

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научный центр рентгенорадиологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Станоевич Углеша

**Клиническое значение результатов молекулярно-генетических
исследований толстой кишки при колоректальном раке**

14.01.12 – онкология

**Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

**Научный консультант:
академик РАН,
доктор медицинских наук,
профессор В.А. Солодкий**

Москва - 2016

Оглавление

Оглавление.....	1
Список использованных сокращений.....	4
Введение	5
ГЛАВА 1. КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	16
1.1. Эпидемиология и факторы риска колоректального рака.	16
1.2. Классификация, морфологическая картина и патогенез колоректального рака.	26
1.3. Диагностика колоректальной аденокарциномы: современное состояние вопроса.	39
1.4. Эволюция методов лечения больных колоректальной аденокарциномой.	46
1.5. Молекулярно-генетический профиль опухоли как основа персонифицированной профилактики и лечения. Анализ причин неуспеха.	55
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ.....	68
2.1. Объект исследования. Критерии включения и исключения, формирование групп.	69
2.2. Методы исследования.	73
2.3.1 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).....	76
2.3.2 Методика пробоподготовки и ОТ-ПЦР в настоящем исследовании.....	81
2.4. Методы лечения.....	83
2.5. Методы статистического анализа данных.	84
ГЛАВА 3. КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ.....	86
3.1. Клиническая характеристика обследованных больных	86
3.2. Морфологическая характеристика удаленных препаратов.	100
3.3. Результаты молекулярно-генетического исследования, их интерпретация, клиническое и прогностическое значение.	108
3.3.1. Результаты анализа и интерпретация уровня экспрессии генов в исследованных группах образцов.	108
3.3.2. Клинико-молекулярные параллели при колоректальном раке: связь профиля экспрессии генов в исследованных образцах тканей больных КРР со стадией, наличием регионарных/отдаленных метастазов и прогрессированием	138

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	181
ВЫВОДЫ:.....	194
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	198
Приложение 1 Уровень экспрессии генов о образцах изучаемых тканей.....	200
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	210

Список использованных сокращений

АПХТ – адъювантная полихимиотерапия.

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМТ – Индекс массы тела.

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КРР – колоректальный рак.

КТ – компьютерная томография

ЛУ – лимфатические узлы

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МРТ – магнитно-резонансная томография

МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография

ОБ – Окружность бедер

ОТ – Окружность талии

ОТ-ПЦР - Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

РВ-ПЦР - Полимеразная цепная реакция в реальном времени

РНК – Рибонуклеиновая кислота

СЖК – Свободные жирные кислоты

УЗИ – Ультразвуковое исследование

ЭКГ – Электрокардиография

ASCO – American society of clinical oncology

FOBT – fecal blood occult test (анализ кала на скрытую кровь)

iFOBT – immunochemical fecal blood occult test (иммунохимический анализ кала на скрытую кровь)

NCCN – National Comprehensive Cancer Network

Введение

Актуальность темы

Колоректальный рак (КРР) занимает одно из ведущих мест в структуре онкологической заболеваемости и смертности во всем мире, несмотря на имеющийся арсенал высокочувствительных диагностических методов как рутинных (эндоскопических, рентгенологических, исследование кала на скрытую кровь), так и высокотехнологичных (КТ, МРТ, ПЭТ, молекулярно-генетический анализ энтероцитов в кале). (1, 2, 3)

По данным российского канцер-регистра за 2014 год впервые выявлено 544763 случая злокачественных новообразований. При этом на КРР пришлось 61874 наблюдение, что составило 11,4%; из них 25% - КРР IV стадии. (3) Неуклонный рост заболеваемости КРР свидетельствует об отсутствии эффективных мер профилактики, несмотря на изученность основных факторов риска рака толстой кишки с эпидемиологических позиций. (4)

Открытыми и широко дискутируемыми остаются ряд вопросов, связанных с особенностями поэтапного лечения КРР: необходимость адъювантной химиотерапии (АПХТ) при II стадии, прогнозирование ответа на назначение химио- и таргетных препаратов, целесообразность проведения циторедуктивной операции при IV стадии (1). Ряд исследований продемонстрировали разнонаправленную эффективность АПХТ при КРР II стадии, и до сегодняшнего дня не принято единых клинических рекомендаций (5, 6). Результаты большинства мета-анализов, посвященных этой проблеме, свидетельствуют о существовании тенденции в отношении эффективности использования АПХТ, однако, статистически значимого эффекта не получено. (7)

В течение последних двух десятилетий широко изучаются различные прогностические маркеры, которые могли бы позволить предвидеть эффективность адъювантного лечения и увеличить общую выживаемость на

3-5% при второй и 10-15% при третьей стадии заболевания с использованием в терапии 5-фторурацила в монорежиме и увеличении этих показателей на 3% при добавлении к терапии оксалиплатина. (8) До настоящего времени ни в одних клинических рекомендациях нет однозначного мнения по использованию полученных молекулярно-генетических данных для назначения адъювантной терапии больных КРР, а ее применение по-прежнему рекомендуется при наличии факторов риска, таких как положительный край резекции, низкая дифференцировка опухоли, кишечная непроходимость, сосудистая и/или периневральная инвазия, исследование менее 12 лимфатических узлов в препарате, прорастание всех слоев стенки кишки или перфорация опухоли. (8, 9) Тем не менее, и при таком подходе достаточно часто встречается непрогнозируемое прогрессирование заболевания, что, в свою очередь, говорит о его недостаточной эффективности.

Возможным решением проблемы может быть выделение категории пациентов с высоким риском рецидивирования (в т.ч. местного рецидива, отдаленного метастазирования) с использованием методов молекулярно-генетического анализа, в частности, анализа экспрессии генов, способного дать дополнительную информацию о пролиферативной и метастатической активности опухоли (10, 11, 12). Существующие прогностические модели (OncotypeDXcoloncancer™ (GenomicHealth, Inc.), Coloprint (Agendia), ColDx) (13, 14, 15) моделируют вероятность рецидива на основе оценки уровня экспрессии генов в ткани опухоли. Однако, данные модели не дают возможность прогнозировать эффективность планируемой АПХТ и в связи с этим не рекомендованы к клиническому использованию (8; 9). Кроме того, ни одна из существующих моделей не позволяет прогнозировать длительность периода безрецидивной выживаемости (13, 14, 15).

Возможной причиной отсутствия детального прогноза времени рецидива, эффективности адъювантного лечения является углубление и детализация молекулярных характеристик преимущественно первичной опухоли, при этом систематически упускается из виду системность

опухолевого процесса как такового. Данная особенность уводит в сторону от изучения другой особенности опухолевого роста – изменений со стороны основных систем поддержания внутреннего гомеостаза – иммунной и нейроэндокринной, которые, по-видимому, носят ранний, а, возможно, и первичный характер.

Анализ экспрессии генов в «морфологически неизменной ткани толстой кишки, окружающей опухоль», исследование, которое не проводится ни в одной из прогностических моделей, также может быть независимым фактором прогноза безрецидивной и общей выживаемости больных. (11, 16, 17) Несмотря на отдельные публикации, комплексное прогностическое значение сравнительного анализа экспрессии генов в опухоли и тканях, окружающих опухоль, до настоящего времени не изучалось.

Помимо этого, обращает на себя внимание некоторая скудность научных публикаций последнего десятилетия, посвященных различным аспектам диагностики и лечения КРР. Несмотря на обилие изучаемых инструментальных и лабораторных, в том числе биомолекулярных параметров, а также влияние последних на чувствительность к тому или иному варианту терапии, общую и безрецидивную выживаемость, попыток проследить клинико-молекулярные параллели и фенотипические особенности больных КРР нами не обнаружены.

Кроме того, абсолютное большинство исследователей, изучающих молекулярно-генетические особенности опухоли, в качестве образцов контроля используют «морфологически неизменную кишку» того же пациента, что противоречит работам патоморфологов, детально изучавшим микроскопические и ультрамикроскопические особенности как опухоли, так и прилегающих участков толстой кишки. (18, 19, 20) Выше сказанное ставит под сомнение правильность трактовки полученных отличий в экспрессии тех или иных генов в ткани опухоли по сравнению с прилегающими участками толстой кишки, свободными от опухолевой

инвазии.

Кроме того, дальнейшее изучение молекулярно-генетических особенностей КРР все больше указывает на значительную гетерогенность опухоли данной локализации даже при сходной морфологической картине (степень дифференцировки, глубина инвазии, наличие регионарных и отдаленных метастазов) и необходимости дополнения морфологического диагноза молекулярным, который, по-видимому, в большей степени приближает врача к пониманию *этиологии* заболевания (1, 2). Таким образом, очевидна необходимость продолжения фундаментальных клинических исследований в данном направлении, результаты которых могут стать основой для изменения диагностической, лечебной и профилактической концепции при злокачественном росте в целом.

В связи с изложенным выше сформулирована **цель исследования:**

Изучить и клинически оценить результаты молекулярно-генетических исследований толстой кишки для обоснования оптимизации лечебно-диагностического алгоритма при колоректальном раке.

Достижение поставленной цели осуществлялось путем решения следующих **задач исследования:**

1. Изучить клинические особенности больных и морфологические характеристики опухоли при колоректальном раке.

2. Провести анализ локализации первично-множественного опухолевого поражения при колоректальном раке для оптимизации алгоритма обследования пациентов с полинеоплазиями.

3. Проанализировать экспрессию 64 генов, ответственных за пролиферацию, апоптоз, ангиогенез, адгезию, ремоделирование

межклеточного матрикса, регуляцию врожденного и приобретенного иммунитета в четырех группах образцов: образцах ткани опухоли, метастаза, слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком и контрольных образцах.

4. Проанализировать взаимосвязь уровня экспрессии изучаемых генов с клиническими характеристиками пациентов и морфологическими параметрами опухоли.

5. Провести сравнительный анализ пролиферативной активности на основании оценки экспрессии гена Ki-67 в изучаемых группах образцов.

6. Проанализировать особенности регуляции пролиферации в ткани первичной опухоли, ткани метастаза и ткани слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев на основании выявленных отличий в уровне экспрессии изучаемых генов.

7. Исследовать молекулярно-генетический профиль слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста больных колоректальным раком на ранних стадиях заболевания.

8. Провести сравнительный анализ молекулярно-генетического профиля ткани метастаза колоректального рака и ткани первичной опухоли.

9. Определить наличие и характер связи между уровнем экспрессии изучаемых генов в ткани слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком и ткани первичной опухоли в зависимости от:

- глубины инвазии первичной опухоли.
- наличия регионарных и отдаленных метастазов
- прогрессирования заболевания

10. Обосновать клиническую целесообразность проведения молекулярно-генетического исследования слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста при колоректальном раке.

Научная новизна

Впервые проведен одновременный анализ экспрессии 64 генов, ответственных за ключевые процессы поддержания гистоархитектоники тканей (пролиферации, апоптоза, ангиогенеза, адгезии, ремоделирования межклеточного матрикса, маркеров и факторов врожденного и приобретенного иммунитета, рецепторов эстрогенов и прогестерона, ароматазы) в 342 образцах ткани аденокарциномы толстой кишки, ее метастазов в печень, слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком и слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев.

Получены достоверные результаты молекулярно-генетических исследований, свидетельствующие об угнетении пролиферации в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком, а также о сходной интенсивности пролиферации в ткани опухоли, метастазах и в слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев. Установлены различия в регуляции механизмов пролиферации в исследуемых группах.

Впервые дана детальная молекулярно-генетическая характеристика слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста больных колоректальным раком, не позволяющая рассматривать данную ткань как «здоровую» для использования ее в качестве контрольных образцов, что подтверждено достоверными различиями экспрессии генов IFN- γ , IL-8, IL-15, NDRG1, CD68, BAG1, TNF- α , STK15, Ki-67, CCNB1, IL-6, TERT, CCND1, GRB7, P16, MYBL2, BIRC5, PTEN, SCUBE2, IL-10 в ткани слизистой оболочки толстой кишки уже при I-II стадии колоректального рака и ткани слизистой оболочкой толстой кишки здоровых лиц.

На основании впервые выявленных статистически значимых различий экспрессии CCND1, NDRG1, CD68, HER2, ESR1, SCUBE2, GREM1, MMP7, IL-2, MMP8, IL-2R, IL-1 β , VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, TLR2, TGF- β , TLR7, HLA-G5 установлены отличия в механизмах регуляции пролиферации, ремоделирования межклеточного матрикса и ангиогенеза в метастазе колоректального рака в печень по сравнению с первичной опухолью.

Установлена связь экспрессии различных групп генов собственно в опухоли P16, IL7, IL2, BAX, CD56, MMP11, IL12a, TLR4, CD45, GNLY, LIFR, IL15, MMP2, IL2Ra, CD69, VEGFA121 и слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста больных колоректальным раком CTSL2, CCNB1, MYBL2, TERT, GREM1, CYP19A с развитием регионарных и отдаленных метастазов.

Впервые выявлено, что величина отличий уровня экспрессии изученных генов в образцах слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком от аналогичного показателя в группе контроля ассоциирована со стадией заболевания, наличием и количеством отдаленных метастазов, прогрессированием процесса.

Обоснована целесообразность изучения молекулярно-генетического профиля как первичной опухоли, так и слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста для разработки персонализации лечебно-диагностической тактики при колоректальном раке.

Практическая значимость

Практическая значимость работы заключается в основанных на учете выявленных клинических особенностей первично-множественного злокачественного поражения при колоректальном раке (молочные железы,

предстательная железа, другой отдел ободочной и прямой кишки, эндометрий, яичники, почки, желудок) предложениях по уточнению диагностического алгоритма при КРР и включению маммографии, ультразвукового исследования предстательной железы и анализа крови на PSA при аденокарциноме толстой кишки, а также колоноскопии при аденокарциноме молочных желез, предстательной железы и почек.

Учитывая доказанную роль ожирения в развитии первичной множественности злокачественного поражения толстой кишки, молочных желез, предстательной железы, эндометрия, яичников, почек и желудка, обоснована необходимость проведения прицельного онкопоиска по указанным локализациям у пациентов с ИМТ ≥ 30 кг/м².

Слизистая оболочка толстой кишки больных колоректальным раком не может быть использована в качестве контрольных образцов при разработке референсных значений тканевых молекулярно-генетических маркеров ввиду выявленных молекулярно-генетических отличий между слизистой оболочкой толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста и слизистой оболочкой толстой кишки здоровых добровольцев.

Определена необходимость оценки экспрессии генов P16, IL7, IL2, BAX, CD56, MMP11, IL12a, TLR4, CD45, GNLY, LIFR, IL15, MMP2, IL2Ra, CD69, VEGFA121 собственно в первичной опухоли и генов CTSL2, CCNB1, MYBL2, TERT, GREM1, CYP19A в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком для формирования групп риска по прогрессированию колоректального рака и обоснована целесообразность проведения молекулярно-генетического исследования слизистой оболочки толстой кишки без макро- и микроскопических признаков опухолевого роста в указанных группах.

Положения диссертации, выносимые на защиту

- Пролиферация в образцах первичного колоректального рака, метастаза и слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев характеризуется сходной интенсивностью при различных механизмах регуляции ее поддержания.
- Уровень экспрессии ряда генов в ткани первичной колоректальной аденокарциномы и ткани слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком ассоциирован с предрасположенностью к регионарному и отдаленному метастазированию.
- Слизистая оболочка толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком, начиная с ранних стадий заболевания, характеризуется молекулярно-генетическими отличиями экспрессии ряда генов от слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев, а величина отличий коррелирует со стадией заболевания, наличием и количеством отдаленных метастазов и прогрессированием.
- Высокая частота первичной множественности с наиболее частым поражением молочных желез у женщин, предстательной железы, другого отдела ободочной и прямой кишки, эндометрия, яичников, почек и желудка является характерной клинической особенностью колоректальной аденокарциномы и диктует необходимость проведения дополнительного прицельного онкопоиска по данным локализациям в процессе обследования больных.
- Взаимосвязь между содержанием мРНК изученных генов в исследованных группах образцов тканей больных колоректальным раком и возрастными, гендерными, антропометрическими особенностями пациентов, а также первичной множественностью и мультицентричностью опухолевого роста, гистологическим строением опухоли, отсутствует.

- Молекулярно-генетическая картина первичной опухоли и слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком является основой для оценки риска возникновения и прогрессирования аденокарциномы толстой кишки.

Внедрение результатов работы:

Результаты исследования внедрены в клиническую практику научно-исследовательского отдела хирургии и хирургических технологий в онкологии ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» МЗ РФ. Материалы диссертации используются при чтении лекций и проведении практических занятий со студентами кафедры онкологии и рентгенорадиологии медицинского института Российского университета дружбы народов.

Апробация работы:

Материалы работы доложены на II всероссийском научно-практическом конгрессе «Рентгенорадиология в России. Перспективы развития» г. Москва 2012 г., VIII съезде онкологов и радиологов СНГ и Евразии г. Казань 2014 г., I (2015 г.) и II Петербургском онкологическом форуме г. Санкт-Петербург, 2016 г., Всероссийском конгрессе с международным участием «Хирургия – XXI век: соединяя традиции и инновации», на XX Российском онкологическом конгрессе г. Москва 2016 г.,

Апробация работы состоялась на совместном заседании Ученого совета и научно-практической конференции ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России 18 апреля 2016 года.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 25 работ: из них статей в журналах рекомендованных ВАК РФ 16, тезисов в материалах научных конференций – 9

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, четырёх глав (обзор литературы, методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Текст диссертации изложен на 235 страницах машинописного текста, иллюстрирован 43 таблицами, 93 диаграммами, 1 рисунком. Библиографический указатель включает 354 источника: из них 39 русскоязычных, 315 зарубежных.

Глава 1. Колоректальный рак: современное состояние проблемы. (Обзор литературы)

1.1. Эпидемиология и факторы риска колоректального рака.

Колоректальным раком с позиций современной терминологии называют аденокарциному слепой, ободочной, сигмовидной и прямой кишки. Плоскоклеточное злокачественное поражение анального канала составляет самостоятельную группу неоплазий, этиологически связанную с персистенцией вируса папилломы человека.

Длительная история изучения причин развития злокачественного поражения слизистой оболочки толстой кишки позволила четко выделить две группы пациентов: подавляющее большинство клинических наблюдений колоректальной аденокарциномы развивается спорадически, по-видимому, под действием модифицируемых факторов риска; меньшую долю пациентов составляют больные с наследственной предрасположенностью к колоректальному раку вследствие мутации в того или иного гена, задействованного в APC-сигналинге. У данной группы больных злокачественное поражение толстой кишки возникает в молодом возрасте, и ввиду установленного наследственного анамнеза они находятся под особым контролем, направленным на раннюю диагностику предрака и рака толстой кишки.

По данным Всемирной организации здравоохранения злокачественные новообразования являются одной из ведущих причин инвалидизации и смертности населения в экономически развитых странах. В 2012 году в мире зарегистрировано около 14 миллионов новых случаев онкологических заболеваний, при этом смертность составила 8,2 миллиона пациентов. Из них колоректальный рак (КРР) является третьим наиболее распространенным раком у мужчин (746 000 случаев или 10,0% от общего количества), и вторым у женщин (614 000 случаев или 9,2% от общего числа).

Смертность от данного заболевания служит четвертой наиболее распространенной причиной смерти от онкологических заболеваний во всем мире и составляет около 694 000 ежегодно. (2, 21, 22)

Средний возраст развития/ диагностики КРР составляет 61-63 года. Таким образом, страны с низкой средней продолжительностью жизни характеризуются низкой заболеваемостью КРР. (21, 22) Наибольшие показатели заболеваемости отмечаются в экономически развитых странах, таких как: Австралия и Новая Зеландия, страны западной Европы и Северной Америки, а самые низкие — в Африке и Центральной и Южной Азии. Для стран с низким уровнем жизни характерны в несколько раз меньшие показатели заболеваемости КРР. (2, 21, 23)

Ряд авторов указывают на то, что помимо собственно диеты, важное значение имеют особенности микронутриентного состава почвы и воды, влияющие на поступление эссенциальных микроэлементов с продуктами питания. Эссенциальность многих микроэлементов обусловлена участием и незаменимостью в окислительно-восстановительных, антиоксидантных и др. процессах в живых системах. Таким образом, их субоптимальное поступление становится абсолютно недостаточным в условиях напряженного функционирования того или иного физиологического процесса. Безусловной повышенной нагрузкой на антиоксидантную системы и систему инактивации и элиминации тяжелых металлов является проживание и работа в условиях мегаполиса, что *частично* может объяснить повышенную заболеваемость в экономически развитых странах. Наиболее интенсивный прирост заболеваемости КРР наблюдается в Индии, Аргентине, России и некоторых государствах. (24, 25)

По данным Каприна А.Д. и соавторов (2016), распространенность КРР в России продолжает прогрессивно увеличиваться и в 2014 году, составляет 236 случаев на 100000 населения, тогда как в 2004 году данный показатель равнялся 147,7 наблюдениям на 100000 населения. (3, 26)

Особенностью проблемы КРР в России является его низкая выявляемость на ранних (I и II) стадиях процесса на фоне высокой летальности в течение первого года после выявления. Так, для прямой кишки данные показатели в 2014 году составили 49,0% и 28,4%, а для ободочной 43,1% и 24,9% соответственно. (3)

Andrew T. Chan и Edward L. Giovannucci в 2010 году опубликовали подробный обзор литературы, посвященный факторам риска КРР, в котором все существующие факторы разделены на 3 группы: диета, образ жизни и медикаменты. (27) По данным ВОЗ, более 30% случаев онкологических заболеваний можно предотвратить путем эффективного контроля и оптимизации действующих на организм факторов внешней среды. (21, 27)

Понимание основных модифицируемых факторов риска КРР, по мнению большинства авторов, является основным ключом к разработке мер первичной профилактики на государственном уровне. Так, доказано, что повышенное употребление слабо термически обработанного красного мяса и алкогольных напитков, дефицит витамина Д3, фолиевой кислоты, ожирение и сахарный диабет 2 типа, гиподинамия и хронический запор достоверно повышают риск развития КРР. В качестве антифакторов риска выступает адекватное потребление молока, селена, кальция, клетчатки и фолатов. (21)

Не исключено, что гиперкалорийная диета с низким общим содержанием клетчатки, витаминов (например, фолиевой кислоты) и микроэлементов (например, кальция) реализует свое проканцерогенное действие через изменение состава кишечной микрофлоры, в том числе при хроническом запоре. Изменение состава кишечной микрофлоры влияет на эндогенную продукцию канцерогенов, их метаболизм, а также печеночную рециркуляцию ксенобиотиков и гормонов, а также, косвенно, на детоксикационную функцию печени. (28, 29)

Количество ксенобиотиков, которые в результате метаболизма в организме человека превращаются в соединения с канцерогенными свойствами, чрезвычайно велико. Со многими из них существующие живые

организмы встречаются впервые, т.е. до сих пор не выработано в ряду поколений ферментов, способных окислить ряд искусственно синтезированных человеком соединений. Многие из них используются в промышленном земледелии, производстве товаров народного потребления. (30, 31) Особое внимание исследователями данного вопроса уделяется нитрозосоединениям, действующим на активацию протоонкогенов. Так, помимо использования в диете пищевых нитритов, выраженными канцерогенными свойствами могут обладать азотосодержащие продукты белкового метаболизма, в частности ароматические амины и индолы, образующиеся в процессе гниения белка в толстой кишке при запоре. Существенным эндогенным канцерогенным фактором служат вторичные желчные кислоты, образующиеся из первичных желчных кислот под действием ферментов кишечных бактерий. (28)

Другим важным пищевым фактором риска КРР, согласно мнению многих авторов, необходимо рассматривать этиловый спирт. Согласно данным метаанализа Yue Wang и соавт. (2015) установлена прямая корреляционная связь между количеством потребляемого алкоголя и риском рака ободочной и прямой кишки. (32) Основными причинами влияния алкоголя на канцерогенез считается его отрицательное влияние на всасывание профилактических компонентов питания в кишечнике и, прежде всего, фолиевой кислоты, а также прямое токсико-метаболический эффект на функциональные и структурные элементы органов пищеварительного тракта и нарушение оптимального уровня потребления продуктов, составляющих основу профилактического питания. (28)

Не менее значимым модифицируемым фактором риска КРР рассматривается гиподинамия. (33, 34) Результаты метаанализа, проведенного К.У. Wolin и соавт. в 2009 году, подтверждают значение физической активности в профилактике КРР: физически активные люди имеют на 20-30% меньше риск заболеть КРР. (35) Достаточный уровень физической активности как «антифактор» риска КРР объясняется следующим образом. С одной

стороны, умеренные физические нагрузки стимулируют мобилизацию жирных кислот из жировой ткани, а регулярные занятия ограничивают отложения жировой ткани. С другой стороны, умеренные физические нагрузки оказывают положительное влияние на различные звенья иммунитета и его состояние при различных видах патологии, и в частности, онкопатологии. (28) Не исключено, что самым мощным положительным моментом физических нагрузок в отношении КРР является улучшение моторики желудочно-кишечного тракта и процесса пищеварения в целом. (28) Помимо этого, весьма вероятно значение роли повышения чувствительности тканей к инсулину, несмотря на то, по результатам Дехисси Е.И., повышенные значения инсулина не увеличивали риск прогрессирования КРР. (36)

Самым частым, упоминаемым в литературе, фактором риска КРР является заболевание, объединяющее практически все «модифицируемые» факторы риска - ожирение. Именно к ожирению приводят и гиподинамия, и диета с повышенным содержанием углеводов, жиров и низким содержанием клетчатки. (21, 27, 37, 38) По данным ВОЗ в мире более 1,5 млрд человек имеют избыточную массу тела, из них не менее 500 млн. страдают ожирением. (39) В 2008 году группой авторов проведен крупный метаанализ, в котором рассмотрена 141 научная публикация, посвященная изучению связи онкопатологии и ожирения. Данное исследование показало наличие связи между увеличением ИМТ на 5 кг/м² и аденокарциномой толстой кишки (ОР – 1,24; $p < 0,0001$). При этом для КРР положительная связь прослеживалась сильнее ($p < 0,0001$) у мужчин, чем у женщин (38). Внятной трактовки гендерных различий по влиянию повышенного ИМТ на риск КРР в проанализированных научных публикациях нами не обнаружено.

Роль ожирения прослеживается как в инициации, так и в промоции онкотрансформации слизистой оболочки толстой кишки. Данная связь объясняется негативным влиянием ожирения на риск КРР посредством нескольких взаимно потенцирующих механизмов. Ожирение приводит к системной провоспалительной реакции и, как следствие, повышению

окислительного стресса и запуску внутриклеточных путей, способствующих выживанию опухолевых клеток толстой кишки, что играет важнейшую роль в развитии КРР. (36)

Рассматривая ожирение в качестве участника канцерогенеза КРР, необходимо отметить важную роль висцерального характера накопления жировой ткани. Висцеральный жир (бурая жировая ткань), представленный сальником, брыжеечным жиром и др., метаболически активнее периферического подкожного жира (белая жировая ткань). Таким образом, фактором риска является не просто ожирение и увеличение индекса массы тела, а именно висцеральное ожирение. (40, 41)

Висцеральная жировая ткань в связи с характерной для нее интенсивным липолизом, является источником избытка свободных жирных кислот (СЖК) в крови, которые используются клетками в качестве преимущественного источника энергии, что приводит первоначально к развитию гипергликоземии, а затем – к последовательной гиперинсулиемии и инсулинорезистентности (42). Блокада физиологических эффектов инсулина стимулирует экспрессию факторов роста, в частности, инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1), сосудистого фактора роста (VEGF), содействующих прогрессии неопластической трансформации путем патологической активации внутриклеточных сигнальных путей с последующей индукцией экспрессии генов, участвующих в стимуляции воспаления, ангиогенезе и пролиферации (43). Развитию и поддержанию инсулинорезистентности способствует изменение секреции адипокинов при ожирении. Снижается выработка адипонектина, важной функцией которого является повышение чувствительности периферических тканей к инсулину и предотвращение взаимодействия факторов роста с рецепторами на поверхности клеток. Параллельно с этим возрастает синтез лептина и резистина (44). Развивающаяся гиперлептинемия способствует снижению синтеза инсулина, при этом патологическая стимуляция лептиновых рецепторов на поверхности клетки усугубляет процессы онкотрансформации, протекающие под

действием факторов роста, активированных инсулинорезистентностью (45, 46). В свою очередь, стимуляция макрофагов приводит к повышенному синтезу резистина. Гиперпродукция резистина обуславливает усиление его физиологических эффектов: нарушение связи инсулина с инсулиновым рецептором и стимуляцию синтеза ИЛ-6 и TNF- α макрофагами. Важно отметить, что эта связь в условиях висцерального ожирения замыкается в порочный круг (42).

В процессе онкотрансформации эпителия толстой кишки на фоне ожирения существенное значение имеет понимание изменений в системе инсулин - инсулиновый рецептор - инсулиноподобный фактор роста (IGF1), связывающий белок (IGF BP). Нарушения, происходящие в данной цепи в условиях избытка СЖК, по данным многих авторов, приводят к нарушению функций поджелудочной железы и, в конечном счете, к состоянию, которое расценивается как сахарный диабет 2 типа. Данные нарушения становятся определяющими факторами в формировании и выживании опухолевого клона клеток (47). Избыток висцерального жира, в частности брыжеечного жира, помимо своего системного действия, создает условия локальной хронической гипоксии для колоноцитов. В результате длительного снижения содержания O₂ и избытка СЖК в крови колоноциты переходят на анаэробный тип дыхания. В норме подавление аэробного гликолиза стимулирует апоптоз (48, 49). Выжившие клетки, компенсаторно увеличивают на своей поверхности количество инсулиновых рецепторов. Высоким средством к ним, помимо инсулина, обладает IGF1, концентрация которого возрастает в условиях инсулинорезистентности при ожирении. Параллельно снижается продукция IGF BP3, обладающего высоким средством к IGF1 и модулирующего его физиологические эффекты в нормальных условиях. Благодаря сходному строению IGF1 и инсулина, эти гормоны способны перекрестно связываться со своими рецепторами на мембранах клеток, при этом аффинность IGF1 к инсулиновому рецептору почти в 100 раз ниже, чем к рецептору инсулиноподобного фактора роста, однако, при их взаимодействии, на клетку

оказывается более сильный ростовой эффект. С другой стороны, инсулин достаточно активно способен связываться с рецептором IGF1. Несмотря на то, что в результате этого митотический эффект на клетку реализуется хуже, общий результат оказывается достаточно значимым (50, 51). В условиях гипергликоземии, гиперинсулинемии и инсулинорезистентности клетка, активно стремясь к выживанию, усиливает экспрессию инсулиновых и IGF1-рецепторов на своей мембране. Исход конкурентной борьбы инсулина и IGF1 за связь с рецепторами определяется более коротким сроком жизни и быстрым обновлением ИР. В итоге ИФР1 связывается с IGF1-рецепторами (IGF1R), при этом, несмотря на невысокую аффинность, избыток IGF1 связывается с быстро обновляющимися инсулиновыми рецепторами, оказывая в сумме высокий митотический эффект на опухолевую клетку. С другой стороны, высокие концентрации инсулина в созданных условиях не способны полноценно взаимодействовать с ИР, но имеют высокое сродство к IGF1R; в итоге, митогенный эффект, реализуемый взаимодействием инсулина с IGF1R, хоть и меньше по силе, но в совокупности имеет большое значение. В результате вместо эффективного энергопотребления глюкозы и нормального функционирования в клетке практически непрерывно активируются внутриклеточные сигнальные пути (Akt\PIK, MAPK, Ras белков), приводящие к ингибированию апоптоза и синтезу факторов роста (сосудистый, эндотелиальный), необходимых для выживания (51, 52). Помимо этого, при высоком уровне глюкозы крови в условиях гиперинсулинемии, инсулинорезистентности на поверхности опухолевых клеток увеличивается плотность рецепторов, переносчиков глюкозы - GLUT4, для обеспечения усиления притока глюкозы в клетку. В условиях гипоксии опухолевой клетки в митохондриях нарастают процессы анаэробного гликолиза и, как результат, возрастает производство лактата, способствуя сдвигу кислотно-основного состояния в сторону ацидоза («кислая микросреда») (53). В подобных условиях в нормальных тканях активируются каспазы, ответственные за апоптоз, однако, опухолевые клетки уклоняются от гибели за счет усиления

деятельности ионного насоса мембраны (54). В результате сохраняющийся ацидоз и, в дополнение к этому, кислотно-опосредованная активация матричных металлопротеиназ (ММП), приводит к разрушению внеклеточной матрицы нормальных тканей, окружающих опухоль, способствуя миграции опухолевых клеток (55, 56).

Тесно связанное с ожирением, но и в качестве самостоятельного фактора риска КРР, выступает *воспаление*. Несмотря на то, что уже длительный период известно, что воспаление и злокачественная трансформация тканей связаны, четкие механизмы воспаления остаются недостаточно понятными. Некоторые работы указывают на роль локальной воспалительной реакции в развитии эпигеномных изменений (метиляции ряда чувствительных генов), ассоциированных с онкотрансформацией. (57) Согласно мнению как отечественных, так и зарубежных авторов, заболевания толстой кишки, характеризующиеся персистирующей сменой эрозивно-язвенного поражения и регенерацией с закономерной хронической воспалительной реакцией (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, хронический свищ) необходимо относить к предраковым состояниям. (Струков, ВОЗ). Одним из ключевых цитокинов, связанных с процессом злокачественной трансформации на фоне воспаления, основным является фактор некроза опухолей (TNF). (58)

Некоторые авторы указывают на то, что воспаление имеет свою определенную патогенетическую роль на любом этапе опухолевого процесса от инициации до прогрессии. (59) Именно на фоне воспаления происходит высвобождение различных цитокинов и хемокинов, что вызывает окислительное повреждение, мутации ДНК и другие изменения микросреды, которая становится благоприятной почвой для трансформации клеток, снижения апоптоза и увеличения пролиферации. Воспаление также способствует ремоделированию межклеточного матрикса, стимуляции ангиогенеза, а также фиброзу в так называемых тканях-мишенях. Незрелость/постоянное ремоделирование межклеточного матрикса,

неполноценность в функциональном отношении стромы зоны онкотрансформации и, в конечном итоге, фиброз/ склероз стромы, приводит к явным ишемическим и некротическим процессам в опухоли, что может быть фактором развития таких осложнений как кровотечение, перфорация; а также способствовать процессам метастазирования. Среди всех воспалительных сигнальных путей клетки NF- κ B играет наибольшую роль в опухолевой трансформации, а TNF является самым мощным активатором этого пути. (60, 61) Colditz et al. считает, что практически 50% всех онкологических заболеваний возможно предотвратить путем своевременного и адекватного лечения воспалительных заболеваний. (62)

В свете патогенетического значения хронического воспаления в развитии колоректальной аденокарциномы становится очевидной защитная роль длительного приема ингибиторов циклооксигеназы (нестероидных противовоспалительных средств) в отношении аденом и рака толстой кишки. (63; 64) Вместе с тем, некоторые авторы отмечают снижение риска КРР на фоне приема нестероидных противовоспалительных препаратов *только* среди пациентов с индексом массы тела более 25 кг/м². В 2015 году Rommergaard Н.С. и соавт. опубликовали результаты рандомизированного исследования об отсутствии влияния нестероидных противовоспалительных препаратов на риск *рецидива* аденом прямой и ободочной кишки. (65)

Таким образом, на основании вышеперечисленных факторов риска КРР существует значительный потенциал для разработки и применения мер первичной профилактики КРР. С учетом неспецифичности всех перечисленных факторов риска, а также факторов, являющихся профилактическими в отношении развития и течения КРР, еще длительное время будет существовать полемика относительно конкретных составляющих диеты, медикаментозного лечения и физической нагрузки, что требует дальнейших крупных рандомизированных исследований. В тоже время, разработка рекомендаций для населения об изменении структуры питания в целом, в сторону увеличения потребления клетчатки и растительных белков

использование неочищенного зерна, бобовых и фруктов, как основного источника углеводов, уменьшение употребления животных жиров, сможет в значительной мере снизить показатели заболеваемости КРР. Основная трудность заключается в необходимости массового изменения стиля жизни, что и представляет собой наиболее сложную для выполнения задачу, посильную только при государственном подходе к ее решению. Перспективным, но практически неисследованным направлением клинической диетологии, служит разработка специальных диет для больных колоректальным раком и злокачественными новообразованиями в целом.

В современных условиях применительно к Российской Федерации важнейшей задачей является ранее выявление колоректальной аденокарциномы, диагностика предраковых заболеваний толстой кишки, анализ и оценка значительного количества данных уже проведенных фундаментальных исследований, касающихся механизмов онкотрансформации слизистой оболочки толстой кишки и продолжение поиска молекулярно-генетической основы для персонифицированной онкопрофилактики и лечения КРР.

1.2. Классификация, морфологическая картина и патогенез колоректального рака.

С начала формирования онкологии как медицинской науки ученые пытаются сгруппировать опухоли по локализации, гистологическому принципу, распространению, наличию регионарных и отдаленных метастазов, а также выделить основные симптомы и синдромы, ассоциированные той или иной локализацией для стандартизации и систематизации лечебно-диагностических подходов, понимания прогноза заболевания и его улучшения.

Первая классификация рака прямой кишки принадлежит английскому патологоанатому Куберту Дюку (Cuthbert Dukes), (1929). Автором впервые были выделены 3 стадии заболевания по принципу глубины инвазии опухоли и наличия поражения лимфатических узлов: А - опухоль ограничена стенкой кишки; В - опухоль прорастает стенку кишки; С - наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах. (66) В последующем классификация по К.Дюку была дополнена В.Б.Астлером и Ф.А. Коллером в 1954 г. (Vernon B. Astler и Frederick A. Coller.), в соответствии с которой: А - опухоль ограничена слизистой; В1 - опухоль врастает, но не прорастает мышечную оболочку; В2 - опухоль прорастает серозную оболочку, но нет метастазов в регионарных лимфатических узлах; В3 - опухоль распространяется на соседние структуры; С1- В1 + метастазы в регионарных лимфатических узлах; С2- В2 + метастазы в регионарных лимфатических узлах; С3- В3 метастазы в регионарных лимфатических узлах; D - отдаленные метастазы. (67)

В настоящее время неоплазии ободочной и прямой кишки классифицируется как по TNM классификации 7 пересмотра, так и по гистологическому строению первичной опухоли. (68, 69) Обращает на себя внимание, что определение гистологического типа опухоли (ее «микроскопического фенотипа») за последние 10 лет стало носить больше традиционный, нежели прогностический характер. Согласно ряду зарубежных исследований, именно данные TNM классификации (глубина инвазии Т) и предложенный молекулярный профиль опухоли влияет на прогноз (риск прогрессирования). (15, 70) Однако данная коммерческая тест-система и другие предложенные рядом исследователей комбинации генов, экспрессия которых ассоциирована с прогрессированием заболевания, не обладают способностью уловить «биологические часы» опухоли, т.е. предсказать продолжительность ремиссии, что существенно затрудняет их практическое применение. По-видимому, до сих пор не установлены биомолекулярные или биофизические характеристики ритмов опухолевой системы.

Таким образом, на основании TNM классификации проводится стадирование процесса с последующим определением тактики лечения пациента (с традиционным учетом гистологического строения опухоли):

- Стадия 0: TisN0M0
- Стадия I: T1N0M0; T2N0M0
- Стадия IIА: T3N0M0
- Стадия IIВ: T4aN0M0
- Стадия IIС: T4bN0M0
- Стадия IIIА: T1N1M0; T2N1M0; T1N2aM0;
- Стадия IIIВ: T3N1M0; T4aN1M0; T2N2aM0; T3N2aM0; T1N2bM0; T2N2bM0
- Стадия IIIС: T4aN2aM0; T3N2bM0; T4aN2bM0; T4bN1M0; T4bN2M0
- Стадия IVа: Любая Т, любая N, M1a
- Стадия IVb: Любая Т, любая N, M1b

В ряде онкологических клиник для определения целесообразности использования анти-EGFR терапии дополнительно проводится оценка наличия KRAS-мутации. Другие молекулярно-генетические исследования проводятся в рамках научных работ того или иного учреждения и не используются рутинно.

Согласно морфологической классификации колоректальная аденокарцинома относится к эпителиальным новообразованиям толстой кишки. В зависимости от степени дифференцировки выделяют низко-, умеренно- и высокодифференцированные опухоли.

По мнению патоморфологов, к предраку толстой кишки необходимо относить аденомы (аденоматозные полипы) (71), а также хронический язвенный колит (болезнь Крона и неспецифический язвенный колит), хронические свищи толстой кишки. (72) Риск малигнизации аденом толстой кишки, по данным различных авторов, достигает 10,0% при ворсинчатом строении доброкачественной опухоли. Гиперпластические полипы не рассматриваются в качестве предраковых заболеваний толстой кишки,

несмотря на патогенетическую связь с воспалительной реакцией слизистой оболочки толстой кишки и частую ассоциацию с появлением BRAF-мутации.

Необходимо подчеркнуть, что согласно данным литературы, существуют лишь доминирующие при той или иной локализации опухоли (право-/ левосторонней) механизмы развития. Абсолютных молекулярных критериев, позволяющих говорить о локализации, гистологическом строении, TNM стадии процесса на данный момент развития науки не существует, но исследовательский поиск продолжается.

К патогенетическим механизмам развития колоректальной аденокарциномы относят

1. Геномную нестабильность:

- хромосомную нестабильность,
- микросателлитную нестабильность; и

2. эпигеномную нестабильность:

- гипометилирование интронных и экзонных участков генов (реже и в молодом возрасте),
- гиперметилирование промоторных участков генов (появление метиляторного фенотипа опухоли).

Необходимо еще раз подчеркнуть, что уточнение патогенетического механизма опухоли с использованием методов молекулярной генетики в настоящее время приобрело большее прогностическое значение по сравнению с определением гистологического варианта рака толстой кишки. Проанализированные источники литературы за последние 5 лет не указывают на гистологический вариант опухоли как на важный фактор, определяющий лечебную тактику и прогноз заболевания. Основную роль, наряду со стадией злокачественного процесса, должно приобрести уточнение молекулярного механизма поддержания неопластических характеристик опухоли (пролиферации, инвазии, метастазирования, прогрессии), который рассматривается главным фактором, влияющим на скорость

прогрессирования, чувствительность к проводимой химио- или таргетной терапии.

В 1990 году Fearon и Vogelstein предложена модель канцерогенеза КРР, которая характеризует злокачественную трансформацию слизистой оболочки толстой кишки как многоэтапный процесс генетических изменений, включающий в себя активирующую мутацию гена KRAS, затем инактивирующую мутацию гена APC и P16 и потерю хромосомных участков 17p и 18q, которые содержат опухолевые гены-супрессоры, такие как белок p53 и DCC на этапах перехода от аденомы к аденокарциноме. (73)

В значительном количестве последующих исследований до наших дней производится попытка пошаговой детализации процесса онкотрансформации слизистой оболочки толстой кишки. Так, изменение хромосом 7, 8q, 13q, 20q вместе с потерей участков 1p, 4,8p и 22q хромосомных регионов также ассоциировались с КРР. Кроме того, потеря гетерозиготности 17p и 18q может быть связана с более высокими стадиями заболевания и играет важную роль как в патогенезе КРР, так и в метастатическом процессе. В последнее время появились данные, показывающие, что контрольные точки в 17p 11.2 области хромосомы были найдены преимущественно в первичных опухолях ободочной кишки у пациентов метастазами в печень (74, 75, 76, 77)

Наиболее распространенный тип геномной нестабильности в патогенезе КРР, встречающийся до 85% случаев, является **хромосомная нестабильность**, которая вызывает многочисленные изменения в ряде хромосомных копирований и их структуре. Анеуплоидия, определяющая хромосомную нестабильность, диагностируется по множественным хромосомным изменениям или структурным aberrациям кариотипа. Самой частой цитогенетической аномалией при КРР в настоящее время считается потеря длинного плеча 18-й хромосомы, которое содержит основные гены-супрессоры опухолевого роста, такие как APC, P53 и гены, кодирующие белки семейства SMAD, которые, в свою очередь, являются транскрипционными медиаторами сигнального пути TGF-β. (78, 79, 80, 81) Экспериментальные

исследования показывают, что потеря экспрессии SMAD4 меняет роль TGF от супрессора роста к стимулятору роста, тем самым увеличивая онкогенный и метастатический потенциал клеток КРР. (82) Таким образом, отмечается значимость хромосомной нестабильности как маркера неблагоприятного течения КРР. (83)

Еще одним механизмом развития геномной нестабильности у больных КРР, является **микросателитная нестабильность**. Согласно данным литературы, опухоли ободочной и прямой кишки, развившиеся по этому пути составляют около 15 % и имеют более благоприятное течение по сравнению с опухолями, возникшими по механизму хромосомной нестабильности (84, 83, 85, 86, 87).

