,1	0,44027	1100	0,49264
1096,4	0,30248	1259,9	0,60041
1239	0,36606	1340,8	0,51714
1526,8	0,97853	1450,7	0,59131
1831,9	0,38082	1658,4	0,90318
1996,8	0,28868	2038,1	0,2069
2084,5	0,25611	2197	0,13151
2263,4	0,22355	2265,2	0,16486
2468,3	0,16485	2348,8	0,13163
2586,2	0,14298	2394,6	0,095779
2621,2	0,1274	2522,8	0,092698
2796,3	0,063882	2581,8	0,08591
2912,3	0,090422	2628,4	0,07995
540,28	0,48958	2679,5	0,070889
2936,3	0,22066	2875	0,15771

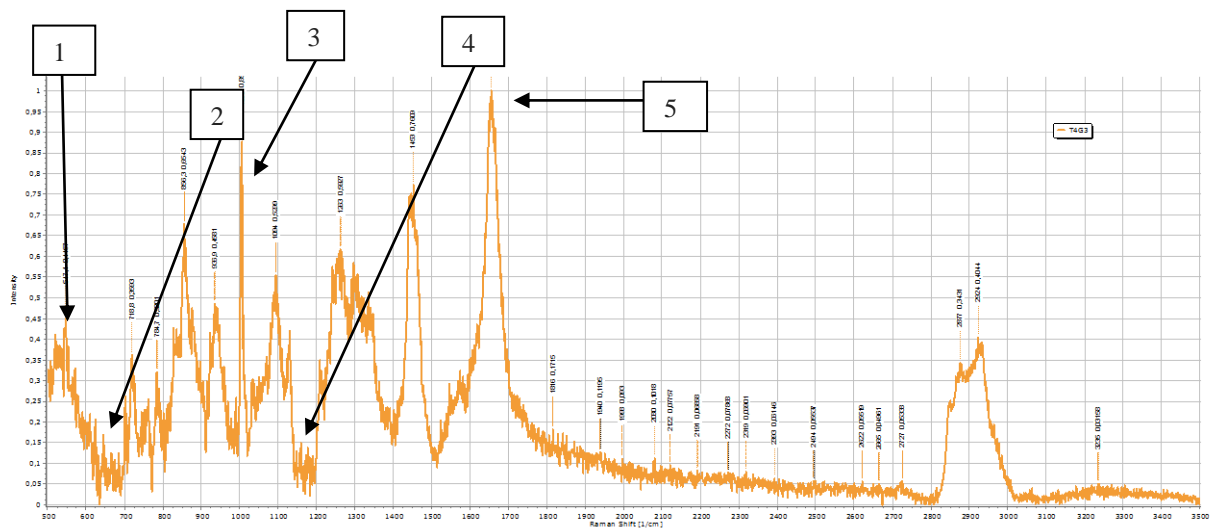


Рисунок 35 – Спектрограммы пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря. Пациент В., 72 года, Диагноз: Рак мочевого пузыря T4N0M0G3. Состояние после ТУР-биопсии мочевого пузыря. Высокие интенсивности пиков, характерных для фенилаланина, амид- VI , L-тирозина, снижение интенсивности пика, характерного для комплексов жирных кислот. Ассоциации пиков: 1 - амид- VI , 2- L-тирозин, 3 – фенилаланин, 4 - комплексы жирных кислот, 5- амид-I и α -спирали.

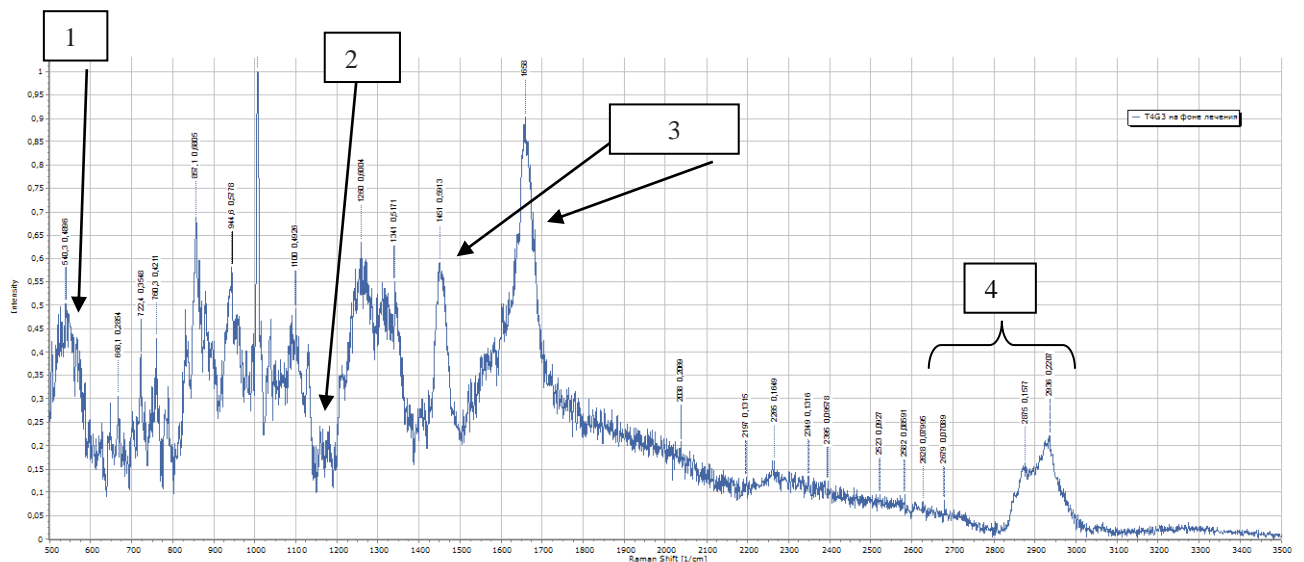


Рисунок 36 – Спектрограмма материала Пациента В., 72 года, Диагноз: Рак мочевого пузыря T4N0M0G3. Состояние после 4 курсов неoadъювантной химиотерапии, радикальной цистэктомии. Отмечается незначительное снижение пиков, характерных для гидроксильного радикала, триптофана. Ассоциации пиков: 1 - гидроксильный радикал, 2- комплексы жирных кислот, 3 - липиды, 4 - CH_2 связь.

Таким образом, неоадьювантная химиотерапия сопровождается значительным полиморфизмом опухоли, а так же влияет на полиморфизм молекулярных оптических спектров. При этом по результатам полученных спектрограмм интенсивность пиков в диапазоне от 540 см^{-1} до 2920 см^{-1} незначительно снизилась, отсутствуют пики от 3065 см^{-1} до 3280 см^{-1} , снизились интенсивности пиков, характерных для аргинина, тирозина, жирным кислотам, СН-группе аденина. Через двенадцать месяцев наблюдения у пациента не был установлен рецидив, не было отдаленных метастазов.

Данное исследование может быть интересно при сравнении группы пациентов, получающих лечение в объеме неоадьювантной химиотерапии с группой пациентов, получающих лечение пембролизумабом.

ГЛАВА 7 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения исследования нами был изучен материал, полученный у 150 больных раком мочевого, без отдаленных метастазов, находившихся на обследовании и лечении в урологическом отделении Клиники БГМУ и 23 образца условно нормальной ткани мочевого пузыря.

Для получения результатов нормальной ткани мочевого пузыря нами была сформирована группа пациентов, которые поступили в урологическое отделение с незначимыми изменениями слизистой мочевого пузыря при следующих клинических ситуациях: при реконструктивных оперативных вмешательствах при стенозе нижней трети мочеточника, при отошедшем камне почки. Эти больные были сформированы в группу для проведения спектроскопического исследования. Средний возраст больных составил 63 года. Мужчин в исследовании было 15, женщин – 8. Все пациенты дали информированное согласие на исследование. Всем пациентам была проведена диагностическая цистоскопия с забором материала, который в последующем был исследован с помощью раман-спектрометра.

Образцы тканей были получены в ходе операций: ТУР мочевого пузыря (первичного и повторного через 3 месяца, при выявлении во время цистоскопии second look рецидива на фоне лечения внутривезикулярной БЦЖ-терапии), ТУР-биопсии, радикальной цистпростатвезикулэктомии и тазовой эквисцерации после проведения 4 курсов химиотерапии по схеме Гемцитабин-Цисплатин. Совместно с морфологическим исследованием проводилось раман-исследование.

