

# Анализ собственной и индуцированной флуоресценции злокачественных новообразований и интактных тканей почек

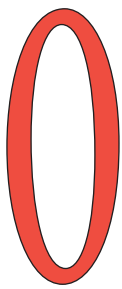
**Analysis of own and induced fluorescence of the malignant kidney tumors and healthy tissue**

*I.V. Chernishev, R.A. Khanakaev*

We have studied the autofluorescence and induced fluorescence in renal tumors and healthy renal tissues in 90 patients with renal cell carcinoma from the National Scientific Institute of Urology in the period from January 2012 up to June 2013. "Alasens" (5-aminolevulinic acid hydrochloride) was shown to be selectively accumulated in the tumor cells, to transform into protoporphyrine IX and to fluoresce against the blue light. Own fluorescence excited by the light with a wave length 630 nm and also in the course of fluorescence diagnostics (FD) at the wave length 460 nm could not be a reliable criteria of the presence or absence of the tumor and could not influence the results of the secondary fluorescence. At that time, induced fluorescence allows the tumor identification; good contrast at the border of tumor and healthy tissue permits the identification of the tumor boundaries using the fluorescence directly at time of operation. In the dosage 20 mg/kg of body weight 5-aminolevulinic acid could be safely used in laparoscopic and open partial nephrectomy without any clinically or laboratory recognizable toxic effects.

*И. В. Чернышев, Р. А. Ханакеев*

*НИИ урологии им. А.Н. Лопаткина – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. А.П. Герцена» Минздрава России*



Одной из актуальных проблем здравоохранения остается заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований. В структуре общей онкологической заболеваемости в Российской Федерации злокачественные новообразования почек составляют 2–3% и занимают 10-е ранговое место [1, 2].

По рекомендации Европейской ассоциации урологов (2010 г.) пациентам с начальными стадиями (T1) рака почек должно быть проведено органосохраняющее оперативное лечение (ОСЛ). Ряд авторов считают, что избирательные показания к ОСЛ могут возникать при размерах опухолевого узла размером не более 7 см [3]. При этом ОСЛ приводят к тем же онкологическим результатам, что и проведение радикального оперативного вмешательства [2, 4].

Важным условием с точки зрения онкологической настороженности при выполнении ОСЛ является радикальность удаления новообразования. Традиционно применяемую для контроля радикальности оперативного лечения экспресс биопсию из резецируемого участка ложа удаленной опухоли нельзя считать точным критерием оценки его радикальности, так как не всегда имеется возможность четкого определения состояния хирургического края в этой области [5, 6]. Как следствие, имеется определенная веро-

ятность ложноотрицательного результата, что связано с тем, что при выполнении биопсии из ложа удаленной опухоли отсутствует возможность четкой визуализации опухолевой ткани в крае резекции и местах, где она производится, т.е. биопсия из различных участков области резекции берется не прицельно, а случайным методом. Кроме того морфологическое исследование занимает довольно много времени, что может продлить период ишемии почки и, следовательно, привести к серьезному нарушению ее функции [6]. Таким образом, разработка методики, позволяющей четко визуализировать опухоль и выполнять прицельную биопсию из подозрительных участков, является актуальной на современном этапе [5].

Одним из таких методов является флуоресцентная диагностика (ФД) злокачественных новообразований, основанная на применении фотосенсибилизаторов (ФС), которые при воздействии на них светом определенной длины волны переходят в возбужденное состояние и иницируют физико-химические процессы, сопровождающиеся люминесценцией и деструкцией опухоли. Фотосенсибилизаторы, используемые для ФД, являются разнообразными производными порфирина и родственных макроциклов. Различают первичную (аутофлуоресцентную) и вторичную ФД. Аутофлуоресцентная диагностика основана

на определении различий в интенсивности и спектральном составе собственной флуоресценции здоровой и опухолевой ткани без применения фотосенсибилизаторов. Ткани с повышенной пролиферативной способностью, такие как неопластическая, эмбриональная и регенеративная, обладают большей способностью накапливать порфирины. Одним из типичных и наиболее легко детектируемых *in vivo* флуорофоров в тканях являются порфирин и его производные, например, протопорфирин IX [7].