Основой микросателитной нестабильности является инактивация семейства генов репарации ДНК посредством либо aberrантного метилирования, либо соматических мутаций. В итоге в опухолевой клетке либо увеличивается, либо уменьшается количество повторов. (88) При КРР с микросателитной нестабильностью происходит потеря активности четырех генов семейства MMR (MSH2, MLH1, MSH6 и PMS2) путем гиперметилирования промотора MLH1 с его инактивацией. (89, 90) Kloor M. et al. считают, что опухоли с микросателитной нестабильностью характеризуются более проксимальным расположением, пожилым возрастом, меньшей дифференцировкой, слизееобразованием, лимфоцитарной инфильтрацией, более частым возникновением среди женщин. (91) В ряде публикаций отмечается, что среди пациентов с выраженной микросателитной нестабильностью больше курильщиков и лиц, употребляющих алкоголь, тогда как среди этих же пациентов процент ожирения меньше. (92, 93, 94)

Опухоли, развивающиеся по пути микросателитной нестабильности, характеризуются устойчивостью к стандартной терапии 5-фторурацилом, а среди пациентов с данным типом патогенеза КРР, получавших указанную терапию, отмечено снижение общей выживаемости. (95, 96, 87)

СрG-метилаторный механизм онкогенеза слизистой оболочки толстой кишки (вариант эпигенетической нестабильности) во многом совпадает с механизмом микросателитной нестабильности, его частота нарастает с возрастом. СрG-островки находятся в районе промоторов практически половины генов, метилирование которых, приводит к полному подавлению экспрессии последних. (97, 98) Около 30-40% опухолей, расположенных в правой половине толстой кишки и 5-15% опухолей в левом отделе толстой и прямой кишки связаны с развитием аномального метилирования генов и ассоциируются с курением и отсутствием ожирения. (99) Несмотря на то, что СрG-метилаторный фенотип играет важную роль в течении КРР, исследования о наличии связи между развитием карциномы толстой кишки по этому пути и выживаемостью противоречивы. (100, 101)

Наряду с геномной и эпигеномной нестабильностью, важным патогенетическим фактором КРР является накопление широкого спектра соматических мутаций (точечные мутации, делеции, инсерции, амплификации) в ряде генов с последующим нарушением регуляции сигнальных путей, контролирующих ключевые процессы канцерогенеза. Наиболее изучены сигнальные пути, задействованные в процессе малигнизации тканей при КРР, такие как WNT, TGF- β , EGFR, MAPK и PI3K, регулирующие пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, ангиогенез и инвазию. (85, 102)

В настоящее время известно, что большинство (55-70%) случаев КРР возникает вследствие последовательной трансформации от *нормальной* слизистой оболочки толстой кишки к аденоме, а затем - аденокарциноме. (103) Этот традиционный путь включает накопление мутаций, стимулирующих онкогенез и деактивирующих мутаций в генах супрессорах опухолевого роста. Опухоли, возникающие в результате этого пути, как правило, характеризуется также мутацией в гене APC и хромосомной нестабильностью. (104)

Ген APC кодирует многофункциональный белок, играющий важнейшую роль в WNT -сигнальном пути, межклеточной адгезии,

стабилизации цитоскелета, регуляции клеточного цикла и апоптозе. Белок APC ингибирует сигнальную трансдукцию по WNT-пути, тем самым вызывая убиквитинзависимую протеосомную деградацию β -катенина. Таким образом, мутация в гене APC вызывает подавление синтеза белка APC, что приводит к активации WNT-сигнального пути по механизму стабилизации β -катенина с его ядерной локализацией. (105, 106) Недавние исследования двух ключевых генов WNT – пути, APC и CTNNB1 (β -катенина), дали надежду на перспективу использования указанных генов в качестве маркеров прогноза как общей, так и безрецидивной выживаемости, однако, к массовому использованию не рекомендованы. (107) Активирующие мутации в гене β -катенина, защищающие белок от APC-опосредованной деградации значительно чаще встречаются в аденомах (12,5%), чем в инвазивных опухолях (1,4%). (108) Несмотря на ключевую и почти универсальную роль активации сигнального пути WNT в канцерогенезе КРР, однозначные рекомендации по использованию мутаций в генах APC и CTNNB1 для выбора стратегии лечения, прогноза или диагностики этого онкологического заболевания на данный момент ещё не разработаны. (109)

TGF- β – сигнальный путь регулирует различные биологические процессы, включая пролиферацию, рост, дифференцировку, апоптоз, внеклеточное моделирование матрикса и иммунный ответ. Соответственно, в условиях нарушения TGF- β сигнального пути создаются условия для патологической пролиферации, миграции, инвазии, ангиогенеза и метастазирования. (110) По данным Lampropoulos P. и соавт., TGF- β - путь играет двойную роль в развитии и течении КРР. На ранних стадиях, TGF- β действует как супрессор, в то время как на более поздних стадиях способствует миграции клеток, инвазии, ангиогенезу, метастазированию. В настоящее время остаётся не до конца изученными факторы, которые влияют на TGF- β -сигнальный путь, ответственный за инвазию и метастазирование. (111) В большинстве случаев, TGF- β сигнальный путь является индуктором апоптоза в эпителиальных и опухолевых клетках толстой кишки через SMAD-

зависимый сигнальный пути. (112) Кроме того, TGF- β сигнальный путь может индуцировать апоптоз как через P53-зависимые, так и P53-независимые механизмы, с помощью участия каспаз. (113) TGF- β активирует апоптоз также за счет стимуляции проапоптических факторов, таких как Bax или подавление антиапоптических факторов (Bcl-2, Bcl-XL). (114)

Утрата SMAD4 ассоциируется с формированием аденом и прогрессией аденокарцином в экспериментах *in vivo*, что предполагает его роль в качестве опухолевого супрессора. Утрата экспрессии SMAD4 наблюдается примерно в половине случаев КРР и ассоциирована с метастазами в лимфоузлы. (109) Таким образом, при отсутствии экспрессии SMAD4, эндогенный TGF- β может играть роль промотора опухоли при КРР. (115) Кроме того, отсутствие экспрессии SMAD4 наблюдалось также в основной массе клеток опухолей ободочной и прямой кишки и может иметь существенную роль в прогрессировании. (80)

Функционально значимые мутации в гене рецептора 2 типа TGF- β обнаружены в 30% случаев КРР и ассоциируются со злокачественной трансформацией аденомы. Мутации в гене TGF- β R2 более характерны для опухолей с микросателлитной нестабильностью, хотя встречаются и в 15% микросателлитно-стабильных опухолей. (109)

Значительная часть функций белка P53 связана с его способностью выполнять роль транскрипционного фактора многих генов. Другие активности P53 обуславливают репрессию транскрипции другой части генов, позволяют ему служить в качестве фермента репарации (ДНК-экзонуклеазы), а также связываться с большим числом других белков (ферментов, транскрипционных факторов, адапторных белков) и тем самым влиять на множества внутриклеточных процессов. Активность белка P53 меняется в зависимости от состояния практически всех процессов внутри клетки. Через многочисленные связи на P53 сходятся сигналы об отклонениях от оптимума процессов, а также о наличии структурных повреждений, что, в зависимости от степени отклонения, приводит либо к ускорению процессов репарации и защиты, либо

к остановке клеточных делений или апоптозу. Утрата функции гена P53 наблюдается практически в каждом случае злокачественных заболеваний, а его недостаточность неминуемо приводит к развитию опухолей. (116)

Мутации в гене *P53*, который кодирует белок P53, наблюдаются в 4% -26% всех аденом, 50% аденом с инвазивным очагом, и в 50% -75% при переходе от аденом в аденокарциному. Как и APC, белок P53 – ключевой опухолевый супрессор, который хорошо изучен, но предиктивная или прогностическая значимость мутаций в кодирующем его гене до сих пор не получила распространения в клинике. (85, 117)

Ген KRAS, член RAS семейства протоонкогенов, – один из наиболее часто мутирующих генов в спектре онкологических заболеваний человека. При КРР частота мутаций в этом гене достигает 50%. (118, 119) Интересен и тот факт, что мутации в гене KRAS встречаются и до 95% гиперпластических полипах, что может говорить о том, что данная мутация не является основополагающей в инициации КРР. (120).

Белок KRAS – эффектор сигнальной трансдукции от рецептора EGFR, передающий сигналы далее через BRAF и активирующий сигнальный путь MAPK, который стимулирует деление клеток. Активирующие мутации в 12-ом и 13-ом кодонах гена KRAS наблюдаются приблизительно в 40% случаев КРР и приводят к непрерывной активирующей сигнальной трансдукции. (121, 122)

Приобретенные мутации в гене KRAS сохраняются в течение всего процесса канцерогенеза, что подтверждается практически полным соответствием мутационных спектров в гене KRAS при первичной и метастатической формах КРР. Этот факт положен в основу эффективной диагностики метастазирования опухоли – проводится идентификация мутаций в гене KRAS как в архивных образцах первичных опухолей пациентов, так и в отдаленных метастазах этой же опухоли. В силу сохраняющейся идентичности паттернов мутаций в гене KRAS, как правило, не требуется дополнительной биопсии ткани и повторного анализа мутаций. (123)

Сигнальный каскад, стимулируемый EGFR, вовлечен в регуляцию практически всех функций клетки: роста, дифференцировки, пролиферации. Постоянная активация сигнального пути EGFR в опухолевых клетках может возникать по нескольким причинам. Во-первых, это может происходить в результате многократного увеличения количества рецепторов на мембране, вызванного амплификацией гена или усилением его экспрессии. Во-вторых – по причине возникновения мутаций в гене EGFR и приобретении рецептором способности к постоянной связи с энергетической молекулой, и, в-третьих, за счет мутаций в генах нижележащих участников каскада, что ведет к активации сигнального пути без участия EGFR. Для КРР характерны первый и третий пути активации. (124)

Ген BRAF, имеющий мутантный статус в 10– 15% случаев КРР, кодирует протеинкиназу, которая функционирует как эффектор, расположенный после белка KRAS в сигнальном пути RAS/RAF/MAPK. Мутации в гене BRAF ассоциируются с неблагоприятным прогнозом. В ходе ретроспективных исследований выявлено, что ни один пациент с опухолями, несущими мутантный вариант BRAF, не отвечал на анти-EGFR-терапию, в то время как 32% больных с KRAS и BRAF дикого типа давали выраженный положительный ответ. (125)

Мутации в генах сигнального пути PI3K наблюдаются примерно в 40% случаев КРР. В пределах сигнального пути PI3K чаще других наблюдаются мутации в гене *PIK3CA*, который кодирует каталитическую субъединицу p110 α (примерно в 32% случаев КРР). Наличие этой мутации часто коррелирует с прогрессией аденомы в карциному. В регуляции сигналинга PI3K участвует путь EGFR/KRAS, и, следовательно, мутации в генах *PIK3CA* и *PTEN* (продукт которого ингибирует фосфоинозитольный путь передачи сигнала) могут служить предиктивными маркерами эффективности анти-EGFR-терапии (126, 127).

Как видно из представленных данных, патогенез колоректального рака представлен многоступенчатым процессом, в результате которого

происходит прогрессирующее накопление генетических мутаций и эпигеномных изменений по различным сигнальным путям. Постепенно расширяющийся спектр лекарственных средств, специфически ингибирующих конкретные онкогены и сигнальные пути онкогенеза КРР, можно рассматривать как индикатор результативности фундаментальных исследований в области изучения молекулярных механизмов развития КРР. Определение молекулярных маркеров для стратификации риска и ранней диагностики КРР становится неотъемлемой частью развивающейся молекулярной онкологии. (128) Однако ни один используемых высокотехнологичных таргетных препаратов не позволяет справиться со злокачественным ростом как таковым, а лишь удлиняет время до прогрессирования, в том числе при использовании комбинации нескольких лекарственных средств или методов лечения. Данная особенность является с одной стороны подтверждением развивающегося под действием лечения патоморфоза, который отражает исходную пластичность опухолевой системы и напоминает проблему с развивающейся антибиотикорезистентностью изначально чувствительных штаммов микроорганизмов; с другой стороны, заставляет задумываться о необходимости переоценки накопленных фактов по вопросам молекулярных особенностей онкогенеза.

Данные литературы свидетельствуют о множестве геномных и эпигеномных изменений, приводящих к развитию злокачественной трансформации слизистой оболочки толстой кишки. Однако, несмотря на накопленный мировой наукой значительный фактический материал о роли того или иного молекулярно-генетического события в канцерогенезе, кроме целесообразности определения KRAS-мутации для решения вопроса о назначении анти-EGFR моноклональными антителами, панель мутированных генов или панель метилированных генов для оценки риска и прогноза КРР до настоящего времени не рекомендована к клиническому использованию. Прогностические модели КРР, построенные на основании логистической регрессии (анализа относительного риска) «ищут, но не находят потребителя».

(1, 129) Маловероятно, что данный факт связан с простой «экономией» средств на диагностику. Все же анализ риска прогрессирования КРР не позволяет полностью исключить этот риск и заставляет задумываться об ускользании опухолевого процесса от изученного сценария развития событий.

Анализ публикаций последних 10-20 лет свидетельствует о детальном исследовании молекулярных особенностей первичной опухоли в сравнении с «морфологически неизменённой кишкой», образцы которой получены от того же больного, т.е. больного колоректальной аденокарциномой. Обнаруженные нами исследования рассматривают «морфологически неизменную кишку» пациентов КРР как контрольные образцы тканей, что фактически сформировало мнение у целого поколения авторов о ее рассмотрении в качестве «здоровых контрольных образцов». Подобное мнение уже в первом приближении входит в противоречие с особенностями факторов риска колоректального рака: изменению микробиоты толстой кишки, значительной частоте хронических запоров, колитов, что не может не иметь отражения в молекулярно-биологических характеристиках слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста и позволяет с теоретических позиций рассматривать ее как «поле/ поля канцеризации» по Nowell. Данная теория позволила нам сформулировать гипотезу настоящего исследования и в качестве контрольных образцов использовать слизистую оболочку толстой кишки, полученную от здоровых добровольцев.

Уже сложившая особенность дизайна современных молекулярно-генетических исследований в своей основе имеет достоверные различия в экспрессии ряда генов между морфологически реализованной опухолью и слизистой оболочкой толстой кишки того же больного. Теория опухолевого поля или полей канцеризации, предложенная в 1976 году Nowell может служить первым важнейшим аргументом против правильности *интерпретации* обнаруженных различий экспрессии генов в большом количестве исследований. Концепция Nowell подразумевает первичную

молекулярно-генетическую гетерогенность трансформирующихся клеток. Накопление молекулярно-генетических особенностей некоторых из них позволяет перейти процессу онкотрансформации ткани на морфологический уровень, доступный световой микроскопии. Другие же клетки, не набравшие необходимого уровня молекулярно-генетических отклонений, на момент проведения исследования еще не обеспечили морфологическую реализацию процесса.

Вторым важнейшим клиническим аргументом, свидетельствующим против рассмотрения слизистой оболочки толстой кишки в качестве «здорового» контроля, является высокая частота первично множественного и мультицентричного поражения толстой кишки при КРР достигающая 12%

Третьим аргументом являются данные электронной микроскопии, свидетельствующие о значительных ультрамикроскопических изменениях в клетках с увеличением количества лизосом, просветлением цитоплазмы и появлением электронно-плотных телец. (1977)

Ряд исследователей на основании сравнения профиля экспрессии первичной и метастатической опухоли при КРР заключают, что метастазы, по-видимому, могут развиваться из дормантных клеток метастазировавших на ранних этапах из того же или рядом расположенного поля канцеризации. (130, 131)

Таким образом, становится очевидной необходимость переоценки накопленных научных данных с использованием других групп сравнения на основе ключевых понятий и закономерностей фундаментальной онкологии.

1.3. Диагностика колоректальной аденокарциномы: современное состояние вопроса.

Традиционно диагностические усилия направлялись на раннее выявление КРР, а не предраковых заболеваний толстой кишки. Однако в

последние годы на первый план выходят диагностика и терапия облигатных предраковых заболеваний, что представляет собой наиболее эффективную меру профилактики КРР. (132)

Своевременная диагностика и лечение предраковых заболеваний толстой кишки, а также выявление КРР на ранних стадиях способны снизить не только заболеваемость, но и смертность, так как своевременное удаление полипов толстой кишки приводит к снижению КРР почти на 80%, а хирургическое лечение пациентов с опухолями ободочной и прямой кишок на первой и второй стадиях показывает наилучшие результаты. (133) По данным некоторых исследований следует, что при скрининге пожизненный риск КРР для населения снижается до 4,4%. (134) Важность и эффективность этой стратегии была признана Европейской Комиссией, призывающей к осуществлению скрининговых программ по всей Европе. (135)

Комитет по профилактике рака Евросоюза рекомендует применение анализа кала на скрытую кровь мужчинам и женщинам с 50 и до 74 лет с интервалом в 1-2 года. В случае положительного результата – выполнение эндоскопического исследования. (8)

Американская национальная сеть по изучению рака (NCCN) в рекомендациях 2015 года в качестве скрининга КРР предлагает несколько вариантов:

- Проведение колоноскопии. При отрицательных результатах проведение следующей колоноскопии через 10 лет.
- Проведение анализа кала на скрытую кровь и при отрицательном результате проведение этого теста 1 раз в год.
- Проведение ректороманоскопии каждые 5 лет и в интервалах каждые 3 года выполнение iFOBТ- теста. (9)

В Российской Федерации отсутствует единый протокол ранней диагностики заболеваний толстой кишки, что подтверждается крайне низкой частотой активного выявления КРР: 6,3% и 13,3% для ободочной и прямой

кишок соответственно (3). Для снижения заболеваемости и смертности от КРР необходима единая эффективная программа ранней диагностики и лечения доброкачественных и предраковых заболеваний толстой кишки, особенностью которых является длительное бессимптомное течение и высокий риск малигнизации.

К применяемым в мире методам ранней первичной диагностики эпителиальных опухолей ободочной и прямой кишки относится FOBТ (исследование кала на скрытую кровь), iFOBТ (иммунохимический анализ кала на скрытую кровь), сигмоскопия, колоноскопия, КТ-колонография, определение молекулярно-генетического профиля энтероцитов в кале. (136) Ирригоскопия в настоящее время не относится к методам скрининга КРР. По данным Winawer S.J. et all, обнаружение полипов ободочной и прямой кишок диаметром до 5 мм возможно только в 32% случаев. При полипах диаметром от 6 до 10 мм частота их обнаружения составляет 53 %. При полипах больших размеров частота обнаружения их при ирригоскопии составляет 48%. (137)

Определение тактики скрининга по данным многочисленных работ должна осуществляться с учетом множества факторов. Основные среди них – возраст обследуемых пациентов, наследственный анамнез, анализ модифицируемых факторов риска, доступность, в том числе и экономическая, тех или иных вариантов обследования. (138, 139)

Анализ кала на скрытую кровь (Fecal Occult Blood Test/FOBТ)

В большинстве программ по раннему выявлению КРР используется тест на определение малых количеств крови в кале на основе пероксидазной реакции. Чувствительность метода составляет всего 50-60% при однократном проведении, в то же время она может достичь 90%, если исследование проводить один раз в 1-2 года в течение длительного периода времени. (135, 140) Тест следует повторять ежегодно. Однократное исследование одного образца кала не рекомендуется.

В 1999 году США опубликованы результаты большого рандомизированного исследования по эффективности FOBТ-теста. В статье

сообщается о 46,551 пациенте, принявшем участие в исследовании, а также о снижении летальности от КРР на 33% за 18-летний период в группе с применением ежегодного FOBТ-теста, и на 21% в группе с применением FOBТ-теста 1 раз в 2 года, по сравнению с контрольной группой. Кроме того, за 18-период наблюдения отмечено и снижение заболеваемости КРР на 20% в первой группе и на 17% во второй. (141).

Данное исследование имело свое продолжение. В 2013 году опубликованы результаты 30-летнего наблюдения. Основной вывод длительного наблюдения за этими группами пациентов заключался в снижении смертности от КРР на 32% в год в первой группе и 22% в год во второй группе. (142) Аналогичные рандомизированные исследования проводились также в Англии, Дании, Швеции, результатом которых стало снижение смертности от КРР на 15-21%.

Вместе с тем, необходимо отметить, что в последних 3-х приведенных исследованиях авторы *не отмечают снижения заболеваемости КРР* на фоне проведения скрининга КРР методом FOBТ-теста. (143, 144, 145)

Иммунохимический анализ кала на скрытую кровь (iFOBТ)

С учетом низкой специфичности FOBТ теста был разработан иммунохимический метод определения человеческого гемоглобина в кале (iFOBТ). Преимущество iFOBТ над FOBТ, заключается в том, что он не обнаруживает гемоглобина от нечеловеческих пищевых источников. Он также не обнаруживает частично переваренной гемоглобин человека, который спускается из верхних отделов желудочно-кишечного. (146)

Согласно результатам Levi Z. et all., полученным путем наблюдения 1000 пациентов из групп риска по КРР, которым провели iFOBТ-тест с последующим контрольным проведением колоноскопии, чувствительность и специфичность составили 88,2% и 89,7% для рака; 61,5% и 91,4% для любой клинически значимой неоплазии. (147) Сходные результаты публикует и Syful A. et all. (148) В систематическом обзоре, проведенном Burch J.A., et al., проведено сравнение 33 рандомизированных исследований, оценивающих

FOBТ и 35 исследований, оценивавших iFOBТ. По результатам не получено четкого преимущества одного метода над другим, как по чувствительности, так и по специфичности. (149) Помимо этого, проведение iFOBТ-теста значительно дороже, и это, наряду с отсутствием значительного превосходства над FOBТ-тестом, не позволяет его рекомендовать в скрининге КРР в большинстве стран. (148)

Сигмоскопия

Применение сигмоскопии в качестве метода скрининга КРР обосновано тем обстоятельством, что основная масса неоплазий диагностируется в левой половине ободочной кишки и прямой кишке. Выявление полипов и аденом может являться основанием для проведения тотальной колоноскопии, которая сопряжена с перфорациями стенки кишки в 0,001% наблюдений. (150)

В 2012 году опубликованы 2 систематических обзора и метаанализа о влиянии сигмоскопии на снижение заболеваемости и смертности по причине КРР. По результатам данных обзоров отмечено снижение смертности на 28% от КРР, а также снижение заболеваемости на 18%. Кроме того, отмечено снижение заболеваемости КРР «левой» локализации на 33 %. (151, 152)

Совмещение исследования кала на скрытую кровь и сигмоскопии

По мнению Kato J. и соавт., которые провели исследование среди 21 794 пациентов на предмет эффективности сочетания iFOBТ и ректороманоскопии, существенная разница в чувствительности и специфичности для диагностики «правого» КРР при применении только iFOBТ или сочетании iFOBТ+ ректороманоскопии отсутствует. Так, чувствительность при диагностике правостороннего КРР при iFOBТ составила 58,3%, а специфичность 94,5%. При сочетании iFOBТ и ректороманоскопии данные показатели составили 62,5% и 93% соответственно. Таким образом, авторы пришли к заключению об отсутствии превосходства при сочетании двух методов по сравнению с использованием только iFOBТ. (153)

Колоноскопия

Колоноскопия – наиболее надёжный метод ранней диагностики аденокарциномы толстой кишки, однако, не может широко использоваться в профилактических целях вследствие своего полуинвазивного характера, риска осложнений, а также высокой стоимости. (154) Несмотря на длительное изучение проблем скрининга КРР до настоящего времени рандомизированные исследования, посвященные влиянию колоноскопии на выявляемость и смертность от карцином толстой кишки, отсутствуют. Тем не менее, данные единичные фрагментарные исследования показывают, что использование колоноскопии в качестве скрининга сможет значительно снизить летальность от КРР. (155, 156, 157, 158, 159) В 2012 году объявлено о начале проведения 15-летнего рандомизированного контролируемого исследования североевропейской группой по изучению рака (NordICC). В исследование планируется включить мужчин и женщин в возрасте от 55 до 64 лет. Ожидается, что в группе пациентов, скрининг которых будет включать колоноскопию (22800 пациентов), показатели смертности от КРР снизятся более чем на 50 %. (160)

Виртуальная колоноскопия (КТ-колонография)

В качестве альтернативы эндоскопической колоноскопии в последнее время рассматривается виртуальная колоноскопия – способ 2D- и 3D-визуализации толстой кишки с помощью многослойной спиральной КТ-технологии. Этот метод обладает высокой диагностической ценностью в обнаружении полипов и КРР. По точности обнаружения полипов больше 6 мм в диаметре виртуальная колоноскопия сравнима с эндоскопической. Чувствительность метода составляет 93,8%, специфичность – 96%. Неоспоримое преимущество виртуальной колоноскопии – возможность ее применения в топической диагностике КРР с субтотальной обтурацией просвета опухолью. Прерогативой данного метода являются: изучение толщины стенки кишки, протяженности ее поражения, оценка паракишечных

изменений, состояния лимфатического аппарата, брыжейки, а также паренхиматозных органов. (133, 161, 162)

В исследовании Iannaccone R. et al оцениена возможность КТ-колонографии без очищения кишечника слабительными препаратами или клизмами. По результатам отмечено, что чувствительность метода составляет 95%, а специфичность 92% для образований более 8 мм в диаметре. (163) К основным недостаткам метода подавляющее большинство авторов относят низкую выявляемость образований диаметром менее 6-8 мм, а также отсутствие возможности морфологической верификации диагноза. (164)

Исследование мутаций ДНК в кале

С целью улучшения скрининговых методов в последние годы прилагаются значительные усилия для выявления специфических ДНК-маркеров КРР в кале. (165) Данные клинических исследований по определению ДНК-маркеров в образцах кала и крови указывают на их пригодность для ранней диагностики КРР. (166, 167) Развитие технологий постоянно повышает его чувствительность и специфичность в диагностике как доброкачественных предраковых заболеваний, так и КРР на ранней стадии, делая его высокоэффективным методом скрининга КРР (132).

В 2014 году опубликованы результаты крупного исследования об эффективности скрининге КРР путем использования политаргетного ДНК-теста. В исследовании произведено сравнение нового политаргетного ДНК-теста для определения ряда мутаций в кале и iFOBТ у лиц из групп риска по КРР. Тест ДНК включает в себя количественные молекулярные анализы для KRAS мутации, аномального метилирования NDRG4, BMP3 и бета-актина, а также выявление гемоглобина. В исследовании учувствовало 9989 пациентов. Чувствительность обнаружения КРР составила 92,3% для политаргетного ДНК-теста и 73,8% для iFOBТ. Чувствительность обнаружения предраковых поражений толстой кишки составила 42,4% при использовании ДНК-теста и 23,8% при iFOBТ. Чувствительность при обнаружении полипов с дисплазией высокой степени - 69,2% при тестировании ДНК-тестом и 46,2% при iFOBТ.

Специфичность тестирования при использовании ДНК-теста и iFOBT составили 86,6% и 94,9%, соответственно. (168)

В настоящее время отсутствует единая унифицированная программа по ранней диагностике КРР и в большинстве экономически развитых стран используются национальные алгоритмы. Подавляющее число исследователей отменяют необходимость разработки и внедрения новых методов скрининга, предусматривающих выявление молекулярных маркеров ранних (доморфологических) стадий опухолевого процесса.

1.4. Эволюция методов лечения больных колоректальной аденокарциномой.

Основным методом лечения больных КРР, как и большинством других эпителиальных злокачественных новообразований, является хирургический. (22)

Первая промежностная экстирпация прямой кишки, описанная в литературе, была выполнена Jean Faget в 1739 году по поводу перфорации опухоли прямой кишки и формирования абсцессов малого таза. В неосложненной ситуации первую операцию по типу промежностной экстирпации выполнил Jacques Lisfranc в 1826 году. Как правило, хирурги использовали промежностный доступ. (169)

На значение радикального хирургического лечения КРР впервые указал William Ernest Miles в конце 19 столетия. Miles считал, что опухолевые клетки распространяются во все стороны по кровеносной и лимфатической системе из-за чего и возникают рецидивы заболевания. В 1908 году в своей работе «A method of performing abdomino-perineal excision for carcinoma of the rectum and of the terminal portion of the pelvic colon» он обосновал необходимость удаление опухоли «единым блоком» вместе с лимфатическими коллекторами вокруг опухоли, в латеральных отделах и в брюшной полости.

В 1924 году Miles сообщил, что снизил количество рецидивов заболевания с 95% до 29,5%. (169) Операция Майлза в последующем на долгие годы стала «золотым стандартом в лечении рака прямой кишки, а рекомендация по высокой перевязке нижней брыжеечной артерии «у аорты», является актуальной до настоящего времени. (170).

В последующем хирургия КРР развивалась, как по пути увеличения радикализма, так и по пути органосохраняющего лечения. Первым на этом пути был Клод Диксон, опубликовавший в 1948 г. результаты лечения 400 пациентов после проведения передней резекции прямой кишки с формированием прямого анастомоза. При этом увеличения количества местных и отдаленных рецидивов не отмечено. (171)

Следующим «революционером» в развитии онкологической колопроктологии – является профессор Richard J. Heald. Автор в своем исследовании наглядно показал необходимость удаления препарата в фасциальном (эмбриональном) футляре, чем достигается снижения местных рецидивов с 10,0 до 4,0%. (172)

Даже с учетом применения всех современных методов диагностики и лечения злокачественных опухолей прямой и ободочной кишки, первичное выявление метастатического КРР остается на высоком уровне. Так, по данным Yvette R.V.M. van Gestel и соавт., около 20% всех пациентов КРР на момент первичной диагностики уже имеют отдаленные метастазы. Еще у 14 - 34% пациентов при первоначальной диагностике I-III стадии КРР появятся метастазы. В своем исследовании авторы отмечают наибольшую частоту метастатического поражения печени - около 60% наблюдений, при этом изолированное поражение печени наблюдается приблизительно в 30 %. На втором месте – метастатическое поражение легких – около 40%. При этом изолированное поражение легких наблюдается приблизительно у 10% пациентов. (173)

Первая публикация по резекциям печени при колоректальных метастазах принадлежит Woodington и Waugh и датирована 1963 годом. В

работе представлены результаты лечения 25 пациентов, четверо из которых прожили более 5 лет после хирургического лечения. (174). В последующем, в 1976 году Wilson и Adson представили результаты операций на печени у 60 пациентов с метастатическим КРР. По результатам данного исследования общая 5-летняя выживаемость составила 25 %, а 10-летняя — 13 %. (175) Собственно с момента публикации результатов указанных 2-х исследований и началась эра хирургического лечения колоректальных метастазов в печень. (176)

Последнее десятилетие отмечается бурное развитие хирургии печени. Кроме того, развитие и разработка мультидисциплинарного подхода в лечении диссеминированных форм КРР, позволяет получать весьма удовлетворительные результаты в отношении как общей, так и безрецидивной выживаемости. Так, если в 60-80-х годах XX века показаниям к резекции печени являлись небольшие краевые, единичные и легкодоступные метастазы, то в настоящее время существуют публикации о радикальном лечении пациентов, насчитывающих 40 и более метастазов. (174, 175, 176) По мнению большинства исследователей, хирургическое лечение этой группы пациентов на сегодняшний день остается единственным способом увеличить 5-летнюю безрецидивную выживаемость. Цель хирургического лечения в данном случае - резекция метастазов с отрицательными гистологическими краями резекции при сохранении достаточной функциональной печеночной паренхимы, а цель мультидисциплинарного и персонифицированного подхода — достичь перевода пациента из группы неоперабельных в группу операбельных больных. Таким образом, сочетание современной лекарственной терапии с методами интервенционной медицины и последними разработками хирургической техники, могут значительно повысить прогноз с продлением медианы выживаемости. (177)

Несмотря на значительные достижения хирургии и существенное уменьшение процента местных рецидивов, как при удалении первичной опухоли, так и после резекции метастазов, смертность от КРР остается на

высоком уровне, и, по данным ВОЗ, в 2012 году составила 49,5% среди всех заболевших данной патологией. (21) Кроме того, многие авторы отмечают частое несоответствие между используемыми («традиционными») факторами прогноза КРР, такими как дифференцировка опухоли, сосудистая и периневральная инвазия, стадия процесса и последующим течением заболевания. Данный факт является основной причиной продолжающегося поиска новых прогностических факторов, которые позволят не только предсказать течение КРР, но и применить персонафицированный подход в лечении. (102)

Первыми хирургическими факторами прогноза при метастатическом КРР, согласно данным литературы, явились размеры и количество метастазов, сроки появления, уровень РЭА, поражение регионарных лимфатических узлов первичной опухоли и ворот печени и другие. Несмотря на длительное изучение данных факторов, до сих пор нет единого консенсуса по формированию и использованию бальной системы риска прогрессирования. (178) Именно поэтому, параллельно с «хирургическими» факторами прогноза, исследователи проводят поиск различных вариантов лекарственной терапии в зависимости от экспрессии тех или иных биомолекулярных маркеров.

До 2000 года единственным химиопрепаратом, используемым при КРР являлся 5-фторурацил, и только в начале XXI столетия в арсенале онкологов появились оксалиплатин и иринотекан. Сочетание 5-фторурацила и платины или иринотекана является стандартом лечения в настоящее время. (179) Однако изменение стандартных схем сочетания 5-фторурацила и оксалиплатина путем оптимизации их дозировок или сроков введения не принесли существенного положительного результата. (179) Таким образом, химиотерапия при многих опухолях достигла своего плато, и дальнейшее улучшение результатов видится большинству исследователей в применении таргетных препаратов. (180)

Первые шаги по персонафикации лечения КРР состоялись только в первом десятилетии XXI века, когда появились препараты, избирательно

блокирующие некоторые из пролифератропных и ангиогенных сигнальных путей, необходимых для прогрессии опухоли: в частности, рецептор эпидермального фактора роста (цетуксимаб, панитумумаб), и сосудистый эндотелиальный фактор роста (бевацизумаб). (180) Применение указанных таргетных препаратов в качестве дополнения к традиционному 5-фторурацилу увеличивает медиану общей выживаемости при метастатическом КРР. (102) Однако, по данным длительного рандомизированного исследования, значительного увеличения не произошло. Так, при исследовании 2673 пациентов со II и III стадией КРР на момент начала лечения, группа пациентов, у которой в качестве лекарственной терапии комплексного лечения, использовали 5-фторурацил + лейковорин + оксалиплатин, достоверно не отличалась от группы пациентов, у которой к лекарственной терапии добавили ингибитор сосудистого эндотелиального фактора роста. Отличий не зафиксировано ни в безрецидивной, ни в общей выживаемости при медиане наблюдения в 5 лет. (181) Практически аналогичные результаты получены в другом рандомизированном исследовании AVANT, где исследовалась эффективность бевацизумаба в качестве дополнения к адъювантной терапии при КРР III стадии. (182)

С другой стороны, исследование CRYSTAL продемонстрировало выраженную эффективность при применении цетуксимаба в комбинации адъювантной терапии пациентов КРР с применением 5-фторурацила, лейковорина и иринотекана у пациентов с диким типом KRAS и отсутствие статистической значимости в группе пациентов с мутацией гена KRAS. (183) Результаты рандомизированных исследований, изучавших панитумумаб в терапии больных КРР без мутации KRAS, показывают, что добавление панитумумаба увеличивало частоту объективных ответов и время до прогрессирования. (184)

Таким образом, основные международные ассоциации онкологов рекомендуют использовать полихимиотерапию в адъювантном режиме при III и IV стадии, а также при II стадии с неблагоприятными факторами риска,

такими как менее 12 удаленных/исследованных лимфоузлов, низкая дифференцировка опухоли, наличие сосудистой и/или периневральной инвазии опухоли, непроходимость или перфорация, pT4 стадия. (185, 186) Основным препаратом лекарственного адъювантного лечения остается 5-фторурацил, к которому последние 1,5 десятилетия присоединился оксалиплатин, а также капецитабин.

На сегодняшний день прикладным направлением научного поиска при КРР, является уточнение молекулярных прогностических факторов. При этом внимание исследователей заострено на молекулярно-генетических особенностях первичной опухоли и, реже, метастазов. Значительным прорывом с фундаментальных позиций явилось обнаружение молекулярных различий между эпителиальными и стромальными клетками первичной опухоли. (131) Более того, обнаружено, что стромальные клетки опережают эпителиальные в своей молекулярно-генетической девиации.

Таким образом, молекулярные характеристики стромы и межклеточного матрикса должны иметь важное значение в процесс опухолевой прогрессии, в том числе развитии рецидива. Так, Делекторская В. В. (2007) публикует данные об ассоциации ряда молекулярно-биологических характеристик опухоли с отдалёнными метастазами. Среди них наиболее тесно связаны с инвазивно-метастатическим потенциалом опухоли система кадгерин - катениновой межклеточной адгезии и протеолитического разрушения внеклеточного матрикса. Кроме того, показателем метастатического фенотипа КРР является высокий уровень содержания в опухоли и сыворотке крови больных MMP9, MMP2 и компонентов системы активации плазминогена uPA, PAI-I. (187)

Зорина Е.Ю. (2014) в своей диссертационной работе приходит к выводам, что пациенты с диссеминированным КРР характеризуются гетерогенностью клинического течения и показателями выживаемости, что связано с гетерогенным молекулярно-генетическим профилем опухолевой ткани. Полученные данные позволили автору сформировать группы прогноза

диссеминированного КРР на основании комбинации экспрессии TS, TP, DPD, COX-2, Ercc-1, KRAS-мутации, наличия микросателитной нестабильности в опухолевой ткани. Интересным выводом в работе также явилось обнаружение изменения молекулярно-генетического профиля опухоли у пациентов после проведения эффективной лекарственной терапии, что потребовало повторного забора биопсийного материала для индивидуализации второй линии химиотерапии. (188) Описанный факт является отражением молекулярного патоморфоза неопластического процесса и свидетельствует о достаточной пластичности сигнальных путей/механизмов роста, которые может использовать опухоль в различных условиях.

Проведенный анализ публикаций обнаружил значительное количество исследований, посвященных поиску оптимального набора биомолекулярных маркеров, изменение экспрессии которых ассоциировано с высоким риском прогрессирования КРР. Проводятся исследования эффективности в этом отношении экспрессии, метилирования, мутаций множества генов на разных стадиях опухолевого роста, при этом универсальная модель риска возникновения и течения КРР не получена. (189)

Разработаны прогностические модели КРР II и III стадии, которые включают TNM характеристики опухоли и профиль экспрессии генов в первичной опухоли. Самые известные прогностические модели КРР – OncotypeDX Coloncancer™ (GenomicHealth, Inc.), ColoPrint (Agendia, ColDx) позволяют с высокой вероятностью предсказать вероятность рецидива на основе оценки уровня экспрессии генов в ткани опухоли. (15, 190) OncotypeDX Coloncancer™ подразумевает оценку экспрессии 12 (7 + 5 референсных) генов (Ki-67, C-MYC, MYBL2, FAP, BGN, INHBA, GADD45B + ATP5E, PGK1, GPX1, UBB, VDAC2) на основании определения мРНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. ColoPrint основан на определении экспрессии мРНК MCTP1, LAMA3, CTSC, PYROX D1, EDEM1, IL2RB, ZNF697, SLC6A11, IL2Ra, CYFIP2, PIM3, LIF, PLIN3, HSD3B1, ZBED4, PPARA, THNSL2, CA4388O2 генов в первичной опухоли. Однако

данные модели не дают возможность прогнозировать эффективность планируемой АПХТ и, именно поэтому, не рекомендованы к клиническому использованию. (185, 186, 191) Несмотря на отсутствие принятых рекомендаций по применению в клинической практике, ряд зарубежных онкологических клиник используют в своей работе указанные тест системы и отмечают лучшую комплаентность пациентов к назначаемой адъювантной химиотерапии. (14, 15, 192, 193, 194, 195)

Помимо тест-систем для исследования первичной опухоли в настоящее время в мире используются тест-система ColoSure, обнаруживающая метилирование гена виментина в кале; ColoVantage, определяющая метилирование гена SEPT9 в плазме; а также Previstage, позволяющая оценить экспрессию мРНК гена GUCY2C в лимфоузлах. Результат, получаемый при их использовании, влияет на агрессивность дальнейшей лечебной тактики при II и III стадии колоректального рака. (196, 197)

Многие авторы изучают прогностический потенциал экспрессии отдельных генов в опухоли как с целью оценки течения самого опухолевого процесса, так и потенциального ответа на лечение. Так, Wang H. et al. (2014) предлагают исследование плазмы крови на наличие мРНК BIRC5 (ингибитора каспазы 3 и 7) как фактора прогноза течения КРР. В публикации отмечается, что уровни мРНК BIRC5 значительно увеличены в сыворотке пациентов с КРР и достоверно коррелируют с дифференцировкой опухоли, региональными метастазами в лимфатических узлах и стадией заболевания. Чувствительность метода составила 84,8%, а специфичность 80,0%, что является достаточно высоким показателем с учетом молекулярной гетерогенности опухолей. (198)

Некоторое количество публикаций посвящено использованию экспрессии гена NDGR1 в качестве прогностического критерия течения КРР. В исследованиях отмечается его роль как маркера дифференцировки и метастазирования. (199, 200) Подавление экспрессии NDRG1 приводит к снижению мембранной и увеличению ядерной экспрессии β -катенина. Однако

Мао Z. et al. в своем исследовании отмечают, что пациенты с низкой экспрессией NDRG1 характеризовались более высокой как общей, так и 5-летней безрецидивной выживаемостью. (201)

По данным Melling N et al. высокая экспрессия маркеров пролиферации в опухоли, в частности, Ki-67 связана с хорошим клиническим исходом, несмотря на высокую пролиферативную активность опухоли. Высокая экспрессия достоверно коррелировала с ранней стадией опухоли, отсутствием метастазов в лимфоузлах и явился независимым прогностическим критерием благоприятного исхода. Кроме того, высокая экспрессия Ki-67 коррелировала с уровнем экспрессии P53 и β -катенина. (202)

По мере изучения молекулярной биологии КРР появляются все новые гены, которые потенциально могут явиться факторами прогноза. Так, Goktas S. et.al предполагает, что повышенная экспрессия STK15 (AURKA), ответственного за формирование и стабилизацию микротрубочек в процессе митоза, может явиться положительным прогностическим фактором, характеризующим общую и безрецидивную выживаемость пациентов (203). Karayiannis G.S. et al публикуют данные о том, что высокая экспрессия GREM1, обладающего цитокиновой и протеинкиназной активностью и в физиологических условиях являющегося антагонистом белков BMP, способствует потере дифференциации клеток рака, а также коррелирует с инвазией опухоли. Таким образом, высокая экспрессия данного гена расценивается как неблагоприятный фактор прогноза. (204) Ряд авторов предлагает использовать семейство HLA генов в качестве прогностического критерия течения рака, так как эти гены экспрессируются на высоком уровне в различных злокачественных опухолях. В частности, обнаружены высокие уровни экспрессии HLA-G и HLA-E в первичных колоректальных опухолях. Отмечаются также высокие уровни корреляции между уровнем экспрессии HLA-G, HLA-E с клиническими исходами. Guo Z.Y. et al 2015 г. считают, что уровень экспрессии HLA-G может служить самостоятельным фактором для

общей выживаемости, тогда как экспрессия HLA-E достоверно коррелирует с метастазированием опухоли. (205, 206)

1.5. Молекулярно-генетический профиль опухоли как основа персонифицированной профилактики и лечения. Анализ причин неуспеха.

Несмотря на значительное количество публикаций, отражающих патогенетическую, диагностическую и прогностическую значимость того или иного молекулярного маркера, диагностическая система, позволяющая предсказать абсолютный или относительный риск возникновения наследственного КРР или риск прогрессирования при любой стадии заболевания, междисциплинарно персонифицировать лечение, отсутствует. Существующие диагностические тест-системы Oncotype DX и OncoPrint направлены на выделение группы высокого риска по прогрессированию при II, III стадии злокачественного процесса толстой кишки.

Описанные выше основные молекулярно-генетические механизмы, присущие колоректальному раку, постоянно дополняются и детализируются. Данные электронной библиотеки PubMed содержат более 20 000 публикаций, посвященных различным молекулярным особенностям колоректального рака. Та или иная работа обнаруживает участие все новых маркеров в развитии злокачественной трансформации слизистой оболочки толстой кишки, а также устанавливает взаимосвязи между различными сигнальными путями в клетке.

Большое количество научных данных заставило нас сгруппировать проанализированные публикации в зависимости от основных сигнальных путей и процессов, участвующих в онкогенезе слизистой оболочки толстой кишки (24):

- маркеры и факторы пролиферации,
- цитокины,
- факторы ангиогенеза,

- факторы ремоделирования межклеточного матрикса и адгезии,
- факторы и ингибиторы апоптоза;
- рецепторы эстрогенов, прогестерона и ароматаза.

Наиболее изученным в отношении онкогенного потенциала в толстой кишке является «APC-ассоциированный» канонический WNT-сигнальный путь, описанный выше. Снижение экспрессии или потеря функциональной активности конечного продукта вследствие приобретенной мутации гена APC приводит к ядерной транслокации β -катенина с стимуляцией экспрессии гена C-MYC, циклина D1 (CCND1), MMP 1, 2, 7, 9, 11, 12, 14, а также циклооксигеназы 2 и BIRC5 (сурвивина), что приводит к стимуляции пролиферации, ангиогенеза, обеспечению выживания и уклонению от апоптоза. (24, 207)

Согласно данным Abdelmaksoud-Damak R. Et al (2015), аномально высокая ядерная экспрессия и сниженная мембранная экспрессия CCNB1 коррелировала с высокой инвазивностью и метастатическим потенциалом опухоли, снижением общей выживаемости, что позволило авторам рекомендовать использовать определение CCNB1 в такти опухоли в качестве прогностического маркера течения КРР. (208) Однако, по мнению японских исследователей, при анализе ядерной экспрессии CCNB1 у больных КРР было обнаружено улучшение показателей опухоль-специфической и общей выживаемости пациентов в случае сочетания повышенной экспрессии данного гена с увеличением ИМТ. Подобной закономерности не обнаружено у пациентов с нормальным ИМТ. Увеличение физической активности не ассоциировалось с увеличением выживаемости у пациентов I-III стадией КРР с ядерной экспрессией β -катенина. (209) Важной особенностью колоректальной аденокарциномы явилась обнаруженная Jung A. Et al. (2001) ассоциированная ядерная экспрессия β -катенина, циклина D1, Ki-67 и P16 во фронте роста высокодифференцированных аденокарцином толстой кишки. Сравнение уровня экспрессии проводилось с центральными участками той же

опухоли. Ученые выявили более низкую пролиферативную активность клеток фронта роста. (210)

Мембранная экспрессия β -катенина обеспечивает связь клеток с Е-кадгеринами межклеточного матрикса. Снижение экспрессии Е-кадгерина рассматривается ранним маркером злокачественного роста в ряде эпителиальных опухолей. (131)

Активирующие мутации важнейшего фермента (фактора), эффект которого направлен на поддержание пролиферативной активности клетки, фосфоинозитол-3-киназы - PI3K, ассоциированы с плохим прогнозом и отсутствием эффекта от анти-EGFR-препаратов у больных КРР. Назначение ацетилсалициловой кислоты улучшает прогноз у данных больных (211, 212, 213). Потеря ингибитора фосфоинозитол-3-киназы – белка PTEN – ассоциирована с развитием отдаленных метастазов и плохим ответом на анти-EGFR-терапию. PI3K и PTEN, наряду с KRAS и BRAF, являются элементами пролиферотропного каскада от EGFR. (214, 215)

Необходимо подчеркнуть, что конечными эффекторами EGFR-сигналинга служат циклин D1 и VEGF. Таким образом, стимуляция пролиферации происходит параллельно со стимуляцией неоангиогенеза, который также параллельно активируется в результате повышения экспрессии COX2 и HIF (гипоксия-индуцируемого фактора) в опухоли.