Был отобран образец ткани размерами 10 x 10 x 10 мм. Без дополнительной пробоподготовки материалы были доставлены в течение двух часов после завершения операции в лабораторию оптической спектроскопии.

От материала каждого пациента на раман–спектрометре было получено 20 спектрограмм, что составляет около 3500 раман–спектрограмм.

После гистологического подтверждения диагноза рак мочевого пузыря пациентам был проведен курс внутривезикулярной БЦЖ–терапии (еженедельно, в течение 6 недель) с поддерживающим курсом (ежемесячно на протяжении 1 года) [96], с последующим проведением раман–спектроскопии материала, через 3 месяца после первичного ТУР – повторный ТУР с забором материала с послеоперационного рубца+раман–исследование.

Положительные пики (оптические маркеры) образцов нормальной ткани выявлены в диапазонах, характерных для нуклеиновых кислот (1297–1284 см^{-1} , 1207–1193 см^{-1} и 1124–1111 см^{-1}), β -D–глюкопиранозы (989 см^{-1}), липидов (1456–1428 см^{-1} , 1065–1047 см^{-1} (C–C связь), 2884 – 3206 см^{-1} (CH₂ группа)), гидроксипролина (коллагена) – 875 см^{-1} , коллагена ((C–C–связь пролина) 729 см^{-1})), белков (1248–1213 см^{-1} , 775–502 см^{-1}), полисахаридов (840 см^{-1}), гликозидной связи (1104 см^{-1}).

Больные, поступившие в урологическое отделение, с диагнозом немышечно–инвазивный рак были включены в группу из 127 пациентов. Средний возраст больных составил 63 года. Всего в исследовании количество мужчин составило 120, женщин – 7. Срок наблюдения составил 12 месяцев. Все пациенты дали информированное согласие на исследование.

Всем пациентам была выполнена трансуретральная резекция мочевого пузыря. Из них у 7 пациентов было выявлено тотальное поражение мочевого пузыря – данные пациенты были переведены в группу пациентов с мышечно–инвазивным раком, и рассматриваются в соответствующей главе, так как тактика лечения была следующей: комбинированное лечение (неoadьювантная химиотерапия + цистэктомия (2) / тазовая экзистенциальная (5)) с последующим проведением раман–спектроскопии материала.

Первую основную группу составили 120 пациентов. В данной группе проведена ТУР мочевого пузыря (радикальное удаление опухоли) с последующим однократным внутривезикулярным введением Доксорубина 50 мг

в 50 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Согласно клиническим рекомендациям по лечению пациентов с диагнозом рак мочевого пузыря после гистологического подтверждения диагноза пациентам был проведен курс внутривезикулярной БЦЖ-терапии (еженедельно, в течение 6 недель) с поддерживающим курсом (ежемесячно на протяжении 1 года) [96], с последующим проведением раман-спектроскопии материала, через 3 месяца после первичного ТУР – повторный ТУР с забором материала с послеоперационного рубца+раман-исследование.

По результатам исследования раман-спектры образцов немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря имеют характерные особенности в виде набора пиков в диапазоне от 502 до 3460 см⁻¹.

Спектральный анализ немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря характеризуется наличием рамановских пиков, характерных для гидроксильного радикала (502 до 730 см⁻¹), 725 см⁻¹ (СН-группе аденина), триптофана, фенилаланина (1031 см⁻¹), связь С-NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина (850 см⁻¹, 1250 см⁻¹), β-D-глюкопиранозы (989 см⁻¹), α-спиральной конформации, С = С-связи липидов (1450 –1660 см⁻¹), снижение интенсивности пика коллагена (820 см⁻¹ (коллаген 1 типа)), пиков комплексов жирных кислот (1100 см⁻¹).

Выявлено, что спектры немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря совпадают со спектрами нормальной ткани мочевого пузыря по значениям пиков, характерных для коллагена (820 см⁻¹), для комплексов жирных кислот (1100 см⁻¹), но низкой интенсивностью.

Положительные пики немышечно-инвазивного рака степени дифференцировки G1 отмечаются в диапазоне спектров от 566 до 3460,5 см⁻¹: от 560 до 730 см⁻¹ – гидроксильный радикал, 755 – 860 см⁻¹ (белки, полисахариды, коллаген – соответствуют пикам нормальной ткани), с 805 до 1100 см⁻¹ – наличие нуклеиновых кислот, от 1230 до 2300 см⁻¹ – белки, 1100 см⁻¹ (комплекс жирных кислот), 850 см⁻¹ и 1250 см⁻¹ (связь С-NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450 –1660 см⁻¹ (α-спиральная конформация, С =

C–связь липидов), 989 см^{-1} (β -D–глюкопираноза), отмечается снижение интенсивности пиков, характерных для коллагена (820 см^{-1} (коллаген 1 типа)), комплексов жирных кислот.

Наиболее высокая интенсивность пиков в области гидроксильного радикала (560 – 730 см^{-1}), фенилаланина (1031 см^{-1}), 850 см^{-1} и 1250 см^{-1} (связь C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450 –1660 см^{-1} (α -спиральная конформация, C = C–связь липидов) отмечается у пациентов с немышечно–инвазивным раком мочевого пузыря G2. Следовательно, переход прогрессии от G1 к G2 характеризуется следующими характеристиками: высокая интенсивность пиков, характерных для фенилаланина, гидроксильного радикала, связи C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина, α -спиральная конформация, C = C–связь липидов.

Положительные пики, характерные для немышечно–инвазивного рака, степени дифференцировки G2 отмечаются в диапазоне спектров от 530 до 3200 см^{-1} : от 560 до 730 см^{-1} – гидроксильный радикал; 755 – 860 см^{-1} (белки, полисахариды, коллаген), 1008 – 1245 см^{-1} (гликозидная связь), с 805 до 1100 см^{-1} – наличие нуклеиновых кислот (фенилаланин, триптофан), от 1230 до 2300 см^{-1} – белки, 1100 см^{-1} (комплекс жирных кислот), 850 см^{-1} и 1250 см^{-1} (связь C–NH₂), 1450 –1660 см^{-1} (α -спиральная конформация, C = C–связь липидов), 989 см^{-1} (β -D–глюкопираноза), отмечается снижение интенсивности пика коллагена (820 см^{-1} (коллаген 1 типа)), пика комплексов жирных кислот. Отрицательные пики были выявлены в диапазоне от 530–560 см^{-1} , 2186 до 2210 см^{-1} , что характерно для липидов.

Исследования спектров пациентов с немышечно–инвазивным раком G3 показали более высокие интенсивности пиков по сравнению с T1G2 в диапазонах, характерных для амид–I и α -спирали, триптофана, низкие интенсивности пиков, характерных для комплекса жирных кислот. Положительные пики, характерные для немышечно–инвазивного рака, степени дифференцировки G3 отмечаются в диапазоне спектров от 502,87 до 3460 см^{-1} . Ассоциация пиков: от 560 до 730 см^{-1} – гидроксильный радикал; 755 – 860 см^{-1}

(белки, полисахариды, коллаген), $1008 - 1245 \text{ см}^{-1}$ (гликозидная связь) – соответствуют пикам нормальной ткани мочевого пузыря; с 805 до 1100 см^{-1} – наличие нуклеиновых кислот (фенилаланин, триптофан), от 1230 до 2300 см^{-1} – белки, 1100 см^{-1} (комплекс жирных кислот), 850 см^{-1} и 1250 см^{-1} (связь C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), $1450 - 1660 \text{ см}^{-1}$ (α -спиральная конформация, C = C–связь липидов), 989 см^{-1} (β -D–глюкопираноза), амид–VI (589 см^{-1}), L–тирозин (639 см^{-1}), амид–I и α -спираль (1654 см^{-1}), отмечается снижение интенсивности пика, характерного для коллагена (820 см^{-1} (коллаген 1 типа)), пика комплексов жирных кислот.

Анализ рамановских пиков немышечно-инвазивного рака показал, что интенсивность пиков рамановских спектров низкодифференцированного рака мочевого пузыря имеют высокую интенсивность пиков. Отмечается увеличение интенсивности пиков от G1 к G3.

Больные, поступившие в урологическое отделение с диагнозом мышечно–инвазивный рак, сформировали группу из 23 пациентов. Средний возраст больных составил 63 года. Срок наблюдения составил 12 месяцев.