В основе вторичной ФД лежит способность ФС избирательно накапливаться в ткани злокачественного новообразования и возможность их обнаружения по характерной флуоресценции (свечению) экзогенных или эндогенных флуорохромов [8, 9]. В настоящее время одним из наиболее часто используемых для диагностики ФС является 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК). Сама 5-АЛК не флуоресцирует. Она является исходным продуктом внутриклеточного биосинтеза гема. Единственное образуемое в цепи синтеза гема вещество протопорфирин-IX (ПП IX) обладает способностью к флуоресценции. Однако ПП IX после присоединения двухвалентного железа в присутствии фермента феррохелатазы превращается в молекулу гема, не способную к флуоресценции. В обычных условиях ПП IX внутриклеточно не накапливается. Для образования флуоресцентно-оптически проявляемых концентраций ПП IX необходимо дополнительное поступление 5-АЛК внутрь клетки [10].

Основным преимуществом метода ФД является его неинвазивность, что позволяет получать информацию о состоянии тканей без воздействия на динамику различных биологических процессов, происходящих в тканях в момент проведения диагностики и при последующем динамическом наблюдении. Другим достоинством оптического анализа тканей является возмож-

ность моментальной обработки данных, что позволяет корректировать объемы лечебной помощи в соответствии с полученной информацией [2].

Особенностью флуорохромов являются тропность к раковым клеткам и их яркая флуоресценция на отличающемся фоне. Эти свойства позволяют отличать объекты, достигающие размеров долей миллиметра [8]. Высокое спектральное разрешение и селективность лазерной спектроскопии позволяют реализовать высокочувствительные исследования, причем неинвазивно и быстро. ФД открывает принципиально новые диагностические возможности неинвазивного мониторинга биохимических изменений клеток тканей при трансформации нормальных клеток в диспластические и злокачественные, которые происходят раньше структурных перестроек [11]. В настоящее время ФД активно применяется для диагностики и лечения поверхностных опухолей полых органов, кожи.

ФД позволяет выявлять микроочаги новообразований и микрометастазы, в том числе множественные, невидимые при обычном освещении. Данная диагностическая методика адаптирована и для эндоскопических исследований, что повышает эффективность лечения в целом. Применение ФД возможно непосредственно и во время операции для контроля зоны резекции, определения ее объема, и, самое главное, оценки хирургического ложа после резекции, чтобы в случае выявления остаточной опухоли выполнить срочную биопсию из конкретного участка [5, 12]. В урологической практике была доказана эффективность данной методики в выявлении ранних опухолей мочевого пузыря [13-16] и снижении риска остаточных опухолей после трансуретральных резекций мочевого пузыря [17, 18].

**Целью** нашего исследования явилась оценка интенсивности ауто- и вторичной флуоресценции злока-

чественной опухоли почки и интактной паренхимы; и демонстрация возможности использования вторичной флуоресценции для диагностики положительного хирургического края при выполнении резекции почки.


## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для настоящего исследования послужили клинкоморфологические данные 90 больных раком почки, находившихся на лечении в ФГБУ «НИИ урологии» Минздрава России за период с января 2012 по июнь 2013 гг. У всех пациентов на дооперационном этапе был диагностирован рак почки клинической стадии T1-2N0M0, подтвержденный при последующем патоморфологическом исследовании. Определение стадии заболевания проводилось в соответствии с 6-м изданием классификации TNM 2007 года [19].

Возраст больных, включенных в исследование в среднем, составил 54,0 [51,4; 55,6] года, минимально – 25 лет, максимально – 76 лет.

Все больные были разделены на две группы. В группу для изучения аутофлуоресценции вошли 20 пациентов, в группу изучения вторичной флуоресценции – 70 больных.