По данным китайских исследователей на агрессивность и прогноз КРР значительное влияние оказывает содержание транскрипционного фактора циклина D1 в ткани опухоли - MYBL2: его гиперэкспрессия значительно снижает безрецидивную выживаемость. Подавление его экспрессии уменьшает пролиферацию, индуцирует апоптоз, не влияет на миграцию клеток. Экспрессия MYBL2 коррелирует с экспрессией MMP9, виментина и Е-кадгерина (216). MYBL2 входит в прогностическую тест-систему Oncotype DX.

Ввиду наличия выработанных эволюционно связей между различными сигнальными путями в клетке (с возможностью взаимного

переключения) одним из важных прикладных направлений научного поиска является выяснения влияния активации того или иного сигнального пути (и использования его маркеров) на уже установленные доминирующие механизмы пролиферации в опухолевой клетке. Так, по данным североамериканских исследователей, изучавших влияние экспрессии IGF-1R, GRB7 и INSIG у пациентов метастатическим КРР без KRAS-мутации на фоне терапии цетуксимабом, повышение IGF-1R, GRB7 (субъединица рецептора HER2new) и снижение INSIG улучшает показатели безрецидивной выживаемости больных. (217)

Исследователи, сравнивавшие особенности молекулярно-генетического профиля метастазов и первичного КРР обнаружили существенную дизрегуляцию канонических путей пролиферации (IGF1R, PIKCA, PTEN, EGFR и др.) в образцах метастазов, что свидетельствует об отличиях метастатической опухоли от первичной. (218)

Значительный интерес представляют публикации, посвященные различным локальным факторам клеточного и гуморального иммунитета, функции Т и В-клеток в прогрессировании КРР. Более того, вследствие четкой связи с показателями выживаемости больных, уточнение особенностей взаимодействия опухолевых клеток с иммунной системой рассматривается одним из стратегических направлений для поиска лекарственных противоопухолевых средств. (189) **Некоторые авторы указывают на нецелесообразность изучения одного-двух маркеров и необходимость разработки комплексной оценки взаимосвязей опухоль-иммунитет.** Провоспалительный характер микроокружения опухоли ассоциирован как с инициацией, так и с прогрессией КРР, что доказано как клинически на основании повышенной частоты КРР у больных с воспалительными заболеваниями толстой кишки, так и эмпирически, на основании снижения риска КРР при длительном применении ингибиторов СОХ2. Получены данные о влиянии опухоль-ассоциированных макрофагов и Foxp3+Т-клеток на стромальный компонент опухоли (фибробласты). При этом

наращивание стромального компонента опухоли по сравнению с эпителиальным во фронте роста рассматривается в качестве индикатора опухолевой прогрессии (210, 219). Метастатическим потенциалом обладают клетки именно со стромальным фенотипом, появляющимся в результате реализации программы эпителиально-мезенхимального перехода. Инфильтрация стромы опухоли Т-регуляторными лимфоцитами у здоровых лиц имеет ключевое значение в предотвращении аутоиммунизации, а также является негативным прогностическим фактором ответа на неоадьювантную терапию при КРР.

Ряд исследователей считают, что опухолевые фибробласты появляются в результате осуществления эпителиально-мезенхимального перехода, главным регулятором которого является TGF- β , активируемый провоспалительными цитокинами. Опухолевые фибробласты и опухоль-ассоциированные иммунные клетки влияют на ремоделирование межклеточного матрикса посредством продукции цитокинов, матриксных металлопротеиназ, которые в свою очередь стимулируют рост сосудов, образование незрелой стромы.

Безусловное влияние на провоспалительные реакции в слизистой оболочке толстой кишки оказывает состав кишечной микрофлоры. Некоторые виды микроорганизмов обладают способностью подавлять или активировать определённые подтипы Т-клеток. Обнаружена связь между выявлением *Fusobacterium nucleatum* и микросателлитной нестабильностью опухоли; выявлено индуцирование апоптоза Т-клеток факторами бактериального происхождения при КРР (220, 221). Кроме того, установлено, что бактериальные эндотоксины способны стимулировать продукцию IL-23 опухоль - ассоциированными макрофагами, что опосредованно ведет к стимуляции онкогенеза через поляризацию IL-17-продуцирующих Т-лимфоцитов и продукцию IL-6. Данная особенность выявляется в 10% КРР и ассоциирована с крайне плохим прогнозом уже при I, II стадии заболевания (68, 222)

В связи с этим важными являются результаты по изучению особенностей экспрессии рецепторов бактериальных токсинов, цитокинов и белков главного комплекса гистосовместимости – TLR - в опухоли. Основная часть TLR-рецепторов характеризуется ранней активацией NF-κB1 в В-клетках посредством активации MYD88, другая меньшая часть – TLR3 и TLR4 характеризуются поздней активацией NF-κB1 через MYD88-независимый механизм. В норме данные рецепторы опосредуют воспалительные реакции и поддерживают барьерные функции эпителия толстой кишки через установление связи между врожденным и адаптивным (приобретенным) иммунитетом. В условиях опухолевого роста они рассматриваются в качестве мишени для разработки противоопухолевых препаратов. Однако обнаружен и проонкогенный характер функции данных рецепторов вследствие активации стромальных макрофагов (увеличение экспрессии простагландин синтетазы 2) с активацией ремоделирования межклеточного матрикса, самообновлением плюрипотентных опухолевых клеток. (223)

Возвращаясь к особенностям иммунных клеток в опухоли, необходимо отметить влияние соотношения различных субпопуляций Т-лимфоцитов в опухоли на безрецидивную выживаемость больных КРР. Таким образом, некоторые исследователи предлагают использовать оценку соотношения популяций Th 17, Th1 и цитотоксических лимфоцитов для определения группы риска по развитию рецидива КРР. Одним из маркеров цитотоксических лимфоцитов является GNLу. При сравнении пациентов КРР без и с регионарными/отдаленными метастазами получены данные, свидетельствующие о независимом от других параметров прогностическом значении экспрессии GNLу и маркера Th1 клеток адаптивного иммунного ответа (IRF1) для оценки метастатического статуса. При этом высокая коэкспрессия мРНК VEGF значительно ухудшала показатели выживаемости больных данной группы. (224, 225, 226)

Североамериканские исследователи обнаружили существенное снижение регулятора дифференцировки Т-хелперов GATA3 в образцах КРР у

умерших пациентов при I-II стадии заболевания и предлагают исследовать данный маркер для определения агрессивного фенотипа опухоли. (227)

Помимо значимости эпителиально-мезенхимального перехода при отдаленном метастазировании, и обратного процесса (мезенхимально-эпителиального перехода) в органе-акцепторе метастазов, ряд исследователей предполагают возможность эпителиально-лейкоцитарного перехода с формированием «пластичного – метастатического - фенотипа» для развития лимфогенной диссеминации опухоли при участии aberrантной TLR-экспрессии. (228, 229, 230)

Член семейства IL-6 цитокинов – LIF, также охарактеризован как участник туморогенеза в толстой кишке. (231) LIF является важным ингибитором p53 в клетках колоректальной аденокарциномы через STAT3-механизм с усилением экспрессии MDM2. Гиперэкспрессия LIF ассоциирована с плохим прогнозом у больных КРР. Промоторный элемент гена LIF содержит несколько сайтов связывания с факторами, индуцируемыми гипоксией.

Широко описана в литературе стимуляция неоангиогенеза под действием гипоксии, опосредованная увеличенной продукцией гипоксия-индуцибельного фактора (HIF). Рассмотрение усиленного неоангиогенеза как условия роста опухоли более 1 см явилось отправной точкой для исследований, направленных на разработку средств, избирательно подавляющих образование новых сосудов в опухоли. В настоящее время анти-VEGF-терапия используется в лечении КРР. Она увеличивает медиану выживаемости на несколько месяцев. Последние данные свидетельствуют о негативных последствиях подобной трактовки изменений в опухоли: развивающаяся гипоксия стимулирует фиброз стромы и ухудшает проникновение системных химиопрепаратов в опухоль. Молекулярной основой данного процесса является повышенное отложение гиалуроновой кислоты и сульфатированных гликозамингликанов в межклеточном матриксе. В итоге, исследователи

предлагают рассматривать данные биомолекулы в качестве еще одной мишени для разработки противоопухолевых препаратов. (232)

Ключевой системой ферментов перестройки межклеточного матрикса являются матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы, участие которых в росте и прогрессировании опухоли широко изучено и продолжает изучаться. При этом обнаружено не только влияние на определённые структурные компоненты межклеточного матрикса, облегчающие миграцию и метастазирование, но и у некоторых металлопротеиназ, например, MMP9, выраженные проангиогенные свойства. Исследование Langers A.M.J. et al (2012) выявило положительную корреляцию экспрессии MMP2 и MMP9 в свободной от опухоли ткани толстой кишки, прилегающей к опухоли, с плохим прогнозом вне зависимости от других факторов. Данное исследование – одно из единичных, обращающихся к изучению молекулярно-генетических маркеров в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста и выявившее их значение в опухолевой прогрессии. (233) Гиперэкспрессия MMP9, MMP7, MMP2, MMP1, MMP13 в опухоли ассоциирована с наличием отдаленных метастазов и глубиной инвазии (T). (234, 235, 236, 237, 238, 239) Роль MMP8 в злокачественной трансформации толстой кишки противоречива и, по-видимому, определяется функциональной активностью данного фермента. Экспрессия дикого типа белка рассматривается как фактор, препятствующий прогрессированию опухоли за счет блокирования адгезии, инвазии, миграции, субстрат-зависимой пролиферации. В случае развития мутации или метилирования гена развивается обратная ситуация. (240, 241)

При исследовании влияния полиморфизма генов 22 матриксных металлопротеиназ и гена сосудистого эндотелиального фактора роста на общую выживаемость и прогноз КРР достоверных результатов не получено. (242)

По мнению китайских исследователей, уровень иммуногистохимически определяемой экспрессии MMP11 и VEGF-C может

рассматриваться значимым фактором прогнозирования степени злокачественности, клинической стадии, лимфогенных и отдаленных метастазов КРР. (243)

Помимо скорости пролиферации важное значение имеет интенсивность апоптоза. Наряду с ядерным путем его реализации (P53 зависимым) в патогенезе колоректальной аденокарциномы задействованы механизмы преодоления митохондриального пути апоптоза, в норме активируемого при перекисном повреждении мембраны митохондрии с утечкой цитохрома С, энергетическом дефиците/гипоксии. Ингибитором митохондриального пути апоптоза является белок BCL2. Применительно к белкам P53 и BCL2 связь с клиническими параметрами опухоли и риском прогрессирования КРР ранние работы конца 20 века не описывали. При КРР нередко наблюдается увеличение его экспрессии при уменьшении стимулятора митохондриального пути смерти клетки – BAX. Причиной повышенной экспрессии нередко является амплификация гена BCL2, а также стимуляция экспрессии некоторыми пищевыми продуктами, бактериальными факторами фузобактерий и бактероидов через активацию NF-κB. (244, 245)

Однако позднее появились обратные данные, указывающие на целесообразность совместного определения в тканях опухоли уровня экспрессии BAX и BCL2. При этом высокий уровень BAX рассматривается некоторыми авторами как хороший прогностический фактор у пациентов, подвергшихся только хирургическому лечению КРР; а содружественное снижение BAX/BCL2 как маркер целесообразности назначения 5-фторурацила. (246)

Другое исследование, нацеленное на поиск способов преодоления проапоптотической резистентности клеток колоректальной аденокарциномы свидетельствует в пользу целесообразности поиска лекарственных веществ – сенситайзеров к митохондриальному апоптозу, что, по мнению авторов должно значительно увеличить чувствительность опухоли к стандартной химиотерапии и позволит снизить курсовую дозу. (247)

Одним из стимуляторов экспрессии BCL2 служит ядерный активатор транскрипции NF-κB, вовлеченного в функциональную адаптацию клетки в условиях воспалительной реакции. Согласно данным Panney R.V. et al (2014), экспрессия NF-κB и IL-6, находится в отрицательной корреляционной зависимости от экспрессии ароматазы как в неизменной слизистой оболочке толстой кишки, так и неизменной печени. Установленная закономерность может объяснить снижение риска КРР в постменопаузе при применении менопаузальной гормональной терапии. Таким образом, генетический полиморфизм фермента, конвертирующего андрогены в эстрогены целесообразно рассматривать в качестве одного из предрасполагающих факторов к КРР. (248)

Японские исследователи обнаружили повышенную экспрессию ароматазы в ткани колоректальной аденокарциномы по сравнению с прилегающей слизистой оболочкой толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста. Уровень экспрессии ароматазы положительно коррелировал с концентрацией эстрадиола в опухоли, тубулярной дифференцировкой и отрицательно коррелировал с экспрессией Ki-67. (249)

Таким образом, пролиферативная активность опухоли находится в обратной зависимости от концентрации эстрадиола. Действие эстрадиола во многом определяется экспрессией эстрогеновых рецепторов в опухоли. Некоторые авторы указывают на сохраняющиеся противоречия в научной среде на предмет роли эстроген-зависимого и, традиционно, «антагонистического» прогестерон-зависимого сигнального пути в развитии и прогрессировании КРР. (250)

Возможное противоречие в трактовках роли ER в развитии КРР может быть объяснено различным функциональным значением подтипов эстрогеновых рецепторов (α и β). Антипролиферативную роль играют β тип ER посредством репрессии PROX1 miR-205, тогда как α тип вносит значительный вклад в патогенез злокачественных эпителиальных опухолей женской репродуктивной системы. (251, 252) Отмечено, что приобретенные

мутации PIK3CA, PTEN и AKT1 в злокачественных опухолях женской и мужской репродуктивной системы, гепатоцеллюлярных аденокарциномах, раке желудка и толстой кишки чаще встречаются при гиперэкспрессии рецепторов половых стероидов: эстрогенов, прогестерона и андрогенов. (253)

Рецепторы прогестерона (PR) играют важнейшую роль в подавлении пролиферативного сигнала от рецептора фолатов α через cSrc/ERK1/2NF- κ B к p53. Антипролиферативный эффект фолиевой кислоты при КРР проявляется только в PR-позитивных опухолях. (254)

Учитывая данные о повышенном риске КРР при сахарном диабете 2 типа и ожирении, многие исследователи изучали роль повышенного уровня инсулина в сыворотке, а также локальной гиперпродукции IGF-1, IGF-2, IGFBR, инсулиновых рецепторов, IGFR в развитии злокачественного поражения толстой кишки. По мнению Vigneri P.G. et al (2015), система инсулин/IGF может быть использована для преодоления химиорезистентности и резистентности к анти-EGFR препаратам при КРР. (255) Как инсулин, так и IGF усиливают пролиферацию, ингибируют апоптоз в клетках КРР через фосфорилирование экстрацеллюлярной киназы $\frac{1}{2}$ (ERF1/2) и c-Jun N-terminal Kinase (JNK). (256) Кроме того, Shanmugalingam T. et al (2016) рассматривают повышенный сывороточный уровень IGF-1 как фактор, способствующий развитию полинеоплазии. (257) Усиленная экспрессия белков IGF-1/R -сигнального пути в образцах КРР при сахарном диабете 2 типа необходимо рассматривать как маркер патогенеза аденокарциномы толстой кишки у данной группы больных. (258) По мнению некоторых исследователей, низкий уровень ингибитора IGF-опосредованного выживания в клетках колоректальной аденокарциномы – протеинкиназы C β II, необходимо рассматривать в качестве предиктора низкой выживаемости. (259)

Согласно результатам отдельных исследований, анализ экспрессии генов в *ткани толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста*, окружающей опухоль, также может быть независимым фактором прогноза безрецидивной и общей выживаемости больных. (11) Однако

исследование подобных образцов не проводится ни в одной из коммерческих прогностических моделей, что ввиду вышеописанных фундаментальных данных онкологии, по нашему мнению, должно заставить исследовать значимые для прогрессирования гены именно в данных образцах больного КРР, наряду с первичной опухолью и тканью метастаза.

Резюме

Оценка слизистой оболочки толстой кишки больного КРР, не содержащей морфологических признаков опухоли, как *неизменной*, встречается в подавляющем количестве публикаций последнего десятилетия, посвященных изучению и сравнению содержания различных биомолекулярных маркеров в ткани опухоли и в окружающей слизистой оболочке больного. Данная трактовка идет вразрез с мнением патоморфологов, изучавших микроскопические и ультрамикроскопические изменения не только собственно ткани аденокарцином толстой кишки, но и участков слизистой оболочки, свободных от атипических клеток. Целью данных изысканий служил поиск специфичных предраковых изменений слизистой оболочки толстой кишки, помимо аденоматозных полипов, диагностика которых позволила бы сформировать группу риска по развитию КРР. Однако их попытки на тот момент не увенчались успехом. Последние два десятилетия характеризуются накоплением значительного количества научных фактов, свидетельствующих о молекулярно-генетических и протеомных особенностях аденокарциномы толстой кишки как факторах прогноза заболевания, что своей результирующей имеет несколько коммерческих тест-систем, не рекомендованных к клиническому применению.

Резюмируя выше изложенное, необходимо подчеркнуть, что успех в оптимизации профилактики, диагностики и лечения как КРР, так и любого другого онкологического заболевания не возможен без переоценки уже сложившихся стереотипов. Быстрое решение задачи с позиций только

молекулярной биологии не представляется воплотимым. Накопленный различными научными медицинскими школами фактический материал по вовлечению того или иного гена или его продукта в злокачественную трансформацию ткани в обязательном порядке должен интерпретироваться с общебиологических и морфологических позиций. Несмотря на расшифровку генома человека, система, управляющая целенаправленной и функционально обусловленной экспрессией в определенный момент времени ряда генов, альтернативным сплайсингом мРНК, конформационными изменениями белковых молекул с образованием конечного продукта, еще до конца не раскрыта. Еще до конца не осознан злокачественный рост как таковой, увеличение его частоты с возрастом на фоне общего угасания организма и т.д. Остается много вопросов на которые молекулярная биология и генетика как отдельные науки дать ответ еще не смогли.

В настоящей работе мы предприняли попытку приблизиться к решению проблемы злокачественного эпителиального поражения толстой кишки через сравнение экспрессии генов с различной функциональной направленностью не только в ткани опухоли и «морфологически неизменной кишке» больного КРР, но и в слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев с последующим сопоставлением с клинико-морфологическими данными.

Глава 2. Методы исследования и лечения.

Данное исследование является фрагментом III темы научно-исследовательской работы, государственного задания ФГБУ «РНЦРР» Министерства Здравоохранения Российской Федерации на 2015-2017 гг.: «Разработка новых альтернативных методов комбинированного и комплексного лечения опухолевых заболеваний различных органов и систем на основе комплексной морфологической и биомолекулярной диагностики».

Исследование одобрено комитетом по этике ФГБУ «РНЦРР» МЗ России.

Сбор клинического материала проводился на базе научно-исследовательского отдела хирургии и хирургических технологий в онкологии. Обследование и лечение пациентов осуществлялось в профильных клинических подразделениях ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ согласно утвержденным клиническим протоколам РНЦРР. Морфологическое исследование выполнено в патологоанатомическом отделении ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ, под руководством заведующего отделением д.м.н. Близнюкова Олега Петровича.

Молекулярно-генетическое исследование проведено в научно-исследовательском отделе молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей подразделениях ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ под руководством заведующего отделом, д.м.н., профессора, заслуженного врача России - Боженко Владимира Константиновича.

Обоснование дизайна исследования

К изучению морфологического субстрата первичной и метастатической опухолевой тканей, а также прилегающей морфологически неизменённой окружающей ткани толстой кишки обращалось большинство исследователей, занимающихся данной проблемой. (24) Однако с учетом фундаментальных данных об опухолевом процессе, сформированных в результате комплексного анализа и синтеза

результатов исследований канцерогенеза середины и конца прошлого столетия, данный подход к изучению рака толстой кишки можно охарактеризовать как неполный. Благодаря работам отечественных и зарубежных ученых (71, 260, 261, 262, 263, 264) к изучению процесса злокачественной трансформации тканей необходимо подходить с позиций системности развивающихся изменений. Опухолевый рост сопровождается (первично?/вторично?) изменением функции различных органов: в первую очередь нейроэндокринной и иммунной систем. Таким образом, использование сравнения содержания различных биомолекулярных маркеров в морфологическом субстрате (собственно опухоли) с окружающей тканью без микроскопических признаков опухолевого роста большого неопластическим процессом, является ограничивающим, сдерживающим моментом результативности крупных высокотехнологичных исследований, направленных на достижение перелома в борьбе с онкологическими заболеваниями во всем мире.

Выше сказанное заставило нас прибегнуть к принципиально новому дизайну исследования – использования в качестве клинического, морфологического и молекулярного контроля сопоставимых по возрасту и полу здоровых добровольцев.

Представленные результаты содержат указания на стадии опухолевого процесса, установленные по результатам комплексного обследования пациентов и морфологического исследования удаленного макропрепарата.

2.1. Объект исследования. Критерии включения и исключения, формирование групп.

Для решения поставленной цели - изучить и клинически оценить результаты молекулярно-генетических исследований толстой кишки для

обоснования оптимизации лечебно-диагностического алгоритма при колоректальном раке. - в исследование включено 605 человек, обратившихся в ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ с 1996 по 2015 год (рисунок 1). Из них 555 человек, страдающих колоректальным раком различных стадий, составили основную группу, и 50 человек, сопоставимых по возрасту и полу здоровых волонтеров с верифицированным инструментально и морфологически отсутствием заболевания толстой кишки, а также онкологическим процессом другой локализации, которые составили контрольную группу (далее по тексту контрольная группа).

Критериями включения в исследование для основной группы явилось морфологически подтвержденное наличие злокачественной эпителиальной опухоли ободочной или прямой кишки.

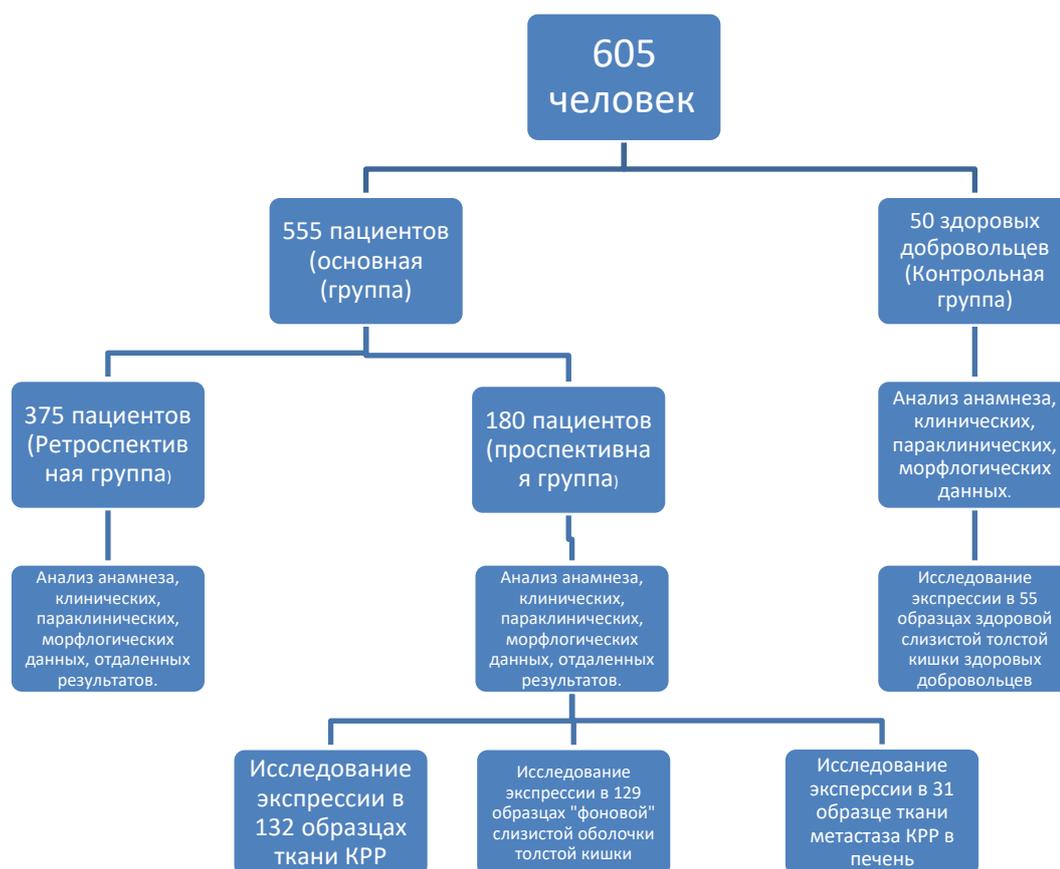
Критериями исключения для пациентов основной группы явились: отказ пациента от включения в исследование, рак анального канала и рак аппендикса, неэпителиальная злокачественная опухоль ободочной и прямой кишки, рак, развившийся на фоне диффузного семейного полипоза, проведение неoadъювантной химио-, лучевой или химиолучевой терапии.

Для пациентов контрольной группы критериями включения являлись – информированное добровольное согласие на включение в исследование, согласие на проведение биопсийного забора слизистой ободочной кишки при плановой колоноскопии, отсутствие онкологического заболевания в анамнезе и на момент исследования, как и отсутствие воспалительных заболеваний и полипов ободочной и прямой кишки.

Критерием исключения для здоровых добровольцев явилось наличие любых очаговых или инфильтративных изменений слизистой оболочки толстой кишки, наличие онкологических заболеваний на момент исследования или в анамнезе, морфологические изменения биоптата слизистой, отсутствие информированного согласия.

Дизайн исследования характеризовался наличием ретро- и проспективной составляющей основной группы 375 и 180 больных соответственно (Рис. 1).

Рис. 1. Дизайн исследования



Формирование групп сравнения проводилось в зависимости от решаемой задачи. Оценку репрезентативности групп определяли по формулам оценки репрезентативности для количественных и качественных признаков при неодинаковом числе наблюдений в группах. Непосредственное количество больных в каждой группе отражен в главе 3 «Результаты собственных исследований».

Клиническое сравнение больных КРР проводилось по традиционным параметрам: клинико-анамнестические особенности, морфологическая характеристика опухоли (локализация и размер,

гистологическое строение, глубина инвазии, степень злокачественности, наличие регионарных и отдалённых метастазов, сосудистая и периневральная инвазия), а также непосредственным и отдаленным результатам лечения.

Кроме того, оценивалась связь между вышеперечисленными клиническими и морфологическими характеристиками больных КРР и экспрессией биомолекулярных маркеров первичной опухоли, слизистой оболочкой толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста больного КРР, ткани метастазов.

В контрольную группу больных вошли 50 добровольцев. Из них мужчин 27 (54,0%) и 23 женщины (46,0%) в возрасте от 39 до 75 лет, средний возраст пациентов в контрольной группе составил 60,1±7,25 года.

Первым этапом явилось создание базы данных пациентов, прошедших лечение в РНЦРР по поводу КРР за период с 1996 по 2011 годы (375 человек). Изучены непосредственные и отдаленные результаты лечения в зависимости от клинико-anamnestических особенностей больных КРР, морфологических параметров опухоли (локализация и размер опухоли, глубина инвазии, гистологическое строение, степень злокачественности, наличие регионарных/отдаленных метастазов).

Параллельно создана проспективная база данных больных КРР, проходивших лечение в условиях центра с 2012 по 2015 год включительно – 180 человек. У данной группы пациентов также проведен анализ клинико-anamnestических данных, морфологических параметров опухоли, изучены непосредственные и отдаленные результаты лечения. Кроме того, произведено определение уровня экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в следующих образцах ткани:

1. Ткань аденокарциномы толстой кишки - 132 образца (КРР);
2. Ткань метастазов КРР - 31 образец (мтс);

3. Ткань толстой кишки больных КРР без морфологических признаков опухолевого роста /край резекции - 129 образцов (норма-);

4. В качестве контрольной группы сравнения, мы исследовали морфологически неизмененную ткань слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев - 50 образцов (норма+).

В последующем проведен сравнительный анализ экспрессии генов:

- В ткани опухоли в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания, непосредственных и отдаленных результатов лечения;
- В слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста больных КРР в зависимости от клинико-морфологических характеристик заболевания, непосредственных и отдаленных результатов лечения;
- В ткани опухоли и слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных КРР;
- В слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных КРР и в морфологически неизменной ткани толстой кишки, полученной от здоровых добровольцев;
- В ткани опухоли больных КРР и в ткани метастазов;

2.2. Методы исследования.

На каждого обследованного пациента заполнялась карта и электронная база данных, позволяющая фиксировать, а, затем, анализировать возраст, антропометрические показатели, жалобы, данные семейного и аллергологического анамнеза, наличие и характер течения соматических

заболеваний, гинекологический статус у женщин, данные морфологического и молекулярно-генетического исследований, вид, характер, эффективность проводимой терапии.

При изучении семейного анамнеза обращали внимание на наличие как доброкачественных, так и злокачественных опухолей различной локализации, у родственников I степени родства. Тщательно собирали анамнез обследуемых на предмет перенесенных либо имеющихся заболеваний - компонентов метаболического синдрома, хронических воспалительных заболеваний различной локализации, патологии пищеварительной, гепатобилиарной системы, эндокринных органов и нервной системы.

При оценке настоящего состояния больного устанавливали тип телосложения. Для диагностики наличия и характера нарушения жирового обмена подсчитывали ИМТ по формуле: $ИМТ = \text{масса (кг)} / \text{рост (м)}^2$, а также измеряли окружность талии (ОТ), окружность бедер (ОБ), вычисляли соотношение ОТ/ОБ. ИМТ от 19,5 до 25 кг/м² позволял судить о нормальной массе тела, 25,1 – 29,9 кг/м² – об избытке массы тела, 30 кг/м² и более – о наличии ожирения. Увеличение ОТ более 80 см и/или индекса ОТ/ОБ более 0,83 расценивали как признак абдоминального типа ожирения.

Лабораторные и функциональные исследования включали: клинический и биохимический анализ крови, коагулограмму, общий анализ мочи, анализ крови на RW, HBS-антиген, анти-HCV антитела, ВИЧ, группу крови и резус фактор, ЭКГ. В зависимости от наличия и характера хронических соматических заболеваний проводилась консультация профильных специалистов и использование дополнительных методов исследования.

Специальное онкологическое обследование включало эндоскопические, лучевые, морфологические и молекулярно-генетические методы обследования.

Эндоскопические методы подразумевали проведение

эзофагогастродуоденоскопии и колоноскопии.

Лучевые методы исследования предполагали проведение рентгенологического исследования органов грудной клетки, ирригоскопию, ультразвуковое исследование органов брюшной полости и малого таза. С 2010 г. в обязательном порядке пациентам, в зависимости от локализации опухоли, проводили мультиспиральную компьютерную томографию органов брюшной полости или магнитно-резонансную томографию органов малого таза, а при показаниях - их сочетание. При подозрении на наличие вторичных изменений легких по данным рентгенологического исследования проводилась МСКТ органов грудной клетки.

Морфологическое изучение материала проводилось в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей толстой кишки ВОЗ. Удаленные макропрепараты подвергались обязательной макроскопической оценке. Для дальнейшего проведения молекулярно-генетического исследования, у пациентов проспективной когорты, производили взятие образцов опухоли, а также участок визуально неизменной слизистой оболочки удаленной 15-20 см от ближайшего опухолевого края (края резекции). Для каждого образца использовались отдельные стерильные лезвие и пинцет. Каждый образец опухолевой ткани делился острым путем пополам. Первый образец направлялся на морфологическое исследование для подтверждения диагноза и определения, в процентном отношении, количества опухолевых клеток. Вторая половина при наличии в первой части опухолевых клеток более 50 %, направлялась на молекулярно-генетическое исследование. Образцы тканей немедленно после получения помещались в пробирки, содержащие стабилизатор РНК и храниться при температуре -180°C до момента исследования.

Методом полимеразной цепной реакции определялась экспрессия следующих генов: MGB1, CTSL2, BCL2, MYC, BIRC5, CCND1, NDRG1, CD68, Ki-67, TERT, HER2, PTEN, BAG1, PGR, CCNB1, ESR1, GRB7, MMP11, STK15, MYBL2, P16, SCUBE2, MMP9, GSTM1, GNLY, P14, IGF1,

COX-2, IGF2, CYP19A, GREM1, MMP2, PAPPА, MMP7, IL-2, MMP8, IL-2Ra, IL-6, IL-12a, IL-7, IL-15, IL-8, IL-1 β , IL-10, TPA, IFN- γ , CD45, TNF- α , CD56, TGF- β , CD69, VEGFA121, BAX, VEGFA165, TLR2, VEGFA189, TLR4, HLA-G1, TLR7, HLA-G5, GATA3, LGALS1, LIF, LIFR. Методы исследования в группах представлены в таблице 1.

Таблица 1

Методы исследования, N=605

	Больные КРР n=555		Здоровые добровольцы n=50
	Ретроспективная составляющая исследования n=375	Проспективная составляющая исследования n=180	
Общеклинические исследования	+*	+	+
Эндоскопические исследования	+	+	+
Лучевые методы исследования	+	+	
Морфологическое исследование операционного материала	+	+	+**
Молекулярно-генетическое исследование образцов тканей.		+	+

*в данной группе пациентов из антропометрических параметров использовалось только определение индекса массы тела.

** морфологическое исследование биопсийного материала.

2.3.1 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

В настоящее время разработано значительное количество модификаций полимеразной цепной реакции, в зависимости от потребностей исследователя. В настоящем исследовании использована методика получившая название ПЦР в реальном времени (или количественная ПЦР - ОТ-ПЦР), способная определить количество искомым транскриптов в исследуемом образце. По окончании реакции исследователь получает информацию в графической и цифровой форме о количестве молекул мРНК

определенных генов в исследуемом образце, что позволяет косвенно судить об уровне экспрессии этих генов. Сравнительный анализ значения экспрессии в образцах патологической и неизменной ткани может дать информацию об активности биологических процессов в условиях патологии по сравнению с нормой. В настоящее время методика ОТ-ПЦР считается наиболее чувствительной и специфичной в отношении количественного определения, особенно низкокопийных молекул.

Подготовка образца к исследованию, заключается в выделении молекул мРНК и синтез на их матрице, так называемой комплементарной ДНК (кДНК).

В данной работе для выделения мРНК использовали набор колонок для выделения РНК из свежей/замороженной ткани RNeasy kit фирмы Qiagen USA. Процесс выделения и очистки РНК построен по следующему образцу: гомогенизация ткани в растворе гуанидина сульфата с последующей фильтрацией в различных буферах и последующим осаждением молекул РНК либо в растворе, либо на мембранных фильтрах колонок. Важной особенностью мРНК из свежей ткани является достаточно высокая сохранность фрагментов молекул, длина которых может достигать до 20000 в.р. Это позволяет создавать уникальные наборы праймеров, исключая фоновую амплификацию геномной ДНК, что, в свою очередь, позволяет исключить этап обработки раствора ДНКазы, снижающий выход реакции.

Необходимость синтеза кДНК на матрице РНК связана с отсутствием аффинитета ДНК-полимераз Taq или MMLV (транскриптаза вируса лейкоза мышей Молони) часто применяемых в ПЦР к мРНК. По своей сути процесс обратной транскрипции *in vitro* воспроизводит действие фермента ревертазы, впервые описанной для ретровирусов. Однако в искусственных условиях исследователь имеет возможность контролировать реакцию путем направленной избирательной транскрипции генов-мишеней за счет подбора олигонуклеотидных последовательностей праймеров, играющих роль затравки для синтеза транскрибируемого фрагмента нуклеиновой кислоты.

Именно достаточная длина мРНК свежей ткани позволяет подбирать праймеры, комплементарная последовательность которых лежит на границе экзонов РНК-матрицы, что исключает случайную транскрипцию ДНК вследствие наличия в ней интронов.

Для протекания ОТ-ПЦР реакции необходимы три ключевых компонента.

- играющая роль матрицы молекула кДНК, содержащая исследуемый фрагмент.

- ДНК-полимераза (фермент для синтеза копий ДНК) и смесь нуклеотидов, используемых ДНК-полимеразой для удлинения нуклеотидной цепи.

- два праймера ПЦР – два коротких фрагмента однонитевой нуклеиновой кислоты, комплементарных началу исследуемого фрагмента ДНК (обычно это последовательности из 15-20 оснований). Присоединяясь к этому фрагменту, праймеры позволяют запустить синтез ДНК.

Если в анализируемом образце присутствует искомая кДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, обеспечиваемых определенными циклами смены температурного режима. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов, описанных ниже.

1. Денатурация. На первом этапе необходимо денатурировать ДНК, находящуюся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92-95° С, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК, целостность которых обеспечивается термолабильными водородными связями, расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул.

2. Отжиг на матрице. На втором этапе праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Этот процесс носит название «отжиг».

Праймеры подбираются таким образом, чтобы они ограничивали искомый фрагмент и были комплементарны противоположным цепям ДНК. Функциональная роль праймеров в данном случае не отличается от обратной транскрипции.

Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, постулирующем, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина – цитозин. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

После отжига праймеров Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК, начиная с 3'-конца праймера.

3. Элонгация (синтез). На третьем этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Таq-полимеразы, и синтез второй цепи продолжается с максимальной эффективностью.

В дальнейшем этапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается.

Для *количественной* оценки содержания мРНК в образце использовалась ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), принципиальной особенностью которой является возможность детекции накопления продуктов амплификации непосредственно во время проведения амплификации. Известно, что кинетика накопления ампликонов непосредственно зависит от числа копий исследуемой матрицы и это позволяет проводить количественные измерения ДНК и РНК интересующих генов. В частности, флюорофоры для мечения нуклеотидов действуют по следующему принципу: специфическая последовательность нуклеотидного зонда, комплементарная фрагменту матричной цепи ДНК между прямым и обратным праймерами, на своем переднем и заднем отрезках одержит флюорофор и его гаситель, до определенного момента ингибирующий свечение. Схематически картина активации красителя выглядит следующим образом:

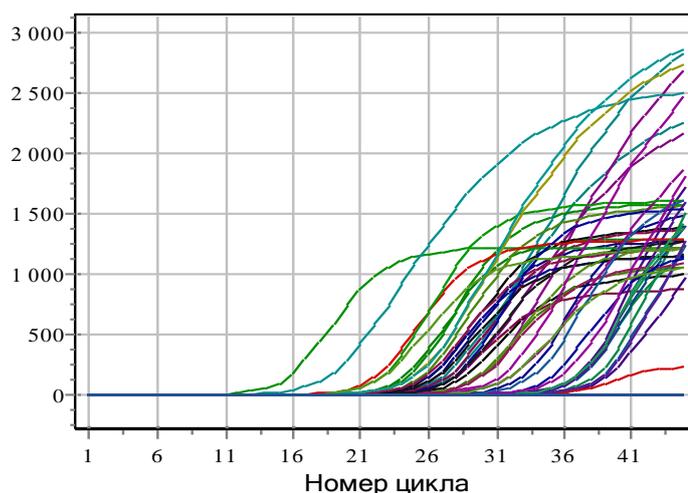
Пространственная конформация зонда, молекулы флюоресцентной метки и гасителя сконструирована таким образом, что определенного момента квантовая активность флюорофора подавляется гасителем. На этапе гибридизации зонд комплементарно связывается с нитью матрицы ДНК, с которой одновременно транскрибируется дочерняя нить. В основе активации

флюоресценции лежит 5`-3` экзонуклеазная активность полимеразы, которая при построении дочерней цепи понуклеотидно фрагментирует зонд. При этом флюорофор высвобождается из-под давления гасителя и активируется. Данные системы флюоресценции обладают значительно большей специфичностью по сравнению с интеркалирующими красителями.

В современных системах амплификации для возбуждения флюоресценции использует излучение в соответствующей области спектра с последующей детекцией изменения длины волны. Как только сила сигнала превысит некоторый пороговый уровень шума, его изменение будет графически отображаться в формате реального времени в форме экспоненциальной кривой, поднимающейся выше уровня изолинии. Именно точка пересечения кривой с осью ОХ и является так называемым пороговым циклом, относительным значением, отражающим концентрацию транскрипта в растворе. Графически интерфейс программы ОТ-ПЦР выглядит следующим образом (диаграмма 1):

Диаграмма 1

Интерфейс программы ОТ-ПЦР. Уровень пороговой детекции лежит на оси Х, точка пересечения экспоненты амплификации является номером цикла детекции.



С целью стандартизации методики ОТ-ПЦР и для получения воспроизводимого алгоритма расчета результатов необходимо введение внешних или внутренних стандартов, относительно которых будет

производиться количественная оценка реакции. Одним из возможных вариантов является одновременное определение экспрессии т.н. «референсных» генов, экспрессия которых не зависит от различных специфических условий.

В целом после статистической обработки результатов ОТ-ПЦР исследователя получает информацию об относительном уровне экспрессии изучаемых генов.

2.3.2 Методика пробоподготовки и ОТ-ПЦР в настоящем исследовании

В целом процедура от момента получения образца ткани до получения результатов ОТ-ПЦР состояла из трех этапов: выделение мРНК из образца ткани, проведение обратной транскрипции и собственно ПЦР.

На этапе выделения РНК использовались коммерческие наборы колонок RNeasy производства Qiagen USA. Обработка исследуемого материала проводилась в соответствии с протоколом компании-производителя. Объем конечного раствора составлял 60 мкл со средней концентрацией РНК в нем 35-40 мкг/мл.

После получения РНК немедленно проводился этап обратной транскрипции. Реакцию ставили, используя наборы НПО «ДНК Технология» согласно инструкции. Реакцию проводили при температуре 40°C в течение 30 минут, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 минут. Для увеличения объемов образцов после ОТ кДНК разводили в 10 раз в ТЕ-буфере. Полученный раствор кДНК либо немедленно использовался для ОТ-ПЦР, либо хранился при -20°C.

Для постановки ПЦР использовались реактивы фирмы «ЗАО НПФ ДНК-Технология». Контроль отсутствия реакции на геномной ДНК ставили с образцами, не прошедшими реакцию обратной транскрипции, которые разводили в ТЕ-буфере в конечной концентрации эквивалентной

конечной концентрации кДНК. ДНК-зонды, использовавшиеся для детекции продуктов амплификации исследуемых и нормировочных генов, были помечены FAM. Реакции амплификации генов ставили в разных пробирках в двух повторах. Оптимальную температуру отжига праймеров и зондов подбирали экспериментально с использованием режима «градиент температур», для всех тест-систем температура была унифицирована и составила 64°C. Амплификацию осуществляли в режиме “реального времени” в объеме 35 мкл по следующей программе: 1 цикл - 80°C 30 сек, 94°C 1 мин; 50 циклов - 94°C 10 сек, 64°C 20 сек, использовали приборы “ДТ-322” и “ДТ-964” производства фирмы ЗАО “НПФ ДНК-Технология”. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64°C.

Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов (C_p) используя несколько формул:

$$[C_i] = 2^{C_{pi} - C_{pi \min}} \text{ (формула 1),}$$

где C_i – уровень экспрессии гена без учета количества материала,

C_{pi} - значение индикаторного цикла в исследуемом образце,

$C_{pi \min}$ - значение индикаторного цикла в образце с максимальным уровнем экспрессии,

2 – эффективность амплификации.

$$NF_{HKG1} = 2^{C_{p \ hkg1} - C_{p \ hkg1 \ min}} \text{ (формула 2)}$$

NF_{HKG1} - нормировочный фактор для одного нормировочного гена/HouseKeeping Gene,

$C_{p \ hkg1}$ - значение индикаторного цикла в нормировочном образце1,

$C_{p \ hkg1 \ min}$ - значение индикаторного цикла в образце с максимальным уровнем экспрессии нормировочного гена 1,

2 – эффективность амплификации.

$$NF = \sqrt[n]{NF_{hkg1} \times NF_{hkg2} \times \dots \times NF_{hkg n}} \quad (\text{формула 3})$$

NF- нормировочный фактор с учетом всех нормировочных генов, рассчитывается как среднее геометрическое,

NF_{HKG1} - нормировочный фактор для одного нормировочного гена, n – число нормировочных генов, в нашем случае n=5.

$$[C_{NF}] = [Ci]/NF \quad (\text{формула 4}),$$

где C_{NF} – уровень экспрессии гена с учетом нормировочного фактора,

где C_i – уровень экспрессии гена без учета количества материала, NF- нормировочный фактор с учетом всех нормировочных генов.

$$\text{Уровень экспрессии} = [C_{NF}]/[C_{NF \min}] \quad (\text{формула 5}),$$

где C_{NF} – уровень экспрессии гена с учетом нормировочного фактора,

$C_{NF \min}$ – значение в образце с минимальным уровнем экспрессии.

Фактически уровень экспрессии приравнивается к 1 в образце с минимальным уровнем экспрессии. В остальных образцах данный показатель (уровень экспрессии) отражает во сколько раз экспрессия гена выше по отношению к данному образцу.

2.4. Методы лечения.

Лечение пациентов основной группы проводилось согласно утвержденным клиническим протоколам РНЦРР лечения опухолевых заболеваний, подразумевающих проведение хирургического лечения, а также проведения химиотерапии и лучевой терапии в зависимости от стадии и локализации процесса.

2.5. Методы статистического анализа данных.

При создании первичной базы данных использовался редактор электронных таблиц MS Excel 2010. Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы Statistica 10. При описании количественных переменных использовались медиана и межквартильный размах в формате Me [LQ;UQ] в случае ненормального распределения признака, а также средние значения данных со стандартным отклонением ($M \pm SD$) в случае нормального распределения. Сравнение признаков в случае ненормального распределения проводилось с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни, а также с использованием однофакторного и многофакторного дисперсионного анализа в случае нормального распределения и равенства дисперсий признаков. Статистическая значимость различий значений признаков в трех и более группах определялась с использованием непараметрического критерия Краскела-Уоллиса для множественных сравнений, а также дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Корреляционный анализ проводился с использованием критерия рангов Уилкоксона. Корреляция считалась выраженной для $r > 0,6$ и умеренной для $r = 0,3 - 0,6$. Для сравнения бинарных и номинальных показателей использовался критерий Хи-квадрат, различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Проверка гипотезы о распределении данных по нормальному закону производилась с помощью критерия согласия Шапиро-Уилка. Для анализа общей и безрецидивной выживаемости использовались методы статистического анализа по Каплану-Майеру. При анализе статистических моделей использовались многопараметрические методы статистики, в частности, факторный анализ по методу k-средних, кластерный анализ по методу Варда с определением евклидова расстояния между объектами, а также линейный дискриминантный анализ с последовательным включением объектов в модель

дискриминантной функции. Также анализировались значения апостериорной вероятности решения дискриминантного уравнения распределения образцов в группы. Отличия и выявленные закономерности считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Глава 3. Клинико-морфологические и молекулярно-генетические особенности больных колоректальным раком: клиническое значение.