В данной группе пациентам первоначально была проведена ТУР–биопсия опухоли мочевого пузыря с проведением раман–спектроскопии послеоперационного материала. Далее пациентам было проведено комбинированное лечение: неoadъювантная химиотерапия (4 курса) по схеме Гемцитабин–Цисплатин (гемцитабин – 1000 мг/м^2 в/в в первый, восьмой и пятнадцатый день, цисплатин – 70 мг/м^2 в/в в первый (второй) день; цикл каждые 4 нед). После завершения 4 курсов химиотерапии пациентам было выполнено оперативное лечение: тазовая эквисцерация (n=8) и цистэктомия (n=15) с последующим проведением раман–спектроскопии удаленного материала.

По результатам исследования раман–спектры образцов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря имеют характерные особенности в виде набора пиков в диапазоне от 503 до 3476 см^{-1} .

Результаты спектроскопического исследования мышечно-инвазивного и немышечно-инвазивного рака характеризуются так же наличием пиков, полученных при исследовании нормальной ткани.

Спектральный анализ мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря характеризуется наличием рамановских пиков, характерных для гидроксильного радикала (503 до 830 см^{-1}), 725 см^{-1} (СН-группа аденина), нуклеиновых кислот (815 до 1480 см^{-1}), фенилаланина (1031 см^{-1}), белков (1230 до 2370 см^{-1}), α -спиральной конформации, С = С-связи липидов (1450 –1660 см^{-1}), L-аргинин (494 см^{-1}), амид-VI (589 см^{-1}), L-тирозин (639 см^{-1}), амид-I и α -спираль (1654 см^{-1}). Выявлены сниженные интенсивности пиков, характерных для коллагена (933 см^{-1} , 1035 см^{-1} , 1401 см^{-1} , 1488 см^{-1}), β -D-глюкопиранозы (989 см^{-1}), гликогена (484–490 см^{-1}), СН₂-СН₃-связи молекул коллагена, эластина и фосфолипидов, снижение (в некоторых спектрах исчезновение пиков), характерных для жирных кислот (1100 – 1443 см^{-1}).

Мышечно-инвазивный рак Т3G3 характеризуется наличием высоких интенсивностей пиков в диапазоне от 503 до 830 см^{-1} – гидроксильный радикал, 815 до 1480 см^{-1} – наличие нуклеиновых кислот, от 1230 до 2370 см^{-1} – белки, 850 см^{-1} и 1750 см^{-1} (связь С-NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450 –1660 см^{-1} (связь амидов I: С = О белков, α -спиральная конформация, С = С-связь липидов). Отрицательные пики выявлены в диапазоне 3050 – 3500 см^{-1} , 2200 – 2800 см^{-1} . Спектрограммы представлены низкими пиками, характерными для коллагена, СН₂-СН₃-связи молекул коллагена, эластина и фосфолипидов, гликогена (484–490 см^{-1}), снижение (в некоторых спектрах исчезновение пиков), характерных для жирных кислот (1100 – 1443 см^{-1}).

В данной группе появились рамановские пики с высокой интенсивностью, характерные для L-аргинина (494 см^{-1}), амид-VI (589 см^{-1}), L-тирозина (639 см^{-1}), амид-I и α -спирали (1654 см^{-1}).

Рамановские пики мышечно-инвазивного рака Т4G3 характеризуются наличием высоких интенсивностей пиков в диапазоне от 503 до 830 см^{-1} – гидроксильный радикал, 815 до 1480 см^{-1} – нуклеиновые кислоты, 840–850 см^{-1} –

¹– лактат, от 1230 до 2370 см⁻¹ – белки, 850 см⁻¹ и 1750 см⁻¹ (связь C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450–1660 см⁻¹ (связь амидов I: C = O белков, α–спиральная конформация, C = C–связь липидов). Так же отмечается преобладанием пиков низкой интенсивности, ассоциированных с молекулами коллагена (1035 см⁻¹), гликогена (484–490 см⁻¹), пики, характерные для L–аргинин (494 см⁻¹), амид–VI (589 см⁻¹), L–тирозин (639 см⁻¹), амид–I и α–спираль (1654 см⁻¹) проявляют более интенсивные сигналы комбинационного рассеяния в данной группе, чем в группе немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря.

Ассоциации пиков мышечно–инвазивного рака мочевого пузыря представлены пиками большей интенсивности в диапазонах от 503 до 830 см⁻¹ – гидроксильного радикала, 815 до 1480 см⁻¹ – нуклеиновые кислоты, 840–850 см⁻¹– лактат, от 1230 до 2370 см⁻¹ – белки, 850 см⁻¹ и 1750 см⁻¹ (связь C–NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина), 1450–1660 см⁻¹ (связь амидов I: C = O белков, α–спиральная конформация, C = C–связь липидов). Так же отмечается преобладанием пиков низкой интенсивности, характерных для молекул коллагена (1035 см⁻¹), гликогена (484–490 см⁻¹), пики, ассоциированные с L–аргинином (494 см⁻¹), амид–VI (589 см⁻¹), L–тирозином (639 см⁻¹), амид–I и α–спираль (1654 см⁻¹) проявляют более интенсивные сигналы комбинационного рассеяния в данной группе, чем в группе немышечно–инвазивного рака.

Рамановские пики L–аргинин (494 см⁻¹), амид–VI (589 см⁻¹), L–тирозин (639 см⁻¹), амид–I и α–спираль (1654 см⁻¹) проявляют более интенсивные сигналы комбинационного рассеяния в группе мышечно–инвазивного рака, чем в группе немышечно–инвазивного рака.

Результаты спектроскопического исследования убедительно свидетельствуют, что концентрация холестерина и его эфиров (986 – 1441 см⁻¹), 989 см⁻¹ (β–D–глюкопираноза) в опухолевых клетках немышечно–инвазивного рака выше, чем у больных мышечно–инвазивного рака.

В процессе динамического наблюдения на фоне проводимого лечения были выявлены пациенты с рецидивом опухоли рака мочевого пузыря. Данные пациенты сформировали отдельную исследовательскую группу.

В динамике на фоне внутривезикулярной химиотерапии через три месяца был выявлен местно–распространенный рецидив, поражение регионарных лимфатических лимфоузлов у 5 пациентов, через шесть месяцев – 7 пациентов, через двенадцать месяцев наблюдения – у 6 пациентов. Всего 18 пациентов за период наблюдения, что составляет 15%.

Отмечено, что у 5 пациентов (рецидив через три месяца) после первичного оперативного лечения гистология соответствовала T1G1, при этом раман–спектры соответствовали T2G3. Исследованные спектры рецидива опухоли показали гистологическое заключение и раман–спектроскопическое исследование, соответствующие T2G3. Выявлена высокая интенсивность пиков комбинационного рассеяния 725 см^{-1} , 1328 см^{-1} и 1455 см^{-1} , ассоциированных с основаниями нуклеиновых кислот, гипоксантином, основаниями ДНК/РНК и дезоксирибозой, триптофаном.

Через шесть месяцев рецидив и прогрессия были установлены у 7 пациентов, при этом у 2 пациентов после первичного оперативного лечения гистологический тип опухоли соответствовал T1G1, раман–спектры соответствовали T2G1, у 5 пациентов первичный гистологический тип опухоли T1G1, раман–спектры – T2G2. Выявлена высокая интенсивность пиков комбинационного рассеяния 568 см^{-1} , 725 см^{-1} , 1031 см^{-1} , 1328 см^{-1} , 1330 см^{-1} и 1455 см^{-1} , ассоциированных с основаниями нуклеиновых кислот, фенилаланином, триптофаном, гипоксантином, основаниями ДНК/РНК и дезоксирибозой.

Через двенадцать месяцев рецидив и прогрессия были выявлены у 6 пациентов, при этом у 3 пациентов после первичного оперативного лечения гистологический тип опухоли соответствовал T1G1, раман–спектры соответствовали T2G1, у 3 пациентов гистологический тип опухоли после первичного оперативного лечения T1G1, раман–спектры – T2G3. Пациентам в

последующем была выполнена неoadьювантная химиотерапия (4 курса GemCis), радикальная цистэктомия.

Анализ спектрограммы пациента рецидивным раком мочевого пузыря выявил следующие особенности: появление в структуре спектрограмм пиков, характерных для гипоксантина (1328 см^{-1}), дезоксирибозы (1455 см^{-1}), пиков, характерных для триптофана (1558 см^{-1}), оснований ДНК (725 см^{-1}). При этом выявлены пики низкой интенсивности, ассоциированные с коллагеном, комплексом жирных кислот.