### *Методика аутофлуоресцентной диагностики*

Изучение аутофлуоресценции необходимо для изучения влияния собственной флуоресценции на результаты индуцированной ФД. Проводился визуальный фотодинамический контроль аутофлуоресценции ( $\lambda=460$  нм) с последующей лазерной флуоресцентной спектрометрией ( $\lambda=630$  нм) в процессе выполнения резекции почки. Специального обследования и подготовки больных для проведения спектрально-флуоресцентных измерений не требовалось. Результаты спектрального анализа сопоставляли с 

результатами планового гистологического исследования удаленного в ходе операции материала.

### **Методика вторичной флуоресцентной диагностики**

В качестве фотосенсибилизатора был использован препарат Аласенс, который принимался внутрь из расчета 20 мг/кг веса тела больного в 50 мл негазированной воды за 3 часа до проведения оперативного вмешательства. Данный препарат Российского производства (ФГУП ГНЦ «НИОПИК»), созданный на основе активной субстанции гидрохлорид 5-аминолевулиновой кислоты.

Эффект флуоресценции тканей при ФД оценивался визуально, изображение передавалось с помощью чувствительной телекамеры на экран монитора. Визуальная ФД проводилась через 3-4 часа после перорального приема Аласенса. В качестве источника излучения, возбуждающего флуоресценцию ПП IX в тканях, использовался аппарат фирмы «KARL STORZ» системы D-Light C (Германия) с ручным режимом переключения от белого к синему свету с рабочей длиной волны  $\lambda_{\text{сред.}}=460$  нм и выходной мощностью на этой длине волны 300 мВт. Полученная информация оцифровывалась и выводилась на экран монитора с высокой чувствительностью. Спектральный анализ проводился на длине волны 630 нм. Анализ спектроскопических характеристик тканей проводился в реальном масштабе времени. Для проведения спектрального анализа использовалась лазерная электронно-спектральная установка LESA-01 "БИОСПЕК" совместного производства лаборатории лазерной биоспектроскопии ЦЕНИ ИОФРАН и "БИОСПЕК" (Россия, Москва, лицензия №42/2002 0172 0007).

Во время резекции почки проводилось видеонаблюдение хирургического края резекции в режиме синего света ( $\lambda=460$  нм). Данный

спектр позволял детектировать очаги накопления ПП IX, которые визуализировались на экране монитора как очаги с красноватым свечением на сине-фиолетовом фоне.

### **Методика оценки и регистрации результатов исследования**

Результатом ФД был график флуоресценции, кривая на графике представляла собой графическую зависимость интенсивности флуоресценции Аласенса, индуцированного ПП IX, от длины волны, возбуждающего ее лазерного излучения. По оси «х» откладывалась длина волны в нм, по оси «у» - интенсивность флуоресценции и рассеянного лазерного света в относительных единицах. Острый пик спектральной кривой соответствовал рассеянному лазерному излучению, а более широкий диапазон - излучению флуоресценции. Для анализа выделялся всегда одинаковый диапазон от 685-690 нм до 715-720 нм.

При оценке флуоресценции возникает необходимость учитывать эффекты геометрии измерений, мощности лазерного излучения, которая может варьировать от измерения к измерению. А также нужно избегать влияния поглощающих свет веществ, к которым относятся и кровь, количество которой в операционной ране различается у разных пациентов. Поэтому для вычисления относительной интенсивности флуоресценции - коэффициента флуоресценции (КФ) - использовалось отношение площади под пиком флуоресценции к площади лазерного излучения. Данное нормирование дало возможность количественно сравнивать результаты измерений, проведенных на разных пациентах, исключить зависимость результатов спектрометрии от мощности лазерного излучения, а также частично от наличия поглощающих свет веществ (крови, слизи).

Для оценки различия интенсивности флуоресценции нормаль-

ной и патологической ткани вычислялся коэффициент диагностической контрастности (КДК), представляющий собой отношение КФ опухолевой ткани к КФ интактной ткани почек.