3.1. Клиническая характеристика обследованных больных

В группу больных КРР (всего 555 человек) вошли 274 мужчин (49,4%) и 281 женщин (50,6%) в возрасте от 22 до 88 лет. С учетом того, что ретроспективная и проспективная группы пациентов достоверно не отличались между собой ни по одному из изученных параметров, здесь и далее мы даем общую объединенную характеристику пациентов основной группы исследования. Средний возраст пациентов составил $62,9 \pm 10,4$ лет, что соответствует мировым эпидемиологическим значениям. (21, 68) Распределение больных по возрастным группам представлено в таблице 2. Достоверных гендерных отличий при анализе по возрастным подгруппам не получено. (21, 68)

Таблица 2

Возрастной состав больных КРР и здоровых добровольцев

Возрастной период	Основная группа N = 555, абс.кол-во/доля в группе (%)	Контрольная группа N=50, абс.кол-во/доля в группе (%)
< 30	4 (0,72)	0
30-39	8 (1,44)	1
40-49	39 (7,03)	4 (3,7)
50-59	150 (27,03)	17 (40,7)
60-69	195 (35,13)	22 (44,5)
70-79	141 (25,41)	6 (11,1)
>79	18 (3,24)	0

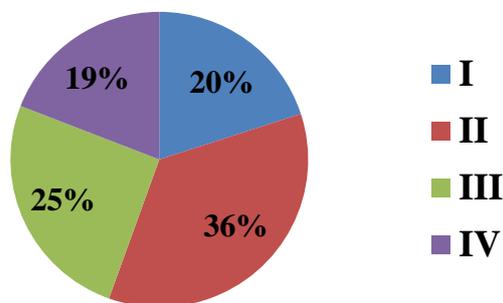
Средние сроки наблюдения пациентов составили $43,4 \pm 37,2$ месяца, что значительно превышает средние сроки прогрессирования КРР, указываемые большинством исследователей. (21, 24)

По стадии опухолевого процесса больные разделились следующим образом: I стадия диагностирована у 111 (20,0%) человек; II стадия - у 197 (35,5%); III стадия - у 141 (25,4%) и IV стадия - у 106 (19,1%). Стадийная структура опухолевого процесса представлена на диаграмме 2. Таким образом, III и IV стадия диагностирована у 44,5% пациентов, что свидетельствует об отсутствии, неэффективности или невыполнении скрининговых мероприятий, по сравнению с рядом стран Европы, Японии, Австралии, США и др., где выявляемость КРР на поздних стадия не превышает 15%. (132, 134, 140)

Диаграмма 2

Стадийная структура опухолевого процесса при КРР (%), N= 555

Стадии заболевания



Регионарные метастазы выявлены у 235 больных (42,3%). Местно-распространенная опухоль с проращением соседних органов обнаружена у 52 (9,4%) человек. Постадийно: местно-распространенный рак отмечен у 9 (4,6%) пациентов II стадии, у 27 (19,2%) пациентов - III стадии и у 16 (15,1%) пациентов - IV стадии заболевания.

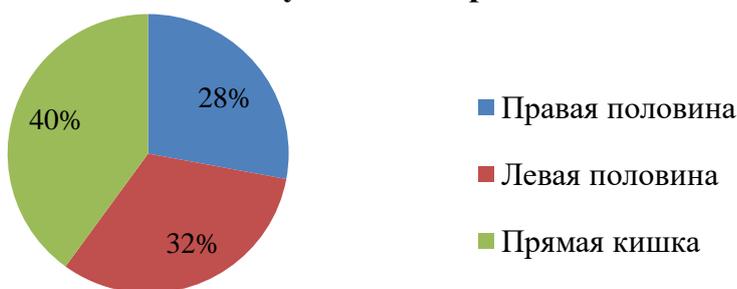
Опухолевое поражение локализовалось в различных анатомических отделах ободочной и прямой кишок: из них, опухоли правой половины толстой кишки (слепая кишка, восходящая ободочная кишка, печеночный

угол, поперечная ободочная кишка) - 155 случаев - составили 27,9%; опухоли дистального отдела ободочной кишки (селезеночный угол, нисходящая ободочная кишка, сигмовидная кишка) – 178 случаев – составили 32,1%. Локализация опухоли в прямой кишке и ректосигмоидном отделе встретилась в 40,0% (222 человека) клинических наблюдений. Распределение больных в зависимости от локализации первичной опухоли представлено на диаграмме 3. Собственные данные полностью укладываются в структуру КРР в зависимости от локализации, указываемую специалистами ВОЗ. (21, 68)

Диаграмма 3

Распределение больных в зависимости от локализации первичной опухоли при КРР (%), N=555

Локализация опухолевого процесса



При этом мы обнаружили изменение структуры опухолевого процесса по локализации в зависимости возраста пациента. Так, рак правой половины ободочной кишки до 40 лет практически не встречался, тогда, как после 80 лет данная локализация представлена почти половиной всех случаев. Данные по локализации опухоли в зависимости от возраста отражены на диаграмме 4.

Основными жалобами являлись неспецифические жалобы на снижение массы тела, слабость, астенический синдром и периодические боли в животе. Частота жалоб в зависимости от локализации первичной опухоли толстой кишки представлена в таблице 3. Подавляющее большинство больных предъявляло две и более жалобы.

Диаграмма 4

Локализация опухолевого процесса при КРР в зависимости от возраста пациента (%), N=555.

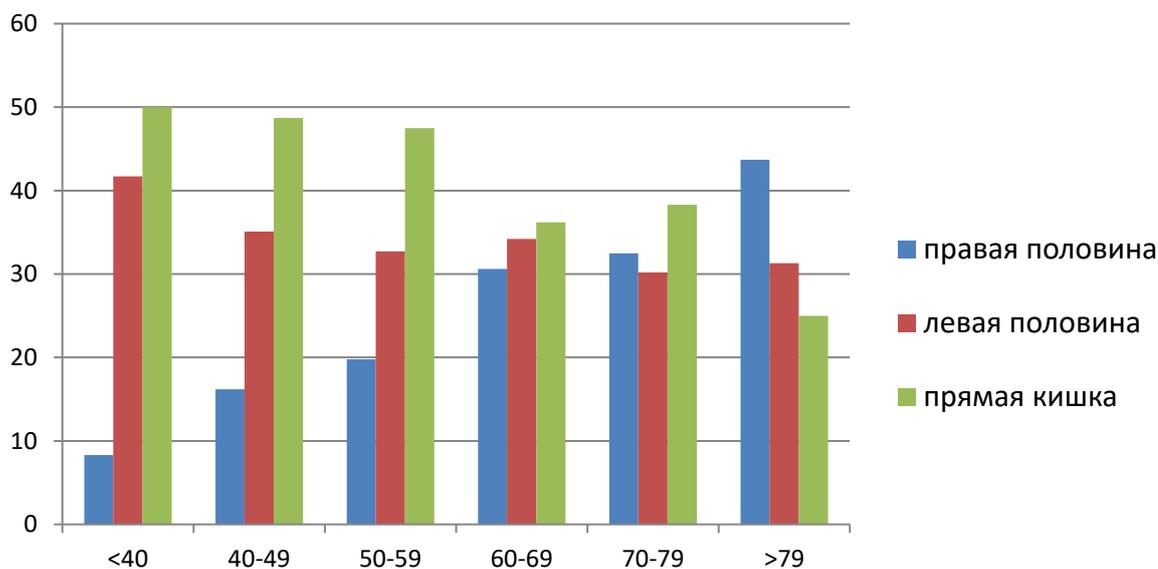


Таблица 3

Основные жалобы больных в зависимости от локализации первичной опухоли при КРР (N=555)

Жалобы	Правая половина (n=155)	Левая половина (n=178)	Прямая кишка (n=222)
	Количество больных/доля в группе		
Запоры	43 (27,7%)	131 (73,6%)	152 (68,5%)
Диарея	31 (20,0%)	16 (9,0%)	43 (19,4%)
Снижение массы тела	81 (52,3%)	21 (11,8%)	37(16,7%)
Слабость/быстрая утомляемость	47 (30,3%)	48 (27,0%)	51 (23,0%)
Болевой синдром	9 (5,8%)	49 (27,5%)	97 (43,7%)
Отсутствие жалоб	63(40,6%)	38 (21,3%)	43 (19,4%)

Частота жалоб и их выраженность нарастала по мере увеличения стадии заболевания. Так, при I стадии среди всех локализаций в 91,0% случаев жалобы отсутствовали, тогда как при увеличении опухоли до стадии T3-4, жалобы в той или иной степени присутствовали практически у всех пациентов,

основной из которых была – хронический запор, перемежающийся с периодическим послаблением стула (диареей).

Изучение семейного анамнеза выявило высокую частоту онкологических заболеваний у родственников первой линии родства - 47,0% наблюдений. Чаще всего встречались онкологические заболевания органов желудочно-кишечного тракта (рак желудка, толстой кишки), органов женской репродуктивной системы (рак эндометрия, яичников, молочных желез) и мочевыделительной системы (рак почек, предстательной железы) в 36,0%, 30% и 23,0% наблюдений соответственно. Объективно сравнить данные с официальной российской статистикой нам не удалось ввиду того, что данный параметр («ненаследственные» опухоли у родственников) не входят в перечень обязательно анализируемых параметров. Идея о наличии генетической предрасположенности к развитию опухоли любой локализации в своей основе имеет предрасполагающий полиморфизм генов или нескольких наследуемых мутаций, что предстоит детально уточнить, чтобы говорить о возможности использования в повседневной клинической практики. В целом установление возможных полиморфизмов, предрасполагающих к развитию заболеваний в неонатальном периоде (создание генетического паспорта) рассматривается некоторыми авторами как наиболее перспективное развитие медицинской науки – фундаментальная база для профилактической превентивной медицины. (265)

Частота перенесенных и имеющихся соматических заболеваний в основной группе пациентов представлена двумя и более хроническими заболеваниями у 413 (74,4%) пациентов. Среди перенесенных и имеющихся сопутствующих заболеваний выявлена высокая частота хронических заболеваний органов пищеварения (53,7%), хронических воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей (47,0%), заболеваний сердечно-сосудистой системы (60,2%), эндокринно-обменных заболеваний и нарушений (66,8%). Высокая отягощенность по различным хроническим соматическим заболеваниям, на наш взгляд, связана со средним возрастом

пациентов и стилем жизни, включающим уровень физической активности, тип питания и др. (28)

Попытка оценить частоту фоновых и предраковых заболеваний толстой кишки представляла значительные трудности в виду того, что в 82,5% (458 человек) наблюдений колоноскопия, выявившая и подтвердившая злокачественное поражение толстой кишки, являлась первой колоноскопией в жизни пациента. Тем не менее, необходимо отметить, что сочетание КРР с аденоматозным/ми полипом/ами данного или другого отдела толстой кишки выявлено в 25,8% (143 человек) наблюдений. Согласно данным литературы частота полипов при КРР составляет 20-60% (1, 68, 266)

При выделении подгрупп пациентов в зависимости от локализации опухоли (правая и левая половина толстой кишки) нами обнаружены достоверные отличия в частоте сочетания КРР с аденоматозными полипами. Так, локализация первичной опухоли среди пациентов, у которых выявлены аденоматозные полипы толстой кишки, находилась в левой половине в 81,1% (116 человек) наблюдений и в правой половине - в 18,9% (27 человек) наблюдений ($p < 0,001$).

97 (17,5%) пациентов указывали на прохождение эндоскопического исследования толстой кишки, причем, только в половине случаев - это была плановая колоноскопия, выполняемая при диспансеризации. Среднее время между последним исследованием (выявившим злокачественное поражение толстой кишки) и предшествовавшим составило $8,3 \pm 6,1$ лет. На проведение анализа кала на скрытую кровь как элемент диспансеризации в течение жизни не указал ни один больной. Различий в частоте фоновой патологии толстой кишки у больных КРР различной локализации не выявлено.

Обращала на себя внимание частота встречаемости доброкачественных опухолей и гиперпластических процессов других органов и систем. Например, частота доброкачественных гиперпластических процессов и опухолей женской репродуктивной системы, по нашим данным,

достигала 98%, а гиперплазия предстательной железы наблюдалась практически у каждого второго пациента.

Изучение аллергоанамнеза не выявило достоверных различий в основной и контрольной группах и характеризовалось наличием моно-, олиго-, или поливалентной аллергии у 19,3% больных и достоверно не отличалось от группы контроля.

В структуре жалоб и заболеваний у обследованных больных четко выделялись проявления, которые, целесообразно расценивать как проявления паранеопластического синдрома (267). Похудание – 37,1%, тромбозы глубоких и поверхностных вен нижних конечностей 13,4%, анемия различной степени выраженности – 52,7%, гипопроотеинемия – 25,7%, гиперфибриногенемия – 13,1%, синдром ускоренного СОЭ - 73,8%, а также анамнестические указания на аутоиммунную патологию (аутоиммунный тиреоидит, системные заболевания соединительной ткани и др.) до диагностики основного заболевания – 10,3%.

Частота некоторых проявлений паранеопластического синдрома различалась в зависимости от локализации первичной опухоли. Так, похудание, анемия, гипопроотеинемия достоверно чаще встречались при локализации опухоли в правой половине толстой кишки. Нами обнаружена умеренная положительная корреляция ($r=0,31$; $p<0,05$) между наличием похудания и стадией опухолевого процесса в случаях локализации опухоли в правой половине толстой кишки; а также умеренная положительная корреляция ($r=0,34$, $p<0,05$) между жалобой на запоры и стадией опухолевого процесса в случаях локализации опухоли в левой половине толстой кишки.

Кроме того, нами выявлена высокая частота отклонений антропометрических характеристик от нормативных у обследованных больных. Так, нормальный ИМТ отмечен только у 209 (37,6%) пациентов. Дефицит массы тела выявлен у 3 (0,5%) пациентов. Таким образом, превышение ИМТ более 25 кг/м² обнаружен более, чем в 60% наблюдений.

Детализированные данные по величине ИМТ в зависимости от пола отражены на диаграмме 5 и таблице 4.

Диаграмма 5

Распределение больных КРР по полу в зависимости от ИМТ, N=555

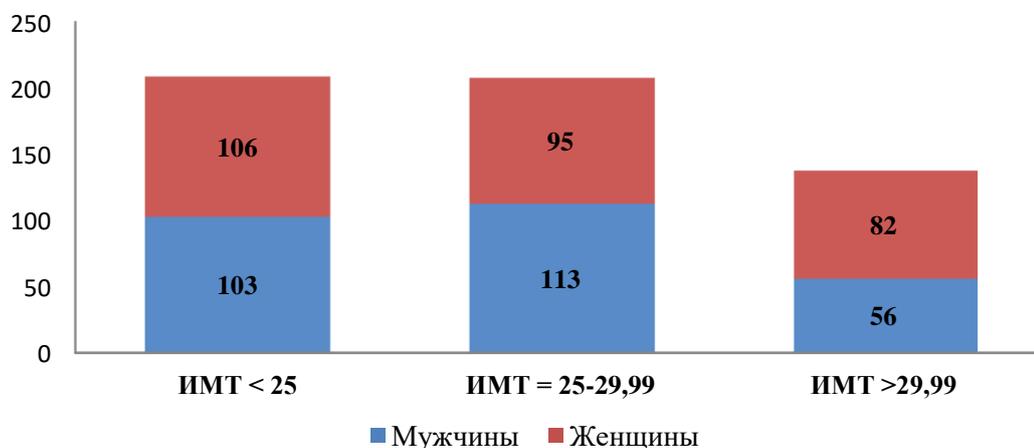


Таблица 4

Распределение больных КРР по полу в зависимости от ИМТ, N=555

	ИМТ < 25	ИМТ = 25-29,99	ИМТ > 29,99
Женщины	106 (37,4%)	95 (33,6%)	82 (29,0%)
Мужчины	103 (37,8%)	113 (41,5%)	56 (20,6%)

Как видно из представленной диаграммы, гендерная структура пациентов КРР существенно не меняется, однако отмечается некоторое преобладание женщин при увеличении ИМТ более 30 кг/м², тогда как среди пациентов с нормальным ИМТ и избыточным весом, различия половой структуры не выявлены, или незначительно преобладают мужчины.

Перспективный этап исследования позволил нам дать детальную антропометрическую характеристику больных колоректальным раком, включающей не только массово-ростовой показатель, но и оценку характера распределения жировой ткани у данных пациентов на основании измерения объема талии и объема бедер с дальнейшим вычислением соотношения ОТ/ОБ. Результаты проведенной антропометрии у 180 пациентов (87 мужчин и 93 женщин) проспективной группы отражены в таблице 5

Таблица 5

Распределение больных КРР (мужчин и женщин) в зависимости от ИМТ и отношения ОТ/ОБ, N=180

Пол	ОТ/ОБ	Дефицит массы тела n=2	Нормальный ИМТ n=74	Избыточная масса тела n=71	Ожирение n=33	Всего n=180
Женский n=93	<0,85	2	19	17	7	33
	>0,85	0	15	20	12	59
Мужской n=87	<1	0	14	12	2	18
	>1	0	26	22	12	60

Нарушенная толерантность к глюкозе и сахарный диабет II типа отмечены у 78,0% пациентов с соотношением ОТ/ОБ, превышающим гендерные нормативные показатели, что являлось показанием к проведению гипогликемической терапии.

Кроме того, мы провели анализ частоты встречаемости первично-множественных синхронных и метасинхронных злокачественных опухолей среди всех пациентов. Частота первичной множественности составила 19,3% (107 человек: 52 мужчины и 55 женщин). У пяти пациентов выявлено две вторичные злокачественные опухоли, а у трех - 3. Результаты представлены в таблице 6.

Таким образом, самой частой второй локализацией среди данной группы пациентов были молочные железы, предстательная железа, другой отдел ободочной или прямой кишки, эндометрий, яичники. В 7 случаях вторая локализация располагалась в двух и более органах. Надо отметить, что средний ИМТ в подгруппе больных с первичной множественностью составил $29,2 \pm 3,1$ кг/м², а среди пациентов с локализацией процесса в нескольких органах этот показатель составил $34,1 \pm 2,8$ кг/м². При сочетании КРР со злокачественным поражением эндометрия или почек, средний индекс массы тела составил $30,7 \pm 4,6$ кг/м².

Таблица 6

Частота поражения других органов у пациентов КРР при первичной множественности, N=118, где N – количество опухолей.

Локализации син-/метахронной опухоли	Абсолютное количество	Частота, %
Другие отделы ободочной и прямой кишки	23	19,5
Молочные железы	21	17,8/38,2*
Предстательная железа	15	12,8/28,9*
Желудок	8	6,8
Эндометрий	10	8,5/18,2*
Почки	10	8,5
НЗО	8	6,8
Яичники	7	5,9/12,3*
Кожа/меланома	5	4,3
Мочевой пузырь	4	3,4
Легкое	2	1,7
Печень	1	0,8
Поджелудочная железа	1	0,8
Уретра	1	0,8
Фатеров сосочек	1	0,8
Щитовидная железа	1	0,8

*первая цифра – доля в общем количестве больных с первичной множественностью; вторая цифра – доля, применительно к полу пациента.

При сопоставлении с данными литературы, наши данные по первичной множественности обладают определенной научной новизной. Мы указали на частое сочетание КРР с раком предстательной и молочных желез, органов мочевыделительной системы. При этом полученные нами данные о высокой частоте сочетания рака толстой кишки с аденокарциномой эндометрия, раком яичников совпадает с результатами отечественных исследователей, занимавшихся данной проблемой, в том числе Дильмана

В.М., который относил КРР к гормонозависимым злокачественным опухолям человека. (262, 268)

По результатам комплексного предоперационного обследования у всех больных установлен и морфологически верифицирован диагноз (по результатам биопсии), установлены локализация и стадия заболевания, что позволило выработать оптимальный объем хирургического лечения и наметить необходимость применения адъювантных методов лечения. Лечение больных проводилось в соответствии с утвержденными в РНЦРР протоколами лечения рака ободочной и прямой кишки, которые соответствуют международным клиническим протоколам лечения (185). В соответствии с данными протоколами, основными факторами, влияющими на выбор метода/методов лечения и последовательность их применения, являются локализация, гистологическое строение, клиническая стадия процесса, общее соматическое состояние пациента.

В зависимости от локализации и распространенности процесса больным выполнялись следующие операции: право/левосторонняя гемиколэктомия, резекция сигмовидной кишки, резекция поперечно-ободочной кишки, передняя резекция прямой кишки, обструктивная резекция прямой кишки, брюшно-промежностная экстирпация. У 52 (9,4%) пациентов в связи с распространенностью процесса проведена операция с удалением или резекцией соседних органов.

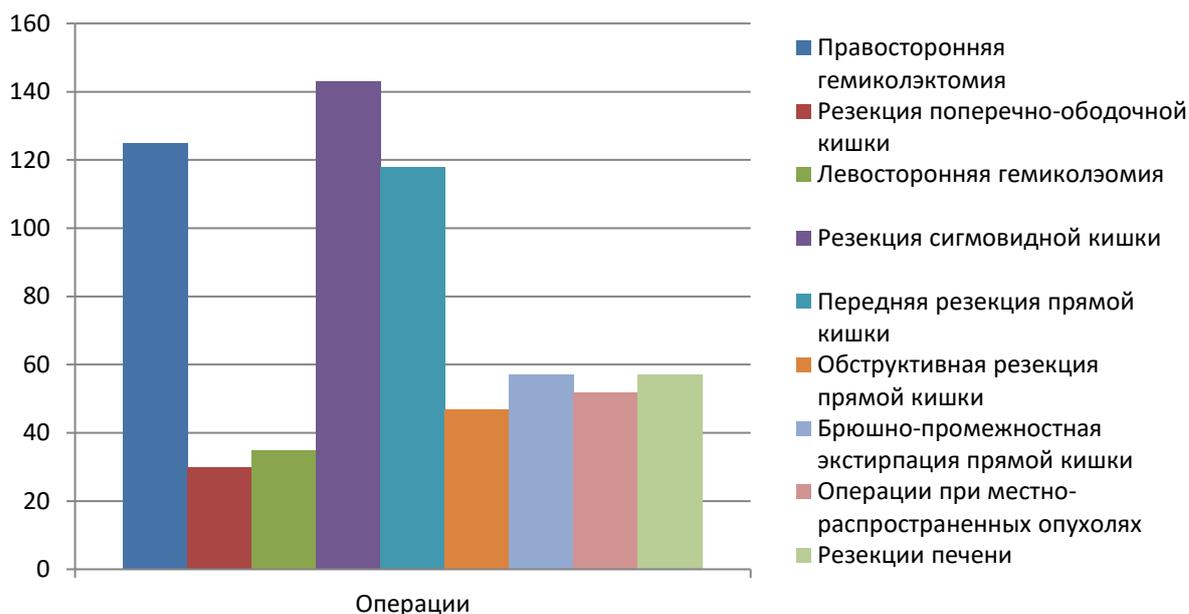
У 56 (10,1%) пациентов общей группы выполнено 57 резекций печени по поводу метастазов КРР. Операции на печени производились как одномоментно, так и на втором этапе. При интраоперационном решении о невозможности проведения операции на печени при наличии метастазов, проводились биопсии метастазов для их морфологического подтверждения и дальнейшего молекулярно-генетического исследования. Выполненные операции представлены на диаграмме 6. Как видно из представленной диаграммы, основными операциями, выполняемыми в клинике, явились

правосторонняя гемиколэктомия, резекция сигмовидной кишки и передняя резекция прямой кишки.

В послеоперационном периоде осложнения отмечены в 97 (17,5%) пациентов. Характер осложнений представлен в таблице 7.

Диаграмма 6

Распределение пациентов КРР основной группы в зависимости от выполненного хирургического вмешательства (абс), N= 664



Летальность в послеоперационном периоде составила 2,9% (16 пациентов) и явилась следствием несостоятельности анастомоза и развитием перитонита у четырех больных, декомпенсацией сердечно-сосудистой деятельности у четырех больных, развитием тромбоза легочной артерии у четырех больных, острого нарушения мозгового кровообращения у двух больных, печеночной недостаточности – у двух больных. Количество осложнений хирургического лечения укладываются в частоту осложнений указываемую исследователями. (269, 270)

При анализе клинических данных, особое внимание уделялось изучению отдаленных результатов лечения. В общей группе отдаленные результаты отслежены у 487 (86,1%) пациентов и средние сроки наблюдения

составили $43,2 \pm 32,3$ мес. (от 1-го до 260 месяцев), при этом сроки наблюдения пациентов в проспективной группе составили $20,1 \pm 12,7$ мес.

Таблица 7

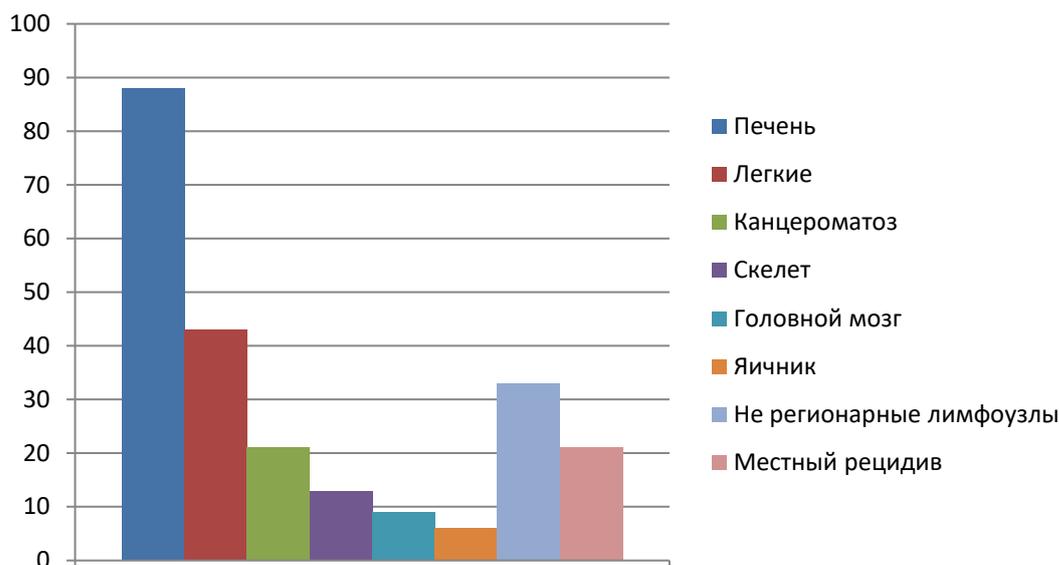
Характер осложнений в послеоперационном периоде ($N=97$)

Осложнение	Частота
Перитонит	19
Несостоятельность межкишечного анастомоза	15
Нагноение п/о раны.	15
Тромботические и тромбоэмболические осложнения	14
Послеоперационное кровотечение	9
Декомпенсация хронических и развитие острой сердечно-сосудистой патологии	8
Кишечная непроходимость	7
Острые язвы органов ЖКК(кровотечение/перфорация)	6(3/1)
Урологические осложнения	7
Острое нарушение мозгового кровообращения	5
Пневмония	4
Печеночная недостаточность	2
Некроз стомы/параколостомический абсцесс	2
Ятрогенные повреждения	1
Другие осложнения	4

Прогрессирование процесса среди пациентов с отслеженными отдалёнными результатами отмечено у 173 (35,5%) человек в сроки от 2 до 144 ($21,5 \pm 22,7$) месяцев. При этом наступление прогрессирования слабо положительно коррелировало ($r=0,21$, $p<0,05$) со стадией процесса, но не коррелировало с уровнем дифференцировки опухоли ($r=0,11$, $p>0,05$). Характер прогрессирования представлен на диаграмме 7

Как видно из представленной диаграммы, самым частым характером прогрессирования явились метастазы в печень, изолированные метастазы в печень в 58 (65,9%) наблюдениях. В тоже время только у 7 (16,3%) больных отмечено изолированное метастатическое поражение легких. При этом метастазы в легких в 21 случае из 43 (48,8%) сочетались с метастазами в печени и в 11 (25,6%) случаях с местными рецидивами.

Характер прогрессирования опухоли (n=133)



Таким образом, на основании анализа результатов клинических и параклинических методов исследования больных КРР, мы пришли к следующим выводам:

1. Возраст 88,5 % больных КРР попадает в диапазон старше 50 лет, что указывает на возрастную категорию морфологической реализации собственно предрака толстой кишки – 40 - 60 лет. Однако крайне низкий охват населения программой скрининга КРР (анализ кала на скрытую кровь с проведением колоноскопии при положительном результате теста или проведение колоноскопии у пациентов высокого риска) приводит к низкой ранней диагностике КРР и отсутствию реализации вторичной профилактики, что подтверждается поздним выявлением заболевания - в 43,9% наблюдений опухоль диагностирована на III-IV стадии процесса по нашим данным.

2. Вероятно наличие нескольких патогенетических вариантов КРР, в пользу чего свидетельствует увеличение частоты опухолевого поражения правых отделов толстой кишки с возрастом при крайне редких клинических наблюдениях данной локализации опухолевого процесса у лиц младше 40 лет по сравнению с левосторонней локализацией, различия в частоте жалоб (бессимптомность, болевой синдром, запоры и диарея) и проявлений

паранеопластического синдрома (похудание, гипопропротеинемия, анемия) при право- и левосторонней локализации опухоли, а также различная частота сочетания право- и левосторонней локализации опухоли с аденоматозными полипами толстой кишки. (89, 271, 272)

3. Для больных КРР характерна отягощенность семейного онкологического анамнеза по злокачественному эпителиальному поражению органов пищеварения, репродукции и мочевыделительной системы (47,0% пациентов) доля онкопатологии органов желудочно-кишечного тракта составила 36%, органов женской репродуктивной системы - 30% и мочевыделительной системы - 23%.

4. Частота первично-множественного опухолевого поражения при КРР составляет 19,2 % и прямо коррелирует с повышением ИМТ ($r=0,31$ $p<0,05$). При этом наиболее часто син- или метакронной локализацией опухолевого поражения являются молочные и предстательная железы, другой отдел толстой кишки, эндометрий, яичники, желудок и почки. Таким образом, пациентов с КРР на фоне избыточной массы тела и ожирения необходимо включать в группу риска по развитию полинеоплазии с поражением органов репродукции, желудочно-кишечного тракта, мочевыделительной системы.

5. Гендерные отличия степени влияния, повышенного ИМТ на риск КРР нами не получены. Однако обнаружено преобладание абдоминального типа отложения жировой ткани при КРР, как у мужчин, так и у женщин.

3.2. Морфологическая характеристика удаленных препаратов.

Морфологическому исследованию подверглись удаленные макропрепараты оперированных больных, у которых ранее, на основании морфологического исследования биоптата/ов слизистой оболочки толстой кишки установлен морфологический диагноз высоко-, умеренно- или низкодифференцированной аденокарциномы толстой кишки. В 8,3% наблюдений морфологическое исследование удаленного макропрепарата

выявило диморфную дифференцировку опухоли: умеренно-высокодифференцированную и умеренно-низкодифференцированную, в 28 (5,0%) и 18 (3,3%) случаев соответственно.

Во всех клинических наблюдениях край резекции не содержал признаков опухолевого роста. Таким образом, морфологическое строение наиболее удаленного края резекции мы условно приняли за «фоновую слизистую оболочку толстой кишки», т.е. слизистую оболочку толстой кишки без специфических микроскопических признаков опухолевого роста, несмотря на то, что научные публикации последних двух десятилетий широко используют терминологию «морфологически неизменная кишка» применительно к данным образцам. Однако данная характеристика, широко вошедшая в научный язык молекулярных генетиков (233, 234, 273), наряду с детальным описанием собственно характеристик опухоли, глубины инвазии, наличие/отсутствие признаков опухолевого роста в крае резекции, метастазов в регионарные лимфоузлы, полностью игнорирует научные данные, посвященные ультрамикроскопическим морфологическим изменениям в тканях, окружающих опухоль, и исключающие возможность существования опухоли на фоне «здоровой» слизистой оболочки толстой кишки. (274, 275, 276). Гиперплазии лимфоидной ткани регионарных лимфатических узлов в настоящее время уделяется диагностическое внимание только ввиду поиска возможной метастатической ткани как причины увеличения лимфоузла. Таким образом, реактивная гиперплазия лимфоидной ткани и ее роль в развитии/торможении опухолевого процесса в настоящий момент, на наш взгляд, недооценивается. Другие, условно «неспецифические» при световой микроскопии, признаки и нередкие черты морфологических изменений в «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки в последнее 10-15 лет «традиционно» не описываются патоморфологами ввиду отсутствия в настоящее время их клинической значимости. Однако гистологические заключения, датируемые 20-м и началом 21-го века, обычно содержали подробное описание «реактивных изменений» в стенке кишки. (71, 72) В

целом, мы можем охарактеризовать принцип рассмотрения данных изменений как «реактивных», правомочным лишь отчасти. По нашему мнению, в «фоновой» слизистой оболочке имеют место, как «реактивные», так и синхронные с опухолью, изменения, что согласуется с мнением ряда авторов. (68, 71, 131, 260) Мы не можем исключить, что реактивность иммунной системы с ее морфологическим выражением в «фоновой кишке» является неспецифическим признаком развития (а возможно и прогрессирования) опухоли.

В этой связи особенно интересным становится не столько обнаружение во всех наблюдениях морфологических признаков иммунного ответа (нерезко выраженных признаков воспалительной инфильтрации), сколько наличие у 19 (3,4%) пациентов в резецированных участках толстой кишки фокусов гиперплазии. Мы не можем исключить, что наличие фокусов гиперплазии служит морфологической основой для развития местных рецидивов и, при стечении обстоятельств, отдаленного метастазирования. Кроме того, мы обнаружили десмопластическую реакцию тканей, а также нередкое развитие фиброза подлежащей ткани брыжейки толстой кишки при прорастании опухоли до брыжейки. Данная особенность в молекулярной основе подразумевает высокую экспрессию TGF- β , который, приводит к развитию бессосудистого склероза в ряде патологических процессов в ответ на ишемию (277, 278, 279, 280), а также является индуктором эпителиально-мезенхимального перехода – главного условия отдаленного метастазирования. (281, 282) Метастазирование требует смены эпителиального фенотипа клетки на мезенхимальный. Более того, в зарубежной печати появились научные публикации, которые с молекулярных позиций (на основании анализа экспрессии эпителиальных, мезенхимальных/лейкоцитарных дифференцировочных маркеров, в том числе TOLL-like рецепторов - TLR) обосновывают возможность и необходимость развития эпителиально-лейкоцитарного перехода опухолевых клеток как основного необходимого условия уклонения от атаки собственной иммунной системы и появления

способности к проникновению в лимфатическую систему, «оседания» в лимфатических узлах и дальнейшего распространения и «хоуминга» в опухолевых нишах. (223, 228)

Еще одной морфологической характеристикой удаленного макропрепарата служила гиперплазия мезотелия (реактивная?) и выраженная лимфоидная инфильтрация субсерозного слоя при приближении морфологических границ опухоли к серозной оболочке кишки. Нередко при размерах опухоли более 4-5 см с прорастанием далее мышечного слоя кишки формировалось изъязвление самой опухоли с развитием фибриноидного некроза, активным привлечением нейтрофилов. Сам некробиотический процесс свидетельствовал о несоответствии потребности опухоли способностям и структуре стромы обеспечивать адекватное поступление субстратов с развитием различных вариантов гипоксии. (72, 207)

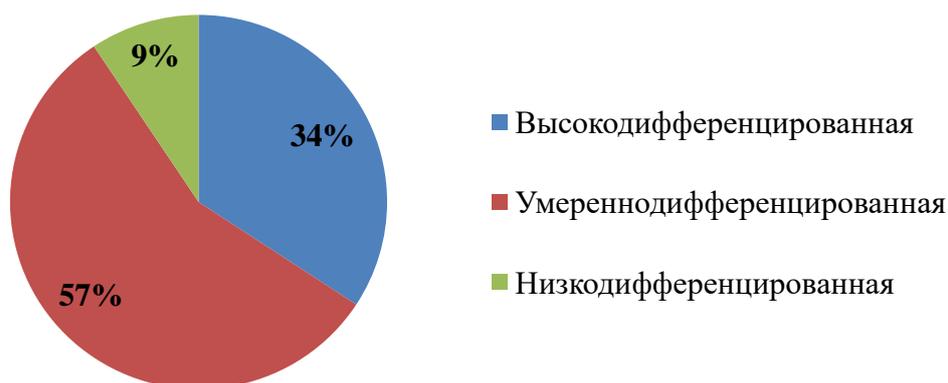
Необходимо отметить, что публикации второй половины XX столетия уже не рассматривали участки толстой кишки, прилегающие к опухоли и попадающие в резецированную часть как «здоровую» ткань, обнаруживая в оных различных ультрамикроскопические и гистохимические отклонения. Данные литературы, относящиеся к 60м-70м годам XX столетия, достаточно подробно освещают вопрос о применении ультрамикроскопических характеристик «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки при КРР в качестве возможного маркера злокачественного перерождения у лиц без признаков опухолевого роста. (98, 276) Однако обнаруженные изменения («цилиндрические клетки со светлой цитоплазмой» в верхних слоях крипт и поверхностном эпителии, повышенное количество везикул в колоноцитах, большое количество лизосом, присутствие малых электронно-плотных телец) носят, по-видимому, неспецифический характер, что затрудняет их использование в клинической практике в качестве предиктора морфологической реализации неопластического процесса толстой кишки и соответствует активации процессов аутофагии. (274, 276) Данная характеристика ультрамикроскопических изменений «фоновой толстой

кишки» при КРР привела к тому, что интерес к обнаружению выше упомянутых изменений у патоморфологов постепенно исчез в виду отсутствия практической значимости, т.е. влияния на выбор лечебной тактики и определения прогноза больного. Таким образом, в нашем исследовании оценка ультрамикроскопических характеристик «фоновой толстой кишки» не проводилась.

При гистологическом исследовании удаленных макропрепаратов у всех больных диагностирована аденокарцинома толстой кишки различной степени дифференцировки. Опухоли представлены железистыми, альвеолярными, папиллярными, трабекулярными и солидными вариантами строения. Слизиобразование различной степени выраженности наблюдалось в 108 (19,5%) случаях. Слизиобразование положительно коррелировало с локализацией опухоли в правых отделах ободочной кишки ($r=0,36$, $p<0,05$) и возрастом старше 70 лет ($r=0,33$, $p<0,05$). Гистологическое строение метастатических очагов соответствовало аденокарциноме кишечного типа данного пациента. Высокодифференцированные аденокарциномы выявлены у 190 (34,2%), умереннодифференцированные - у 313 (56,4%), низкодифференцированные - у 52 (9,4%) пациентов. Мы не обнаружили достоверной зависимости между степенью дифференцировки опухоли и ее локализацией. Доли различных степеней дифференцировки опухолей представлены на диаграмме 8.

Диаграмма 8

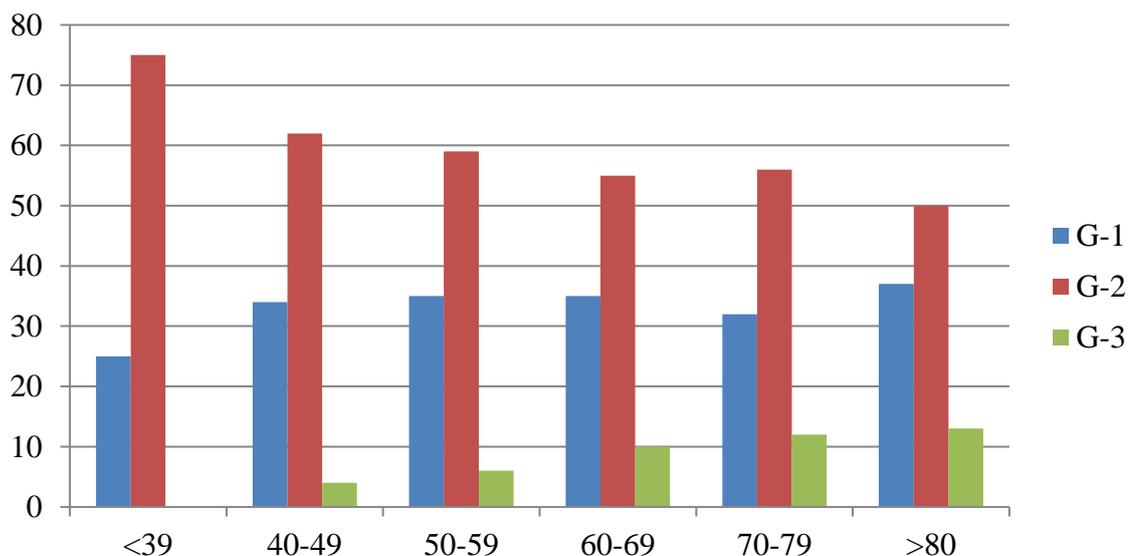
Дифференцировка опухоли при КРР (%), N=555



Сосудистая и периневральная инвазия опухоли наблюдалась в 12,4% случаев и слабо положительно коррелировала ($r=0,33$; $p<0,05$) с глубиной инвазии опухоли в стенку толстой кишки, но не коррелировала со стадией процесса, наличием гематогенных и лимфогенных метастазов.

При анализе степени дифференцировки опухоли в зависимости от возраста, отмечено увеличение доли низкодифференцированных опухолей и снижение умереннодифференцированных по мере увеличения возраста анализируемой подгруппы ($p>0,05$). Полученные результаты отражены на диаграмме 9.

Диаграмма 9
Степень дифференцировки опухоли в зависимости от возраста больных КРР
(%), $N=555$

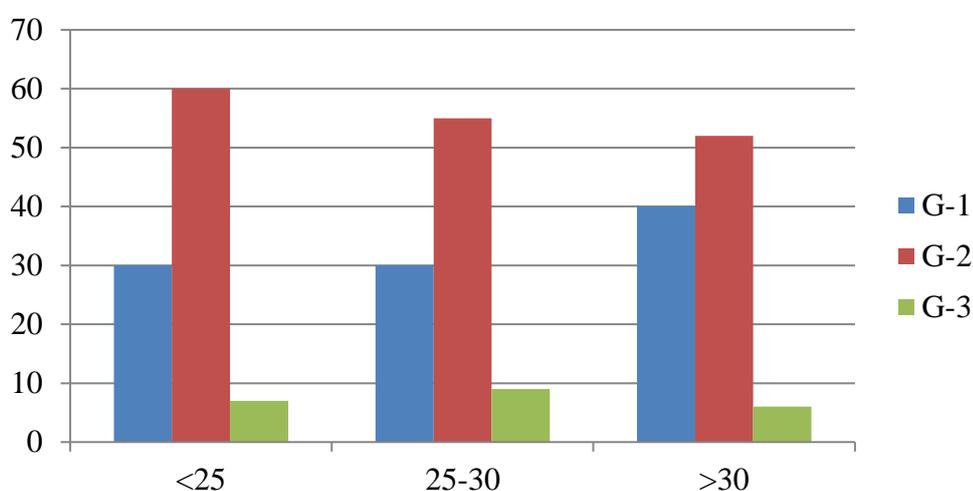


При изучении взаимосвязи ИМТ и степени дифференцировки опухоли, нами отмечена тенденция к повышению доли высокодифференцированных опухолей у пациентов с ожирением, однако, статистически не значимо ($p>0,05$). Результат представлен на диаграмме 10.

Мы не выявили отличий в частоте сочетания аденоматозных полипов и различных морфологических вариантов КРР.

Необходимо отметить, что стадия заболевания на клиническом этапе в 27,3% случаев отличалась от патологоанатомической. Таким образом, после проведенного хирургического лечения при получении новых данных, проводилось рестадирирование. Стадия опухоли, установленная на основании развернутого морфологического исследования макропрепарата, и явилась основой для формирования групп исследования по стадиям.

Диаграмма 10
Степень дифференцировки опухоли в зависимости от ИМТ больных КРР (%), N=555



При морфологическом исследовании биопсии слизистой оболочки толстой кишки у здоровых добровольцев – во всех случаях результат представлен морфологически неизменной слизистой оболочкой толстой кишки.

Таким образом, на основании сопоставления результатов дооперационного обследования больных КРР и данных морфологического исследования удаленных макропрепаратов, мы пришли к следующим выводам:

1. Доли высоко-, умеренно- и низкодифференцированных аденокарцином толстой кишки в структуре КРР изменяются в зависимости от

возраста: по мере старения возрастает доля низкодифференцированного КРР вне зависимости от локализации опухоли ($p < 0,05$).

2. В доле высоко-, умеренно- и низкодифференцированных аденокарцином толстой кишки в структуре КРР имеется *тенденция* к изменению в зависимости от ИМТ: при ожирении возрастает доля высокодифференцированного КРР вне зависимости от локализации опухоли ($p > 0,05$).

3. Клинико-морфологические параллели, отражающие связь особенностей жалоб, анамнеза, структуры сопутствующих заболеваний, первичной множественности неоплазии и морфологической структуры КРР, нами не выявлены.

4. Слизистую оболочку толстой кишки больных КРР, прилегающую к зоне резекции даже при отсутствии микроскопических признаков элементов опухоли, не представляется возможным охарактеризовать как «морфологически неизмененную». Ряд неспецифических морфологических характеристик слизистой оболочки толстой кишки больных КРР, характеризующийся признаками активации иммунитета, что проявляется «реактивными изменениями», по-видимому, имеет важное значение по мере прогрессирования опухоли. В 3,4 % наблюдений резецированный отрезок толстой кишки, прилежащий к краю резекции, содержит гистологические признаки очаговой «реактивной» гиперплазии слизистой оболочки толстой кишки.

5. Дальнейшее изучение «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки с молекулярных позиций может иметь в будущем важное клиническое значение.

3.3. Результаты молекулярно-генетического исследования, их интерпретация, клиническое и прогностическое значение.