Таким образом, прогрессия и рецидив характеризуются выявлением пиков, характерных для гипоксантина (1328 см^{-1}), дезоксирибозы (1455 см^{-1}), триптофана (1558 см^{-1}), оснований ДНК (725 см^{-1}), низкой интенсивности пиков, характерных для коллагена, комплексов жирных кислот. Данные пики могут быть диагностическими маркерами рецидива и прогрессии.

По результатам исследования было выявлено, что уровни опухолевой ДНК в значительной степени связаны с рецидивом заболевания у пациентов. Повышенный уровень нуклеиновых кислот можно объяснить более агрессивной природой опухолевых клеток и аномально ускоренной пролиферацией и некрозом клеток. Комбинационное смещение 1558 см^{-1} биохимически соответствует триптофану, метаболиты которого могут играть роль в канцерогенезе мочевого пузыря человека, а также быть предиктором рецидива и прогрессии [29, 108]. L-аргинин (494 см^{-1}), амид-VI (589 см^{-1}), L-тирозин (639 см^{-1}), амид-I и α -спираль (1654 см^{-1}) проявляют более интенсивные сигналы комбинационного рассеяния в группе мышечно-инвазивного рака. Эти данные свидетельствуют о том, что при развитии злокачественного новообразования наблюдается увеличение количества свободных аминокислот, что согласуется с результатами предыдущих исследований [111]. Причина может заключаться в том, что аномально активный рост и пролиферация опухолевых клеток требуют большого количества питательных веществ и энергии, что приводит к нарушению

метаболизма аминокислот, поэтому увеличение количества аминокислот, вероятно, является комплексным эффектом катаболизма белков [67].

Кроме того, очевидно, что пик при 725 см^{-1} значительно увеличился как в группах немышечно–инвазивного рака, так и в группах мышечно–инвазивного рака по сравнению со здоровой группой. Этот пик комбинационного рассеяния соответствует моде изгибных колебаний СН-группы аденина, что указывает на аномальный метаболизм оснований ДНК и РНК у больных РМП [32].

Пик комбинационного рассеяния при $1100 - 1443 \text{ см}^{-1}$, соответствующий насыщенным жирным кислотам, уменьшается или даже исчезает в группе мышечно–инвазивного рака, так как быстрая пролиферация опухолевых клеток потребляет большое количество жирных кислот для удовлетворения потребности в синтезе клеточных мембран и выработке энергии [92]. Таким образом, истощение сывороточных жирных кислот предполагает, что липиды играют важную роль в патогенезе опухоли.

В работе Н.С. Александрова (2019) было проведено исследование светлоклеточного рака почки, по результатам которого были выявлены рамановские пики, характерные для опухоли в диапазоне от 1000 до 2980 см^{-1} : пик 1003 см^{-1} соответствовал рассеянию молекул фенилаланина, 1157 см^{-1} – метионина, 1517 см^{-1} и 2965 см^{-1} различным модификациям бетакаротина, 2977 см^{-1} молекулам холестерина. Спектр папиллярного рака имел специфические рамановские пики, обусловленных молекулами гидроксильного радикала (582 см^{-1}), комплекса жирных кислот (1100 см^{-1}) и идентифицировал углеводородную связь липидов и белков на частоте рамановского сдвига 2873 см^{-1} [109].

В работе С.Т. Авраамовой (2021 г.) были выявлены рамановские спектры паренхиматозной составляющей ацинарной аденокарциномы простаты: пиков в диапазоне $300-1900 \text{ см}^{-1}$: 762 см^{-1} (ДНК), 820 см^{-1} (коллаген 1 типа), 840 см^{-1} (полисахариды), 989 см^{-1} (β -глюкоза), 1032 см^{-1} (фенилаланин), 1104 см^{-1} (гликозидная связь), 1131 см^{-1} (пальмитиновая кислота), 1176 см^{-1} (гуанин,

цитозин), 1240 см⁻¹ (РНК), 1298 см⁻¹ (жирные кислоты), 1323 см⁻¹ (гуанин), 1400 см⁻¹ (глутаминовая кислота), 1441 см⁻¹ (холестерин и его эфиры), 1482 см⁻¹ (амид II), 1546 см⁻¹ (свободный и связанный НАДН), 1480, 1600, 1629, 1650 см⁻¹ (амид I). Рамановский спектр стромального компонента опухоли, согласно исследованиям, отличался от паренхиматозного преобладанием пиков коллагена (933 см⁻¹, 1035 см⁻¹, 1401 см⁻¹, 1488 см⁻¹), гликогена (484-490 см⁻¹), СН₂-СН₃-связи молекул коллагена, эластина и фосфолипидов [1].

В работе S. Chen и соавт. [67], посвященной рамановской спектроскопии мышечно-инвазивного и немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря, были выявлены более интенсивные пики L-аргинин (494 см⁻¹), амид-VI (589 см⁻¹), L-тирозин (639 см⁻¹), амид-I и α-спираль (1654 см⁻¹) мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря.

При раман-исследовании материала на фоне химиотерапии после оперативного вмешательства у группы пациентов с T2G3, T3G3, T4G3 отмечается снижение интенсивности пиков в диапазоне от 560–805 см⁻¹, с 820 до 1230 см⁻¹, СН₂-СН₃-связи молекул коллагена, эластина, фенилаланина (1031 см⁻¹). Так же отмечается уменьшение интенсивности пиков в диапазоне 494 см⁻¹ (L-аргинин), 589 см⁻¹ (амид-VI), 639 см⁻¹ (L-тирозин), 725 см⁻¹, 1328 см⁻¹ и 1455 см⁻¹.

При дальнейшем наблюдении данной группы было установлено, что у пациентов с мышечно-инвазивным раком T2G3 (n=11) в течение года рецидива опухоли не выявлено. У пациентов с T3G3 прогрессия была установлена через шесть месяцев, в виде поражения парааортальных и паракавальных лимфатических узлов. Пациентам была показана иммунотерапия (Пембролизумаб по схеме). У группы с T4G3 прогрессия по КТ в виде поражения парааортальных лимфатических узлов была выявлена у 1 пациента – проведена иммунотерапия, через шесть месяцев – смерть пациента по сопутствующей патологии, через двенадцать месяцев – прогрессия у 2 пациентов в виде метастатического поражения печени, легких, костей.

Таким образом, неоадьювантная химиотерапия сопровождается значительным полиморфизмом опухоли, а так же влияет на полиморфизм молекулярных оптических спектров. При этом по результатам полученных спектрограмм интенсивность пиков в диапазоне от 540 см^{-1} до 2920 см^{-1} незначительно снизилась, отсутствуют пики от 3065 см^{-1} до 3280 см^{-1} , снизились интенсивности пиков, характерных для аргинина, тирозина, жирным кислотам, СН-группе аденина. Через двенадцать месяцев наблюдения у пациента не был установлен рецидив, не было отдаленных метастазов.

Данное исследование может быть интересно при сравнении группы пациентов, получающих лечение в объеме неоадьювантной химиотерапии с группой пациентов, получающих лечение пембролизумабом.

В данной работе метод раман-спектроскопии был рассмотрен как метод оценки лечения, критерий ответа опухоли на проводимое лечение. Были выявлены закономерности снижения интенсивности пиков на фоне лечения БЦЖ-терапии и неоадьювантной химиотерапии.

Есть несколько ключевых моментов в определении соответствующих функциональных групп каждого пика. Эти моменты играют большую роль в процессе характеристического пикового анализа, и они имеют исключительное значение в процессе четкого понимания спектральных методов, используемых в исследовательской работе. Возрастает потребность в определении ключевых спектральных пиков и их правильном назначении на химические структуры. Поэтому крайне важно иметь надежную спектральную базу данных, которая широко доступна для исследователей, работающих с вибрационно-спектроскопическими методами.

Методы обработки PCA-LDA является самым популярным (45%), который сопровождается PCA-ANN (33%) и SVM (22%). В таблице 16 показана эффективность обнаружения, достигаемая с помощью различных методов обработки сигналов. Можно заметить, что PCA-SVM дает наивысшую точность (99,9%), за которой следуют PCA-ANN (98%) и LRA (97%) (Таблица

20). С другой стороны, производительность PCA–LDA и PCA–SVM является оптимальным как по чувствительности, так и по специфичности.