Количественные показатели отображались в при помощи медианы и 95%-го доверительного интервала (Me [ДИ95%-; ДИ 95%+]). Достоверность различий полученных результатов определялась с помощью критерия Манна-Уитни.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

При проведении анализа аутофлуоресценции злокачественной опухоли и интактных тканей почек было отмечено, что подъем интенсивности собственной флуоресценции отмечался в диапазоне 650-660 нм, наибольших значений в нормальных тканях достигая в области 680-695 нм, затем регистрировался постепенный спад практически до полного прекращения регистрации флуоресценции к 800 нм. Наименьшая интенсивность наблюдалась в нормальных тканях (рис. 1.а).

В среднем КФ аутофлуоресценции непораженной паренхимы почек составил 0,7 [0,6; 1,0]; опухоли почки через паренхиму - 1,2 [0,9; 1,2]; опухоли почки на разрезе - 1,2 [0,8; 1,3] (рис. 1.б). Различия между группами не достигли статистически значимого уровня ( $p>0,05$ ).

КДК аутофлуоресценции для опухоли, исследуемой через паренхиму, составил 1 [1,0; 1,1], для опухоли на разрезе - 1,0 [1,1; 1,2].

Таким образом, отмечалось отсутствие различий между аутофлуоресценцией нормальной паренхимы почек и опухоли почек. Ни у одного больного при выполнении ФД с возбуждающим флуоресценцию светом на длине волны 460 нм (синий спектр) визуально не было отмечено признаков наличия экзогенных веществ, флуоресцирующих на длине волны флуоресценции ПП IX. Иными словами, собственная флуоресценция, как при возбужде-

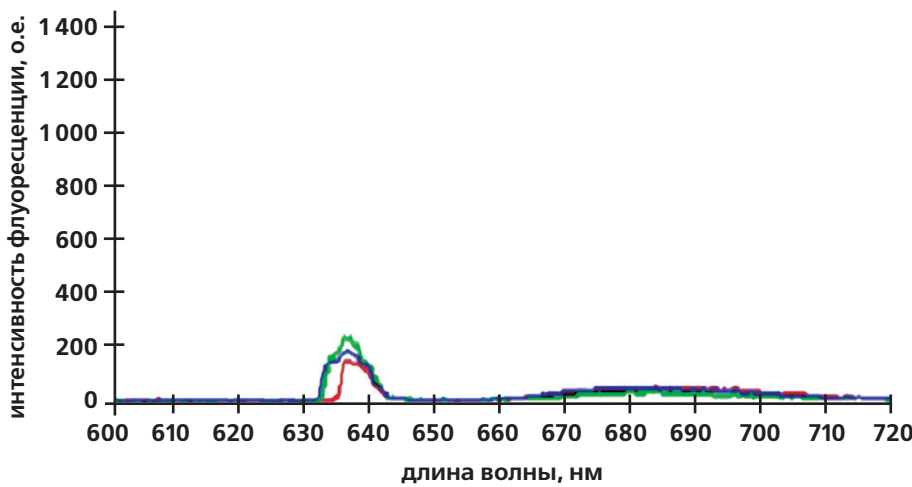


Рис. 1а. Показатели аутофлуоресценции тканей почек  
Спектры аутофлуоресценции тканей почек (больной X.)  
1. красный – нормальная паренхима почек  
2. синий - опухоль почки через паренхиму  
3. зеленый - собственно ткань опухоли

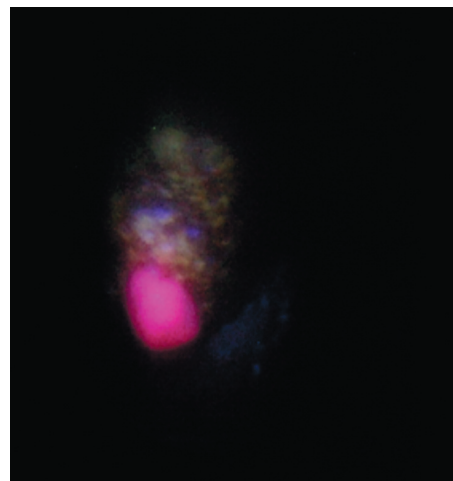
нии ее длиной волны 630 нм, так и при выполнении ФД на длине волны 460 нм, не может являться диагностическим критерием наличия или отсутствия опухоли, и не может влиять на результаты вторичной флуоресценции.