3.3.1. Результаты анализа и интерпретация уровня экспрессии генов в исследованных группах образцов.

На первом этапе молекулярно-генетического исследования мы определили и сравнили уровень экспрессии панели ранее перечисленных генов в морфологически неизменной слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев (n=50) – «норма+», в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у пациентов колоректальным раком, взятой из самого удаленного края макропрепарата (около 15-20 см от опухоли – край резекции) (n=129) «норма-», ткани опухоли (n=132) «КРР» и ткани метастаза (n=31) «МТС». Полученные результаты представлены на диаграммах 1.1-1.56 в приложении 1

При сравнении экспрессии ряда генов, ассоциированных с пролиферацией, в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста и в ткани опухоли больного КРР, получены данные, свидетельствующие о повышенной пролиферативной активности опухоли. В частности, в пользу этого свидетельствует достоверное повышение экспрессии прямого маркера пролиферации Ki-67 в ткани первичного и метастатического КРР по сравнению с «фоновой» слизистой оболочкой толстой кишки ($p < 0,00001$). Помимо прямого маркера пролиферации Ki-67, ткань первичного и метастатического КРР характеризуется достоверным повышением экспрессии генов, ответственных за прогрессию клеточного цикла, таких как CCND1 ($p < 0,00001$), MYC ($p < 0,00001$), CCNB1 ($p < 0,00001$), STK15 ($p < 0,00001$), MYBL2 ($p < 0,00001$), VIRC5 ($p < 0,00001$). Полученные данные согласуются с значительным количеством публикаций по биомолекулярным особенностям КРР: роли повышенной экспрессии/угнетением деградации β -катенина, повышенной экспрессии

циклин-D1, MYC, STK15, BIRC5 и отдельным публикациям по MYBL2 в патогенезе и прогрессировании КРР (79, 109, 216, 283, 284).

Синергичная закономерность обнаружена по ряду генов ингибиторов апоптоза. Так, ингибитор ядерной транслокации β -катенина NDRG1 достоверно снижен в ткани первичного КРР по сравнению с «фоновой» кишкой ($p < 0,02$). Сходную закономерность показал негативный регулятор Akt-пути восприятия внешних сигналов - ген PTEN ($p < 0,00001$). Кроме того, повышение экспрессии продемонстрировали факторы ангиогенеза VEGFA121 ($p < 0,00001$), VEGFA156, ($p < 0,01$), и VEGFA189 ($p < 0,2$).

Вышеперечисленные закономерности укладываются в принятую концепцию опухолевого роста, которая главными условиями опухолевого роста и прогрессии рассматривает повышенную пролиферативную активность клеток опухоли, угнетение их апоптоза, стимуляцию неоангиогенеза (2, 24, 285).

Однако по некоторым генам получены противоречивые данные. Так, несмотря на обнаруженную нашим предшественниками повышенную экспрессию гена BAG1 в КРР, согласно нашим данным, экспрессия этого гена достоверно снижена в первичном и метастатическом КРР ($p < 0,0002$) по сравнению с «фоновой» слизистой оболочкой толстой кишки. Снижение экспрессии показал и ген BCL2. Экспрессия BIRC5 – ингибитора каспаз 3 и 7 - повышена в образцах опухоли. (284, 286, 287)

Принимая во внимание один из основных морфологических принципов развития злокачественного процесса: повышение эпителиально-стромального соотношения в ткани опухоли, (71, 210, 219) которое может быть достигнуто только благодаря абсолютному преобладанию пролиферации эпителиальных клеток над их апоптозом, интерпретация данных по относительно низкому содержанию мРНК ингибиторов апоптоза свидетельствует лишь о вовлечении иных механизмов уклонения от

запрограммированной клеточной гибели, возможно на более поздних этапах передачи проапоптотического сигнала.

Более того, исследования последних двух десятилетий с применением иммуногистохимических методов окраски/идентификации типа клеток по экспрессии того или иного маркера, проведенные морфологами, показали существенные различия в интенсивности экспрессии и профиле маркеров в центральной части и «фронте роста» злокачественных эпителиальных опухолей различной локализации. Так, «фронт роста» КРР характеризуется высокой ядерной экспрессией β -катенина, циклина D1, низкой экспрессией Ki-67 и повышенной экспрессией P16. Ряд авторов указывают на потерю экспрессии β -катенина в некоторых КРР, другие авторы обнаруживают увеличение его цитоплазматической и ядерной экспрессии. (210, 219) Некоторые исследователи обнаружили уменьшение эпителиально-стромального соотношения во «фронте роста» опухоли по сравнению с его центральной частью, что объясняют усилением эпителиально-мезенхимального перехода и повышенной способностью к метастазированию. (219) Согласно данным ультрамикроскопии, клетки опухоли характеризуются дезинтеграцией и потерей нормальной структуры и количества митохондрий, что, однако, не всегда приводит к их гибели. Усиление митохондриального пути апоптоза посредством определенных химических соединений предлагается рядом авторов использовать с целью повышения эффективности лечения различных злокачественных опухолей. (288, 289)

Выше перечисленные особенности приобретают иное звучание при добавлении в качестве группы контроля образцов слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев.

Экспрессия прямого маркера пролиферации Ki-67 в ткани первичного КРР, ткани метастазов КРР достоверно не отличается от слизистой оболочки толстой кишки здорового человека и достоверно выше «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки больного КРР ($p < 0,00001$). Сходную закономерность экспрессии в изученных группах образцов тканей

продемонстрировали CCNB1, STK15, BIRC5 ($p < 0,00001$). При этом гены MYC, CCND1 показали практически линейное увеличение экспрессии в ряду «норма+» - «норма-» - KPP-МТС, а ген MYBL2 – наименьшее значение экспрессии в «фоновой кишке», достоверно отличающееся как от «нормы+», так и от KPP ($p < 0,00001$).

Выявленные различия экспрессии факторов пролиферации в слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев и ткани опухоли при достоверно равных уровнях пролиферации (по Ki-67) свидетельствуют об отличных от нормы механизмах (сигнальных путях) поддержания уровня пролиферативной активности в опухоли.

Применительно к положению об угнетении апоптоза в опухолевой ткани мы получили следующую закономерность: ген BCL2 – ингибитор митохондриального пути апоптоза - линейно снижается от «нормы+» к «норме-» и образцам первичной опухолевой ткани; ген BAG достоверно снижается от образцов слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста к образцам первичного KPP; экспрессия гена P14 достоверно не различается между слизистой оболочкой толстой кишки здоровых добровольцев и образцами опухоли (KPP и МТС), однако, характеризуется достоверно меньшими значениями экспрессии в «фоновой кишке» больных KPP; экспрессия гена P16 линейно увеличивается в ряду сравнения («норма+» - «норма-» - KPP+МТС). Таким образом, однозначно говорить об угнетении апоптоза в опухоли, согласно нашим данным, не представляется возможным. По-видимому, происходит перераспределение основных сигнальных путей апоптоза в сравнении с здоровой слизистой оболочкой толстой кишки. Угнетение P53-зависимого апоптоза в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки при сопоставлении с угнетением пролиферации, позволяет поддерживать клеточный состав тканей. (266, 290) Не исключено, что использование препаратов, угнетающих пролиферацию и/или стимулирующих апоптоз может приводить к

осложнениям: атрофии и язвенным процессам «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки. (71)

Применительно к оценке интенсивности ангиогенеза в «классическом» ряду сравнения - «норма-» - «КРР» - «МТС», на основании оценки уровня экспрессии 121, 165, и 189 субъединиц VEGFA мы получили данные, которые полностью укладываются в сформированное представление об интенсификации процессов неоангиогенеза в опухоли, которые уже приобрели практическое выражение в использовании моноклональных анти-VEGF препаратов в лечении поздних стадий КРР. (291, 292, 293) При этом сравнение полученной закономерности с группой здоровых добровольцев, показала достоверно более низкую экспрессию указанных субъединиц VEGFA во всех группах образцов тканей больных КРР.

Таким образом, принимая во внимание объективные данные морфологии, которые обнаруживают повышенную плотность и наличие атипических сосудов в опухоли размерами более 1 см (261, 262, 266), мы можем интерпретировать полученные данные как стимуляцию патологического неоангиогенеза, не характерного для здоровой слизистой оболочки толстой кишки. Данные по наименьшей экспрессии VEGFA в «фоновой» слизистой оболочки больных КРР, еще раз указывают на снижении пролиферативной активности тканей, что может в клиническом аспекте реализоваться в снижении адаптивных и функциональных свойств толстой кишки.

Применительно к важным факторам ремоделирования межклеточного матрикса мы обнаружили ряд закономерностей, которые также подчеркивают выраженные молекулярные отличия «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки больных КРР от слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев. Ткань первичного КРР продемонстрировала достоверно большую экспрессию MMP 7,8,9,11 в сравнении с «фоновой» кишкой, и достоверно меньшую экспрессию MMP2. При этом экспрессия MMP 7,8 и 11 в образцах «норма+» и «норма-» не

различалась. По экспрессии MMP9 образцы опухолевой ткани достоверно не отличались от слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев. Наиболее дискуссионным при сопоставлении с результатами других авторов являются данные по экспрессии MMP2, максимальный уровень которой наблюдался у здоровых лиц и минимальный - в ткани первичной опухоли и метастаза КРР (233, 294). Объективным подтверждением отсутствия ошибки по данной матричной металлопротеиназе служит база данных по экспрессии генов в различных тканях человека на сайте BioGPS, согласно приведенным данным, экспрессия MMP2 в слизистой оболочке толстой кишки здорового человека на порядок превышает ее экспрессию в колоректальной аденокарциноме. (295) Данная металлопротеиназа играет важную роль в формировании зрелых сосудов. Другие публикации свидетельствуют о связи экспрессии данной матричной металлопротеиназы при инвазивном и метастатическом КРР. (296, 297)

Полученные нами результаты позволяют совершенно по-новому охарактеризовать опухоль – которая, по сути, не отличается повышенной пролиферативной и ангиогенной активностью от слизистой оболочки толстой кишки здорового человека, однако, как в опухоли, так и в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки доминируют иные механизмы поддержания клеточности ткани, ее перестройки. Таким образом, мы имеем веские основания утверждать, что не опухоль характеризуется повышенной пролиферативной активностью, а «фоновая» слизистая оболочка толстой кишки у больных КРР отличается угнетением пролиферации ангиогенеза. К подобному выводу невозможно прийти без введения группы контроля – здоровых добровольцев.

Полученные нами результаты по уровню экспрессии различных иммунных факторов и цитокинов в подавляющем большинстве случаев характеризуются достоверными отличиями между образцами слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев и образцами тканей, полученных от больных КРР. Так, в образцах тканей, полученных от

пациентов с ККР, нами отмечены достоверно более низкие показатели экспрессии генов COX2, IL-2, IL-12a, IL-15, IL-10, INF- γ , CD45, TNF- α , CD56, TLR2, TLR4, TLR7, TGF- β , HLA-G1, HLA-G5, LIF, LIFR. Достоверным повышением у больных КРР характеризовались CD68, IL-6, IL-7, IL-8. Различия между образцами тканей больных КРР получены по гену CD68, IL-2R (достоверно повышены в ткани метастаза), IL-8 (достоверно выше в ткани первичного и метастатического КРР), IL-1 β (достоверно выше в образцах первичной опухоли по сравнению с «нормой-» и МТС), IFN- γ (достоверно наименьшие значения в «норма-»), CD56 (наименьшие значения в ткани первичного и метастатического КРР), TLR2, TGF- β и HLA-G5 (достоверно выше в ткани МТС), TLR7 и LIFR (достоверно наименьшие значения в образцах первичного КРР)

Экспрессия только 7-ми изученных генов в слизистой оболочке здоровых добровольцев достоверно не отличается от «фоновой» слизистой оболочки больных КРР, что дает обоснованное право впредь не рассматривать «фоновую кишку» больного КРР в качестве контрольных образцов, а экспрессию различных биомолекулярных маркеров в данных образцах как физиологическую норму. Более того, в ряде случаев изменения экспрессии в слизистой оболочке здоровых добровольцев и больных КРР по отношению к самой ткани опухоли носят разнонаправленный характер.

Выявленная особенность ставит под сомнение доминировавшую на протяжении последнего полувека трактовку различных морфологических и молекулярно-биологических данных, которая основывалась на поиске различий между «фоновой кишкой» больного КРР и первичной опухолью, а данные различия объяснялись нарастанием молекулярно-генетических событий/ опухолевого прогрессией в морфологическом субстрате опухоли, что позволяло продолжать поиски средств «подавления» повышенной пролиферации, ангиогенеза и т.д. собственно в первичной и метастатической опухолевой ткани без фундаментального обоснования параллельного исследования характерных для неопластического процесса изменений в

«фоновой» кишке. (68, 266) Между тем, полученные молекулярно-генетические характеристики «условно здоровой» или «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки позволяют рассматривать ее как непосредственного участника системного процесса неопластической трансформации, играющего роль не только источника первичного рекрутирования генетически трансформированной/ых клетки/ок, но и активного динамического микроокружения морфологического опухолевого субстрата. (210, 228, 260, 298, 299)

На фоне «дозволяющих» / разрешающих молекулярно-генетических событий, происходящих в слизистой оболочке толстой кишки в процессе инициации и промоции опухолевого роста, к которым необходимо отнести благоприятное сочетание иммунных, эндо-/паракринных и нейрогенных факторов, остается неясным, каким образом в течение длительного времени первичная опухоль толстой кишки продолжает быть единственным морфологическим субстратом системного неопластического процесса? Является ли это следствием четкого управления микроокружением клональной экспансии по строго определенному пути, или сам опухолевый субстрат подавляет морфологическую реализацию накопленных молекулярно-генетических событий в других участках/отрезках толстой кишки?

Таким образом, еще до фактического сопоставления экспрессии ряда генов в ткани опухоли и слизистой оболочке здоровых добровольцев, возможно предположить результаты, которые дадут возможность по-новому рассматривать активность ключевых генов, ответственных за пролиферацию, апоптоз, ангиогенез, ремоделирование межклеточного матрикса/ метастазирование, адгезию, рецепцию факторов роста и иммунный ответ в морфологически злокачественной, «фоновой» и метастатической ткани.

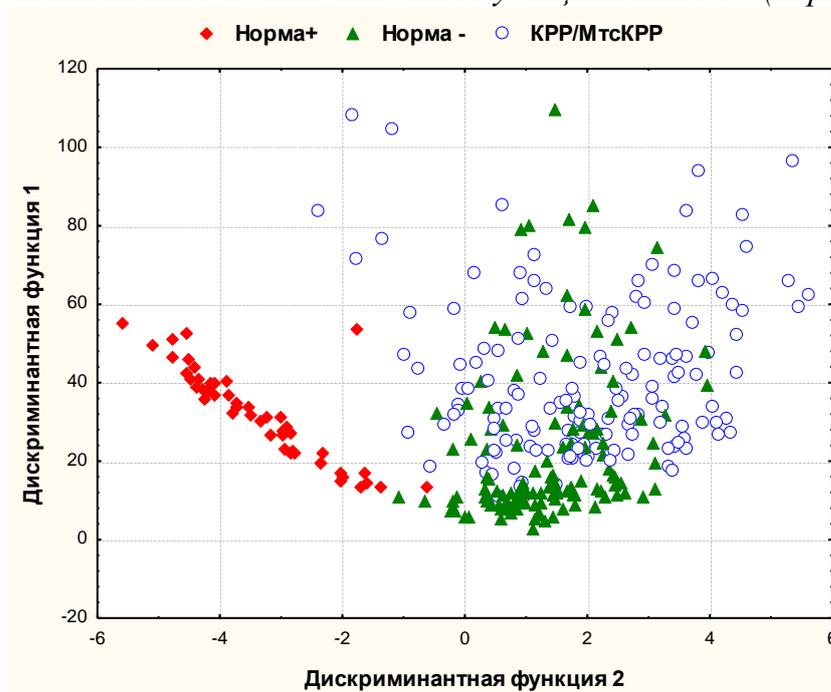
Связей между уровнем экспрессии изученных генов в исследованных группах образцов тканей больных колоректальным раком и клиническими параметрами пациентов: возрастом, полом,

антропометрическими характеристиками, первичной множественностью и мультицентричностью опухолевого роста, а также гистологическим типом опухоли, нами не выявлено.

Далее в процессе исследования мы проанализировали возможность идентификации образцов на основании определения профиля исследованных генов. Для этого мы использовали дискриминантный анализ, на основании которого, нам удалось с 99% вероятностью получить отличия «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки у больных КРР и слизистой толстой кишки здоровых добровольцев. Данная особенность может быть использована, для улучшения результатов лечения и повышения эффективности профилактики КРР, а также, что наиболее важно, для ранней диагностики злокачественного поражения толстой кишки (89, 300) Результаты представлены на диаграмме 11 и таблицах 8,9.

Диаграмма 11

Решение дискриминантной функции для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев (норма +) и морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР (норма -).



Однозначные результаты после проведения дискриминантного анализа по экспрессии генов в ткани опухоли и метастазах, нами не получены:

их точность составила 92%, что мы интерпретируем как совпадение механизмов опухолевой экспансии в первичном и метастатическом опухолевом очаге в 8% наблюдений. Так, можно предположить, что 5,2% образцов первичного КРР использовали сходные механизмы опухолевой экспансии с тканью метастаза; при этом 17,9% метастазов использовали механизмы опухолевой экспансии, характерные для первичного опухолевого узла.

Таблица 8

Значение лямбды Уилкса и уровень статистической значимости для генов включенных в уравнение дискриминантной функции для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев и морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР.

	Wilks&apos;	p-level
HLA-G1	0,198571	0,000146
IL6	0,202955	0,000024
TNFα	0,198909	0,000127
NDRG1	0,220122	0,000000
CD68	0,194927	0,000695
P16INK4A	0,196958	0,000290
LGALS1	0,220042	0,000000
PTEN	0,191970	0,002565
MYBL2	0,189563	0,007681
GREM1	0,196600	0,000338
KI67	0,196100	0,000419
VEGFA121	0,193560	0,001265
CCNB1	0,189477	0,007994
IL8	0,199422	0,000102
COX-2	0,189642	0,007404
VEGFA189	0,191071	0,003846
MMP11	0,195039	0,000662
ESR1	0,195289	0,000594
CTSL2	0,191872	0,002680
TERT	0,185869	0,045305

Таблица 9

Степень совпадения клинко-морфологической и полученной, согласно данным дискриминантной функции, классификации для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев и морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР

	Percent	кишка норма	КРР норма
норма +	98,0000	49	1
Норма -	100,0000	0	129
Total	99,4413	49	130

Таким образом, подавляющее количество метастазов использует сходные с первичной опухолью сигнальные пути, но с перераспределением функциональной нагрузки между ними. (131, 260, 263) Данная особенность несет фундаментальный смысл для дальнейшего изучения механизмов опухолевого роста. Результаты представлены на диаграмме 12 и в таблицах 10,11.

Диаграмма 12

Решение дискриминантной функции для ткани опухоли и ткани метастаза.

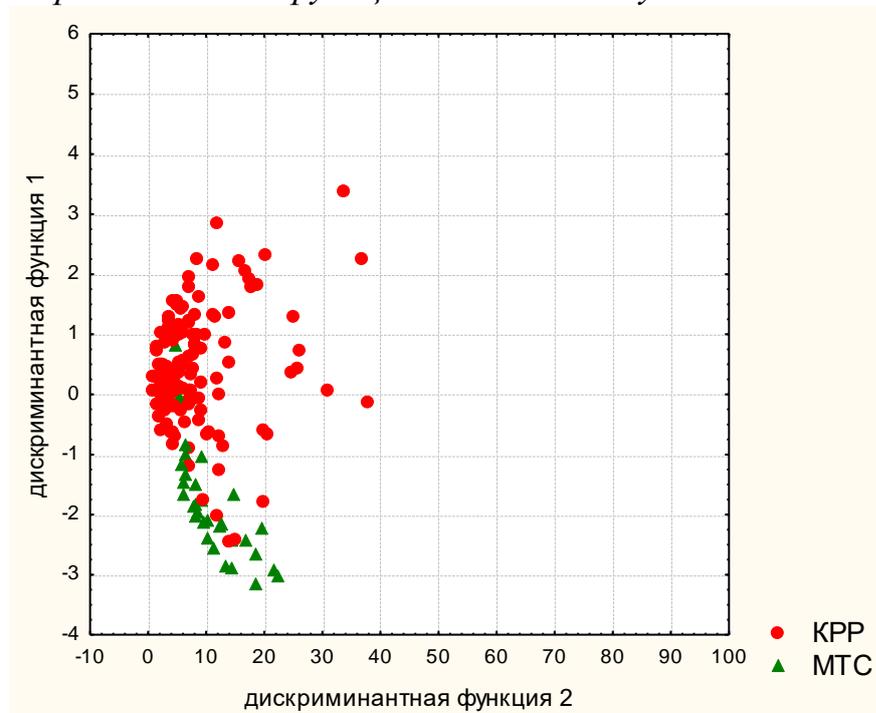


Таблица 10

Значение лямбды Уилкса и уровень статистической значимости для генов, включенных в уравнение дискриминантной функции для ткани опухоли и ткани метастаза

	Wilks'	p-level
CCND1	0,583707	0,038202
NDRG1	0,583562	0,039072
HER2	0,642881	0,000012
ESR1	0,635227	0,000032
SCUBE2	0,639556	0,000019
IL2	0,594954	0,007188
IL1b	0,607290	0,001277
VEGFA165	0,623425	0,000148

Таблица 11

Степень совпадения клинико-морфологической и полученной, согласно данным дискриминантной функции, классификации для ткани опухоли и ткани метастаза.

	Percent	KPP	МТС
KPP	96,21212	127	5
МТС	77,41936	8	25
Total	92,63804	134	29

Дискриминантный анализ экспрессии данных генов между первичной опухолью и «фоновой» слизистой оболочкой больного не проводился ввиду отсутствия фундаментальной и практической значимости в настоящий момент, так как гистологическое исследование полностью решает данную задачу, а молекулярно-генетическое исследование смещенных колоноцитов в кале весьма трудоёмко и затруднительно ввиду контаминации материала примесями. (301) Однако нами получены достоверные отличия экспрессии биомолекулярных маркеров, перечисленных в таблице 12, между первичной опухолью и «фоновой» слизистой оболочкой толстой кишки больного, что позволяет предполагать их важное значение в морфологической реализации неопластического процесса, (71, 72, 131, 260, 261) и возможность

использования для оценки риска местного рецидива и/или развития метастатической опухоли толстой кишки. (таблица 12).

Таблица 12

Маркеры отличия «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки больных КРР и ткани опухоли

Маркер	Направление экспрессии маркеров в опухоли в отличие от «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки больных КРР
MYBL2	↑
CTSL2	↑
BCL2	↓
MYC	↑
BIRC5	↑
CCND1	↑
NDRG1	↓
Ki67	↑
TERT	↑
PGR	↓
PTEN	↓
CCNB1	↑
ESR1	↓
MMP11	↑
STK15	↑
HER2	↓
P16	↑
SCUBE2	↓
MMP9	↑
P14	↑
IGF1	↓
GREM1	↑
MMP2	↓
PAPPA	↓
MMP7	↑
IL2	↓
MMP8	↑
IL15	↓
IL8	↑
IL1b	↑
TPA	↑
IFNg	↑
CD45	↓
CD56	↓
VEGFA121	↑
BAG1	↓
VEGFA165	↑
TLR7	↓
LIF	↑
LIFR	↓

Для удобства дальнейшего анализа и трактовки полученных результатов мы сочли целесообразным объединить изученные гены в группы в зависимости от направления изменения в ряду нормальная слизистая оболочка здорового добровольца «норма+» – «фоновая» слизистая оболочка больного КРР «норма-» – собственно ткань опухоли (R). Таким образом, нами выделено 4 группы генов. Разделение маркеров по группам и подгруппам представлено в таблице 13.

Таблица 13

*Распределение биомолекулярных маркеров
в зависимости от уровня экспрессии в тканях*

Группа факторов	Маркеры
Ia («norm+» «norm-» «R»)	MYC; CCND1; P16; MMP7; IL-8; IL-1R; CD56
Ib («norm+» «norm-» «R»)	BCL2; NDRG1; PTEN; MMP2; MMP8; IL-15; CD45
IIa («norm+» «norm-» «R»)	CD68; GREM1; IL-6; VEGFA
IIb («norm+» «norm-» «R»)	TERT; GNYL; IL-7; TNF α ; BAX; HLA-G1; TLR7; HLA-G5; GATA; LIF
IIIa («norm+» «norm-» «R»)	отсутствуют
IIIb («norm+» «norm-» «R»)	BIRC5; Ki-67; CCNB1; GRB7; STK15; tPA; IFN γ
IVa («norm+» «norm-» «R»)	CTSL2; MMP11; MYBL2; MMP9; P14
IVb («norm+» «norm-» «R»)	PGR; ESR; SCUBE2; IGF1; IL2; LIFR

Первая группа характеризуется прогрессивным повышением (Ia) или снижением (Ib) экспрессии биомолекулярных маркеров в образцах. Изменение содержание маркеров данной группы укладывается в

доминирующую концепцию прогрессивного нарастания молекулярно-генетических событий по мере появления морфологической реализации опухолевого процесса. (71, 207, 261)

Таким образом, важное значение в злокачественной трансформации слизистой оболочки толстой кишки имеет прогрессивная стимуляция митохондриального пути апоптоза (по-видимому, без конечной реализации эффекта, но переходом на анаэробный тип получения энергии) через снижение экспрессии BCL2, перераспределение локализации β -катенина из цитоплазмы в ядро ввиду снижения экспрессии NDRG1, активация PI-3пути передачи сигнала через прогрессивную потерю PTEN, а также изменение физиологических механизмов ремоделирования межклеточного матрикса за счет прогрессивного снижения MMP2. Особенности экспрессии, выявленные нами MMP2, на первый взгляд, противоречат мнению многих авторов о роли MMP2 в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей. (233, 237, 239)

Наше исследование выявило общую закономерность - подавление экспрессии данной металлопротеиназы от здорового человека к больному КРР с минимальной ее общей экспрессией в ткани опухоли. В целом, MMP2 в норме расщепляет ламинин-5 базальной мембраны, обеспечивающей адгезию эпителиальных клеток. (239, 295) Не исключено, что в процессе онкогенеза увеличивается продолжительность жизни белка MMP2, а также играет роль его локальной гиперпродукции на фоне общего снижения, что и определяет общий протеолитический ответ в том или ином тканевом компартменте. Помимо этого, мы предполагаем активацию альтернативных путей ремоделирования межклеточного матрикса, которые в условиях опухолевого роста становится «более приспособленным для нужд» опухоли и теряют физиологическую функциональную направленность для органов в целом. Закономерным кажется снижение экспрессии MMP2 от ткани здорового человека к ткани опухоли принимая во внимание роль MMP2 в созревании кровеносных и лимфатических сосудов. (284, 295)

Вторая группа характеризуется повышением (IIa) или снижением (IIб) экспрессии биомолекулярных маркеров в «norm-» и «R» по сравнению с «norm+» при отсутствии достоверных отличий между «norm-» и «R». Существование данной группы, на наш взгляд подтверждает существование доморфологического этапа онкогенеза. (68, 71, 72, 131) Содружественные изменения экспрессии факторов второй группы отражает активацию неспецифического иммунитета - макрофагов (CD68), развитие воспалительного ответа и стимуляцию гуморального неспецифического иммунитета, повышение чувствительности тканей к инсулину (через повышение экспрессии IL-6, GREM1), а также стимуляцию ангиогенеза (VEGFA), что в условиях общего снижения MMP2 может свидетельствовать в пользу образования неполноценных сосудов. При этом уменьшается содержание маркера цитотоксических гранул Т-лимфоцитов и NK-клеток, содержание белка VAX - стимулятора открытия анионных каналов мембран митохондрий с последующей стимуляцией апоптоза через каспазу-3; снижается локальная экспрессия TNF- α , происходит парциальное снижение экспрессии TLR7, без снижения TLR2 и TLR4, что может свидетельствовать в пользу особой настройки врожденной иммунной системы в условиях онкогенеза на фоне снижения содержания GNLY – маркера цитотоксических Т- лимфоцитов, что может быть объяснено парциальным снижением TLR7 (обычно экспрессируемым макрофагами, дендритными клетками и NK клетками). (284, 295, 302, 303)

Снижение экспрессии LIF в тканях толстой кишки больных КРР по сравнению со здоровыми добровольцами на фоне повышенной экспрессии IL-6 свидетельствует об особом функционировании фибробластов слизистой оболочки толстой кишки со стимуляцией провоспалительного ответа в условиях отсутствия развития иммунологической толерантности при снижении экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости HLA-G1 и HLA-G5; а также уменьшением вероятности мезенхимально-эпителиального перехода. (205, 263, 304, 305, 306, 307, 308) В этих условиях

особенно примечательно снижение экспрессии обратной транскриптазы (TERT) в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки и собственно в опухоли. В физиологических условиях, экспрессия TERT характерна для второго типа стволовых клеток кишечной крипты, ответственных за поддержание пула стволовых клеток, а также данный маркер играет существенную важную роль в поддержании пула клеток иммунной системы. Кроме того, он участвует в модуляции WNT сигнального пути. (273, 309, 310, 311) Наши данные, благодаря уникальному дизайну исследования, полностью изменяют представление о высокой экспрессии TERT в ткани опухоли, ввиду того, что максимальная экспрессия данного маркера обнаружена в слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев. Таким образом, маркеры второй группы в целом характеризуют слизистую оболочку толстой кишки больного КРР и отражают процесс активации неспецифического иммунитета, системных изменениях ангиогенеза, активации митохондриального проапоптического сигнала на фоне измененной Т-цитотоксичности.

Третья группа характеризуется сходным уровнем экспрессии в слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев и ткани первичной опухоли, но снижением экспрессии в слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев. Необходимо отметить, что третья группа маркеров не разделена на подгруппы а и б, поскольку нами не выявлен ни один маркер, чья экспрессия достоверно повышается в «фоновой» слизистой оболочке по сравнению с собственно опухолью и слизистой оболочкой толстой кишки здоровых добровольцев. Существование третьей группы биомолекулярных маркеров является веским доводом в пользу важной роли «фоновой кишки» в морфологической реализации неопластического процесса. Снижение экспрессии факторов пролиферации и прямого маркера пролиферации Ki-67, а также тканевого активатора плазминогена урокиназного типа (tPA) и γ -интерферона (INF- γ) в «фоновой» слизистой оболочке больного КРР возможно трактовать как первично?/ вторично? индуцированный процесс функциональной атрофии, который, с одной стороны, может предрасполагать

к клональной экспансии генетически измененных популяций клеток кишечных крипт, а с другой стороны, может быть отражением попыток системы поддержания клеточного состава тканей подавить опухолевый рост. Последнее может, на наш взгляд, быть реализовано при условии сохраненной физиологической чувствительности путей сигнальной трансдукции в «фоновой кишке». В виду выше сказанного, возможно предположить эффективность стратегии медикаментозного воздействия на «фоновую» слизистую оболочку толстой кишки больного КРР как важного компонента противорецидивной терапии. (312, 313, 314)

Четвертая группа маркеров характеризовалась одинаковым уровнем экспрессии в слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев и больных КРР, но при этом в подгруппе IVа экспрессия в ткани опухоли была достоверно повышена, а в подгруппе IVб – достоверно снижена по сравнению с морфологически неизменными тканями.

Процессами достоверно отличающим морфологическую реализацию неопластического процесса при КРР являются: активация экспрессии факторов ремоделирования межклеточного матрикса (MMP9 и MMP11, катепсина – лизосомальной протеиназы, активирующуюся при низком pH и ответственной за деградацию коллагена и «лизосомальную аутофагию» - т.е. лизосомальный путь апоптоза), транскрипционного фактора MYBL2, необходимого для прогрессии клеточного цикла, а также активацию P53-зависимого апоптоза по P14 (arf) и P16-зависимому механизму. Кроме того, ткань опухоли характеризуется достоверным снижением экспрессии SCUBE2, ESR, IGF1. (216, 231, 233, 315, 316)

Принимая во внимание данные многочисленных публикаций об участии того или иного фактора роста, цитокина, их рецепторов, ингибиторов, проапоптических факторов в цепочках сигнальной трансдукции, мы предположили наличие корреляционных связей в изменении уровня экспрессии изученных нами генов. Для уточнения нашего предположения мы использовали факторный анализ. Примененный статистический метод оценки

величин экспрессии различных генов и закономерностей содружественного изменения позволил нам разделить изученные гены на 4 группы (4 фактора). Количество выделенных групп (факторов) определено нами искусственно после детального изучения генного состава получаемых групп в случае выделения двух, трех, четырех и более групп. По сути, выделение трех и более групп генов приводило к постепенному дроблению второй группы факторов. Первая группа (фактор), вобравшая в себя большую часть иммунных маркеров, ассоциированных с TGF- β сигнальным путем, практически не изменялась, «медленно отдавая» 1-2 гена во вновь выделяемые группы. Обобщая вышеизложенное мелкие группы факторов (генов) фактически отражали наиболее тесно связанные элементарные механизмы поддержания жизнедеятельности клеток. Таким образом, мы пришли к заключению, что дробление «промежуточной» второй группы (которая в итоге была разделена вторую, третью и четвертую) можно проводить до 1-3 генов. Такое мелкое дробление трудно использовать для обобщения, однако, при необходимости данный анализ легко воспроизводим с помощью статистического программного обеспечения.

В первую группу (первый фактор) вошли следующие гены: SCUBE2, GNLY, IGF1, IGF2, PAPPA, VEGFA165, VEGFA 189, BAX, TLR2, TLR4, LGALS, MMP2, MMP9, COX2, TNF- α , CD45, CD56, CD69, LIF, IL-2, IL-2Ra, IL-6, IL-7, IL-12a, IL-15, IL-1b, IL-10. Таким образом, первый фактор представлен маркерами врожденного и приобретенного иммунного ответа, циклооксигеназой второго типа, маркерами ремоделирования межклеточного матрикса, факторами ангиогенеза, инвазии и миграции клеток. В целом, большинство из вошедших в первый фактор иммунных маркеров являются активаторами TGF- β сигнального пути. (189, 223, 228)

Второй фактор представлен геном катепсина 5 (CTSL2), BIRC5, Ki-67, TERT, CCNB1, GRB7, STK15, MYBL2, tPA. На основании анализа и обобщения результатов значительного количества публикаций по данным молекулярным маркерам результирующее действие второго фактора, можно

охарактеризовать как усиление пролиферации по β -катениновому пути с приобретением способности к миграции (210, 290, 317, 318).

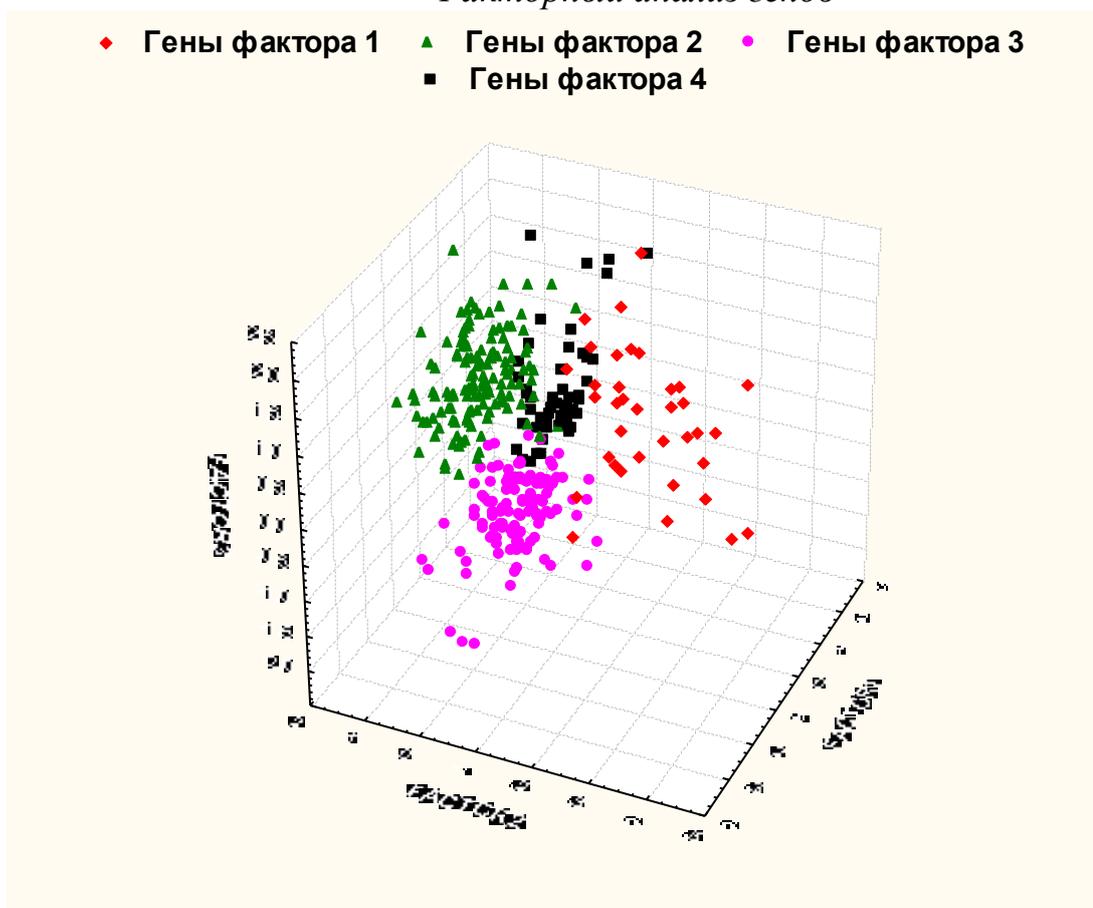
В третий фактор вошли следующие гены: MYC, CCND1, CD68, P16, MMP11, MMP7, MMP8, IL-8, VEGFA121, LIFR. Эффектом содружественного воздействия измененной экспрессии данных генов является усиление пролиферации по циклин-D1-зависимому механизму, а также способствование метастазированию. (319, 320, 321) Обращает на себя внимание достоверное повышение экспрессии в образцах первичной и метастатической ткани опухоли MMP8. Данная металлопротеиназа в норме (wild type) ингибирует основные пути распространения опухоли. Mutant type способствует миграции, метастазированию опухолевых клеток, а также развитию изъязвления. (240)

В четвертый фактор вошли рецепторы эстрогенов и прогестерона, PTEN, HER2, BCL2, NDRG1, CYP19A. Данный фактор возможно охарактеризовать как гормон-ассоциированную стимуляцию фосфоинозитольного пути передачи сигнала и ингибирование митохондриального апоптоза. (322, 323, 324, 325, 326, 327, 328)

Распределение образцов по факторам представлено на диаграмме 13 и в таблице 14.

Направление и величина содружественного изменения выделенных факторов (групп генов) дали возможность распределить изученные 342 образца в 4 кластера, характеризующиеся сходным молекулярным профилем. Иными словами, «попадание» в один кластер образцов и «фоновой» кишки, и ткани первичного КРР, и ткани метастаза, а также образцов слизистой толстой кишки здоровых добровольцев (второй кластер) свидетельствует о сходной интенсивности использования тех или иных сигнальных путей (групп факторов). Распределение исследованных образцов по кластерам отражено в таблицах 15-16.

Факторный анализ генов



Примечательно, что все образцы тканей, полученные от здоровых добровольцев, «попали» во второй кластер, - наиболее многочисленный, который не содержал ни одного образца ткани метастаза и всего 11 образцов (9,0% всех образцов кластера) опухолевой ткани. Если исключить из анализа образцы здоровой ткани, то данный кластер на 87,9% представлен образцами «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки больных КРР и только на 12,1% собственно образцами опухолевой ткани.

Для наглядности представления большого объема данных ниже используется условная балльная оценка исследованных групп генов (факторов) (см. главу 2). Применительно к величине и направлению изменений вышеописанных факторов во втором кластере, по 6-ти балльной системе от -3 до +3, величина первого, второго и четвертого фактора составила 2+, а третьего фактора 3-, что свидетельствует в пользу низкого потенциала

метастазирования на фоне пролиферации в образцах, вошедших в данный кластер. (68, 263)

Таблица 14

Факторное распределение набора генов

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
CTSL2	-0,092136	0,804300	0,150934	-0,053044
BCL2	0,098431	-0,166786	-0,123267	0,865663
MYC	-0,229661	0,267274	0,640716	0,105441
BIRC5	0,053771	0,871919	0,157600	0,105985
CCND1	-0,058297	0,244751	0,671309	0,171083
NDRG1	0,293534	0,083868	-0,030604	0,672129
CD68	0,049596	0,092576	0,348131	0,337557
Ki-67	0,009145	0,909131	0,061765	-0,053345
TERT	0,123225	0,686797	-0,209783	0,098222
HER2	-0,205779	0,235431	0,020219	0,782959
PTEN	0,244178	-0,101455	-0,240778	0,324109
BAG1	-0,053757	0,013547	-0,037935	0,737327
PGR	0,135083	0,126756	-0,072826	0,498485
CCNB1	0,042470	0,733734	0,179962	-0,162655
ESR1	0,132898	-0,233096	0,120332	0,714544
GRB7	0,013997	0,766792	-0,022821	0,117597
MMP11	-0,041967	0,327758	0,597568	0,340655
STK15	-0,030412	0,884209	0,111250	-0,078423
MYBL2	-0,049617	0,862552	0,200121	-0,026503
P16INK4A	-0,176288	0,315893	0,665432	0,148225
SCUBE2	0,644288	-0,156196	-0,132085	0,337632
MMP9	0,540602	0,209240	0,485374	-0,033746
GNLY	0,823689	0,027993	-0,022489	-0,080714
P14ARF (P19ARF)	0,558968	0,190857	0,499464	0,028851
IGF1	0,593730	-0,395115	-0,020266	0,372557
COX-2	0,751052	-0,201191	0,234429	-0,002667
IGF2	0,662294	-0,167290	0,320411	0,163020
CYP19A	0,027531	-0,050257	0,165284	0,344578
GREM1	0,318990	0,005478	0,219630	0,216933
MMP2	0,633186	0,012522	-0,306540	0,091454
PAPPA	0,770324	-0,041623	0,159741	0,146401
MMP7	0,185628	0,200727	0,717818	-0,302312
IL-2	0,348269	0,002563	-0,229734	-0,034224
MMP8	0,266298	0,161704	0,589226	-0,226299
IL-2Ra	0,731685	0,191416	-0,012827	-0,207299
IL-6	0,623574	-0,194014	0,380731	0,018276

IL-12a	0,596561	0,119093	0,097083	0,101692
IL-7	0,659528	0,241915	-0,290500	0,015954
IL-15	0,639809	-0,100903	0,048542	0,113722
IL-8	0,262420	-0,026886	0,791552	-0,172664
IL-1b	0,529329	-0,052615	0,498534	0,023518
IL-10	0,741624	-0,168326	0,200578	0,123071
tPA	0,318365	0,512536	0,086137	-0,101241
IFN γ	0,337348	0,163957	-0,017273	-0,133362
CD45	0,857536	-0,170829	-0,050934	0,105097
TNF α	0,439951	-0,034408	0,172592	0,165161
CD56	0,793459	0,000320	-0,197509	0,040225
TGF- β	0,465808	0,041349	-0,088728	0,051254
CD69	0,731003	-0,143090	-0,002722	0,110201
VEGFA121	0,147127	0,224468	0,520971	-0,017061
BAX	0,837512	0,198397	-0,077562	-0,026126
VEGFA165	0,697181	0,168810	0,357228	-0,107344
TLR2	0,847858	-0,003263	0,140237	-0,053555
VEGFA189	0,652289	0,160659	0,217219	-0,051272
TLR4	0,770462	0,124760	-0,086405	-0,083086
HLA-G1	0,610549	0,093974	-0,219162	0,075865
TLR7	0,613773	0,107752	-0,382937	-0,047963
HLA-G5	0,425486	0,086833	-0,240554	0,083105
GATA3	0,336242	0,113563	-0,139263	0,101320
LGALS1	0,823743	-0,138263	0,151213	0,079765
LIF	0,835144	0,172191	0,062381	-0,021634
LIFR	-0,428069	0,277941	0,482331	-0,188583

Структура еще одного многочисленного кластера – третьего - отражена в таблице 15-16. При этом, данный кластер в 72,1% случаев представлен образцами опухолевой ткани, в 21,6% образцами ткани метастазов и лишь в 6,3% «фоновой» слизистой оболочкой толстой кишки больного КРР. Профиль факторов по предложенной бальной оценке в третьем кластере составил по первому фактору 2+, по второму и третьему фактору 3+, по четвертому фактору 4-.