Таблица 20 – Методы обработки сигналов для анализа спектров комбинационного рассеяния при обнаружении болезни

Заболевание	Материал	Субстрат	Метод			
				Точность	Чувствительность	Специфичность
Назофарингеальный рак (Feng S.Y., 2010)	Плазма крови	Ag наночастицы	PCA–LDA	–	90.7	100
Рак желудка (Feng S.Y., 2011)	Плазма крови	Ag наночастицы	PCA–LDA	–	79.5	91
Колоректальный рак (Lin D., 2011)	Плазма крови	Ag наночастицы	PCA–LDA	–	97.4	100
Рак легких (Li X., 2012)	Слюна	Ag наночастицы	PCA–LDA	80	78	83
Рак шейки матки (Duraipandian S., 2013)	Клетки	In vivo, оптоволоконный эндоскоп	PCA–LDA	84.1	81	87.1
Рак груди (Richardo–Molina J.L., 2007)	Плазма крови	Алюминий	PCA–LDA	–	97	78
Рак простаты (Wang L., 2013)	Ткань и клетки	Стекло	PCA–SVM	–	85.7	88.9
Карцинома печени (Yang T., 2011)	Плазма крови	Образец в пробирке	PCA–ANN	80	89	95

Спектроскопически образцы были изучены на раман–спектрометре с длиной волны лазерной установки 785 нм, так как данный параметр позволяет повысить глубину проникновения лазера (10 мм), что дает более качественную и полную информацию о материале.

Благодаря интеллектуальным методам обработки машинного обучения e-learning появляется возможность обработать за короткое время в режиме онлайн большой объем получаемой информации при рамановском исследовании.

Изменения рамановских пиков свидетельствуют о наличии инвазии опухоли (по T классификации TNM), определяют степень дифференцировки по градации G, позволяют выявить рецидив опухоли, оценить эффективность лечения и прогноз, тем самым могут считаться оптическими маркерами (Таблица 21).

Таблица 21 – Оптические маркеры нормальной ткани мочевого пузыря, немышечно-инвазивного рака, мышечно-инвазивного рака

Рамановский пик	Значение	Нормальная ткань	Немышечно-инвазивный рак	Мышечно-инвазивный рак
1297–1284 см ⁻¹	Нуклеиновые кислоты	+++	++	+
1207–1193 см ⁻¹	Нуклеиновые кислоты	+++	++	+
1124–1111 см ⁻¹	Нуклеиновые кислоты	+++	++	+
1456–1428 см ⁻¹	Липиды	+++	++	+
1060–1047 см ⁻¹	Липиды	+++	++	+
2884 – 3206 см ⁻¹	C–H колебаний липидов	+++	++	+
1248–1213 см ⁻¹	Белки	+++	++	+
775–502 см ⁻¹	Белки	+++	++	+
875 см ⁻¹ , 729 см ⁻¹ 1	Гидроксипролин (коллаген)	+++	++	+
840 см ⁻¹	полисахариды	+++	++	+

Продолжение таблицы 21				
Рамановский пик	Значение	Нормальная ткань	Немышечно-инвазивный рак	Мышечно-инвазивный рак
989 см ⁻¹	β-D- глюкопираноза	+++	++	+
1104 см ⁻¹	гликозидная связь	+	++	+
502 до 730 см ⁻¹	гидроксильный радикал	–	++	+++
1031 см ⁻¹	фенилаланин	–	++	+++
1558 см ⁻¹	триптофан	–	++	+++
725 см ⁻¹	CН-группа аденина	–	++	+++
850 см ⁻¹ и 1250 см ⁻¹	связи C–NH ₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина	–	++	+++
1450–1660 см ⁻¹	C = C–связи липидов	–	++	+++
1450–1660 см ⁻¹	связи амидов I: C = O белков, α- спиральной конформации	–	++	+++
815 до 1480 см ⁻¹	нуклеиновые кислоты	–	–	+
820 см ⁻¹	Коллаген	+++	++	+
494 см ⁻¹	L-аргинин	–	–	+

Продолжение таблицы 21				
Рамановский пик	Значение	Нормальная ткань	Немышечно-инвазивный рак	Мышечно-инвазивный рак
589 см ⁻¹	амид-VI	-	-	+
639 см ⁻¹	L-тирозин	-	-	+
1654 см ⁻¹	амид-I и α-спираль	-	-	+

ВЫВОДЫ

1) Разработаны условия морфоспектроскопического исследования нормальной ткани мочевого пузыря с определением основных раман-спектроскопических характеристик с последующим анализом полученных спектров при помощи интеллектуальных методов обработки данных. При исследовании нормальной ткани мочевого пузыря детектируются пики, характерные для нуклеиновых кислот, β -D-глюкопиранозы, липидов, коллагена, белков.

2) Морфоспектроскопический профиль немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря характеризуется наличием рамановских пиков, ассоциированных с гидроксильным радикалом (502 до 730 см^{-1}), 725 см^{-1} (СН-группой аденина), фенилаланином (1031 см^{-1}), связью С-NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина (850 см^{-1} , 1250 см^{-1}), β -D-глюкопиранозой (989 см^{-1}), α -спиральной конформации, С = С-связи липидов (1450 –1660 см^{-1}).

3) Морфоспектроскопический профиль мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря ассоциируется пиками гидроксильного радикала (502 до 730 см^{-1}), СН-группы аденина (725 см^{-1}), фенилаланина (1031 см^{-1}), L-аргинина (494 см^{-1}), амид-VI (589 см^{-1}), L-тирозина (639 см^{-1}), амид-I и α -спирали (1654 см^{-1}).

4) Определены особенности морфоспектроскопического профиля ткани мочевого пузыря у пациентов с немышечно-инвазивным раком на фоне внутрипузырной БЦЖ-терапии, а так же при рецидиве и прогрессии заболевания. Пики в области гипоксантина, оснований ДНК/РНК, дезоксирибозы, триптофана ассоциированы с рецидивом и прогрессией опухоли.

5) В мониторинге пациентов с немышечно-инвазивным и мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря раман-спектрокопия является перспективным методом раннего выявления рецидива и прогрессии заболевания. Метод позволил ранее диагностировать рецидив рака ориентировочно на 18%, прогрессию заболевания ориентировочно на 12%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Данные, полученные с помощью метода раман-спектроскопии, обладают дополнительной диагностической значимостью и могут быть использованы для выбора дальнейшей тактики лечения.

Данные раман-спектроскопического исследования обладают достаточной диагностической значимостью и могут быть использованы для уточнения прогрессии и рецидива, определения особенностей патологического процесса и выбора метода лечения.

Метод может применяться в режиме реального времени. Полученные маркеры могут быть использованы для составления морфоспектроскопического профиля тканей мочевого пузыря при различных заболеваниях и патологических состояниях, а так же для оценки эффективности лечения пациентов на фоне неoadьювантной терапии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЦЖ – бацилла Кальметта–Герена

в/в – внутривенно

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМП – инфекция мочевых путей

ИФА – иммуноферментный анализ

КТ – компьютерная томография

МП – мочевой пузырь

МИ РМП – мышечно–инвазивный рак мочевого пузыря

МРТ – магнитно–резонансная томография

НМИ РМП – немышечно–инвазивный рак мочевого пузыря

ПКР – почечно–клеточный рак

РМП – рак мочевого пузыря

РМП – рак мочевого пузыря

ТУР – трансуретральная резекция мочевого пузыря

ТЭ – тазовая эквисцерация

УЗИ – ультразвуковое исследование

ХТ – химиотерапия

ЦЭ – цистэктомия

RECIST – response evaluation criteria in solid tumours (критерии ответа солидных опухолей на терапию)