При анализе индуцированной флуоресценции злокачественной опухоли и интактных тканей почек установлено, что Аласенс способен избирательно накапливаться в опухолевых клетках, превращаться в ПП IX и флуоресцировать при освещении синим светом ( $\lambda=440-485$  нм). При проведении исследований с этим препаратом всегда наблюдалось выраженное свечение опухоли на фоне здоровой паренхимы. Визуально при выполнении ФД опухоль определялась как участок красноватого свечения на сине-фиолетовом фоне. При этом ни один из очагов, флуоресцирующих в режиме синего света ( $\lambda=460$  нм), не был визуально изменен и не выделялся из окружающей ткани при осмотре в белом свете.

При проведении ФД во время резекции почек также были получены изображения почек в белом и синем цвете: на фоне нормальной ткани, приобретающей синий цвет, отчетливо визуализировалась ткань почки с участком ярко-красного свечения. Таким образом, высокий контраст между опухолью и окру-

жающими тканями обеспечивает выявление и уточнение границ опухоли при ФД непосредственно во время оперативного вмешательства. Особенное значение этот метод приобретает при оценке хирургического края (рис. 2).

После удаления опухолевой ткани выполнялась оценка ее флуоресценции. Обработка результатов спектрограмм показала незначительное накопление ПП IX в интактной паренхиме почек. В то же время, обнаружена высокая интенсивность флуоресценции опухоли почки, как через паренхиму, так и в разрезе. Максимум флуоресценции зарегистрирован на 715 нм (рис. 3.а)



а. в синем свете

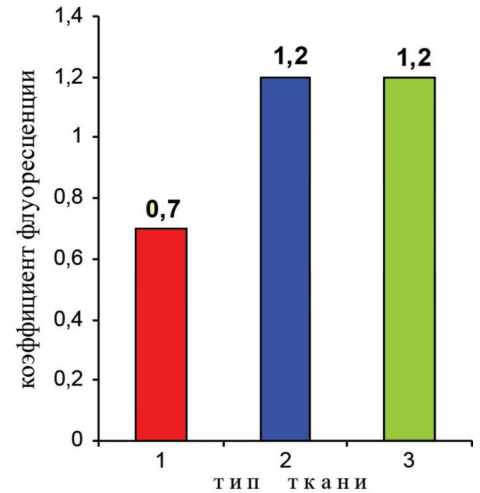
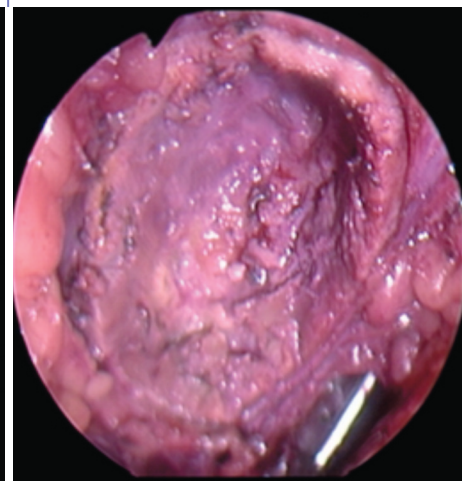


Рис. 1б. Показатели аутофлуоресценции тканей почек  
КФ аутофлуоресценции (в среднем):  
1. интактная паренхима почки  
2. опухоль через паренхиму почки  
3. собственно ткань опухоли

КДК индуцированной флуоресценции для опухоли, исследуемой через паренхиму, составил 9,1 [7,6; 10,1], для опухоли на разрезе – 10,2 [9,7; 11], различия по данному показателю не достигли статистически значимого уровня ( $p=0,742$ ).