Таблица 15

Распределение образцов по кластерам с указанием доли образца каждой морфологической группы внутри кластера (N=342, расчет долей произведен после исключения из подсчетов ткани группы контроля, NI=292)

Ткань \ Кластер	I	II	III	IV
«Фоновая» слизистая оболочка толстой кишки при КРР	20 39,2%	80 87,9%	7 6,3%	22 56,4%
Опухоль	30 58,8%	11 12,1%	80 72,1%	11 28,2%
Метастаз	1 2%	0 0%	24 21,6%	6 15,4%
Всего	51 100%	91 100%	111 100%	39 100%
Здоровая слизистая оболочка толстой кишки	0	50 100%	0	0

Таблица 16

Распределение образцов по кластерам с указанием доли образцов каждой группы сравнения попавших в данный кластер. (N=319, из них 292 образца тканей больных КРР и 50 образцов слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев)

Ткань \ Кластер	I	II	III	IV	Всего
«Фоновая» слизистая оболочка толстой кишки при КРР	20 15,5%	80 62%	7 5,5%	22 17%	129 100%
Опухоль	30 22,8%	11 8,3%	80 60,6%	11 8,3%	132 100%
Метастаз	1 3,2%	0 0%	24 77,5%	6 19,3%	31 100%
Здоровая слизистая оболочка толстой кишки	0 0%	50 100%	0 0%	0 0%	50 100%

Таким образом, по сравнению с образцами второго кластера, можно судить о необходимых доминирующих сигнальных путях для развития

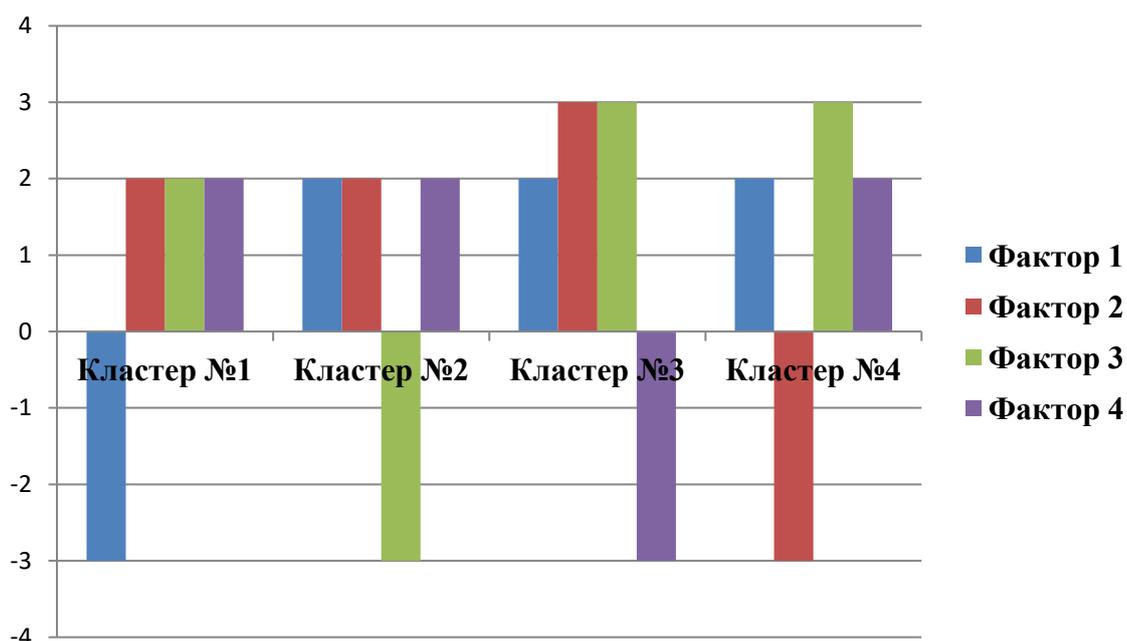
основной части КРР, а именно: сохраняющаяся высокая экспрессия иммунных маркеров факторов, повышение экспрессии генов пролиферации β -катенинового пути, гена циклина D1, маркеров ремоделирования межклеточного матрикса и важного значения снижения чувствительности тканей к LIF на фоне крайне низкой чувствительности образцов к половым стероидам при активации фосфоинозитольного сигнального каскада и уменьшения экспрессии фактора подавляющего ядерную транслокацию β -катенина. Данные особенности характерны для 60,2% образцов первичной опухоли и 76,7% образцов отдаленных метастазов. Подобный факториальный профиль наблюдался лишь в 5,4% образцов «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки у больных КРР.

Два других кластера (первый и четвертый) составили 17,5 и 13,4 % всех изученных образцов. При этом первый кластер представлен на 58,8% тканью опухоли, на 39,0% - «фоновой» слизистой оболочкой толстой кишки больных, и лишь на 1,9% (1 образец) ткань отдаленного метастаза. Поводом к выделению данного кластера явилась крайне низкое значение первого фактора по предложенной бальной системе - -3 балла и умеренное высокое значение по второму, третьему и четвертому фактору.

Четвертый кластер образован на основании обратного направления экспрессии генов второго фактора -3, при высоком третьем факторе 3+ и умеренно высоком первом и четвертом факторе, что свидетельствует о преобладании циклин-D1 сигнального пути пролиферации на фоне активации маркеров ремоделирования межклеточного матрикса. Структура четвертого кластера в 56,4% представлена «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки больных КРР, в 28,2% тканью опухоли и в 15,4% тканью метастаза. Профиль кластеров по факторам в условных единицах отражены на диаграмме 14.

Достоверных отличий образцов опухоли по морфологической структуре в различных кластерах не выявлено. Это свидетельствует о том, что опухоли различного гистологического строения могут характеризоваться сходным профилем экспрессии генов.

Соотношение факторов в кластерах (в усл.ед./баллах)



Кроме того, после проведенного факторного и кластерного анализов, мы обратили внимание, что многие гены, показавшие содружественную экспрессию в кластерном анализе, попали в одну группу маркеров при сопоставлении уровня экспрессии в ряду «норма+» - «норма-» - «KPP». Так, гены второго фактора кластерного анализа *BIRC5*, *Ki-67*, *CCNB1*, *GRB7*, *STK15 tPA*, являются 6-тью из 8 генов 3-ей группы, а оставшиеся два - *MGB1* и *IFN-γ* - не играли роли в кластерном анализе. Маркеры иммунного ответа сформировали первую (*CD56*, *IL-15*, *IL-1β*,) и вторую группу (*IL-6*, *GNLY*, *TNF-α*, *IL-7*, *HLA-G1*, *HLA-G5*, *TLR7*, *LIF*). Помимо этого, в первую группу факторов попала *MMP2* (первый фактор кластерного анализа), а во вторую группу маркер активации митохондриального апоптоза из первого фактора – *BAX*, а также маркеры третьего фактора – *CD68* и *VEGFA*. Четвертая группа факторов, достоверно отличающая опухоль от морфологически не измененной ткани и больного и здорового, представлена маркерами первого (*MMP9*, *SCUBE2*, *IGF1*, *IL-2*), второго (*CTSL2*, *MYBL2*) третьего (*MMP11*, *LIFR*) и четвертого фактора (*PGR*, *ESR1*). Таким образом, каждая из групп факторов,

кроме третьей, характеризовавшей и молекулярные изменения в «норма-» - молекулярные подтверждения атрофических процессов на фоне подавления противоопухолевого иммунитета, содержала гены из различных групп факторного анализа. При этом четвертая группа генов, позволяющая отличить опухоль от морфологически неизменной слизистой оболочки кишки здорового человека, несет в себе гены всех четырех фактора факторного анализа.

Первая группа генов позволяет отличить между собой «норма+» - «норма-» - «КРР» и не содержит вторую группу факторов факторного анализа, а вторая группа генов отличает ткани («норма-»-«КРР»), больного КРР от слизистой оболочки толстой кишки здорового человека.

Вторая группа генов содержит преимущественно маркеры первой группы факторного анализа, а также ген TERT (второй фактор), маркер макрофагов CD68 (третьей группы), а также GREM1 и GATA, не включенные в факторный анализ.

Таким образом, помимо подавления β -катенин-зависимой пролиферации, снижения апоптоза (что можно охарактеризовать как удлинение жизни клеток) в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки больных КРР, на фоне подавления противоопухолевого иммунитета, для возникновения опухоли, необходимо участие факторов 1, 3 и 4, которые в различных опухолях вступают в игру на разных этапах, что подтверждается, по-нашему мнению, формированием 4-х кластеров в процессе использования факторного анализа.

Основная часть образцов (60,6%) опухолевой ткани попала в 3-й кластер. Для данного типа опухолей чрезвычайно важен β -катениновый путь повышения пролиферации и активация циклина-D1, на фоне выраженной макрофагальной инфильтрацией с продукцией IL-8, а также MMP7, MMP8, MMP11, при низкой чувствительности тканей к половым стероидам (по экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона), подавление экспрессии PTEN, NDRG1, что оказывает синергичное действие, направленное на

пролиферацию. (79, 109) Необходимо отметить, что 76,7% образцов отдаленных метастазов имело сходную молекулярную характеристику против 5,4% образцов ткани «норма-».

Принимая во внимание выше изложенное, подобный молекулярный профиль характеризует либо а) большинство аденокарцином толстой кишки, либо б) стадию злокачественного процесса на которой происходит основная диссеминация опухоли, т.е., наиболее агрессивный фенотип опухоли с наибольшим подавлением цитотоксических иммунных реакций макроорганизма.

Второй по частоте молекулярный профиль опухолевой ткани, практически нехарактерный для ткани метастазов, характеризуется умеренной активацией β -катенинового пути, умеренной активацией циклин-D1- и гормон-зависимого пути пролиферации, на фоне низкого иммунного ответа. Практически 15,5% образцов «норма-», обладает подобным профилем экспрессии изученных генов. Выключение β -катенинового пути, т.е. преобладание других путей наращивания клеточности опухолевой ткани, отмечено в 8,3%, при этом существенно важным остается циклин-D1 зависимый путь, гормон-зависимый и активация иммунных реакций. Сходным профилем обладает каждый 5-й образец ткани метастаза и 17,0% образцов «норма-».

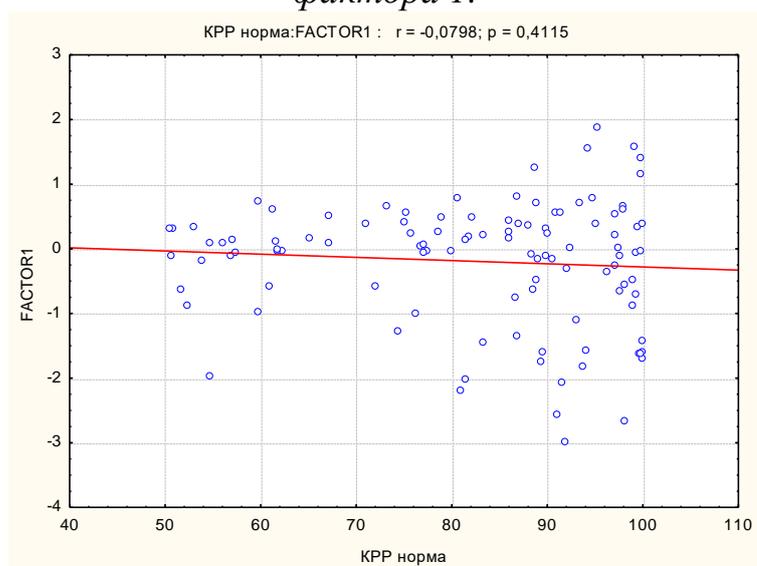
Похожая картина по количеству и доле образцов первичной опухоли, отмечена во втором кластере – 9,0%. В данном кластере циклин-D1-зависимая пролиферация соответствует уровню слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев. Данная особенность характерна для всех образцов «норма+» и 62,0% «норма-». Таким образом, описанный профиль экспрессии изученных генов, характерен для слизистой оболочки кишки здорового человека, большинства образцов «норма-» и каждого 10-го образца ткани опухоли, что свидетельствует в пользу существования не изученных нами молекулярных особенностей рака толстой кишки. При этом в данный кластер отсутствуют образцы ткани метастазов, что свидетельствует о существенной

важности 3-го фактора для развития метастазов, т.е. активации генов MYC, CCND1, переключения на P16-зависимую стимуляцию проапоптотического сигнала, активации макрофагов и нейтрофилов с высокой экспрессией матриксных металлопротеиназ 7, 8 и 11 на фоне высокой экспрессии VEGFA121.

Для оценки системности/локальности действия выделенных 4-х групп факторов, нами проведена оценка корреляции степени отличия «норма-» от «норма+» и величины факторов 1,2,3,4 в условных единицах. Полученные результаты представлены на диаграммах 15-18.

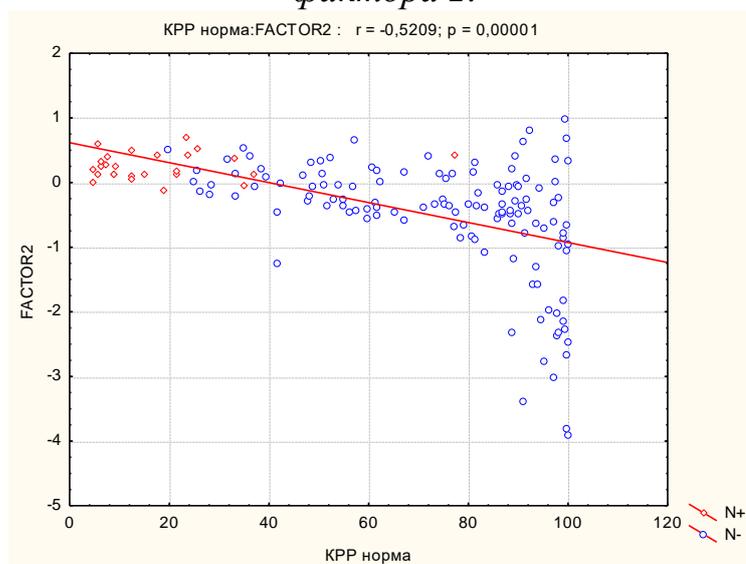
Диаграмма 15

Корреляция степени отличия «норма-» от «норма+» (%) и величины фактора 1.

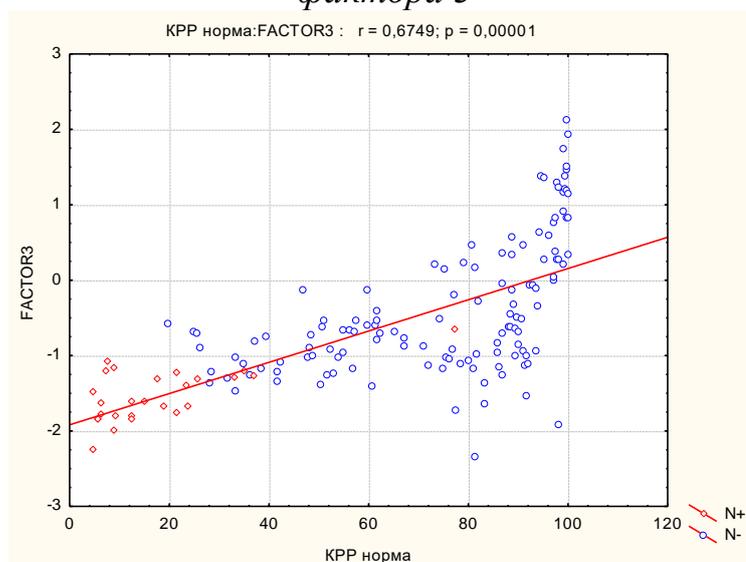


Исходя из диаграммы 15, корреляция фактора 1, содержащего преимущественно гены цитокинов, остается неизменной в «фоновой» кишке больных КРР по сравнению со здоровыми, что свидетельствует о возможности различных направлений изменений иммунных реакций в условиях рака толстой кишки. Выявленная особенность, по-видимому, свидетельствует о системном характере воспалительного ответа при КРР, не зависящего от локальных/органных условий.

Корреляция степени отличия «норма-» от «норма+» (%) и величины фактора 2.



Корреляция степени отличия «норма-» от «норма+» (%) и величины фактора 3

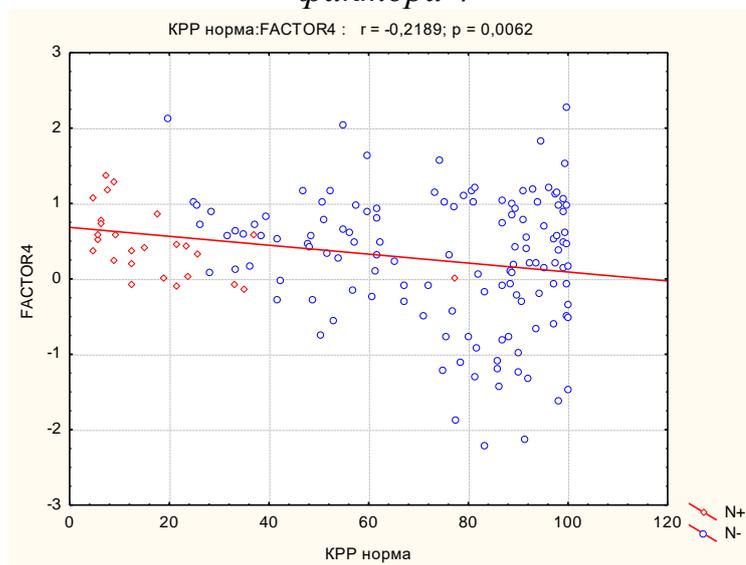


В отличие от первого фактора по второму, третьему и четвертому получена достоверная зависимость коэффициента корреляции условной величины фактора и степени непохожести образцов «норма-» на «идеальную» норму, что говорит в пользу роли локальной регуляции экспрессии того или иного гена по мере развития опухоли. Так, максимально непохожие образцы «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки демонстрируют уменьшение

вклада β -катенинового пути сигнальной трансдукции в поддержании клеточности тканей.

Диаграмма 18

Корреляция степени отличия «норма-» от «норма+» (%) и величины фактора 4



Роль гормонального (четвертого) фактора по мере отклонения профиля экспрессии генов, составляющих данный фактор, также уменьшается. Напротив, роль генов, ассоциированных с циклин-D1-зависимой пролиферацией, возрастает по мере отклонения «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки от «идеальной» нормы.

3.3.2. Клинико-молекулярные параллели при колоректальном раке: связь профиля экспрессии генов в исследованных образцах тканей больных КРР со стадией, наличием регионарных/отдаленных метастазов и прогрессированием

С учетом выявленных особенностей «молекулярных» изменений морфологически неизменной ткани толстой кишки и для постадийного определения выявленных изменений, мы провели сравнительный анализ по стадиям уровня экспрессии для выбранных генов. Таким образом, мы

получили достоверные отличия ($p < 0,05$) в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки и слизистой толстой кишки здоровых добровольцев уже при I стадии опухолевого процесса для экспрессии ряда интерлейкинов и некоторых других генов. Результаты представлены в таблице 17

Таблица 17

Отличия экспрессии генов в «норма+» и «норма-» («норма-» при I стадии заболевания)

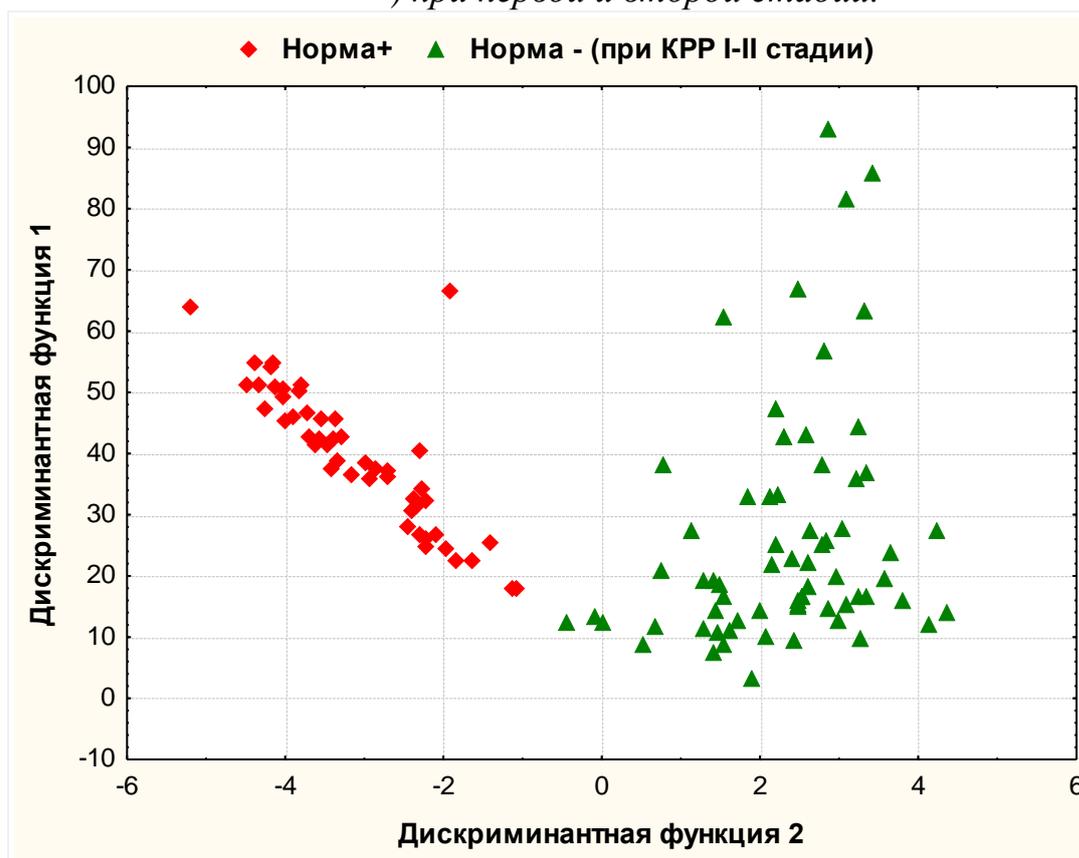
	Норма+	Норма-	p	Valid N H+	Valid N H-
IL8	4,23509	9,08636	0,000005	50	33
TNFα	4,67949	2,98434	0,000014	50	33
IL7	7,13654	4,78535	0,000034	50	33
IFNg	4,57244	2,71818	0,000209	50	33
NDRG1	11,58397	8,53485	0,000230	50	33
TERT	9,69936	8,10505	0,000375	50	33
IL6	1,95321	6,16919	0,000384	50	33
GATA3	5,21050	3,92828	0,000508	50	33
HLA-G1	7,38974	4,51313	0,000950	50	33
CD68	4,95449	5,61566	0,001253	50	33
MMP2	12,07885	8,93384	0,001736	50	33
LIF	9,60064	6,86503	0,004023	50	33
P16INK4A	1,74167	2,36503	0,004134	50	33
MYC	3,28974	4,03081	0,006397	50	33
MMP8	0,85962	3,40354	0,006770	50	33
BCL2	7,99679	7,05960	0,010251	50	33
CCNB1	5,15028	4,40051	0,012830	50	33
BAX	10,69423	8,66465	0,015298	50	33
TLR7	6,71346	5,45152	0,016659	50	33
HLA-G5	11,41154	8,73737	0,021493	50	33
GRB7	15,67051	14,44596	0,024922	50	33
MGB1	6,74103	4,93283	0,028096	50	33
CCND1	1,79615	2,21503	0,031983	50	33
CD45	6,95092	5,76313	0,047380	50	33
TPA	10,37051	8,95303	0,048118	50	33

На основании проведенного дискриминантного анализа, «фоновую» слизистую оболочку толстой кишки больных КРР, на основании изучения экспрессии генов, отраженных в таблице 15 возможно отличить от слизистой

оболочки толстой кишки здоровых лиц практически в 100% наблюдений уже на первой-второй стадии процесса КРР (см. диаграмму 19 и таблицы 18,19).

Диаграмма 19

Решение дискриминантной функции для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев (норма +) и морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР (норма -) при первой и второй стадии.



Обобщая процессы, происходящие в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишке больного КРР I стадии можно говорить об активации сигнальных молекул врожденного иммунитета, уменьшении экспрессии маркеров пролиферации Т- и В-клеток, увеличении экспрессии маркеров дифференцировки В-клеток, увеличении экспрессии хемоаттрактантов нейтрофилов с продукцией их коллагеназы, что, в целом, создает благоприятные условия для ангиогенеза. Стимуляции гуморальных иммунных

реакций благоприятствует снижению продукции LIF необходимого для поддержания иммунологической толерантности. (231)

Таблица 18

Значение лямбды Уилкса и уровень статистической значимости для генов включенных в уравнение дискриминантной функции для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев и морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР при I-II стадии заболевания.

	Wilks'	p-level
IFNg	0,133372	0,004056
IL8	0,151993	0,000005
IL15	0,160791	0,000000
NDRG1	0,156048	0,000001
CD68	0,138806	0,000512
BAG1	0,144898	0,000058
TNFα	0,132440	0,005871
STK15	0,128737	0,027159
KI67	0,186298	0,000000
CCNB1	0,168980	0,000000
IL6	0,153570	0,000003
TERT	0,136322	0,001296
CCND1	0,142432	0,000137
GRB7	0,144778	0,000060
P16INK4A	0,135113	0,002057
MYBL2	0,133913	0,003278
BIRC5	0,129560	0,019129
PTEN	0,130277	0,014172
SCUBE2	0,138973	0,000481
IL10	0,131420	0,008860

Таблица 19

Степень совпадения клинко-морфологической и полученной, согласно данным дискриминантной функции, классификации для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев и морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР I-II стадии

	Percent	кишка норма	КРР норма 1
кишка норма	100,0000	50	0
КРР норма 1	98,5075	1	66
Total	99,1453	51	66

Важной особенностью «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки, является повышение экспрессии IL-8, с одной стороны являющегося хемоаттрактантом и активатором нейтрофилов, с другой стороны - мощным фактором эпителиально-мезенхимальной трансдукции, необходимого условия проникновения через базальную мембрану, регионарного и отдаленного метастазирования (329, 330). По-видимому, в «фоновой» слизистой оболочке при КРР реализуются некие (гипотетические) механизмы, направленные на подавление роста опухоли. Экспрессии β -катенина и TERT снижается. Однако продукция фактора, блокирующего ядерную локализацию β -катенина, NDRG1 также снижается по сравнению со слизистой оболочкой толстой кишки здорового человека. Ввиду этого, для более точного понимания процессов происходящих в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки больного КРР, применительно к регуляции локализации β -катенина, мы ввели показатель соотношения CCNB1 к NDRG1, который в ряду «норма+» - «норма-» - «R» прогрессивно увеличивается: 0,44:0,56:0,94 соответственно. Таким образом, снижение экспрессии NDRG1, приводящее к усилению ядерной транслокации β -катенина, активирует экспрессию P16, MYC и циклина-D1, что подтверждается достоверным их повышением в ткани опухоли. Таким образом, мы имеем дело с изменением в цепи Wnt-сигнального пути. (331, 332, 333)

Согласно нашим данным, снижение продукции NDRG1 в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста является отличительной особенностью больного КРР. Данная особенность «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки при КРР I стадии является второй характерной чертой «фоновой» слизистой оболочки и отражает вовлечение изменений β -катениновой регуляции в ранние этапы опухолевого роста. Кроме того, обращает на себя внимание снижение экспрессии MMP2, ответственной за деградацию коллагена IV типа, главного структурного элемента базальной мембраны. Данная особенность сохраняется и в морфологически реализованном раке толстой кишки. На наш взгляд, данная

особенность может свидетельствовать, либо об иных механизмах деградации базальной мембраны, либо о наличии способов проникновения через базальную мембрану, инвазирующих или метастазирующих клеток опухоли, без ее существенного повреждения. (102, 295) В пользу данного утверждения свидетельствует достоверное нарастание экспрессии MMP9 и резкое нарастание MMP7, MMP11 уже при первой стадии КРР.

Примечательной особенностью слизистой оболочки толстой кишки при КРР служит снижение экспрессии TERT. Данный факт возможно оценить, как уменьшение количества стволовых клеток кишечной крипты второго типа, ответственных за поддержание пула стволовых клеток, что в контексте низкой экспрессии Ki-67 в образцах слизистой оболочки больных КРР в фундаментальном аспекте приводит к функциональной атрофии ткани и снижению ее адаптационных и регенераторных возможностей. (334, 335)

Четвертой особенностью опухолевого процесса в толстой кишке, который появляется в «фоновой» слизистой оболочке и сохраняется в опухоли, является вовлечение сигнального пути BCL2 – снижение его экспрессии. Данный ген в физиологических условиях подавляет митохондриальный путь апоптоза, эффективную реализацию которого мы не наблюдаем при КРР, так как микроскопический уровень исследования свидетельствует о наращивании клеточности ткани. Это наталкивает на мысль о наличии действенной системы уклонения или блокировки данного сигнального пути на достаточно поздних этапах передачи сигнала. В качестве маркера с вышеописанной функцией выступает BIRC5 - ингибитор каспазы 3, одного из основных эффекторов митохондриально-опосредованной запрограммированной гибели клетки. (131, 336) Данное утверждение подтверждается полуторакратным снижением соотношения BCL2 к BIRC5 в ткани опухоли по сравнению со слизистой оболочкой здоровых добровольцев: 1,08 и 1,62 соответственно. Согласно данным литературы, посвященных ультрамикроскопическому строению злокачественных опухолей, последние характеризуются изменением количества и структур митохондрий за счет

усиления перекисного окисления липидов с одновременным существованием системы «ловушек» для свободных радикалов, что и делает опухолевую клетку мало уязвимой при срыве сложных регуляторных процессов поддержания гомеостаза в многоклеточной системе. (275, 337, 338)

Появление морфологически идентифицируемой опухолевой ткани – гистологический уровень реализации опухолевого процесса, наряду с сохранением тенденции изменения экспрессии ряда генов, характеризуется достоверным повышением/снижением экспрессии дополнительной группы маркеров. Наряду с сохраняющимися тенденциями, характеризуется появлением/усилением экспрессии целого ряда других генов. В целом морфологический этап канцерогенеза – объективный признак многокомпонентности и сложной внутренней организации/системы регуляции опухоли, которые характеризуются установлением связей между молекулярными путями регуляции биохимических процессов, нехарактерных для полноценной в функциональном отношении слизистой оболочки толстой кишки здорового человека. Вновь появившаяся система организации клеток (опухоль) использует пути сигнальной трансдукции «выработанные эволюционно» и функционирующие на ранних этапах онтогенеза и ранних этапах филогенеза. Предполагаемое нами наличие управляемого переключения важных сигнальных каскадов в различных клетках опухоли заставляет рассматривать опухоль как «саморегулирующуюся систему». Данную характеристику опухолевого роста (саморегуляция и система) впервые выдвинули сотрудники лаборатории иммунологии опухолей НИИ им. А.П. Герцена на основании изучения локальных и системных иммунологических показателей у онкологических больных. (263)

Итак, применительно к особенностям первой морфологической стадии КРР мы можем говорить о:

1. Активация Wnt-сигнального каскада через появляющиеся на данной стадии повышение экспрессии циклина D1, и экспрессии MYC.

2. Повышение продукции β -катенина на фоне сохраняющегося снижения экспрессии NDRG1.

3. Активация фосфоинозитольного пути передачи сигнала через достоверное снижение экспрессии PTEN.

4. Усилении P53-зависимого проапоптотического сигнала в следствие резкого повышения экспрессии P16.

5. Снижение чувствительности тканей к эстрогенам и прогестерону (по экспрессии ESR и PGR).

6. Активация ремоделирования межклеточного матрикса и киназ.

7. Рекрутирование эндотелиальных стволовых клеток через повышение экспрессии MMP7, MMP9, MMP11.

8. Нарастание экспрессии IL-8 – стимулятора эпителиально-мезенхимального перехода на фоне усиления экспрессии IL1b - -индуктора COX2, активатора В-клеток и фибробластов.

На основании выделенных 4-х групп факторов, выделенных нами ранее, (см. гл. 3.3.1.) проведен дискриминантный анализ слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев и «фоновой кишки» больных КРР. Результаты отражены в таблицах 20,21.

Таблица 20

Значение лямбды Уилкса и уровень статистической значимости для генов включенных в уравнение дискриминантной функции для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев и морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР по факторам

	Wilks&apos;	p-level
FACTOR1	0,730446	0,000132
FACTOR2	0,662535	0,866492
FACTOR3	0,869659	0,000000
FACTOR4	0,737037	0,000065

Исходя из представленных данных, статически достоверных различий по второй группе факторов, ассоциированных с β -катениновым

механизмом пролиферации не получено между образцами здоровых лиц и больными КРР. Максимальные изменения «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки наблюдаются по 3-й и 4-й группе факторов отражающих циклин-D1-зависимую прогрессию клеточного цикла, возможность отдаленного метастазирования и активацию фосфоинозитольного пути с ингибацией митохондриального пути апоптоза.

Таблица 21

Степень совпадения клинико-морфологической и полученной, согласно данным дискриминантной функции, классификации для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев и морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР по факторам

	Percent	Норма+	норма-
Норма+	96,15385	48	2
Норма-	82,94574	22	107
Total	85,16129	70	109

Нами обнаружена связь между степенью отличия слизистой оболочки толстой кишки больных КРР от слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев и рядом клинико-морфологических характеристик опухолевого роста: количеством пораженных метастазами органов, стадией заболевания и прогрессированием. Для указанных характеристик выявлена общая закономерность: взаимосвязь параметров с возрастанием степени отличий «фоновой» кишки от здоровой ($p=0,0344$, $p=0,0116$, $p=0,00009$ соответственно). Таким образом, чем более похожа «фоновая» слизистая оболочка больных КРР на слизистую оболочку здоровых добровольцев, тем меньше стадия, реже встречаются метастазы и наступает прогрессирование. Полученные данные отражены на диаграммах 20-22.

Диаграмма 20

Частота встречаемости метастазов (M0 – M1a – M1б) в зависимости от степени отличия «норма+» и «норма-» (апостериорная вероятность)

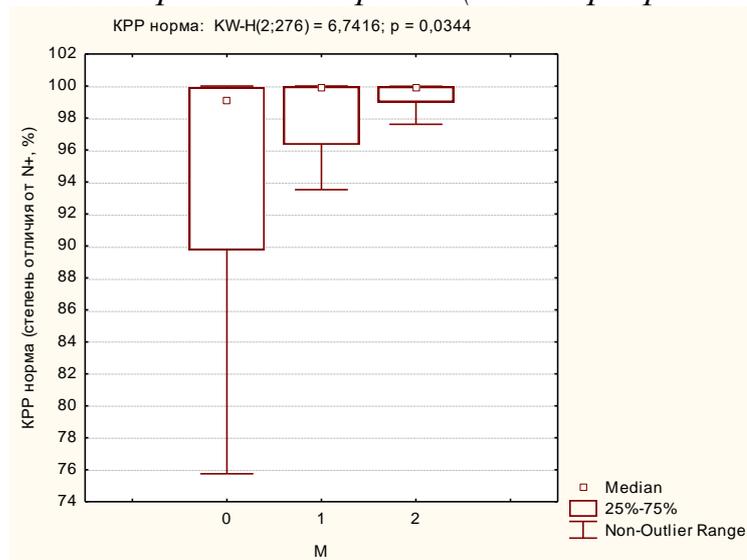
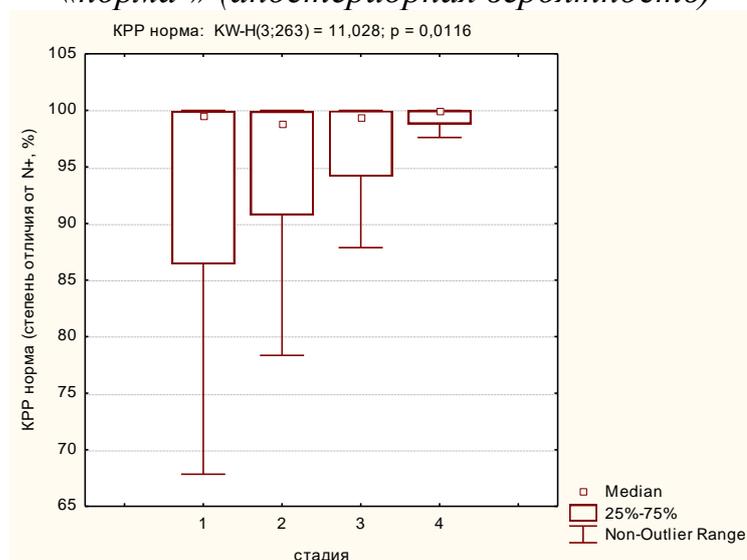


Диаграмма 21

Стадия заболевания в зависимости от степени отличия «норма+» и «норма-» (апостериорная вероятность)

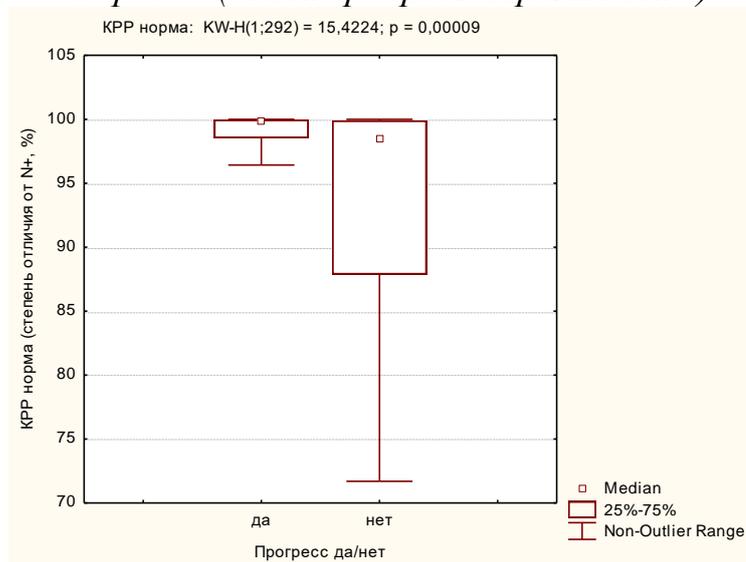


При исследовании взаимосвязи глубины инвазии опухоли и экспрессии различных генов, отмечено отсутствие стойких корреляционных связей экспрессии биомолекулярных маркеров и глубины инвазии опухоли, однако, при выделении группы пациентов с прорастанием всей стенки толстой кишки (T4) и группы пациентов без инвазии всех стенок (T1-T3), получены

существенные отличия в экспрессии большого количества генов и особенно генов, отвечающих за иммунный ответ.

Диаграмма 22

Частота прогрессирования в зависимости от степени отличия «норма+» и «норма-» (апостериорная вероятность)



В целом, при исследовании ткани опухоли, прорастание всех стенок характеризуется

1. Макрофагальной инфильтрацией - высокой активацией врожденного иммунитета (по CD68),
2. низкой способности к формированию иммунологической толерантности (по LIF),
3. при крайне низкой активности цитотоксических Т-лимфоцитов и цитотоксических характеристик NK клеток (по IL-15, CD56, GNLY, IL-2, IL-7, CD45, TLR4, TLR2, TLR7, IL-2R α , IL-12a, CD69),
4. угнетении пролиферации В-клеток (по IL-6),
5. в условиях патологического неоангиогенеза с образованием незрелых кровеносных сосудов (MMP2, VEGFA165),
6. повышением способности клеток к миграции (по SCUBE2),
7. снижением проапоптотических факторов (по BAX). (284)

Результаты представлены в таблице 22.

Таблица 22

Отличия экспрессии генов в ткани колоректального рака в зависимости от глубины инвазии (T1-3/T4)

	T1-3	T4	p	Valid N	Valid N
CD56	5,54704	2,33472	0,000008	92	40
MMP2	9,18370	6,82639	0,000242	92	40
GNLY	10,09074	6,35370	0,000246	92	40
IL2	5,10463	2,95463	0,000925	92	40
BAX	8,91778	6,68889	0,002174	92	40
LIF	8,71481	5,99954	0,002314	92	40
IL7	5,36000	4,01019	0,003697	92	40
CD45	5,91389	4,65139	0,005396	92	40
TLR4	8,59667	6,99074	0,007295	92	40
SCUBE2	6,32685	4,72315	0,007874	92	40
IL2Ra	10,72056	8,11759	0,008751	92	40
IL15	6,31926	5,12361	0,008947	92	40
CD68	5,42278	6,09769	0,012740	92	40
VEGFA165	7,42870	6,47315	0,017185	92	40
IL12a	8,91667	7,46991	0,024033	92	40
LGALS1	10,95204	9,21343	0,030675	92	40
IL6	7,08019	5,35185	0,041732	92	40
PAPPA	8,84296	7,41157	0,041885	92	40
LIFR	4,94926	3,93056	0,042947	92	40
CD69	5,05889	4,13194	0,043208	92	40
COX-2	8,23556	6,52037	0,048630	92	40
TLR2	8,67704	7,22824	0,051510	92	40
TLR7	4,79611	3,89120	0,053670	92	40
P16INK4A	4,37167	5,01574	0,057026	92	40

Вместе с тем, такие отличия выявлены и при исследовании «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки, однако, в меньшем количестве генов. При этом практически все гены, достоверно отличающиеся в зависимости от глубины инвазии T1-3/ T4 в «фоновой кишке», отличаются и в ткани опухоли (см. табл. 23)

Таблица 23

Отличия экспрессии генов в «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки у больных КРР в зависимости от глубины инвазии (Т1-3/Т4)

	T1-3	T4	p	Valid N	Valid N
SCUBE2	8,38295	6,02667	0,000299	91	38
CD56	7,15747	4,37762	0,000738	91	38
BAX	9,15517	7,03190	0,004370	91	38
IL15	7,16418	5,64095	0,006221	91	38
PTEN	3,68851	3,39048	0,022433	91	38
GPLY	10,46724	7,95333	0,024441	91	38
LGALS1	11,52299	9,67619	0,030950	91	38
LIF	7,36149	5,38000	0,031187	91	38
IL12a	8,99061	7,49238	0,040375	91	38
PAPPA	9,95498	8,30762	0,045409	91	38

На основании полученных данных мы пришли к выводу о том, что важным признаком инвазивного роста рака толстой кишки является прогрессивное снижение цитолитической способности иммунной системы за счет выраженного многофакторного угнетения Т-лимфоцитов (GPLY, IL-15, CD56, IL-12a) и их кооперации. Несмотря на то, что к изучению и разработке лекарственных средств воздействия на иммунную систему обращались многие авторы, (339, 340) в подавляющем большинстве случаев, речь шла о попытках стимуляции Т-клеточного иммунитета. Кроме того, в процессе развития опухоли с вовлечением серозной оболочки (глубина инвазии Т4), определенную роль играет угнетение митохондриального пути апоптоза (снижение экспрессии BAX), снижения связывания эпителиальных клеток с межклеточным матриксом за счет угнетения экспрессии SCUBE2.

Применительно к отличиям экспрессии изученных генов при стадиях Т1-Т3 достоверный результат получен лишь по повышению экспрессии ароматазы в ткани опухоли, начиная со II стадии, что согласуется с достоверным повышением ESR и PGR, начиная со II стадией опухолевого процесса. Судя по всему, локальная продукция эстрадиола является важным необходимым условием опухолевой прогрессии. При анализе соотношения

PGR к ESR1 в ряду «норма+», I, II, III, IV стадии опухолевого процесса, нами получено прогрессивное увеличение данного соотношения от 0,86 к 0,95. Таким образом, продукция и чувствительность к прогестерону также важны в процессе опухолевого роста, а учитывая способность прогестерона стимулировать развитие иммунологической толерантности и подавлять иммунные реакции отторжения (в норме необходимые в процессе вынашивания беременности), нарастание индекса PGR к ESR1 согласуется с выявленной закономерностью повышения соотношения LIF/LIFR в ткани опухоли по сравнению с «фоновой» слизистой оболочкой толстой кишки больных КРР. Данный показатель в ряду «норма+», I, II, III, IV стадии составил 1,3: 2,1: 1,5: 1,7: 1,7 соответственно. Остается открытым вопрос об источнике продукции прогестерона и субстрата ароматазы – андрогенов у мужчин и женщин соответственно, учитывая средний возраст больных КРР 62,9 лет - возраст, значительно превышающий средний возраст менопаузы и андропаузы. (341) «Подозрения» падают на надпочечниковую продукцию стероидов, а также на продукцию эстрогенов периферической жировой тканью, которая становится клинически значимой при ожирении, а учитывая возможность взаимных превращений половых стероидов, как в норме, так и в патологии, вопрос становится решенным. (341)

В связи с этим, мы предприняли попытку выявить влияние ожирения на экспрессию анализируемых маркеров в опухолевой ткани, «фоновой слизистой» при КРР, однако, наши предположения не подтвердились. Мы не отметили достоверного изменения экспрессии изучаемых маркеров ни в ткани опухоли, ни «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки больных КРР в зависимости от ИМТ, как в общей группе, так и деление на подгруппы по полу, возрасту, степени дифференцировки опухоли, клинической стадии неопластического процесса, что, принимая во внимание данные литературы (36, 47, 94) о роли ожирения и метаболического синдрома в патогенезе КРР, наводит на мысль о влиянии ожирения и инсулинорезистентности на ранние этапы канцерогенеза, а также на «провоспалительную» настройку иммунного

ответа, что, в конечном итоге, выполняет роль синергиста с сигналами от самой опухоли. (290, 341, 342, 343)

Для дальнейшего решения поставленных задач исследования мы провели анализ изменения экспрессии по каждому из изученных маркеров в ткани опухоли и «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки больных КРР в зависимости от наличия или отсутствия метастазов в регионарные лимфоузлы. В ткани опухоли получены достоверные отличия по 2-м генам: циклин-D1 и P16. Результаты представлены в таблице 24.

Таблица 24

Отличия экспрессии генов в ткани опухоли толстой кишки у больных КРР в зависимости от наличия регионарных метастазов (N0/N+)

	N0	N+	p	Valid N	Valid N
CCND1	3,07557	3,67170	0,001461	73	59
P16INK4A	4,15320	5,11006	0,001759	73	59

Данные по увеличению экспрессии P16 не являются парадоксальными. По мнению французских исследователей, данный процесс является компенсаторным в ответ на узнавание наличия поврежденной ДНК в клетке. Однако опухолевые клетки обладают способностью уклоняться от апоптоза благодаря непрерывной селекции наиболее приспособленных клонов (344)

Отличия в «фоновой» ткани выявлены в экспрессии 2-х генов: KI-67 и IL-6. Результаты представлены в таблице 25.

Таблица 25

Отличия экспрессии генов в «фоновой» слизистой толстой кишки у больных КРР в зависимости от наличия регионарных метастазов (N0/N+)

	N0	N+	p	Valid N	Valid N
KI67	6,40845	7,21209	0,021522	72	57
IL6	7,11479	5,23072	0,033733	72	57

Принимая во внимание полученные данные, особенно примечательным становится факт незначительного достоверного усиления

пролиферации в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки больного КРР при наличии метастазов в лимфоузлы на фоне некоторого снижения в пределах высоких значений ИЛ-6, который ответственен за созревание В-лимфоцитов и повышение чувствительности к инсулину. (295)

Наличие отдаленных гематогенных метастазов характеризовалось различной экспрессией в 13 генах в ткани КРР, тогда как при изучении экспрессии генов в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки этот показатель отличался всего лишь по 2 генам. Результаты представлены в таблицах 26 и 27.