EORTC – European Organisation for the Research and Treatment of Cancer

CIS – карцинома in situ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авраамова, С.Т. Дооперационная и интраоперационная диагностика рака предстательной железы с использованием раман–люминесцентной спектроскопии: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.02 / Авраамова София Тариэловна. – М., 2021. – 23 с.
2. Адеишвили, Г.З. Оценка диагностической и прогностической значимости цитокератинов у больных раком мочевого пузыря: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.12 / Адеишвили Георге Зурабович. – СПб., 2017. – 20 с.
3. Александров, Н.С. Сравнительная иммуноморфологическая и спектроскопическая характеристика опухолей почек: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.02 / Александров Николай Сергеевич. – М., 2019. – 24 с.
4. Болотина, Л.В. Инвазивный рак мочевого пузыря: современные подходы к лечению / Л.В. Болотина, И.Г. Русаков // Российский онкологический журнал. – 2007. – № 6. – С. 47–51.
5. Большакова, Л. В. Применение кластерного и дискриминантного анализов в процессе обработки и интерпретации статистических данных при обеспечении экономической и информационной безопасности хозяйствующего субъекта / Л.В. Большакова, А.И. Примакин, Н.А. Яковлева // Вестник Санкт–Петербургского университета МВД России. – 2014. – № 2 (62). – С. 148–156.
6. Введение в рамановскую спектроскопию / Компания INTERTECH Corporation // Пластические массы. – 2009. – № 8. – С. 7–13.
7. Возможности лучевых методов исследования в диагностике рака мочевого пузыря / П.В. Глыбочко, В.В. Зуев, В.М. Попков [и др.] // Саратовский научно–медицинский журнал. – 2011. – Т. 7, № 1. – С. 148–151.
8. Возможности применения рамановской спектроскопии в онкоурологии / С.Т. Авраамова, Н.С. Александров, Т.О. Бабичева [и др.] // Пространство и Время. — 2017. — № 1 (27). — С. 247—250.
9. Возможности применения раман–флуоресцентной спектроскопии в оториноларингологии / В.М. Свистушкин, М.Т. Александров, Д.М. Пшонкина

[и др.] // РМЖ. – 2015. – № 6. – С. 317.

10. Громов, А.И. Лучевая диагностика и терапия в урологии: национальное руководство / А.И. Громов, В.М. Буйлов. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2011. – 544 с.

11. Значение маркеров опухолевого роста и ангиогенеза в диагностике рака мочевого / П.В. Глыбочко, А.Н. Понукалин, Н.К. Шахпазян, Н.Б. Захарова // Онкология. – 2009. – № 2. – С. 56–60.

12. Ишкинин, Р.Э. Применение рамановской спектроскопии в медицине / Р.Э. Ишкинин, Л.А. Фазлыяхметова, И.Г. Насртдинов // Актуальные проблемы и достижения в медицине. – 2016. – № 27. – С. 129–132.

13. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020. – 252 с.

14. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком мочевого пузыря / М.И. Волкова, В.Б. Матвеев, С.В. Медведев [и др.]. – М., 2014. – 32 с.

15. Коваленко, А.А. Спектроскопия комбинационного рассеяния: методическая разработка / А.А. Коваленко, А.А. Елисеев. – М.: Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, 2011. – 37 с.

16. Маркеры рака мочевого пузыря: их роль и прогностическая значимость (обзор литературы) / Л.И. Белякова, А.Н. Шевченко, А.Б. Сагакянц, Е.В. Филатова // Онкоурология. – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 145–156.

17. Оперативная прижизненная оценка состояния соединительной ткани мочевого пузыря в возможности прогнозирования тяжести лучевого поражения / О.С. Стрельцова, А.А. Моисеев, Е.Б. Киселева [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2018. – № 4. – С. 40-45.

18. Основные характеристики и особенности молекулярно–генетических тест–систем, предназначенных для неинвазивной диагностики и оценки прогноза рака предстательной железы и рака мочевого пузыря / Д.С.

Михайленко, С.А. Сергиенко, Б.Я. Алексеев [и др.] // Онкоурология. – 2019. – № 4. – С. 18–29.

19. Отдаленные результаты комбинированного лечения пациента, страдающего первично множественным местнораспространенным раком почки, уротелиальным раком мочевого пузыря и контралатеральной почки / О.Б. Лоран, А.Г. Мартов, А.Д. Морозов [и др.] // Урология. – 2020. – № 4. – С. 95-99.

20. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака мочевого пузыря / О.А. Гладков, Р.А. Зуков, В.Б. Матвеев [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2021. – № 11 (3s2–1). – С. 523–539.

21. Рак мочевого пузыря. Клинические рекомендации: одобрено на заседании научно–практического совета Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол от 20.12.2019г. №10/2–3–4). – М., 2020. – 25 с.

22. Рак мочевого пузыря. Клинические рекомендации: одобрено на заседании научно–практического совета Министерства здравоохранения Российской Федерации. – М., 2022. – 119 с.

23. Рак мочевого пузыря: возможности лучевых методов диагностики (обзор литературы) / Е.Г. Григорьев, И.Г. Фролова, Е.А. Усынин [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 3. – С. 75–81.

24. Роль молекулярно–генетических изменений в прогнозе эффективности адьювантной внутрипузырной терапии немышечно–инвазивного рака мочевого пузыря / Д.С. Михайленко, С.А. Сергиенко, И.Н. Заборский [и др.] // Онкоурология. – 2018. – Т. 14, № 4. – С. 124–138.

25. Роль структурных изменений внеклеточного матрикса мочевого пузыря в возникновении побочных эффектов лучевой терапии разной степени тяжести / О.С. Стрельцова, В.В. Дуденкова, А.В. Масленникова [и др.] // Урология. – 2018. – № 2. – С. 14-19.

26. Сравнительное исследование ряда коммерческих маркеров рака мочевого пузыря в реальной клинической практике / О.И. Аполихин, А.В. Сивков, Д.А. Роцин [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. –

2015. – № 1. – С. 48–53.

27. Тучин, В.В. Оптическая Биомедицинская диагностика / В.В. Тучин // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2005. – Т. 5, № 1. – С. 39–53.

28. Урология. Российские клинические рекомендации / под ред. Ю.Г. Аляева, П.В. Глыбочко, Д.Ю. Пушкаря. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2017. – 544 с.

29. A new method for determination of urinary tryptophan metabolites in bladder carcinoma / N.A. Romas, L. Ionascu, S. Sholem [et al.] // J. Urol. – 1975. – Vol. 114, № 2. – P. 223–225.

30. Adjuvant nivolumab versus placebo in muscle–invasive urothelial carcinoma / D.F. Bajorin, J.A. Witjes, J.E. Gschwend [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2021. – Vol. 384, № 22. – P. 2102–2114.

31. Analysis of human colon by Raman spectroscopy and imaging–elucidation of biochemical changes in carcinogenesis / B. Brozek–Pluska, J. Musial, R. Kordek, H. Abramczyk // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20, № 14. – P. 3398.

32. Argilés, J.M. The metabolic environment of cancer / J.M. Argilés, J. Azcón–Bieto // Mol. Cell. Biochem. – 1988. – Vol. 81, № 1. – P. 3–17.

33. Babjuk, M. EAU Guidelines on non–muscleinvasive urothelial carcinoma of the bladder: Update 2016 / M. Babjuk, A. Böhle, M. Burger // Eur. Urol. – 2017. – Vol. 71, № 3. – P. 447–461.

34. Bassi, P.–F. Invasive bladder cancer / P.–F. Bassi, F. Pagano. – Springer–Verlag London Limited, 2007. – 303 p.

35. Biomarkers for precision medicine in bladder cancer / T. Kojima, K. Kawai, J. Miyazaki, H. Nishiyama // Int. J. Clin. Oncol. – 2017. – Vol. 22, № 2. – P. 207–213.

36. Bladder cancer incidence and mortality: A global overview and recent trends / S. Antoni, J. Ferlay, I. Soerjomataram [et al.] // Eur. Urol. – 2017. – Vol. 71, № 1. – P. 96–108.

37. Bladder cancer: analysis of multidetector row helical CT enhancement pattern and accuracy in tumor detection and perivesical staging / J.K. Kim, S.Y. Park,

H.J. Ahn [et al.] // Radiology. – 2004. – Vol. 231, № 3. – P. 725–731.

38. Bladder tumor staging: comparison of contrast-enhanced CT, T1- and T2-weighted MR imaging, dynamic gadolinium-enhanced imaging, and late gadolinium-enhanced imaging / B. Kim, R.C. Semelka, S.M. Ascher [et al.] // Radiology. – 2004. – Vol. 193, № 1. – P. 239–245.

39. Bladder tumour antigen (BTA stat) test compared to the urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: a meta-analysis / A. Guo, X. Wang, L. Gao [et al.] // Can. Urol. Assoc. J. – 2014. – Vol. 8, № 5–6. – P. 347–352.

40. Bohle, A. Intravesical bacille Calmette–Guerin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression / A. Bohle, P.R. Bock // Urology. – 2004. – Vol. 63. – P. 682.