В среднем КФ для индуцированной флуоресценции непораженной паренхимы почек составил 1,4 [1,1; 1,4]; опухоли почки через паренхиму – 9,1 [8,3; 11]; опухоли почки на разрезе – 11,3 [8,6; 12,9] (рис. 3.б). Различия в КФ непораженной паренхимы с таковой у опухоли через паренхиму и опухоли на разрезе статистически достоверны ( $p<0,01$  в обоих случаях). У опухоли через паренхиму,



б. в белом свете

Рис.2. Хирургический край ложа удаленной опухоли при применении Аласенса в качестве фотосенсибилизатора



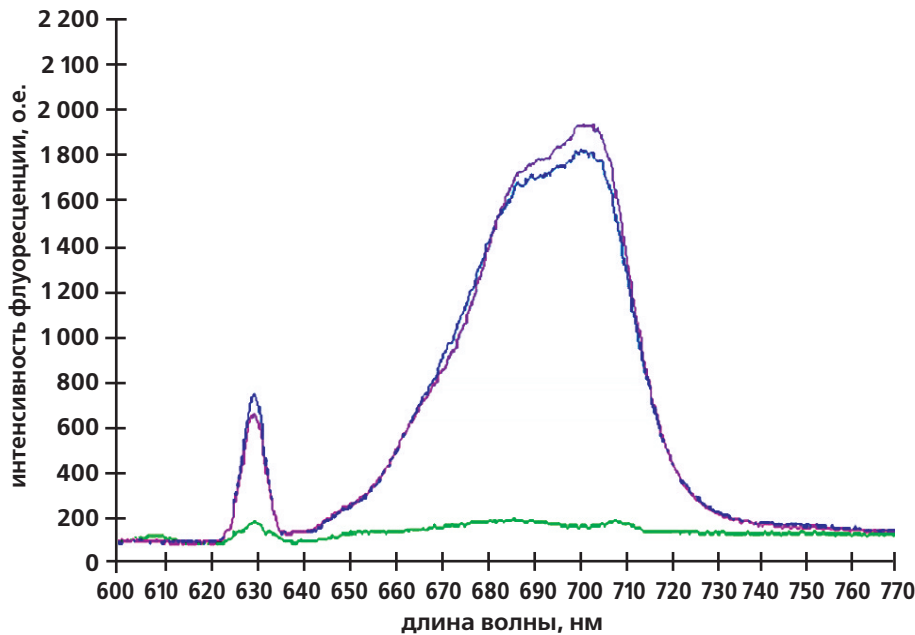


Рис. 3а. Показатели аласенс-индуцированной флуоресценции тканей почек  
Спектры АЛК-индуцированной флуоресценции паренхимы почек пациентки О.  
зеленый – интактная паренхима почки  
синий – опухоль через паренхиму  
лиловый – собственно ткань опухоли

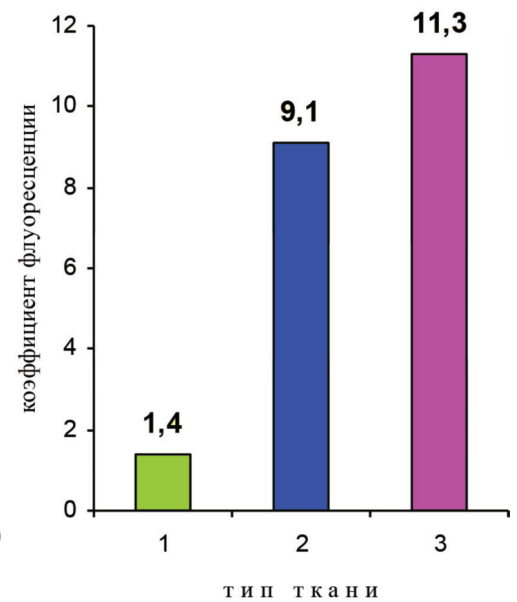


Рис. 3б. Показатели аласенс-индуцированной флуоресценции тканей почек  
КФ индуцированной флуоресценции тканей почек (в среднем):  
1. интактная паренхима; 2. опухоль через паренхиму  
3. собственно ткань опухоли

по сравнению с опухолью на разрезе, различия в этом показателе статистически достоверного уровня не достигли ( $p=0,462$ ).