Таблица 26

Отличия экспрессии генов в ткани опухоли у больных КРР в зависимости от наличия гематогенных метастазов (M0/M+)

	M0	M1	p	Valid N	Valid N
BAX	8,93069	5,65600	0,000056	105	27
TGF-β	7,80941	5,88267	0,000283	105	27
TLR4	8,56931	6,39467	0,001246	105	27
P16INK4A	4,32739	5,47800	0,002404	105	27
GNLY	9,66865	6,41467	0,005334	105	27
GATA3	4,67195	3,64067	0,005645	105	27
IGF1	7,07673	5,26267	0,005654	105	27
IL7	5,26106	3,81600	0,006174	105	27
LIFR	4,95924	3,44200	0,007407	105	27
CD45	5,81304	4,50333	0,011036	105	27
HLA-G5	8,29505	5,82867	0,011412	105	27
IL6	7,05660	4,68667	0,013337	105	27
LIF	8,36716	6,20933	0,034270	105	27

Таблица 27

Отличия экспрессии генов в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки у больных КРР в зависимости от наличия гематогенных метастазов (M0/M+)

	M0	M1	p	Valid N	Valid N
P14ARF (P19ARF)	6,64680	4,64348	0,019873	104	25
TGF-β	7,53232	6,35870	0,046590	104	25

Общей особенностью для ткани толстой кишки больных КРР оказалась повышенная экспрессия TGF-β, ответственного за эпителиально-мезенхимальный переход, от которого на прямую зависит возможность

отдаленного метастазирования. При этом «фоновая» слизистая оболочка толстой кишки у больных КРР показала достоверное повышение экспрессии P14, а опухолевая ткань - повышение P16. Таким образом, проапоптотический сигнал в исследуемых тканях больного стимулируется через повышенную экспрессию различных генов. Если для регионарного метастазирования существенным оказалась активация апоптоза в сочетании с поддержанием прогрессии клеточного цикла, то для отдаленного метастазирования важнейшей характеристикой, помимо усиления эпителиально-мезенхимального перехода, прогрессирующим снижением цитотоксических свойств клеток неспецифического и специфического иммунитета, а также чувствительности макрофагов, нейтрофилов и дендритных клеток к антигенам, синергичное повышение экспрессии BAX и P16. В субстратном отношении данные гены синергистами не являются. Так, продукт гена BAX напрямую стимулирует митохондриальный путь апоптоза, а P16 ингибирует пролиферацию через торможение активации циклина D. (345, 346, 347)

Принимая во внимание полученные данные о существенных отличиях молекулярно-генетического профиля слизистой оболочки толстой кишки больного КРР от слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев, мы сочли целесообразным изучить наличие связи между глубиной развивающихся отклонений в «норма-» и клинико-прогностическими характеристиками опухоли: глубиной инвазии, наличием регионарных и отдаленных метастазов, наступлением прогрессирования. Для этого мы применили метод апостериорной вероятности отличия «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки от слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев. Таким образом, образцы «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки максимально отличные от образцов здоровых добровольцев в основном составили первый и третий кластеры. Данные отражены на диаграмме 23 и в таблице 28.

Распределение образцов «норма-» по кластерам с учетом степени отличия «норма+» и «норма-» (апостериорная вероятность)

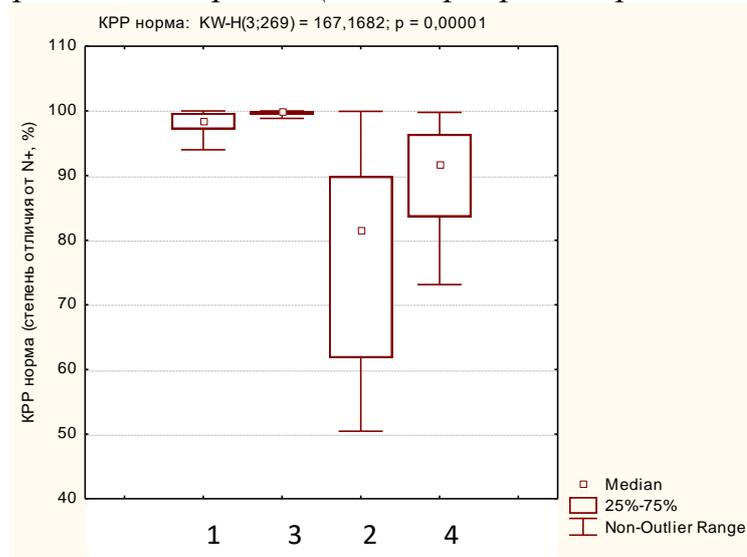


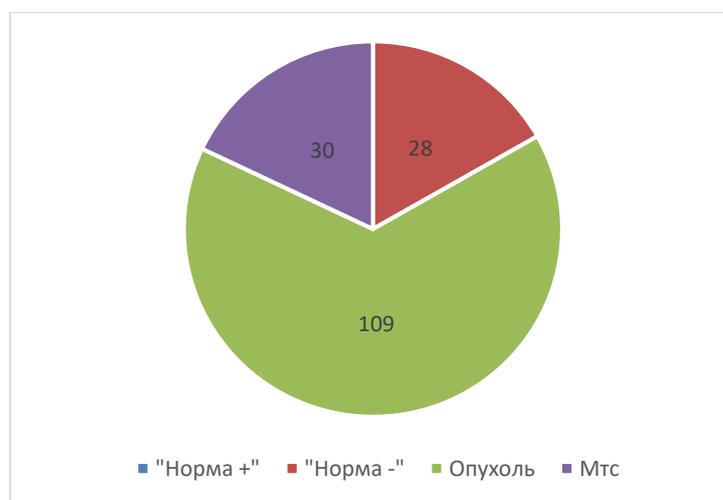
Таблица 28

Отличия средних апостериорной вероятности для «норма-» кластеров 1,3 и 2,4

	1,3 кластеры	2,4 кластеры	p	Valid N a	Valid N b
Норма-	97,23232	77,23928	0,0000001	27	102

Таким образом, образцы «норма-», вошедшие в кластеры 2 и 4 характеризуются меньшими отличиями средних апостериорной вероятности, и составили $77,0 \pm 14,5\%$, тогда как средняя степень отличия «норма-» от «норма+» для 1 и 3 кластеров $97,0 \pm 3,0\%$. Таким образом, можно выделить 2 группы: соответствующие «норма-» на $97,0 \pm 3,0\%$ и соответствующие на $77,0 \pm 14,5\%$. Первый и третий кластеры, которым соответствует «норма-» наиболее непохожая на «норма+», также содержит подавляющее количество образцов первичной опухоли (82,7%) и большинство метастазов (80,0%). Второй и четвертый кластеры представлены «норма-» сходной с молекулярных позиций с «норма+», а также все образцы здоровых добровольцев и 17,3% образцов первичной опухоли и 20,0% образцов ткани метастазов. Данные представлены на диаграммах 84, 85.

Распределение образцов в 1,3 кластерах.



Распределение образцов в 2,4 кластерах.



При сопоставлении экспрессии изученной панели генов в ткани первичной опухоли на основании выделения групп сравнения в зависимости от процента отклонения «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки от физиологической нормы более или менее 94% в первую группу сравнения вошли 101 образец первичной опухоли, в которых «фоновая» слизистая оболочка толстой кишки отличалась от физиологической нормы менее, чем на 94%, согласно расчетам апостериорной вероятности. Вторую группу

сравнения составил 28 образцов первичных опухолей, в которых «фоновая» слизистая оболочка отличалась от нормальной, более чем на 94%. Сравнение групп проводился независимо по каждому фактору. Данные представлены в таблице 29 и на диаграммах 26-29.

Таблица 29

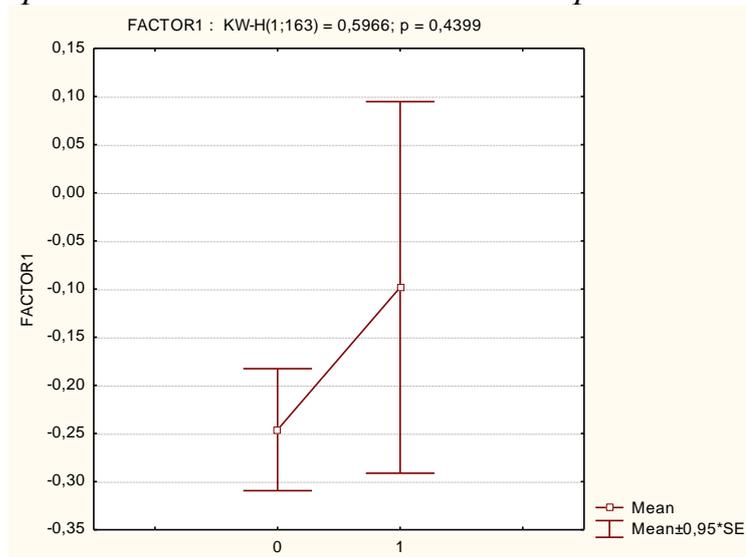
Отличие средних значений факторов в ткани опухоли в группах сформированных по степени отличия «норма+» и «норма-»

	Mean 0	Mean 1	p	Valid N 0	Valid N 1	Std.Dev. 0	Std.Dev. 1
FACTOR1	-0,302359	-0,100767	0,285308	101	28	0,813045	1,113782
FACTOR2	0,336304	0,091035	0,237896	101	28	0,855925	1,329475
FACTOR3	0,516283	1,071103	0,000050	101	28	0,651256	0,492102
FACTOR4	-0,386265	-0,139838	0,322213	101	28	1,109620	1,361432

Достоверные отличия уровня экспрессии генов в ткани первичной опухоли в зависимости от «похожести/непохожести» «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки на «норму+» присутствуют для генов третьего фактора (генов ассоциированных с циклин-D1 зависимой пролиферацией).

Диаграмма 26

Средние значения первого фактора в ткани опухоли в группах, сформированных по степени отличия «норма+» и «норма-»

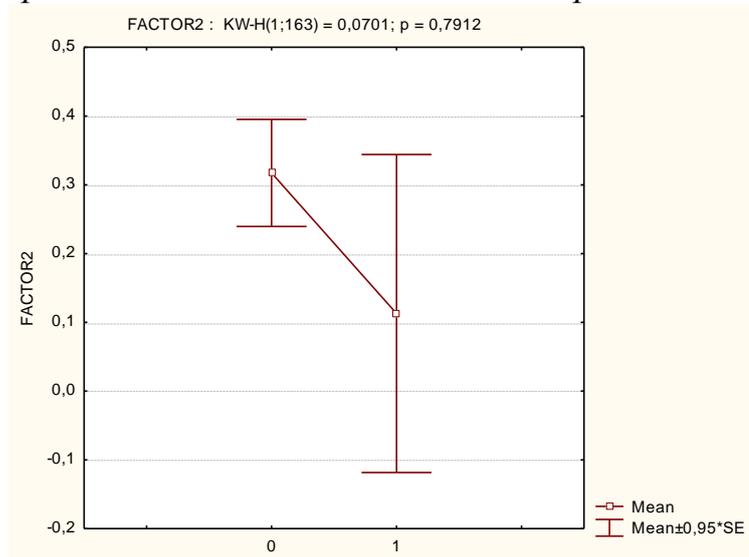


Из представленных данных следует, что в выделенных подгруппах, различающихся по клиническому течению, первичная ткань опухоли характеризуется достоверными отличиями только по третьему фактору. Таким

образом, применительно к экспрессии генов в первичной ткани опухоли, группа генов, составляющих 3-й фактор, ассоциирована с развитием метастазов и прогрессированием. Описанные выше функции продуктов генов, составляющих 3-й фактор, свидетельствует о том, что уклонение от физиологических сигнальных пролифератропных путей, десмолитическая активация иммунной системы и подавление Р-53 зависимого апоптоза, наряду с активацией ангиогенеза, являются важнейшими факторами опухолевого роста и метастазирования.

Диаграмма 27

Средние значения второго фактора в ткани опухоли в группах, сформированных по степени отличия «норма+» и «норма-»



Далее проведено сравнение экспрессии изученной панели генов по факторам между первичной опухолью и слизистой оболочкой «фоновой» толстой кишки среди пациентов с наибольшими отличиями «фоновой» кишки от физиологической нормы. Достоверные отличия получены для второго и четвертого факторов. Средние значения свидетельствуют об относительном преобладании β -катенин ассоциированной пролиферации в ткани опухоли по сравнению с «фоновой» кишкой. При этом средние значения пролиферации не отличаются от пролиферации в слизистой оболочке толстой кишки здорового человека (на основании сравнения экспрессии Ki-67 (данные отражены выше)). Кроме того, первичная ткань опухоли, полученная от больных с

выраженными отличиями «норма-» от «норма+», характеризовалась уменьшением вклада четвертого фактора в опухолевый рост по сравнению с «фоновой» кишкой. Данные отражены в таблице 30 и диаграммах 30-33.

Диаграмма 28

Средние значения третьего фактора в ткани опухоли в группах, сформированных по степени отличия «норма+» и «норма-»

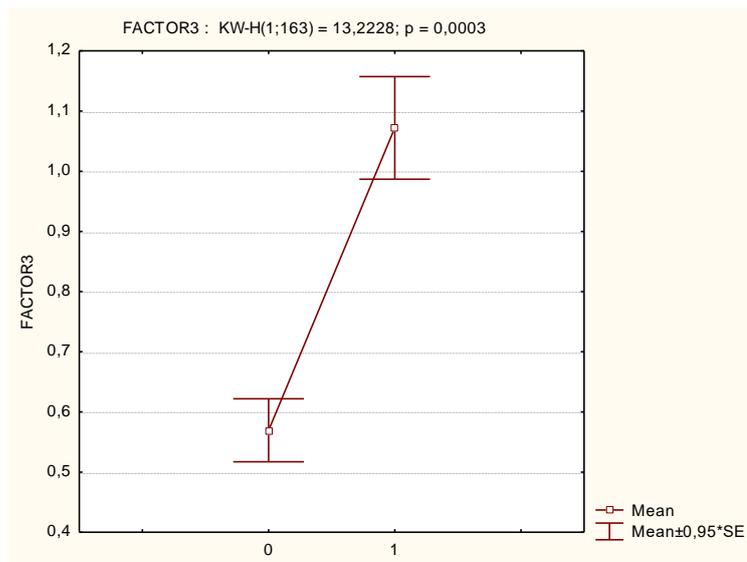


Диаграмма 29

Средние значения четвертого фактора в ткани опухоли в группах, сформированных по степени отличия «норма+» и «норма-»

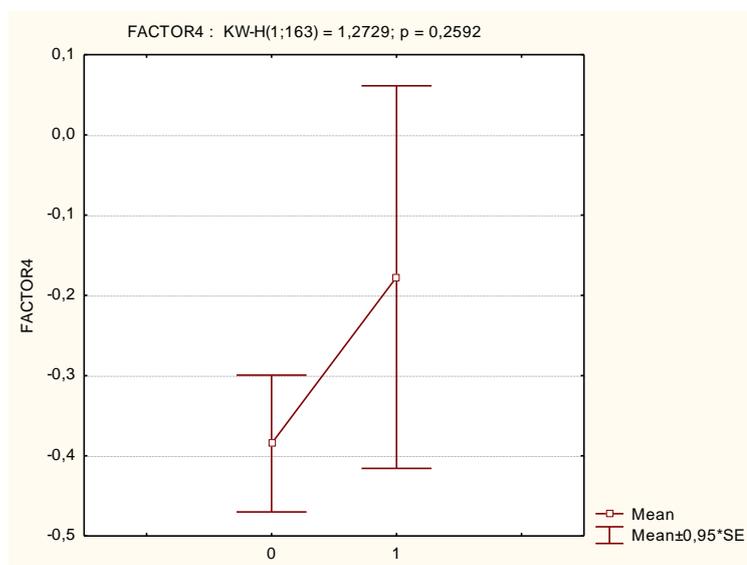


Таблица 30

Отличие средних значений факторов в ткани опухоли и «фоновой» кишке в группе с отличием «норма-» и «норма+» более 94%

	Mean KPP	Mean N-	p	Valid N KPP	Valid N N-	Std.Dev. KPP	Std.Dev. N-
FACTOR1	-0,100767	-0,09544	0,985464	28	28	1,113782	1,064237
FACTOR2	0,091035	-1,32129	0,000180	28	28	1,329475	1,297762
FACTOR3	1,071103	0,87429	0,194082	28	28	0,492102	0,620553
FACTOR4	-0,139838	0,46847	0,044074	28	28	1,361432	0,764428

Диаграмма 30

Значения фактора 1 в ткани опухоли и «фоновой» кишке в группе с отличием «норма-» и «норма+» более 94%

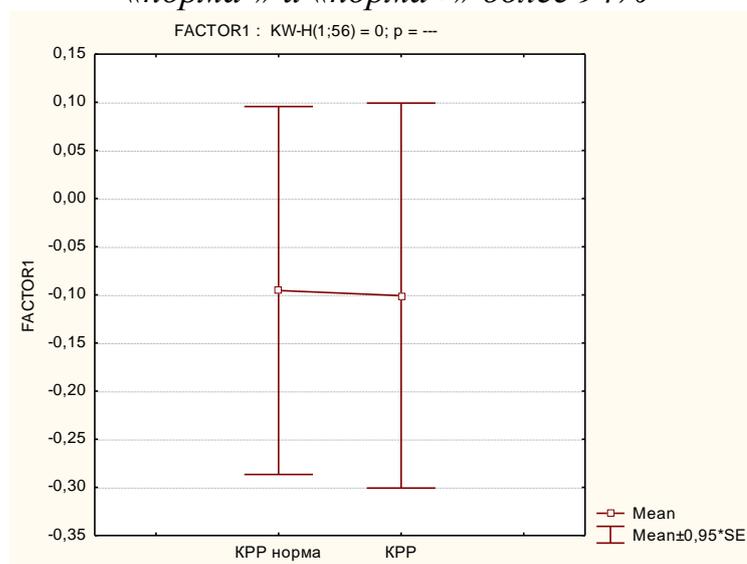


Диаграмма 31

Значения фактора 2 в ткани опухоли и «фоновой» кишке в группе с отличием «норма-» и «норма+» более 94%

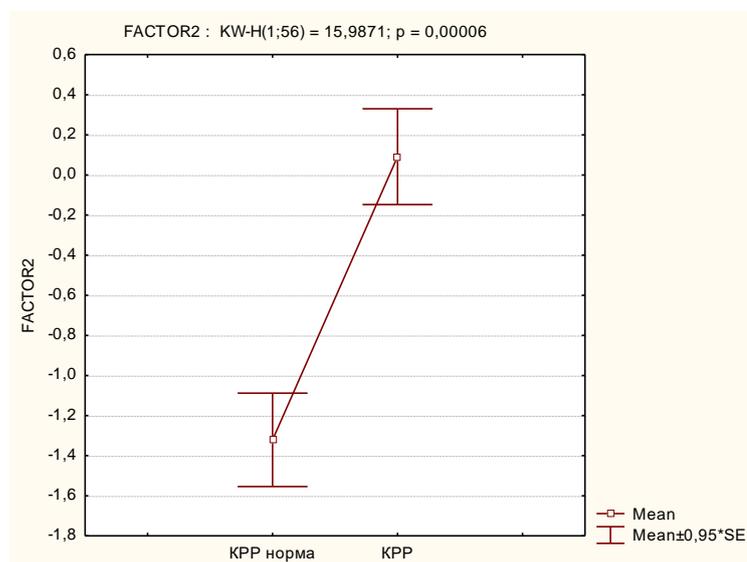


Диаграмма 32

Значения фактора 3 в ткани опухоли и «фоновой» кишке в группе с отличием «норма-» и «норма+» более 94%

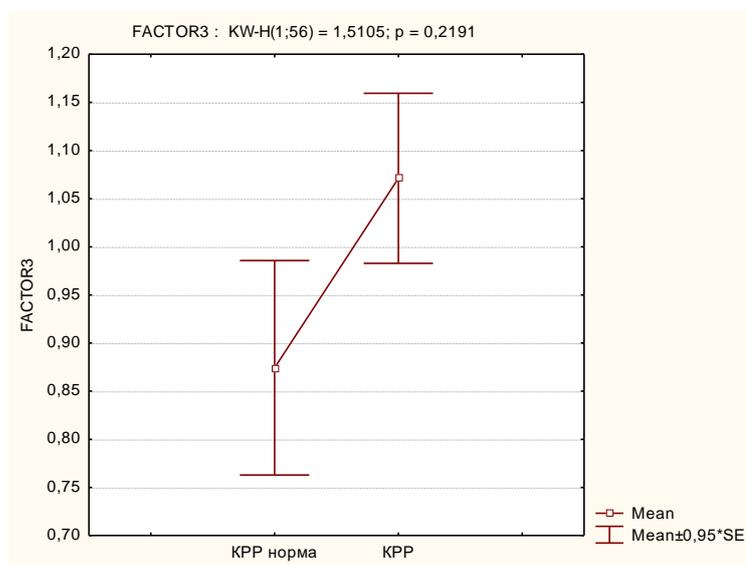
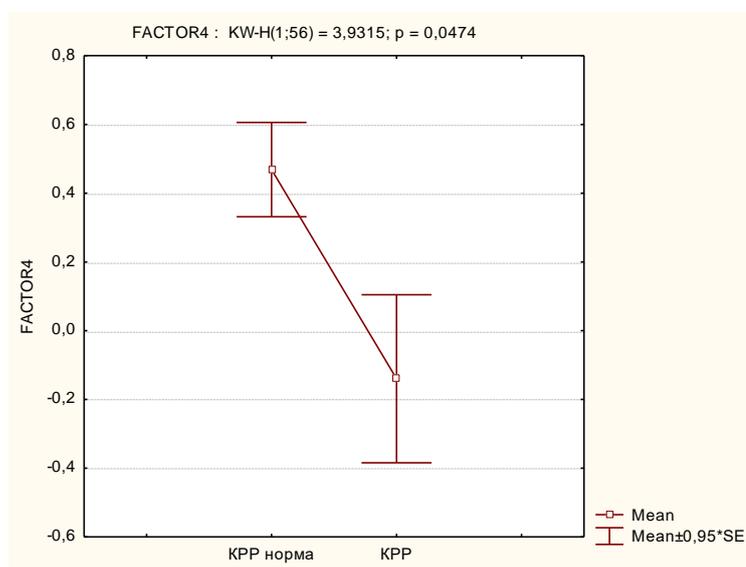


Диаграмма 33

Значения фактора 4 в ткани опухоли и «фоновой» кишке в группе с отличием «норма-» и «норма+» более 94%



С целью оценки ассоциированного изменения экспрессии изученной панели генов, сгруппированных по факторам, в ткани первичной опухоли и слизистой оболочки «фоновой» кишки, произведен расчет коэффициентов корреляции отраженных в таблице 31.

Таблица 31

Корреляция значения факторов в ткани первичной опухоли и слизистой оболочки «фоновой» кишки.

	FACTOR1 N-	FACTOR2 N-	FACTOR3 N-	FACTOR4 N-
FACTOR1	,6208	-,0815	,2754	-,2277
	p=,000	p=,380	p=,003	p=,013
FACTOR2	-,1245	,0016	-,1061	,1363
	p=,179	p=,986	p=,253	p=,141
FACTOR3	,2799	-,0778	,3193	,0809
	p=,002	p=,403	p=,000	p=,384
FACTOR4	-,1045	-,0159	,1965	,4824
	p=,260	p=,864	p=,033	p=,000

Наибольшая положительная связь (умеренная положительная корреляция), т.е. относительная синхронность и однонаправленность изменений, отмечается по иммунному, гормональному факторам. Слабая положительная корреляция отмечается по третьему фактору. Кроме того, нами выявлена слабая положительная корреляция между фактором 3 в первичной опухоли и фактором 1 в «фоновой» кишке. Фактор 1 в опухоли и «норма-», фактор 4 в опухоли и фактор 3 в «фоновой» кишке, а также слабая отрицательная корреляция между фактор 1 в опухоли и фактор 4 в «норма-».

Суммарно, прогрессирование у пациентов, чьи образцы «норма-» соответствовали 1 и 3 кластеру, наступило в 44,4% наблюдений (12 человек из 27); прогрессирование у пациентов, чьи образцы «норма-» соответствовали 2 и 4 кластеру – в 25,0% (23 человека из 102). Результаты являются статистически значимыми ($p=0,0376$) и отражены в таблицах 32,33.

Таблица 32

Характер течения опухолевого процесса (с/без прогрессирования) у пациентов, образцы «норма-» которых соответствовали первому и третьему кластеру

Прогресс да/нет Кластеры 1, 3 «норма-»		
	Count	Percent %
Прогрессирование	12	44,44444
Без прогрессирования	15	55,55556

Таблица 33

Характер течения опухолевого процесса (с/без прогрессирования) у пациентов, образцы «норма-» которых соответствовали второму и четвертому кластеру

Прогресс да/нет Кластеры 2, 4 «норма-»		
	Count	Percent
Прогрессирование	23	22,54902
Без прогрессирования	79	77,45098

Таким образом, молекулярно-генетические особенности слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста имеют значение и могут быть использованы для оценки риска прогрессирования, а, следовательно, могут влиять на лечебную тактику и особенности третичной профилактики КРР.

Таблица 33

Корреляция уровней экспрессии генов объединённых во второй и четвёртый факторы в слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев

	BCL2	NDRG1	HER2	PTEN	BAG1	PGR	ESR1	CYP19A
CTSL2	-,2318	,3207	,1854	-,2372	,2066	-,2601	-,3210	-,2476
	p=,245	p=,103	p=,355	p=,233	p=,301	p=,190	p=,103	p=,213
BIRC5	,0367	,5943	,0531	-,1804	,1621	-,2938	-,2561	-,3492
	p=,856	p=,001	p=,793	p=,368	p=,419	p=,137	p=,197	p=,074
KI67	-,1031	,3266	-,1736	-,3729	-,0286	-,2546	-,2970	-,3248
	p=,609	p=,096	p=,387	p=,055	p=,887	p=,200	p=,132	p=,098
TERT	,3919	-,0677	,2378	,4514	,1276	,5005	,3963	,3218
	p=,043	p=,737	p=,232	p=,018	p=,526	p=,008	p=,041	p=,102
CCNB1	-,0715	,3548	-,0785	-,3583	,0621	-,2536	-,3453	-,4334
	p=,723	p=,069	p=,697	p=,067	p=,758	p=,202	p=,078	p=,024
STK15	,2072	,5234	,2147	-,2455	,3551	,0420	,0571	-,2147
	p=,300	p=,005	p=,282	p=,217	p=,069	p=,835	p=,777	p=,282
MYBL2	-,0472	,2097	-,4333	-,0999	-,1767	-,3354	-,2444	-,3100
	p=,815	p=,294	p=,024	p=,620	p=,378	p=,087	p=,219	p=,116
TPA	,0979	,5165	-,1170	-,0298	,1243	-,1871	-,1578	-,1747
	p=,627	p=,006	p=,561	p=,883	p=,537	p=,350	p=,432	p=,383

Для оценки взаимного влияния уровня экспрессии генов, отнесенных к 4-м группам факторов, нами проведен корреляционный анализ между

уровнем экспрессии генов во II и IV, и III и IV факторах. Результаты (коэффициенты корреляции и уровень достоверности) отражены на ниже приведенных таблицах 33 – 37. Достоверные результаты выделены красным.

Впервые нами получена достоверная положительная связь между экспрессией TERT и PGR, что прямо указывает на ассоциированность прогестеронового сигнала и фермента поддержания длины теломер. (284)

Кроме того, в данной группе образцов нами обнаружена умеренная положительная корреляция между экспрессией NDRG1 (блокатора ядерной транслокации β-катенина) и BIRC5 (ингибитора апоптоза), STK15 (формирование и стабилизация микротрубочек в процессе митоза), что отражает взаимоотношения β-катениновой регуляции и пролиферации в условиях нормы. (284, 295)

Таблица 34

Корреляция уровней экспрессии генов объединенных во втором и четвертом факторах в морфологически неизменной слизистой оболочке толстой кишки больных КРР при отсутствии метастазов в регионарных лимфоузлах.

	BCL2	NDRG1	HER2	PTEN	BAG1	PGR	ESR1	CYP19A
CTSL2	-,1650	,0175	,1336	,0300	,0852	,2804	-,5030	-,0691
	p=,169	p=,885	p=,267	p=,804	p=,480	p=,018	p=,000	p=,567
BIRC5	,0510	,1195	,1607	-,0398	-,1036	,4226	-,0127	-,1345
	p=,673	p=,321	p=,181	p=,742	p=,390	p=,000	p=,917	p=,264
Ki-67	-,1936	-,0398	-,0543	-,0446	-,1880	,4546	-,2546	-,1363
	p=,106	p=,742	p=,653	p=,712	p=,116	p=,000	p=,032	p=,257
TERT	-,0948	,0584	-,0396	,1474	-,1428	,4852	-,1263	,0112
	p=,432	p=,628	p=,743	p=,220	p=,235	p=,000	p=,294	p=,926
CCNB1	,0647	,0344	,0387	,0036	,1961	,1681	-,2868	,1395
	p=,592	p=,776	p=,749	p=,976	p=,101	p=,161	p=,015	p=,246
STK15	-,2254	-,0627	-,0006	,1006	-,1581	,2389	-,2437	-,1810
	p=,059	p=,603	p=,996	p=,404	p=,188	p=,045	p=,041	p=,131
MYBL2	,0251	-,0618	,0693	-,0357	-,3462	,3154	-,3873	-,0910
	p=,835	p=,609	p=,566	p=,768	p=,003	p=,007	p=,001	p=,450
tPA	,0196	,0732	,0456	,1318	-,0671	,0364	-,2952	,0941
	p=,871	p=,544	p=,706	p=,273	p=,578	p=,763	p=,012	p=,435

Примечательной особенностью данных образцов явилось отсутствие корреляционных связей характерных для слизистой оболочки толстой кишки

здоровых добровольцев за исключением умеренного влияния чувствительности к прогестерону на экспрессию TERT; а также появление слабого и умеренного влияния PGR на экспрессию других генов, ассоциированных с пролиферацией: CTSL2, BIRC5, Ki-67, STK15, MYBL2. Помимо этого, в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки больных КРР впервые отмечается слабое негативное влияние экспрессии ESR1 на экспрессию генов ассоциированных с пролиферацией: CTSL2, Ki-67, CCNB1, STK15, MYBL2. Кроме того, в изученных образцах нами отмечено слабое положительное влияние чувствительности к эстрогенам на экспрессию урокиназы тканевого типа (tPA) ответственную за миграцию и ремоделирование. Дополнительно появились слабые отрицательные корреляционные связи между ингибитором митохондриального апоптоза BCL2 и STK15, а также геном BAG1 и транскрипционным фактором MYBL2. (284, 295)

Таблица 35

Корреляция уровней экспрессии генов объединенных во второй и четвертый факторы в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки больных КРР при наличии метастазов в регионарных лимфоузлах.

	BCL2	NDRG1	HER2	PTEN	BAG1	PGR	ESR1	CYP19A
CTSL2	-,0681	-,0006	,2176	-,1364	,1213	,1637	-,1090	,3203
	p=,635	p=,996	p=,125	p=,340	p=,397	p=,251	p=,447	p=,022
BIRC5	,2017	,2274	,3722	-,3483	,1385	,2864	,3096	,3321
	p=,156	p=,108	p=,007	p=,012	p=,333	p=,042	p=,027	p=,017
KI67	-,1231	-,1575	,0431	,0091	-,0550	,1644	-,2004	,1293
	p=,389	p=,270	p=,764	p=,950	p=,702	p=,249	p=,159	p=,366
TERT	-,2525	-,2185	,0172	-,2417	-,2505	,4594	,0268	,4561
	p=,074	p=,124	p=,905	p=,087	p=,076	p=,001	p=,852	p=,001
CCNB1	-,0455	,0158	,0545	-,2160	,0385	,2177	-,0379	,1483
	p=,751	p=,912	p=,704	p=,128	p=,788	p=,125	p=,792	p=,299
STK15	-,1592	-,0996	,1394	-,3057	-,1035	,3296	,2250	,4118
	p=,265	p=,487	p=,329	p=,029	p=,470	p=,018	p=,112	p=,003
MYBL2	,0400	,1277	,2036	-,4405	-,0709	,4309	,2752	,2719
	p=,780	p=,372	p=,152	p=,001	p=,621	p=,002	p=,051	p=,054
TPA	-,1643	-,0080	-,1214	-,0985	-,2616	,2451	,0925	,1128
	p=,249	p=,956	p=,396	p=,492	p=,064	p=,083	p=,519	p=,431

В случае развития регионарных метастазов отмечено сохранение влияния чувствительности к прогестерону на экспрессию ряда генов, ассоциированных с пролиферацией, при этом появляется достоверная роль эстрогенов (через положительные корреляционные связи ароматазы и CTSL2, BIRC5, TERT, STK 15), а также слабую положительную связь ESR1 и BIRC5 в развитии регионарного метастазирования. Помимо этого, нами четко выявлена задействованность подавления экспрессии PTEN в повышении экспрессии ряда генов пролиферации: BIRC5, STK15, MYBL2. Кроме того, при наличии регионарных метастазов в патологический процесс вовлекается HER2 путь передачи сигнала (появляется слабая корреляционная связь между HER2 и BIRC5). (284, 295) Данные приведены в таблице 35.

При сравнении корреляционных связей в ткани опухоли и «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки в условиях отсутствия регионарных метастазов, мы обнаружили существенное повышение роли экспрессии HER2, PTEN и BAG1 в экспрессии синергистов CTSL2, BIRC5, Ki-67, TERT, STK16 MYBL2, что указывает на важное значение вовлечения данных генов в патогенез КРР на стадии морфологически реализованной опухоли. Кроме того, нами выявлено положительная связь между экспрессией BCL2, NDRG1 и BIRC5, TERT, а также достоверное положительное влияние PGR, ESR1, CYP2 на экспрессию обратной транскриптазы TERT. При слабой корреляции экспрессии PGR и CCNB1. (295, 327, 348)

В случае развития регионарных метастазов, ткань опухоли отличается выраженной содружественной отрицательной корреляционной связью между экспрессией генов четвертого фактора с экспрессией BCL2, ESR1, CYP19A, а также отрицательной корреляционной связью между PTEN и CTSL2, BIRC5, Ki-67, CCNB1, MYBL2, отрицательной корреляционной связью между NDRG1 и CTSL2, BAG1 и TERT, при слабой положительной связи между TERT и PGR, что свидетельствует о значении генов четвертого фактора в подавлении регионарного метастазирования. (295)

Таблица 36

Корреляция уровней экспрессии генов объединенных во второй и четвертый факторы в ткани опухоли при отсутствии метастазов в регионарных лимфоузлах.

	BCL2	NDRG1	HER2	PTEN	BAG1	PGR	ESR1	CYP19A
CTSL2	,0095	-,0095	,4249	,2936	,4073	,0625	-,0531	-,0406
	p=,936	p=,936	p=,000	p=,011	p=,000	p=,597	p=,653	p=,731
BIRC5	,4420	,5080	,6272	,3908	,5512	,1304	,1939	-,0364
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,001	p=,000	p=,268	p=,098	p=,758
Ki-67	,2255	,2154	,4609	,4026	,5047	,0569	,0601	,0589
	p=,053	p=,065	p=,000	p=,000	p=,000	p=,630	p=,611	p=,618
TERT	,3283	,2754	,4069	,4380	,4307	,4039	,2849	,2618
	p=,004	p=,018	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,014	p=,024
CCNB1	-,1553	-,0519	,1065	-,0805	,1337	-,3304	-,2607	,0258
	p=,186	p=,661	p=,367	p=,495	p=,256	p=,004	p=,025	p=,827
STK15	,0610	,1633	,4058	,3315	,3429	-,0111	-,0690	-,0059
	p=,606	p=,164	p=,000	p=,004	p=,003	p=,925	p=,559	p=,960
MYBL2	,2453	,2522	,4362	,3248	,4599	,0598	,1160	,0373
	p=,035	p=,030	p=,000	p=,005	p=,000	p=,613	p=,325	p=,752
TPA	-,0092	,1841	,0180	-,0630	,0617	-,0745	-,0567	,0668
	p=,938	p=,116	p=,879	p=,594	p=,601	p=,528	p=,631	p=,572

Таблица 37

Корреляция уровней экспрессии генов объединенных во второй и четвертый факторы в ткани опухоли при наличии метастазов в регионарных лимфоузлах.

	BCL2	NDRG1	HER2	PTEN	BAG1	PGR	ESR1	CYP19A
CTSL2	-,5176	-,3585	-,0273	-,3026	-,1174	-,0015	-,5485	-,2646
	p=,000	p=,008	p=,846	p=,028	p=,402	p=,991	p=,000	p=,056
BIRC5	-,2882	-,0601	,0848	-,3751	-,0500	-,1284	-,3168	-,3008
	p=,036	p=,669	p=,546	p=,006	p=,722	p=,359	p=,021	p=,029
Ki-67	-,5231	-,1884	-,0474	-,4269	-,2469	,0431	-,4521	-,4572
	p=,000	p=,177	p=,736	p=,001	p=,075	p=,759	p=,001	p=,001
TERT	-,4568	,0396	-,2352	-,1795	-,2941	,2986	-,2851	-,4465
	p=,001	p=,778	p=,090	p=,198	p=,033	p=,030	p=,039	p=,001
CCNB1	-,3992	-,2272	-,0516	-,4550	-,1983	-,1483	-,4171	-,1745
	p=,003	p=,102	p=,714	p=,001	p=,155	p=,289	p=,002	p=,211
STK15	-,5499	-,1936	-,0998	-,2024	-,2039	-,1413	-,4793	-,3804
	p=,000	p=,165	p=,477	p=,146	p=,143	p=,313	p=,000	p=,005
MYBL2	-,3981	-,2576	,0330	-,4186	-,2301	-,0498	-,5152	-,1570
	p=,003	p=,063	p=,814	p=,002	p=,097	p=,723	p=,000	p=,262
TPA	-,3198	,1503	-,0343	-,0269	-,1711	-,3674	-,1666	-,3317
	p=,020	p=,283	p=,807	p=,848	p=,221	p=,007	p=,233	p=,015

При сравнении корреляционных связей и их значения в развитии отдаленного метастазирования между экспрессией генов второго и четвертого

факторов в морфологически неизмеренной слизистой оболочки толстой кишки больных КРР, нами обнаружена потеря ранее установленных корреляционных связей в случае развития отдаленных метастазов. Данные отражены в таблицах 38-41.

Так, происходит потеря достоверного взаимного влияния BCL2, PTEN, BAG1, PGR на экспрессию генов второго фактора, при выявлении отрицательного влияния сниженной локальной продукции эстрогенов и чувствительности к ним в развитии отдаленных метастазов.

Таблица 38

Корреляция уровней экспрессии генов объединенных во второй и четвертый факторы в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки больных КРР без признаков прогрессирования заболевания.

	BCL2	NDRG1	HER2	PTEN	BAG1	PGR	ESR1	CYP19A
CTSL2	-,2624	,0333	,1024	-,2650	,0580	,2932	-,1374	-,1176
	p=,011	p=,751	p=,329	p=,010	p=,581	p=,004	p=,189	p=,262
BIRC5	,0437	,1945	,2363	-,3087	-,1034	,4489	,3351	-,1059
	p=,677	p=,062	p=,023	p=,003	p=,324	p=,000	p=,001	p=,312
KI67	-,2664	-,0088	-,0756	-,2409	-,2270	,4544	,0678	-,2628
	p=,010	p=,933	p=,471	p=,020	p=,029	p=,000	p=,518	p=,011
TERT	-,2254	,0201	-,0296	-,1543	-,2281	,5228	,3417	,1510
	p=,030	p=,848	p=,778	p=,140	p=,028	p=,000	p=,001	p=,148
CCNB1	-,1299	,0476	-,0483	-,3332	,0742	,2112	,0640	-,0117
	p=,214	p=,650	p=,645	p=,001	p=,480	p=,042	p=,542	p=,912
STK15	-,2285	-,0166	,0581	-,2689	-,2045	,3490	,2239	-,0157
	p=,028	p=,874	p=,580	p=,009	p=,049	p=,001	p=,031	p=,881
MYBL2	-,0883	-,0370	,0608	-,4090	-,4401	,4358	,1193	-,1908
	p=,400	p=,725	p=,562	p=,000	p=,000	p=,000	p=,255	p=,067
TPA	-,1219	,0736	-,0212	-,0782	-,1550	,1087	-,0320	-,0399
	p=,244	p=,483	p=,840	p=,456	p=,138	p=,299	p=,761	p=,704

При сравнении корреляционных зависимостей экспрессии генов второго и четвертого фактора в ткани опухоли у больных без и с прогрессированием мы пришли к заключению о роли сниженной чувствительности к эстрогенам и активации HER2 зависимого пути передачи сигнала на фоне появившейся положительной корреляционной связи между генами второго фактора и экспрессией PTEN, подавляющего

гормонозависимый путь передачи сигнала в развитии отдаленного метастазирования.

Таблица 39

Корреляция уровней экспрессии генов объединенных во второй и четвертый факторы в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки больных КРР с признаками прогрессирования заболевания.

	BCL2	NDRG1	HER2	PTEN	BAG1	PGR	ESR1	CYP19A
CTSL2	,0813	-,0667	,1846	,3996	,2004	,2155	-,7982	,1887
	p=,643	p=,704	p=,288	p=,017	p=,248	p=,214	p=,000	p=,278
BIRC5	,2778	,0927	,2348	,1087	,2131	,1792	-,3657	,2460
	p=,106	p=,596	p=,175	p=,534	p=,219	p=,303	p=,031	p=,154
KI67	,0179	-,2207	,0499	,2956	,0732	,2478	-,7393	,1611
	p=,919	p=,203	p=,776	p=,085	p=,676	p=,151	p=,000	p=,355
TERT	-,0474	-,1818	-,0235	,2513	-,0717	,4520	-,7631	,0209
	p=,787	p=,296	p=,893	p=,145	p=,682	p=,006	p=,000	p=,905
CCNB1	,2804	,0011	,1656	,2504	,2653	,2035	-,5431	,2871
	p=,103	p=,995	p=,342	p=,147	p=,123	p=,241	p=,001	p=,094
STK15	-,1098	-,2472	,0635	,2827	,0619	,1149	-,6815	,0862
	p=,530	p=,152	p=,717	p=,100	p=,724	p=,511	p=,000	p=,622
MYBL2	,2608	,0812	,2238	,0927	,1606	,2630	-,5840	,3507
	p=,130	p=,643	p=,196	p=,596	p=,357	p=,127	p=,000	p=,039
TPA	,1345	-,0286	-,0247	,2841	-,0548	,1631	-,4248	,3583
	p=,441	p=,871	p=,888	p=,098	p=,754	p=,349	p=,011	p=,035

Таблица 40

Корреляция уровней экспрессии генов объединенных во второй и четвертый факторы в ткани опухоли без признаков прогрессирования заболевания.

	BCL2	NDRG1	HER2	PTEN	BAG1	PGR	ESR1	CYP19A
CTSL2	-,1029	-,1079	,3207	,0323	,2544	-,0027	-,2324	-,0643
	p=,321	p=,298	p=,002	p=,756	p=,013	p=,979	p=,023	p=,536
BIRC5	,2594	,3411	,4466	,1303	,3229	,0307	-,0325	-,1348
	p=,011	p=,001	p=,000	p=,208	p=,001	p=,767	p=,755	p=,193
KI67	-,0099	,0431	,2581	,1078	,2192	,0139	-,1844	-,0924
	p=,924	p=,678	p=,012	p=,298	p=,033	p=,894	p=,074	p=,373
TERT	,1453	,2222	,1704	,1630	,1899	,3306	,1344	,0501
	p=,160	p=,030	p=,099	p=,114	p=,065	p=,001	p=,194	p=,630
CCNB1	-,1452	-,0622	,1471	-,0668	,1432	-,2108	-,3236	-,1205
	p=,160	p=,549	p=,155	p=,520	p=,166	p=,040	p=,001	p=,245
STK15	-,0283	,0912	,2811	,0949	,1861	-,0919	-,2354	-,1021
	p=,785	p=,379	p=,006	p=,360	p=,071	p=,376	p=,022	p=,325
MYBL2	,0572	,0493	,2941	,0758	,2150	-,0011	-,1530	-,0566
	p=,582	p=,635	p=,004	p=,466	p=,036	p=,992	p=,139	p=,586
TPA	-,0621	,1921	-,0121	-,0785	-,0130	-,0997	-,0878	-,0543
	p=,550	p=,062	p=,907	p=,450	p=,900	p=,337	p=,398	p=,601

Таблица 41

Корреляция уровней экспрессии генов объединенных во второй и четвертый факторы в ткани опухоли с признаками прогрессирования заболевания.

	BCL2	NDRG1	HER2	PTEN	BAG1	PGR	ESR1	CYP19A
CTSL2	-,1068	,0420	,4335	,2707	,2760	,1038	-,4060	-,1360
	p=,386	p=,734	p=,000	p=,026	p=,023	p=,400	p=,001	p=,269
BIRC5	,0390	,3157	,5082	,1888	,3607	,0746	-,1974	-,0577
	p=,752	p=,009	p=,000	p=,123	p=,003	p=,546	p=,107	p=,640
KI67	,0150	,2010	,4918	,1494	,3484	,0750	-,2653	-,0934
	p=,904	p=,100	p=,000	p=,224	p=,004	p=,543	p=,029	p=,449
TERT	-,1576	,1744	,3298	,2700	,1117	,2505	-,2722	-,0688
	p=,199	p=,155	p=,006	p=,026	p=,364	p=,039	p=,025	p=,577
CCNB1	-,2821	-,0556	,1917	-,2005	-,0574	-,2562	-,4452	,0445
	p=,020	p=,652	p=,117	p=,101	p=,642	p=,035	p=,000	p=,719
STK15	-,2081	,1227	,3142	,2570	,1743	,0228	-,2986	-,1219
	p=,089	p=,319	p=,009	p=,034	p=,155	p=,854	p=,013	p=,322
MYBL2	-,0263	,2358	,4461	,0980	,2759	,0827	-,2585	,0437
	p=,831	p=,053	p=,000	p=,427	p=,023	p=,503	p=,033	p=,723
TPA	-,0876	,2445	,3428	,1628	,1648	-,2210	-,3453	-,1191
	p=,477	p=,045	p=,004	p=,185	p=,179	p=,070	p=,004	p=,334

Таким образом, на основании проведенного анализа, мы пришли к заключению что:

1. Экспрессия различных биомолекулярных маркеров (факторов роста эпителия, эндотелия, цитокинов и их рецепторов, маркеров адгезии и ремоделирования межклеточного матрикса, факторов апоптоза) достоверно отличает слизистую оболочку толстой кишки больного КРР от слизистой оболочки толстой кишки здорового человека, что не позволяет рассматривать толстую кишку больного КРР как здоровый орган и может служить основой диагностики доморфологического этапа развития КРР.