41. Can MRI be used to distinguish between superficial and invasive transitional cell bladder cancer? / X. Tillou, E. Grardel, M. Fourmarier [et al.] // Prog. Urol. – 2008. – Vol. 18, № 7. – P. 440–444.

42. Cancer imaging using surface-enhanced resonance Raman scattering nanoparticles / S. Harmsen, M.A. Wall, R. Huang, M.F. Kircher // Nature Protocols. – 2017. – Vol. 12. – P. 1400–1414.

43. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012 / J. Ferlay, E. Steliarova–Foucher, J. Lortet–Tieulent [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2013. – Vol. 49. – P. 1374–1403.

44. Cancer statistics, 2005 / A. Jemal, T. Murray, E. Ward [et al.] // CA Cancer J. Clin. – 2005. – Vol. 55, № 1. – P. 10–30.

45. Clinical outcome in a contemporary series of restaged patients with clinical T1 bladder cancer / G. Dalbagni, K. Vora, M. Kaag [et al.] // Eur. Urol. – 2009. – Vol. 56. – P. 903–910.

46. Clinical outcomes of bacillus Calmette–Guerin instillation therapy for carcinoma in situ of urinary bladder / A. Takenaka, Y. Yamada, H. Miyake [et al.] // Int. J. Urol. – 2008. – Vol. 15. – P. 309–313.

47. Cystectomy – technical considerations in male and female patients / A. Stenzl, U. Nagele, M. Kuczyk [et al.] // EAU Update Series. – 2005. – Vol. 3. – P.

138–146.

48. DeGeorge, K.C. Bladder cancer: diagnosis and treatment / K.C. DeGeorge, H.R. Holt, S.C. Hodges // *Am. Fam. Physic.* – 2017. – Vol. 96, № 8. – P. 507–514.

49. Determination of meningioma brain tumour grades using Raman microspectroscopy imaging / C.L.M. Morais, T. Lilo, K.M. Ashton [et al.] // *Analyst.* – 2019. – Vol. 144, № 23. – P. 7024–7031.

50. Discrimination of renal cell carcinoma from normal renal parenchyma using Raman spectroscopy / E.Y. Huang, Y.H. Liao, A.T.L. Lin, H.K. Chiang // *J. Urol.* – 2012. – Vol. 187, № 4. – P. 398.

51. Distinguishing between renal oncocytoma and chromophobe renal cell carcinoma using Raman molecular imaging / S. Stewart, H. Kirschner, P.J. Treado, R. Priore // *J. Raman Spectrosc.* – 2014. – Vol. 45. – P. 274–280.

52. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013 / M. Babjuk, M. Burger, R. Zigeuner [et al.] // *Eur. Urol.* – 2013. – Vol. 64, № 4. – P. 639–653.

53. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam, 2020. - Режим доступа: <https://uroweb.org/eau-guidelines/citing-usage-republication> (Дата обращения: 15.02.2022).

54. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam, 2022. - Режим доступа: <https://uroweb.org/eau-guidelines/citing-usage-republication> (Дата обращения 03.05.2022).

55. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? / K.D. Sievert, B. Amend, U. Nagele [et al.] // *World J. Urol.* – 2009. – Vol. 27, № 3. – P. 295–300.

56. Effect of routine repeat transurethral resection for superficial bladder cancer: a long-term observational study / M.O. Grimm, C. Steinhoff, X. Simon [et al.] // *J. Urol.* – 2003. – Vol. 170. – P. 433–437.

57. Efficacy and tolerance of one-third full dose bacillus Calmette–Guérin maintenance therapy every 3 months or 6 months: Two-year results of URO-BCG-4

multicenter study / C. Pfister, W. Kerkeni, J. Rigaud [et al.] // *Int. J. Urol.* – 2015. – Vol. 22, № 1. – P. 53–60.

58. EORTC nomograms and risk groups for predicting recurrence, progression, and disease-specific and overall survival in non-muscle-invasive stage Ta–T1 urothelial bladder cancer patients treated with 1–3 years of maintenance bacillus Calmette–Guérin / S. Cambier, R.J. Sylvester, L. Collette [et al.] // *Eur. Urol.* – 2016. – Vol. 69, № 1. – P. 60–69.

59. European association of urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) – 2019 Update / M. Babjuk, M. Burger, E.M. Compérat [et al.] // *Eur. Urol.* – 2019. – Vol. 76, № 5. – P. 639–657.

60. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy – part II: patient evaluation, cytology, voided markers, imaging, cystoscopy, nephrology evaluation, and follow up / G.D. Grossfeld, M.S. Litwin, J.S. Wolf Jr. [et al.] // *Urology.* – 2001. – Vol. 57, № 4. – P. 604–610.

61. Expression of p53 family genes in urinary bladder cancer: correlation with disease aggressiveness and recurrence / D. Papadogianni, N. Soultziz, D. Delakas, D.A. Spandidos // *Tumor Biol.* – 2014. – Vol. 35, № 3. – P. 2481–2489.

62. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma / A.H. Jebar, C.D. Hurst, D.C. Tomlinson [et al.] // *Oncogene.* – 2005. – Vol. 24. – P. 5218–5225.

63. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2018. – Vol. 68, № 6. – P. 394–424.

64. Hall, T.B. Imaging of bladder cancer / T.B. Hall, A.D. MacVicar // *Imaging.* – 2001. – Vol. 13, № 1. – P. 1–10.

65. Hricak, H. New horizons in genitourinary oncologic imaging / H. Hricak // *Abdom. Imaging.* – 2006. – Vol. 31, № 2. – P. 182–187.

66. Identification and characterization of colorectal cancer using Raman spectroscopy and feature selection techniques / L. Shaoxin, C. Gong, Z. Yanjiao [et

al.] // *Optic. Express.* – 2014. – Vol. 22, № 21. – P. 25895–25908.

67. Identifying non-muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer based on blood serum surface-enhanced Raman spectroscopy / Sh. Chen, Sh. Zhu, X. Cui [et al.] // *Biomed. Opt. Express.* – 2019. - № 10. – P. 3533-3544.

68. In vivo bladder cancer diagnosis by high-volume Raman spectroscopy / R.O. Draga, M.C. Grimbergen, L.P. Vijverberg [et al.] // *Anal. Chem.* – 2010. – Vol. 82. – P. 5993–5999.

69. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics / L. Seymour, J. Bogaerts, A. Perrone [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2017. – Vol. 18, № 3. – P. e143–152.

70. Kim, Y.K. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer / Y.K. Kim, W.J. Kim // *J. Int. Urology.* – 2009. – Vol. 16, № 1. – P. 17–22.

71. Liu, Q. Role of optical spectroscopy using endogenous contrasts in clinical cancer diagnosis / Q. Liu // *World J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 2, № 1. – P. 50–63.

72. Long-term follow-up of a randomized prospective trial comparing a standard 81 mg dose of intravesical bacille Calmette–Guerin with a reduced dose of 27 mg in superficial bladder cancer / J.A. Martínez–Piñeiro, N. Flores, S. Isorna [et al.] // *BJU Int.* – 2002. – Vol. 89. – P. 671–680.

73. Luca, S. History of BCG vaccine / S. Luca, T. Mihaescu // *Maedica (Buchar).* – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 53–58.

74. Mahadevan–Jansen, A. Raman spectroscopy for detection of cancers and precancers / A. Mahadevan–Jansen, R. Richards–Kortum // *J. Biomed. Opt.* – 1996. – Vol. 1. – P. 31–70.

75. Maintenance avelumab + best supportive care (BSC) versus BSC alone after platinum-based first-line (1L) chemotherapy in advanced urothelial carcinoma (UC): JAVELIN Bladder 100 phase III interim analysis / T. Powles, S.H. Park, E. Voog [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2020. – Vol. 38. – DOI: 10.1200/JCO.2020.38.18_suppl.LBA1.

76. Morales, A. Intracavitary bacillus Calmette–Guerin in the treatment of

superficial bladder tumors / A. Morales, D. Eidinger, A.W. Bruce // *J. Urol.* – 1976. – Vol. 116. – P. 180.

77. Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses / H. Suttman, J. Riemensberger, G. Bentien [et al.] // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 8250–7.

78. Observation of periodic fine structure in reflectance from biological tissue: a new technique for measuring nuclear size distribution / L.T. Perelman, V. Backman, M. Wallace [et al.] // *Phys. Rev. Lett.* – 1998. – Vol. 80. – P. 627–630.