При применении Аласенса не было отмечено патологических изменений основных показатели периферической крови, биохимических анализов, дающих представление о состоянии углеводного, жирового обмена, синтеза белка, антитоксической функции печени и степени токсического поражения гепатоцитов и эпителия печеночных

протоков, результатов исследования мочи. Только у 1 (1,4%) пациента на принятый препарат отмечалась наружная аллергическая реакция в виде крапивницы, купированная после инъекции антигистаминного препарата.

## Выводы

1. Собственная флуоресценция, как при возбуждении ее источником света длиной волны 630 нм, так и при выполнении ФД на длине

волны 460 нм, не может являться диагностическим критерием наличия или отсутствия опухоли и не может влиять на результаты вторичной флуоресценции.

2. Индуцированная флуоресценция позволяет проводить оценку наличия злокачественных новообразований почек; высокий контраст между опухолью и окружающими тканями обеспечивает выявление и уточнение границ опухоли при ФД непосредственно во время оперативного вмешательства. ■

## Резюме:

В исследовании изучена аутофлуоресценция и индуцированная флуоресценция злокачественной опухоли и интактной паренхимы почек у 90 больных раком почки, находившихся на лечении в ФГБУ «НИИ урологии» Минздрава России за период с января 2012 по июнь 2013 гг. Известно, что препарат «Аласенс» (5-аминолевулиновой кислоты гидрохлорид) способен избирательно накапливаться в опухолевых клетках, превращаться в протопорфирин IX и флуоресцировать при освещении синим светом.

В ходе исследования выяснилось, что собственная флуоресценция, как при возбуждении ее источником света длиной волны 630 нм, так и при выполнении флуоресцентной диагностики (ФД) на длине волны 460 нм, не может являться диагностическим критерием наличия или отсутствия опухоли и не может влиять на результаты вторичной флуоресценции. В то же время индуцированная флуоресценция позволяет проводить оценку наличия злокачественных новообразований почек; высокий контраст между опухолью и окружающими тканями обеспечивает выявление и уточнение границ опухоли при ФД непосредственно во время оперативного вмешательства. В дозе 20 мг/кг веса тела больного при выполнении лапароскопической и открытой резекции почки 5-аминолевулиновая кислота не вызывает клинических и лабораторных признаков токсического воздействия.

**Ключевые слова:** рак почки, аутофлуоресценция, индуцированная флуоресценция, 5 – аминолевулиновая кислота, аласенс.

**Key words:** renal cell carcinoma, autofluorescence, induced fluorescence, 5-aminolevulinic acid, Alasens.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2008 году (заболеваемость и смертность) [Под ред. В.И.Чиссова, В.В.Старинского, Г.В.Петровой]. М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А.Герцена Росмедтехнологий», 2010. 256 с.
2. Ljungberg B, Cowan N, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PFA, Patard J-J, Sinescu I.C. [Пер. Ю.С. Серомолот; под ред. В.Б.Матвеева]. Почечно-клеточный рак. Клинические рекомендации. 2010. 46 с.
3. Becker F, Siemer S, Hack M, Humke U, Ziegler M, Stöckle M. Excellent long-term cancer control with elective nephron-sparing surgery for selected renal cell carcinomas measuring more than 4 cm. // Eur Urol. 2006. Vol.49, N 2. P. 308-313.
4. Peycelon M, Hupertan V, Comperat E, Renard-Penna R, Vaessen C, Conort P, Bitker MO, Chartier-Kastler E, Richard F, Rouprêt M. Long-term outcomes after nephron sparing surgery for renal cell carcinoma larger than 4 cm. // J Urol. 2009. Vol. 181, N 1. P. 35-41.
5. Чернышев И.В., Алтунин Д.В., Самсонов Ю.В., Каллаев К.К. Новые возможности фотодинамической диагностики и лечения рака предстательной железы и почки. // Онкоурология. 2011. N 2 3. С.92-94.
6. Raschid HM, Popken G. Surgical Outcomes of fluorescence-guided laparoscopic partial nephrectomy using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. // J Surg Res. 2009. Vol.154, N 2. P.220-225.
7. Wyss P. History of photomedicine. // In book: Photomedicine in gynecology and reproduction. [ed. Wyss P, Tadir Y, Tromberg B.J., Haller U.]. – Basel: Karger, 2000. P.4-11.
8. Fukuhara H, Inoue K, Satake H, Tamura K, Karashima T, Yamasaki I, Tatsuo I, Kurabayashi A, Furihata M, Shuin T. Photodynamic diagnosis of positive margin during radical prostatectomy: Preliminary experience with 5 aminolevulinic acid. // Int J Urol. 2011. Vol. 18, N 8. P.585-591.
9. Sultan SM, El-Doray AA, Hofstetter A, Abdel-Gawad O, El-Mahdy Ael-D, Khoder W. Photodynamic selectivity of 5-aminolevulinic acid to prostate cancer cells. // J Egypt Natl Canc Inst. 2006. Vol. 18, N 4. P.382-386.
10. Сушков О.И. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в онкопроктологии (обзор литературы). // Колопроктология. 2008. N 4. С. 42-52
11. Cohen JK, Miller RJ Jr, Ahmed S, Lotz MJ, Baust J. Ten-year biochemical disease control for patients with prostate cancer treated with cryosurgery as primary therapy. // Urology. 2008. Vol.71, N 3. P.515-518.
12. Каллаев К.К. Интраоперационный фотодинамический контроль радикальности простатэктомии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2012. 32 с.
13. Denzinger S, Burger M, Walter B, Knuechel R, Roessler W, Wieland WF, Filbeck T. Clinically relevant reduction in risk of recurrence of superficial bladder cancer using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis: 8-year results of prospective randomized study. // Urology. 2007. Vol. 69, N 4. P. 675-679.
14. Ahmad S, Aboumarzouk O, Somani B, Nabi G, Kata SG. Oral 5-aminolevulinic acid in simultaneous photodynamic diagnosis of upper and lower urinary tract transitional cell carcinoma – a prospective audit. // BJU Int. 2012. Vol. 110, N 11, Pt. B. P. 596-600.
15. Inoue K, Karashima T, Kamada M, Kurabayashi A, Ohtsuki Y, Shuin T. Clinical experience with intravesical instillations of 5-aminolevulinic acid (5 ALA) for the photodynamic diagnosis using fluorescence cystoscopy for bladder cancer. // Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi. 2006. Vol. 97, N 5. P. 719-729.
16. Zaak D, Karl A, Knüchel R, Stepp H, Hartmann A, Reich O, Bachmann A, Siebels M, Popken G, Stief C. Diagnosis of urothelial carcinoma of the bladder using fluorescence endoscopy. // BJU Int. 2005. Vol. 96, N 2. P. 217-222.
17. Zaak D, Kriegmair M, Stepp H, Stepp H, Baumgartner R, Oberneder R, Schneede P, Corvin S, Frimberger D, Knüchel R, Hofstetter A. Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid: results of 1012 fluorescence endoscopies. // Urology. 2001. Vol. 57, N 4. - P. 690-694.
18. Zaak D, Frimberger D, Stepp H, Wagner S, Baumgartner R, Schneede P, Siebels M, Knüchel R, Kriegmair M, Hofstetter A. Quantification of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence improves the specificity of bladder cancer detection. // J Urol. 2001. Vol. 166, N 5. - P. 1665-1668. TNM. Классификация злокачественных опухолей 6-е издание [Пер. и ред. Н.Н. Блинова]. 2003. // URL: <http://www.oncology.ru/specialist/treatment/tnm>