79. Outcomes of radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: a contemporary series from the Bladder Cancer Research Consortium / S.F. Shariat, P.I. Karakiewicz, G.S. Palapattu [et al.] // *J. Urol.* – 2006. – Vol. 176. – P. 2414–2422.

80. Oxford Centre for Evidence-based Medicine Levels of Evidence. – Updated by J. Howick. March 2009. – Режим доступа: <https://www.cebm.ox.ac.uk/resources/levels-of-evidence/oxford-centre-for-evidence-based-medicine-levels-of-evidence-march-2009> (Дата обращения: 14.01.2018).

81. Ozaki, Y. Medical application of Raman spectroscopy / Y. Ozaki // *Appl. Spectrosc. Rev.* – 1988. – Vol. 24. – P. 259–312.

82. Potential for Raman spectroscopy to provide cancer screening using a peripheral blood sample / A.T. Harris, A. Lungari, C.J. Needham [et al.] // *Head Neck Oncol.* – 2009. – Vol. 1. – P. 34. – DOI: 10.1186/1758-3284-1-34.

83. Preliminary results of a multicentre study of the UBC rapid test for detection of urinary bladder cancer / T.H. Ecke, C. Arndt, C. Stephan [et al.] // *Anticancer Res.* – 2015. – Vol. 35. – P. 2651–2655.

84. Prognosis of muscle-invasive bladder cancer: difference between primary and progressive tumours and implications for therapy / B.P. Schrier, M.P. Hollander, B.W.G. van Rhijn [et al.] // *Eur. Urol.* – 2004. – Vol. 45. – P. 292–296.

85. Prostate sparing cystectomy for bladder cancer: 20-year single center

experience / L.S. Mertens, R.P. Meijer, R.R. de Vries [et al.] // J. Urol. – 2014. – Vol. 191. – P. 1250.

86. Raman microspectroscopic model of human breast tissue: Implications for breast cancer diagnosis in vivo / K.E. Shafer–Peltier, A.S. Haka, M. Fitzmaurice [et al.] // J. Raman Spectrosc. – 2002. – Vol. 33. – P. 552–563.

87. Raman spectroscopy discloses altered molecular profile in thyroid adenomas / A. Sodo, M. Verri, A. Palermo [et al.] // Diagnostics (Basel). – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 43.

88. Raman spectroscopy, a potential tool for the objective identification and classification of neoplasia in Barrett's oesophagus / C. Kendall, N. Stone, N. Shepherd [et al.] // J. Pathol. – 2003. – Vol. 200, № 5. – P. 602–609.

89. Raman spectroscopy: A powerful technique for biochemical analysis and diagnosis / L.M. Moreira, L. Silveira Jr., F.V. Santos [et al.] // Spectroscopy. – 2008. – Vol. 22. – P. 1–19.

90. Raman techniques: Fundamentals and Frontiers / R.R. Jones, D.C. Hooper, L. Zhang [et al.] // Nanoscale Res. Lett. – 2019. – Vol. 14. – P. 231.

91. Recurrence, progression and cancer–specific mortality according to stage at re–TUR in T1G3 bladder cancer patients treated with BCG: not as bad as previously thought / J. Palou, F. Pisano, R. Sylvester [et al.] // World J. Urol. – 2018. – Vol. 36. – P. 1621–1627.

92. Reference database of Raman spectra of biological molecules / J.D. Gelder, K.D. Gussem, P. Vandenabeele, L. Moens // J. Raman Spectrosc. – 2007. – Vol. 38, № 9. – P. 1133–1147.

93. Screening and monitoring for bladder cancer: refining the use of NMP22 / L.E. Ponsky, S. Sharma, L. Pandrangi [et al.] // J. Urol. – 2001. – Vol. 166, № 1. – P. 75–78.

94. Significance of the interval between first and second transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with high–risk non–muscle–invasive bladder cancer treated with maintenance intravesical Bacillus Calmette–Guerin / S. Baltaci, M. Bozlu, A. Yıldırım [et al.] // BJU Int. – 2015. – Vol. 116. – P.

721–726.

95. Swami, M.K. Optical spectroscopy for biomedical diagnosis / M.K. Swami, P.K. Gupta // *Proc. Nat. Acad. Sci. India. Sect. A.* – 2018. – Vol. 88, № 3. – P. 1–8.

96. Sylvester, R.J. The schedule and duration of intravesical chemotherapy in patients with non–muscle–invasive bladder cancer: a systematic review of the published results of randomized clinical trials / R.J. Sylvester, W. Oosterlinck, J.A. Witjes // *Eur. Urol.* – 2008. – Vol. 53. – P. 709–719.

97. Teh, S.K. Diagnostic potential of near–infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue / S.K. Teh, W. Zheng, K.Y. Ho // *Br. J. Cancer.* – 2008. – Vol. 98, № 2. – P. 457–465.

98. The clinical research office of the Endourological Society (CROES) multicentre randomised trial of narrow band imaging–assisted transurethral resection of bladder tumour (TURBT) versus conventional white light imaging–assisted TURBT in primary non–muscle–invasive bladder cancer patients: Trial protocol and 1–year results / S. Naito, F. Algaba, M. Babjuk [et al.] // *Eur. Urol.* – 2016. – Vol. 70. – P. 506–515.

99. The economics of bladder cancer: Costs and considerations of caring for this disease / R.S. Svatek, B.K. Hollenbeck, S. Holmang [et al.] // *Eur. Urol.* – 2014. – Vol. 66, № 2. – P. 253–262.

100. The effect of repeat transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with T1 tumors of the bladder who received intravesical mitomycin: a prospective, randomized clinical trial / R.T. Divrik, U. Yildirim, F. Zorlu, H. Ozen // *J. Urol.* – 2006. – Vol. 175. – P. 1641–1644.

101. The influence of review pathology on study outcome of a randomized multicentre superficial bladder cancer trial. Members of the Dutch Sought East cooperative Urological Group / J.A. Witjes, L.A. Kiemeney, H.E. Schaafsma, F.M. Debruyne // *Br. J. Urol.* – 1994. – Vol. 73, № 2. – P. 172–176.

102. The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of bladder followed for at

least 20 years / S. Holmang, H. Hedelin, C. Anderstrom, S.L. Johansson // *J. Urol.* – 1995. – Vol. 153, № 16. – P. 1823–1826.

103. TP53 and FGFR3 gene mutation assessment in urine: pilot study for bladder cancer diagnosis / N. Noel, J. Couteau, G. Maillet [et al.] // *Anticancer Res.* – 2015. – Vol. 35, № 9. – C. 4915–4922.

104. Urinary biomarkers for diagnosis of bladder cancer: a systematic review and meta-analysis / R. Chou, J.L. Gore, D. Buckley [et al.] // *Ann. Intern. Med.* – 2015. – Vol. 163, № 12. – P. 922–931.

105. Urinary markers in the everyday diagnosis of bladder cancer / F.D. Moro, C. Valotto, A. Guttilla, F. Zattoni // *Urologia.* – 2013. – Vol. 80, № 4. – P. 265–275.

106. Urothelial carcinoma of the prostate / J. Palou, J. Baniel, L. Klotz [et al.] // *Urology.* – 2007. – Vol. 69. – P. 50.

107. UroVysion Bladder Cancer Kit. – Режим доступа: <https://www.molecular.abbott/sal/enus/staticAssets/UroVysion-package-insert-R6--watermark.pdf> (Дата обращения: 21.04.2019).

108. Usefulness of basal cell cocktail (34betaE12+p63) in the diagnosis of atypical prostate glandular proliferations / R.B. Shah, L.P. Kunju, R. Shen [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2004. – Vol. 122, № 4. – P. 517–523.

109. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies / M. Brausi, L. Collette, K. Kurth [et al.] // *Eur. Urol.* – 2002. – Vol. 41. – P. 523–531.

110. Venyo, A. The expression of P53 in human urothelial carcinoma / A. Venyo, H. Greenwood, D. Maloney // *Webmed Central UROLOGY.* – 2010. – Vol. 1, № 11. – P. 1–12.

111. Yoshida, O. Relationship between tryptophan metabolism and heterotopic recurrences of human urinary bladder tumors / O. Yoshida, R.R. Brown, G.T. Bryan // *Cancer.* – 1970. – Vol. 25, № 4. – P. 773–780.