2. В патогенезе КРР играют важную роль молекулярно-генетические изменения как собственно в опухоли, так и «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки в том числе изменения экспрессии маркеров врожденного и приобретенного иммунного надзора.

3. Формирование морфологически идентифицируемого рака толстой кишки, подразумевает функционирование динамической системы клеток,

использующих в своей жизнедеятельности нехарактерные для выполнения основной функции органа сигнальные пути и связи между биохимическими циклами.

4. Полученные закономерности экспрессии цитокинов свидетельствует об активации неспецифических иммунных реакций, стимуляции В-лимфоцитарного звена иммунитета, подавлении пролиферации и дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов. Специфическая активация гуморального звена иммунитета с экранированием цитотоксических эффектов является важным условием опухолевого роста и прогрессирования и может служить важной мишенью для разработки средств лекарственного воздействия на опухолевый процесс.

5. Анализ закономерностей изменения экспрессии генов апоптоза, пролиферации, их индукторов, ингибиторов и рецепторов, генов ремоделирования межклеточного матрикса и маркеров различных звеньев иммунитета в слизистой оболочке толстой кишки здорового добровольца, «фоновой» слизистой оболочке больного КРР и ткани опухоли, позволяет условно подразделить изученные факторы на четыре группы. Основным принципом деления на группы является отношение экспрессии выше указанных биомолекулярных маркеров в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки и опухоли к морфологически неизменной слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев.

6. Постадийный профиль экспрессии генов, ответственных за реализацию основных условий жизнедеятельности опухоли и позволяющий разработать универсальную прогностическую модель для больных КРР, отсутствует, что обусловлено исходным дублированием и возможностью взаимного переключения сигнальных путей от различных внешних и внутренних сигналов в клетке. Данная особенность, обеспечиваемая в определенных условиях поддержания гомеостаза тканей, становится основным принципом становления и жизнедеятельности опухолевой системы, позволяющей подчинить себе ключевые эволюционно-выработанные

«системы безопасности» макроорганизма: иммунную и эндокринную системы.

7. Учитывая широту механизмов ускользания клеток опухоли при подавлении того или иного звена сигнальных путей, за счет значительного количества возможностей дублирования и переключения, в стратегическом аспекте, разработка таргетных препаратов, как в монорежиме, так и в комбинации нескольких, обречена на временную эффективность, лимитируемую скоростью девиантного отбора и клональной экспансии ускользающего от применяемой терапии пути биохимических процессов.

8. Стратегическим прикладным направлением полученных результатов является дальнейшее планирование и разработка способов воздействия на иммуноопосредованные механизмы подавления опухолевого роста.

При изучении молекулярно-генетических особенностей прогрессирования, нами выявлены гены, достоверно отличающиеся в зависимости от течения процесса (без прогрессирования / с прогрессированием). Так, если выбрать группу пациентов с I-II-III стадией заболевания и разделить ее на тех, у кого в последующем наступило прогрессирование, и на тех, у которых прогрессирование не наблюдалось, то обнаруживается значительное количество генов, чья экспрессия достоверно отличающихся между группами. Результаты представлены в таблице 42

Данный перечень генов, безусловно, важен в понимании патогенетических механизмов, способствующих прогрессированию. На основании определения экспрессии генов выше указанного перечня можно сформировать группу риска по прогрессированию КРР, что влечет за собой использование более «агрессивных» средств/ схем лечения. Однако данное направление научного поиска не решает проблему онкогенеза как таковую, уводит в сторону от поиска средств воздействия на создаваемую опухолью систему управления иммунной системой человека в интересах собственного существования и развития. По-видимому, еще не удавалось увидеть/описать

пик развития данной системы, так как она «паразитарно» использует основные системы поддержания жизнедеятельности организма носителя, и, нарушая их, приводит к развитию летальных осложнений. (28, 263)

Таблица 42

Различия экспрессии генов в ткани опухоли в зависимости от наличия/отсутствия прогрессирования у пациентов I-III стадией опухолевого процесса

	Без прогрессирования	Прогрессирование	p	Valid N	Valid N
P16INK4A	3,76553	4,97967	0,000108	82	27
IL7	5,86061	4,49878	0,001950	82	27
IL2	5,67348	3,85549	0,003260	82	27
BAX	9,58485	7,58130	0,003707	82	27
CD56	5,89962	3,94756	0,005207	82	27
MMP11	10,08371	11,71240	0,007040	82	27
IL12a	9,54091	7,94654	0,008438	82	27
TLR4	9,05038	7,64817	0,013639	82	27
CD45	6,22462	5,19289	0,016862	82	27
GNLY	10,50682	8,22683	0,020205	82	27
LIFR	5,35720	4,28313	0,024027	82	27
IL15	6,59432	5,64675	0,029480	82	27
MMP2	9,35947	8,05447	0,035223	82	27
IL2Ra	11,26402	9,28618	0,036475	82	27
CD69	5,35644	4,49228	0,046768	82	27
VEGFA121	2,33788	2,73699	0,052692	82	27

При использовании эволюционного подхода с рассмотрением мутагенеза как естественного и обязательного свойства живых систем, опухолевый процесс возможно рассматривать как безуспешную попытку адаптации к прессу неблагоприятных факторов внешней среды с изменением генотипа уже в данном поколении. Судя по всему, имеющихся миллионов вариаций, «запасов прочности» биохимических процессов, обеспечивающих пластичность функциональных систем организма, при стечении обстоятельств

становится недостаточным, а изменчивость, достигаемая в ряду поколений по скорости «не успевает» за количеством и силой воздействия факторов риска. Косвенным подтверждением данной гипотезы является рост онкологической заболеваемости в странах с «западным стилем жизни»: высоко развитой промышленностью, приводящей к загрязнению окружающей среды, проживанием населения преимущественно в крупных городах и подвергающихся хронической прооксидантной нагрузке и воздействию свинца; потреблению высоко-энергетических продуктов питания, полученных в результате промышленного земледелия (уменьшенным содержанием эссенциальных микроэлементов, витаминов на 100 ккал); повышенными психоэмоциональными нагрузками с отсутствием переключения сезонных видов деятельности, что в совокупности можно расценить как хронический *стресс*. (28, 349)

В целом, применительно к протоколам лечения больных КРР, каких-либо уникальных методов лечения больных нами не использовано. Таким образом, на современном этапе, как подходы к лечению, так и к изучению различных комбинаций комплексного и комбинированного лечения, в том числе с известной долей персонификации (единственные введенные маркеры – наличие мутации KRAS – как прогностический маркер неэффективности анти-EGFR терапии), вышли на некоторое плато.

Лавинообразное накопление данных по содержанию различных биомолекулярных маркеров в ткани опухоли в сравнении с окружающей, «фоновой» слизистой оболочкой толстой кишки, не смотря на возлагаемые надежды, не позволяют достоверно прогнозировать течение колоректального рака и лишь приблизительно проливают свет на особенности его патогенеза в данный конкретный промежуток времени. Необычайное множество и взаимосвязь сигнальных путей в процессе опухолевой прогрессии позволяет опухоли не только уклоняться от наиболее эффективного противоопухолевого воздействия – собственной системы противоопухолевого иммунитета, но и

благодаря биохимической пластичности преодолевать комбинированные варианты лечения.

В пользу необходимости дальнейшего изучения доморфологической стадии опухолевого роста свидетельствуют частота местных рецидивов (5,8 %) после радикально выполненных операций. Края резекции в наших наблюдения всегда были свободными от собственно опухолевой ткани, а местный рецидив, в таком случае, является прямым подтверждением необходимости введения в клиническое использование доморфологической стадии опухолевого роста и уже назревшую необходимость перехода от клинико-морфологического стадирования опухоли к молекулярно-морфологическому.

Важнейшим моментом понимания клинической значимости изучения экспрессии тех или иных генов, участвующих в онкогенезе, является в фундаментальном аспекте не столько формирование биохимического портрета опухоли с неизменяемыми и изменяемыми чертами оноко, сколько поиск и характеристика системных молекулярно-генетических признаков стадийности онкогенеза, т.е. *разрешающих* изменений, основных систем поддержания функционально-направленного тканевого гомеостаза: иммунной и нейроэндокринной систем.

Проведенный нами анализ значительного количества экспрессии важных генов, участвующих в онкогенезе, свидетельствует о наличии нескольких групп опухолей в зависимости от используемых основных сигнальных путей увеличения клеточности тканей и биохимических преимуществ перед функционально полноценными клетками слизистой оболочки толстой кишки. Помимо общей черты – обязательного вовлечения элементов Wnt- сигнального пути в канцерогенез колоноцитов, с участием β -катенина и его аффлекторов и эффекторов, можно четко выделить систему изменения R13-пути передачи сигнала, а также активацию сигнального пути митохондриального апоптоза с его блокировкой на конечных этапах. Однако мы обнаружили, что вне зависимости от гистологического строения,

локализации, клинико-морфологической стадии опухоли, данные составные молекулярно-генетические элементы онкогенеза в слизистой оболочке толстой кишки, а) могут появляться в той или иной комбинации в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста; б) а также в различной последовательности и комбинации на различных этапах морфологически реализованной опухоли толстой кишки. При этом стадия T4 характеризуется задействованностью всей палитры сигнальных путей.

Судьбу дальнейшего наращивания злокачественности на этой стадии, проследить крайне сложно ввиду развития основных клинических осложнений колоректального рака: перфорации, пенетрации, кишечной непроходимости, развитием вторичных ограниченных и распространенных гнойно-воспалительных заболеваний.

По-видимому, существуют внешние факторы (факторы образа жизни, состава потребляемой пищи, микрофлоры толстой кишки; характер сопутствующих заболеваний ЖКТ, эндокринных органов, нарушений углеводного, жирового обмена; особенностей эндокринного репродуктивного статуса), которые определяют последовательность использования/вовлечения тех или иных сигнальных путей канцерогенеза у конкретного больного. (71)

Проведенный нами факторный анализ, несмотря на выделение 4-х крупных групп факторов, свидетельствовал о значительном количестве молекулярных подтипов опухоли, определение которых в современных условиях рассматривается как база персонализированной терапии в онкологии (350). Однако, на наш взгляд, ожидаемые результаты такого подхода (определение молекулярного профиля собственно опухоли) весьма эфемерны, так как оставляют за кадром ключевое значение системных изменений в организме, необходимых для продвижения онкогенеза.

Возвращаясь к основной изначальной концепции исследования – поиску прогностических факторов течения опухолевого процесса в зависимости от экспрессии той или иной группы генов, мы обнаружили практически полное несовпадение предрасполагающего профиля

экспрессируемых генов в ткани опухоли и «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки больных КРР, предрасполагающего к прогрессированию.

При анализе различий в экспрессии изученной панели генов в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки у больных КРР в зависимости от наступления прогрессирования, нами получены достоверные отличия по 6 генам отраженными в таблице 43.

Таблица 43

Перечень генов с достоверными отличиями экспрессии в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки у больных КРР при I-III стадии в зависимости от наступления прогрессирования

Гены	Без прогрессирования	Прогрессирование	p	Valid N	Valid N
CTSL2	5,29677	4,54714	0,016235	79	27
CCNB1	4,55627	3,92429	0,019663	79	27
MYBL2	6,93262	6,11857	0,027485	79	27
TERT	7,36470	6,12571	0,040875	79	27
GREM1	11,53154	9,85905	0,046004	79	27
CYP19A	6,57312	4,56571	0,047913	79	27

При этом нами отмечено достоверное повышение экспрессии GREM1 в морфологически неизменной ткани кишки больного КРР при развитии в последствии местного рецидива. Кроме того, нами выделена группа из 4-х генов (CTSL2, CCNB1, MYBL2, TERT), экспрессия которых не меняется по сравнению с больными без прогрессирования, однако снижается в группе больных с развитием отдаленных метастазов. Данную, «казалось бы» парадоксальную особенность, мы трактуем следующим образом: высокая экспрессия данных генов в слизистой оболочке толстой кишки без признаков опухолевого роста у больных КРР, характеризует доморфологическую стадию онкогенеза и является условием как возникновения первичной опухоли, так и местного рецидива.

Принимая во внимание экспрессию CTSL2, CCNB1, MYBL2, TERT, GREM1, CYP19A, предполагаемую роль измененной экспрессии данных

генов в развитии местного рецидива как варианта прогрессирования, мы дополнительно провели анализ уровня экспрессии по всей панели генов у больных продемонстрировавших прогрессирование опухолевого процесса, которых разделили на 2 подгруппы: прогрессирование с развитием местного рецидива и прогрессирование без развития местного рецидива. Достоверные отличия слизистой оболочки толстой кишки без признаков опухолевого роста у больных КРР без прогрессирования от слизистой оболочки толстой кишки без признаков опухолевого роста у больных КРР с прогрессированием без местного рецидива получены по следующим генам: GREM1, TGF β , MMP11, P14, PAPPA, IL6, TLR4, LGALS1.

По многим генам в первой подгруппе от «норма-» без прогрессирования отличий не получено, однако отмечены статистически достоверные снижения экспрессии двух генов (CCNB1 и GREM1), а также тенденции к снижению экспрессии генов CTSL2 MYC, BIRC5, Ki-67, TERT, MMP11, MYBL2, P16, TGF- β , в слизистой оболочке толстой кишки без признаков опухолевого роста у больных с прогрессированием без развития местного рецидива, что является мощным аргументом в пользу существования доморфологической клинически значимой стадии опухолевого процесса, которая ранее не принималась во внимание при выборе оптимальных диагностических и лечебных мероприятий. Все выше сказанное заставляет предлагать оценку молекулярного профиля экспрессии выделенной группы генов морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки, больных КРР на дооперационном этапе, для оценки молекулярных границ опухоли с целью профилактики местного рецидива в отдаленном периоде.

Таким образом, морфологический уровень диагностики исследования края резекции на современном этапе недостаточен.

Учитывая предположенную нами неоднозначность влияния экспрессии изученных генов в ткани опухоли на риск отдаленного метастазирования, мы провели сравнение экспрессии изученной панели генов в ткани опухоли, подразделив изученные образцы на 2 подгруппы: без

прогрессирования и появление отдаленных метастазов в течении периода наблюдения без развития местных рецидивов.

Достоверно повышенными у пациентов, продемонстрировавших появление отдаленных метастазов без возникновения местного рецидива, оказалась у следующих генов: CCND1, Ki-67, P14, MMP7, MMP9, отражающих повышенную пролиферативную активность, угнетение P53-зависимого апоптоза, повышенную способность к деградации коллагена базальной мембраны и расщеплению фибронектина, а также рекрутированию эндотелиальных стволовых клеток. (295) При этом экспрессия 3-х генов: IFN γ , GATA3 и LIFR оказалась достоверно сниженной, что интегрально отражает более низкую способность к развитию иммунологической толерантности, неэффективность специфического клеточного иммунитета. (263, 303) Оценка экспрессии данных генов в ткани опухоли может быть использована для формирования группы риска по развитию отдаленных метастазов. Взаимосвязь повышенной или пониженной экспрессии ряда генов на момент хирургического удаления опухоли с развитием отдаленных метастазов в течении периода наблюдения свидетельствует в пользу диссеминации опухолевых клеток к моменту операции.

Далее, мы провели анализ экспрессии генов в ткани опухоли продемонстрировавших прогрессирование в зависимости от наличия или отсутствия местных рецидивов. Достоверные отличия получены по MMP9, GREM1, MMP8. Таким образом, GREM1 и MMP8 также целесообразно определять в ткани опухоли, а для MMP9 выделить референсные значения для каждого варианта прогрессирования.

Таким образом, на основании сопоставления профиля экспрессии изученных генов в различных группах образцов больных КРР в зависимости от клинического течения опухолевого процесса после проведенного хирургического и/или комплексного лечения мы пришли к следующему заключению:

Существует предрасполагающий к прогрессированию профиль экспрессии ряда генов (BAX, TGF- β , TLR4, P16, GNLY, GATA3, IGF1, IL-7, LIFR, CD45, HLA-G5, IL-6, LIF) собственно в первичной опухолевой ткани, который имеет преимущественное значение для развития отдаленных метастазов.

Существует профиль экспрессии ряда генов в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки у больных КРР (Ki-67, IL-6 P14, TGF- β), который отличается от профиля экспрессии генов в опухолевой ткани и ассоциирован с развитием как местного, так и отдаленного рецидивирования. Изучение экспрессии панели генов в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки больных КРР и ткани опухоли в биоптатах на дооперационном этапе может быть использовано для оптимизации и персонификации лечебно-диагностической тактики.

Заключение.

История изучения фундаментальных основ опухолевого роста: эпидемиологии и факторов риска, этиологии и патогенеза, вопросов морфологической и ультраморфологической диагностики, хирургического, лекарственного и лучевого методов лечения, разработка мер профилактики шла параллельно и вслед за историей появления новых технологических возможностей с переоценкой уже имеющихся достижений.

Несмотря на относительную ясность и доказанность основных факторов риска КРР, которые преимущественно связаны с особенностями пищевого поведения и образа жизни как такового, выявление данного заболевания у лиц без основных факторов риска/их сочетания в глубоком смысле заставляет задуматься о широчайшем спектре факторов инициации и промоции канцерогенеза в толстой кишке, а современная медицинская и смежные науки, как прикладная отрасль науки в целом, занимается изучением лишь наиболее часто реализуемых в конкретных условиях существования той или иной популяции механизмов опухолевого роста. Таким образом, мы должны отметить, что установленные нами, в том числе впервые, характеристики КРР отражают в прикладном смысле основные механизмы опухолевого роста в условиях «западного» стиля жизни применительно к российской популяции. Однако пришедшее осознание данной характеристики изучаемого явления в процессе выполнения работы заставило провести переоценку ее направленности в фундаментальную сторону.

Нарастанию количества молекулярно-генетических событий (накопление мутаций и др.) в клетках опухоли придавалось и до сих пор продолжает придаваться ведущее значение в прогрессировании злокачественного процесса, что подтверждается большим количеством публикаций в международных и отечественных периодических научных изданиях, содержащих данные о повышении/снижении тех или иных факторов роста, цитокинов и др. в ткани опухоли. Поиск сочетания постадийного

изменения того или иного маркера в первичной опухолевой ткани или сочетание нескольких маркеров как при КРР, так и при злокачественных опухолях других локализаций, а также связь этих изменений с прогрессированием является важнейшим направлением развития клинической онкологии.

Целью нашей работы явилось изучение и клиническая оценка результатов молекулярно-генетического исследования толстой кишки для обоснования оптимизации лечебно-диагностического алгоритма при КРР. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи: изучены клинические особенности больных и морфологические характеристики опухоли; проведен анализ локализации первично-множественного опухолевого поражения для оптимизации алгоритма обследования пациентов с полинеоплазиями; проанализирована экспрессия 64 генов, ответственных за пролиферацию, апоптоз, ангиогенез, адгезию, ремоделирование межклеточного матрикса, регуляцию врожденного и приобретенного иммунитета в четырех группах образцов: образцах ткани опухоли, метастаза, слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных КРР и контрольных образцах; проанализирована взаимосвязь уровня экспрессии изученных генов с клиническими характеристиками пациентов и морфологическими параметрами опухоли; проведен сравнительный анализ пролиферативной активности на основании оценки экспрессии гена Ki-67 в изучаемых группах образцов; проанализированы особенности регуляции пролиферации в ткани первичной опухоли, ткани метастаза и ткани слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев на основании выявленных отличий в уровне экспрессии изученных генов; исследован молекулярно-генетический профиль слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста больных КРР на ранних стадиях заболевания; проведен сравнительный анализ молекулярно-генетического профиля ткани метастаза КРР и ткани первичной опухоли; определено наличие и характер связи между

уровнем экспрессии изучаемых генов в ткани слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных КРР и ткани первичной опухоли в зависимости от глубины инвазии первичной опухоли, наличием регионарных и отдаленных метастазов, прогрессированием заболевания; обоснована клиническая целесообразность проведения молекулярно-генетического исследования слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста при КРР.

Анализ публикаций последних 10-15 лет выявил важнейшую особенность дизайна исследований наших предшественников. Мы не обнаружили ни одной публикации, посвященной изучению молекулярных особенностей КРР, в которой в качестве контрольных образцов использовалась слизистая оболочка толстой кишки здорового человека, что заставило нас прибегнуть к разработке уникального дизайна исследования: сравнению первичной опухолевой ткани, ткани метастаза не только между собой и со слизистой оболочкой толстой кишки этих же больных, но и с группой контроля здоровых лиц без выявленной онкопатологии в целом и патологии органов желудочно-кишечного тракта в частности. Полученные предварительные результаты, благодаря введению группы контроля (здоровых добровольцев), полностью изменили наше представление и исследовательские стереотипы, заставив по-новому взглянуть на соотношение процессов опухоль/фоновая слизистая оболочка, пораженный орган/макроорганизм.

Необходимо отметить, что существенную помощь в критическом отношении к результатам крупных зарубежных исследований, в том числе основополагающих для коммерческих тест-систем, сыграли работы морфологов прошлого столетия, посвященных изучению ультрамикроскопического строения опухоли и «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки больных КРР, а также их биохимическим особенностям. Не обладая на тот момент технологической возможностью к изучению молекулярной генетики, но обладая дополнительными методами

микроскопической визуализации и усовершенствованными моделями электронных микроскопов, исследователи изучали ультрамикроскопическое строение различных морфологических групп КРР, а также субклеточные особенности слизистой оболочки толстой кишки больных КРР по сравнению со здоровыми. (351, 352, 353, 354) После всестороннего изучения ультрамикроскопического строения толстой кишки в условиях нормы и патологии интерес морфологов и онкологов несколько ослаб и сошел на нет ввиду безуспешности поиска связей между особенностями ультрамикроскопического строения опухоли и прогнозом для больного.

Данное явление в совокупности с набирающей силой молекулярной биологией/молекулярной генетикой опухолевого процесса отодвинуло на второй план интерес к изучению «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки, изменения которой, согласно нашим данным, присутствуют у больных КРР. По нашему мнению, морфологические, ультраморфологические и молекулярно-генетические изменения слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных КРР целесообразно рассматривать как необходимую/важную черту органности/системности опухолевого поражения.

Исследование проведено на основании клинического материала, накопленного в ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России за период с 1996 по 2015 гг., включающего 555 человек, страдающих колоректальным раком различных стадий, которые составили основную группу, и 50 человек, сопоставимых по возрасту и полу здоровых волонтеров с инструментально и морфологически верифицированным отсутствием заболевания толстой кишки, а также онкологическим процессом другой локализации, которые составили контрольную группу.

Первым этапом явилось создание базы данных пациентов, прошедших лечение в РНЦРР по поводу КРР за период с 1996 по 2011 годы (375 человек). Изучены непосредственные и отдаленные результаты лечения в зависимости от клинико-anamnestических особенностей больных КРР,

морфологических параметров опухоли (локализация и размер опухоли, глубина инвазии, гистологическое строение, степень злокачественности, наличие регионарных/отдаленных метастазов). Параллельно создана проспективная база данных больных КРР, проходивших лечение в условиях центра с 2012 по 2015 год включительно – 180 человек. У данной группы пациентов также проведен анализ клинико-anamнестических данных, морфологических параметров опухоли, изучения непосредственных и отдаленных результатов лечения произведено определение уровня экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в ткани аденокарциномы толстой кишки, ткани метастазов ККР, ткани толстой кишки больных КРР без морфологических признаков опухолевого роста. В качестве контрольной группы сравнения, мы исследовали морфологически неизмененную ткань слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев.

В группу больных КРР (всего 555 человек) вошли 274 мужчин (49,4%) и 281 женщин (50,6%) в возрасте от 22 до 88 лет. С учетом того, что ретроспективная и проспективная группы пациентов достоверно не отличались между собой ни по одному из изученных параметров. Средний возраст пациентов составил $62,9 \pm 10,4$ лет.

Безусловно, молекулярные методики опережают по своей чувствительности морфологический уровень. Мы допускаем наличие молекулярной патологии: изменение экспрессии того или иного гена, повышение/снижение концентрации того или иного белка и др. еще до того момента, как эти изменения будут доступны сначала электронной, а затем световой микроскопии. Согласно нашим данным, край резекции толстой кишки без признаков опухолевого роста характеризуется морфологическими признаками воспалительного ответа в 17,3% наблюдений, признаками очаговой реактивно-воспалительной гиперплазии слизистой оболочки в 3,4% наблюдений и достоверными отличиями экспрессии CCND1, NDRG1, CD68,

Ki-67, TERT, CCNB1, P16, GREM1, MMP8, IL-6, TNF- α , HLA-G1 от слизистой оболочки толстой кишки здорового человека в 100% образцов.

Выявленные нами молекулярные особенности «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки при КРР не позволяют рассматривать ее как «здоровую» в функциональном отношении ткань и являются признаками молекулярной патологии органа. Не исключено, что ряд молекулярных событий в «фоновой» слизистой оболочке возникают первично, синхронно с теми же событиями в клетках опухоли, под действием того или иного фактора риска.

Выявленные особенности экспрессии биомолекулярных маркеров, наличие устойчивых корреляционных связей между определёнными маркерами с формированием факторов, не встречается в публикациях отечественных и зарубежных авторов и описаны нами впервые. Также впервые мы выявили неравноценность участия каждого фактора (группы генов) в функционировании клеток первичной опухоли, метастаза и «фоновой» слизистой оболочки.

В зависимости от вклада каждого фактора в поддержание жизнедеятельности исследуемого образца (исчисляемого в условных единицах/балах) нами произведена группировка образцов по кластерам. Данное выделение групп сравнения образцов ключевым образом повлияло на анализ полученных данных и их трактовку. Основной идеей, которая возникла на основании кластерного анализа образцов явилось понимание возможности участия каждой группы генов (1-4 фактора) на каждом этапе опухолевого роста, стадии процесса, морфологического варианта КРР, локализации метастаза, пола и антропометрических особенностей больного. Кроме того, кластерный анализ позволил нам впервые выявить группу образцов первичной опухолевой ткани составившую 9% от всех образцов первичного КРР, чей факториальный профиль совпадал с профилем образцов здорового человека, что свидетельствует о наличии неустановленного нами дополнительного фактора (группы генов) участвующих в онкогенезе. Обращало на себя

внимание «попадание» контрольных образцов здоровых добровольцев только в один (второй) кластер, основные характеристики которого отражены в главе 3.3. Постадийный анализ участия третьего фактора показал его обязательное участие на поздних стадиях КРР, а кластерный анализ выявил возможность его вовлечения как в слизистую оболочку толстой кишки у больных КРР, так и частое участие в первичной опухолевой ткани и ткани метастаза. Сходную картину мы наблюдали по первому второму и четвертому фактору. Наибольшее количество образцов первичной опухоли и ткани метастаза попали в 3-й кластер в совокупности составив в нем 93,6%. Остальные 6,4% составили образцы фоновой кишки. Таким образом, факторный профиль, характерный для 3-го кластера образцов является наиболее типичным профилем (молекулярным портретом) аденокарцином толстой кишки, что совершенно не исключает существование других профилей, в том числе в 9,0% похожих на ткань толстой кишки здорового человека.

Постадийный анализ задействованности 4-х групп генов (факторов) показал их одновременное участие на поздних стадиях опухолевого роста. Начальные стадии характеризовались доминирование вклада того или иного фактора в различном процентном отношении, что позволило нам выделить важную характеристику опухолевого роста: пластичность и вариабельность спектра сигнальных путей наращивания количества клеток. Данная особенность, принимая во внимание возможность дублирования и взаимного переключения сигнала между четырьмя группами выделенных генов (факторами), становится объяснением практического временного лимита использования различных схем химиолучевого лечения, что роднит разработку новых таргетных препаратов с созданием новых антибиотиков, основной проблемой разработки которых служит опережение скорости адаптивных мутаций бактерий над скоростью разработки и внедрения новых препаратов.

Согласно нашему исследованию, в котором в качестве контроля использована слизистая оболочка толстой кишки здоровых добровольцев, а не

«фоновая» кишка или культура клеток, нет оснований говорить о повышенной пролиферативной активности клеток опухоли по сравнению с нормой.

Выявленная особенность дает основание рассматривать молекулярно-генетические события в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки как молекулярную основу функциональной атрофии и трактовать данный процесс как результат системного ответа организма на опухоль, к которому клетки с меньшими отличиями от нормы более чувствительны.

Заслуживает внимания достижение опухолью нормального уровня пролиферации на фоне сниженной экспрессии генов апоптоза в условиях молекулярно-генетических признаков распознавания неоплазии иммунной системой (активация экспрессии генов цитокинов), что является косвенным отражением наличия механизмов ускользания от цитолитических иммунных реакций, несмотря на полученные нами достоверные признаки активации генов неспецифического (врожденного) иммунитета, генов гуморального иммунитета и молекулярно-генетических признаков подавления функции Т-эффекторов и NK-клеток. Не исключено, что отдельные элементы иммунного ответа, в частности, хроническая персистирующая иммунная реакция с развитием десмолитической реакции в тканях, может способствовать инвазии и метастазированию. Кроме того, активация генов HLA-G-1 и 5 способствует развитию иммунологической толерантности. В связи с этим мы считаем, что специфическая активация гуморального иммунитета с подавлением цитотоксических эффектов иммунных клеток является важным элементом/условием опухолевого роста и прогрессирования и может служить важной мишенью для разработки средств лекарственного воздействия на опухолевый процесс. Более того, патогенез КРР связан не только с первичными молекулярно-генетическими событиями собственно в клетках опухоли, но и в окружающей опухоль слизистой оболочке толстой кишки на фоне реагирования системы врожденного и приобретенного иммунного надзора.

В пользу системности опухолевого процесса любой локализации свидетельствует и установленная нами особенность первично-множественного поражения различных органов при КРР. Нами установлено, что наиболее частые син/метахронные локализации опухолевого процесса являются молочные железы у женщин 38,2%, предстательная железа 28,9%, другой отдел ободочной и прямой кишки 19,5%, эндометрий 18,2%, яичники 12,3%, почки 8,5% и желудок 6,8%. При анализе клинических особенностей больных с первично-множественным поражением злокачественными поражениями различных органов, нами выявлено умеренная положительная корреляция с увеличением ИМТ ($r=0,31$, $p<0,05$), что согласуется с рассмотрением ожирения и метаболического синдрома как фактора риска злокачественного роста в целом. Повышенная частота первично-множественного поражения различных органов при КРР в случае фонового ожирения, позволяет рассматривать данный фактор риска в качестве системного, а дальнейшее уточнение общих молекулярно-генетических и/или эпигенетических событий в органах в случае злокачественного поражения, позволит точнее установить цепочку молекулярных событий потенцирования. Структура первично множественного опухолевого поражения при КРР заставила нас рекомендовать включить пациентов с КРР с повышенным ИМТ в группу риска по развитию полинеоплазии с поражением органов репродукции, желудочно-кишечного тракта и мочевыделительной системы.

Согласно используемым в РФ протоколам обследования больных КРР обследование молочных желез у женщин и предстательной железы не входит в стандарт обследования, что, принимая во внимание полученные нами данные, целесообразно изменить. Здесь необходимо отметить, что в современных условиях массовое использование уже имеющихся протоколов обследования не достигается.

Крайне низкий охват населения программой скрининга КРР (анализ кала на скрытую кровь с проведением колоноскопии при положительном результате теста или проведение колоноскопии у пациентов высокого риска)

приводит к низкой ранней диагностике КРР и отсутствию реализации вторичной профилактики, что подтверждается поздним выявлением заболевания - в 43,9% наблюдений опухоль диагностирована на III-IV стадии процесса, по нашим данным, и в 52%, по данным литературы (3).

Помимо собственно ожирения, нами на значительном количестве больных доказано преобладание пациентов с абдоминальным типом отложения жировой ткани в структуре больных и ИМТ более 25 кг/м². Нами установлено, что ИМТ и возраст пациента достоверно влияют на степень дифференцировки опухоли вне зависимости от ее локализации: так, с возрастом нарастает доля низкодифференцированных аденокарцином толстой кишки, достигая 13 % у больных старше 80 лет.

Принимая во внимание установленную нами частоту син/метахронного злокачественного поражения органов при КРР, особое звучание приобретает отягощенный наследственный анамнез обследованных больных по злокачественному эпителиальному поражению органов пищеварения (желудок, толстая кишка), репродукции (молочные железы, яичники, матка) и мочевыделительной системы (почки, мочевого пузыря, предстательная железа) которые выявлены у 47,0% больных. Выявленная нами особенность заставляет подозревать наличие предрасполагающего к онкологическому заболеванию полиморфизма генов, который будет реализовываться фенотипически под действием определенных экзогенных факторов риска (стиль жизни). Изложенное выше подтверждается клиническими особенностями больных КРР которые напрямую ассоциированы с «западным» стилем жизни. Нами выявлена высокая частота заболеваний органов пищеварения (хронический гастрит, хронический панкреатит, дискинезия желчевыводящих путей, хронический холецистит); сердечно-сосудистой системы (артериальная гипертензия, атеросклероз), эндокринно-обменных нарушений (ожирение, нарушение толерантности к глюкозе/сахарный диабет II типа, субклинический гипотиреоз).

Клинико-морфологические параллели, отражающие связь особенностей жалоб, анамнеза, структуры сопутствующих заболеваний, первичной множественности неоплазии и морфологической структуры КРР, нами не выявлены. Также, нами не выявлены специфические особенности экспрессии той или иной группы генов (факторов) для право/левосторонней локализации опухоли. По-видимому, функциональное доминирование того или иного сигнального пути на разных стадиях опухолевого роста, при различных гистологических вариантах у пациентов не сопоставимых по возрасту, полу и др. осуществляется за счет различных молекулярно-генетических механизмов: собственно мутаций, эпимутаций, посттрансляционных модификаций, протеомных изменений. Обобщая вышеизложенное выделенные нами 4 фактора (группы генов) отражают в баллах участие патогенетических механизмов, на прямую ассоциированных с факторами риска. Точный спектр молекулярно-генетических событий, принимающих участие в онкогенезе у конкретного больного очевидно несут уникальный характер и еще неопределенно долгое время будет «позволять» опухоли уклоняться от индивидуально-подобранной противоопухолевой терапии. Таким образом, основными прикладными направлениями дальнейших исследований, мы обоснованно считаем 1. Детальное изучение противоопухолевого иммунитета с молекулярно-генетических позиций, 2. Усовершенствование комплексного лечения, направленного на продление жизни больного, на основе анализа спектра экспрессии генов как в ткани опухоли, так и слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста.

Между тем, определённый уровень экспрессии выделенной нами группы генов первичной опухоли, (P16INK4A, IL7, IL2, BAX, CD56, MMP11, IL12a, TLR4, CD45, GNLY, LIFR, IL15, MMP2, IL2Ra, CD69, VEGFA121) и в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки (CTSL2, CCNB1, MYBL2, TERT, GREM1, CYP19A) предрасполагает развитию отдаленных метастазов, что имеет важное практическое значение. Необходимо подчеркнуть, что

развитие отдаленных метастазов связано с изменением уровня экспрессии различных генов, как в ткани опухоли, так и «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки. Установленная нами ассоциированность профиля экспрессии CTSL2, CCNB1, MYBL2, TERT, GREM1, CYP19A в «фоновой» слизистой оболочке больных КРР в развитии отдаленных метастазов говорит в пользу активной роли окружающих опухоль тканей в прогрессировании опухолевого процесса. Данная группа 6-ти генов состоящая из гена катепсина, гена β -катенина, маркера второй группы стволовых клеток кишечной крипты, активатора экспрессии циклин-D1, и активатора TGF- β сигнального пути и ароматазы характеризуется уменьшением интенсивности экспрессии в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки у больных продемонстрировавших развитие отдаленных метастазов КРР, что свидетельствует в пользу роли функциональной атрофии в прилегающих к краю резекции толстой кишки в способствовании развитию отдаленного метастазирования. В сравнении с предрасполагающим уровнем экспрессии ряда генов, как в первичной опухоли, так и в «фоновой» кишке, для отдаленного метастазирования, развитию местного рецидива, мы не обнаружили предрасполагающего профиля экспрессии тех или иных генов ни в ткани опухоли, ни в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки, что совпадает с мнением большинства клиницистов исследователей, рассматривающих нерадикальность выполненной операции, как основную причину местного рецидива. В связи с изложенным выше, выделенная нами панель генов впервые предложена для персонификации лечебно-диагностической тактики в сторону повышения ее агрессивности. Принимая во внимание относительно малые средние сроки наблюдения проспективной группы обследованных больных, практическое использование данной модели затруднено и может быть рекомендовано только после клинической апробации.

Таким образом, нами впервые обнаружена ассоциированность клинических параметров колоректальной аденокарциномы с молекулярно-

генетическим профилем слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков злокачественности, что ключевым образом меняет исследовательские стереотипы и служит фундаментом для разработки алгоритма персонифицированной лечебно-диагностической тактики при раке толстой кишки.

Выводы:

1. Для больных колоректальным раком характерно: нарастание частоты опухолевого поражения правых отделов толстой кишки от 8,3% у лиц младше 40 лет до 36,7% у пациентов старше 70 лет; корреляция ($r=0,21$, $p<0,05$) дифференцировки опухоли с возрастом пациента - увеличение доли низкодифференцированных аденокарцином толстой кишки у пожилых пациентов вне зависимости от локализации; высокая частота первично-множественного злокачественного поражения различных органов – 19,3%, которая коррелирует с повышением индекса массы тела ($r=0,31$, $p<0,05$).

2. При колоректальном раке наиболее частой второй локализацией опухолевого поражения являются молочные железы у женщин (38,2%), предстательная железа (28,9%), другой отдел ободочной и прямой кишки (19,5%), эндометрий (18,2%), яичники (12,3%), почки (8,5%) и желудок (6,8%), что требует включения дополнительных методов исследования этих органов на этапе первичной диагностики.

3. Анализ экспрессии 64 генов (MGB1, CTSL2, BCL2, MYC, BIRC5, CCND1, NDRG1, CD68, Ki-67, TERT, HER2, PTEN, BAG1, PGR, CCNB1, ESR1, GRB7, MMP11, STK15, MYBL2, P16, SCUBE2, MMP9, GSTM1, GNLY, P14, IGF1, COX-2, IGF2, CYP19A, GREM1, MMP2, PAPP, MMP7, IL-2, MMP8, IL-2Ra, IL-6, IL-12a, IL-7, IL-15, IL-8, IL-1 β , IL-10, TPA, IFN- γ , CD45, TNF- α , CD56, TGF- β , CD69, VEGFA121, BAX, VEGFA165, TLR2, VEGFA189, TLR4, HLA-G1, TLR7, HLA-G5, GATA3, LGALS1, LIF, LIFR) в 132 образцах ткани первичной опухоли; 31 образце ткани метастаза КРР в печень, 129 образцов ткани толстой кишки без признаков опухолевого роста и 50 образцах морфологически неизменной ткани толстой кишки здоровых добровольцев показал достоверные отличия ($p<0,05$) по определенным генам между указанными образцами.

4. Взаимосвязь между уровнем экспрессии изученных генов в исследованных группах образцов тканей больных колоректальным раком и клиническими параметрами пациентов: возрастом, полом, антропометрическими характеристиками, первичной множественностью и мультицентричностью опухолевого роста, а также гистологическим строением и локализацией опухоли, не выявлена.

5. Пролиферативная активность в опухоли, метастазе колоректального рака в печень и образцах группы контроля, оцениваемая по содержанию мРНК гена Ki-67, достоверно не отличается: $8,05 \pm 0,17$; $7,79 \pm 0,38$ и $7,74 \pm 0,11$ соответственно ($p > 0,05$). При этом слизистая оболочка толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста характеризуется более низкой пролиферативной активностью ($6,81 \pm 0,18$; $p = 0,00001$) по сравнению с другими группами образцов.

6. Первичная и метастатическая опухоль отличаются от контрольных образцов механизмами регуляции пролиферации, что подтверждается различиями в уровнях экспрессии генов, ответственных за поддержание клеточности тканей: NDRG1, CCND1, PTEN, MYBL2, BCL2, TGF- β , MYC, P16, HER2 и TERT ($p < 0,01$).

7. Слизистая оболочка толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком достоверно отличается от слизистой оболочки группы контроля по уровню экспрессии мРНК 59 из 64 изученных генов. Анализ экспрессии генов IFN- γ , IL-8, IL-15, NDRG1, CD68, BAG1, TNF- α , STK15, Ki-67, CCNB1, IL-6, TERT, CCND1, GRB7, P16, MYBL2, BIRC5, PTEN, SCUBE2, IL-10 в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком на ранних стадиях заболевания в 99,1% позволяет отличить ее от контрольных образцов.

8. Уровень экспрессии 19 из 64 генов (CCND1, NDRG1, CD68, HER2, ESR1, SCUBE2, GREM1, MMP7, IL-2, MMP8, IL-2R, IL-1 β , VEGFA121,

VEGFA165, VEGFA189, TLR2, TGF- β , TLR7, HLA-G5) в ткани метастаза достоверно отличается ($p < 0,05$) от уровня экспрессии в ткани первичной опухоли, что свидетельствует об отличиях в механизмах регуляции роста (пролиферации, ремоделирование межклеточного матрикса, ангиогенеза) в первичном и метастатическом опухолевом узле.

9. Глубина инвазии опухоли T4 характеризуется достоверным изменением молекулярно-генетической картины первичной опухоли и слизистой оболочки толстой кишки без признаков опухолевого роста: у больных колоректальным раком выявлено снижение экспрессии генов ответственных преимущественно за иммунный ответ CD56, MMP2, GNLY, IL-2, BAX, LIF, IL-7, CD45, TLR4, SCUBE2, IL-2Ra, IL-15, CD68, VEGFA165, IL-12a, LGALS1, IL-6, PAPP, LIFR, CD69, COX-2 ($p < 0,05$) в 40 образцах первичной опухоли, и SCUBE2, CD56, BAX, IL-15, PTEN, GNLY, LGALS1, LIF, IL-12a, PAPP ($p < 0,05$) и в 38 образцах слизистой оболочки толстой кишки без признаков опухолевого роста. При глубине инвазии опухоли T1-T2-T3 достоверные отличия экспрессии 64 генов в образцах первичной опухоли и образцах слизистой оболочке толстой кишки без признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком не выявлены.

10. Наличие регионарных метастазов аденокарциномы толстой кишки ассоциировано ($p < 0,05$) с повышением экспрессии генов CCND1 и P16 в ткани первичной опухоли, а также повышением экспрессии гена Ki-67 и снижением IL-6 в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста. Наличие отдаленных метастазов аденокарциномы толстой кишки ассоциировано ($p < 0,05$) со снижением экспрессии генов BAX, TGF- β , TLR4, GNLY, GATA3, IGF1, IL7, LIFR, CD45, HLA-G5, IL6, LIF и повышением P16 в образцах первичной опухоли и снижением экспрессии генов P14 и TGF- β в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста, что может быть использовано для выделения группы пациентов, нуждающихся в проведении

более агрессивных схем адъювантного и/или неадъювантного химиолучевого лечения.

11. Снижение экспрессии генов IL-7, IL2, VAX, CD56, IL-12a, TLR4, CD45, GNLY, LIFR, IL-15, MMP2, IL-2Ra, CD69, и повышение экспрессии P16, MMP11, VEGFA121 в ткани первичной опухоли, а также снижение экспрессии генов CTSL2, CCNB1, MYBL2, TERT, GREM1, CYP19A в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста, ассоциировано с прогрессированием колоректального рака.

12. Проведение молекулярно-генетического исследования слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком целесообразно ввиду ассоциированности величины отличий экспрессии изученных генов в образцах ткани у больных от контрольных образцов со стадией заболевания, наличием и количеством отдаленных метастазов, прогрессированием: чем больше величина отличий молекулярно-генетического профиля, тем больше стадия ($p=0,0116$), чаще выявляются отдаленные метастазы с поражением двух и более органов ($p=0,0344$), чаще наступает прогрессирование ($p=0,00009$)

Практические рекомендации

1. Учитывая высокую частоту первично множественного злокачественного поражения различных органов, в стандарт обследования больных колоректальным раком целесообразно дополнительно включить маммографию, эхографическое исследование предстательной железы и анализ крови на PSA; план обследования пациентов с диагностированной злокачественным поражением молочных желез, предстательной железы и почек необходимо дополнить колоноскопией.

2. Принимая во внимание ожирение как фактор риска первично множественного злокачественного поражения толстой кишки, молочных желез у женщин, предстательной железы, эндометрия, яичников, почек и желудка, пациенты с ИМТ ≥ 30 кг/м² должны подвергаться прицельному комплексному обследованию с целью выявления предраковых заболеваний и ранних стадий злокачественной трансформации соответствующих локализаций.

3. Слизистую оболочку толстой кишки при КРР не рекомендуется использовать в качестве контрольных образцов при разработке референсных значений тканевых молекулярно-генетических маркеров ввиду наличия молекулярно-генетических отличий между слизистой оболочкой края резекции толстой кишки без признаков опухолевого роста больных колоректальным раком и слизистой оболочкой толстой кишки здоровых добровольцев.

4. Оценка экспрессии генов IFN- γ , IL-8, IL-15, NDRG1, CD68, BAG1, TNF- α , STK15, Ki-67, CCNB1, IL-6, TERT, CCND1, GRB7, P16, MYBL2, BIRC5, PTEN, SCUBE2, IL-10 в слизистой оболочке толстой кишки без макроскопических и морфологических признаков опухолевого роста в

группах риска по возникновению колоректального рака перспективна для разработки персонализированного лечебно-диагностического алгоритма при колоректальном раке.

5. Для оценки риска прогрессирования колоректального рака морфологическое исследование удаленных в процессе радикальной операции макропрепаратов, целесообразно дополнить молекулярно-генетическим исследованием с определением экспрессии генов: P16, IL7, IL2, BAX, CD56, MMP11, IL12a, TLR4, CD45, GNLY, LIFR, IL15, MMP2, IL2Ra, CD69, VEGFA121 в первичной опухоли и CTSL2, CCNB1, MYBL2, TERT, GREM1, CYP19A в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста при колоректальном раке.

Приложение 1. Уровень экспрессии генов о образцах изучаемых тканей.

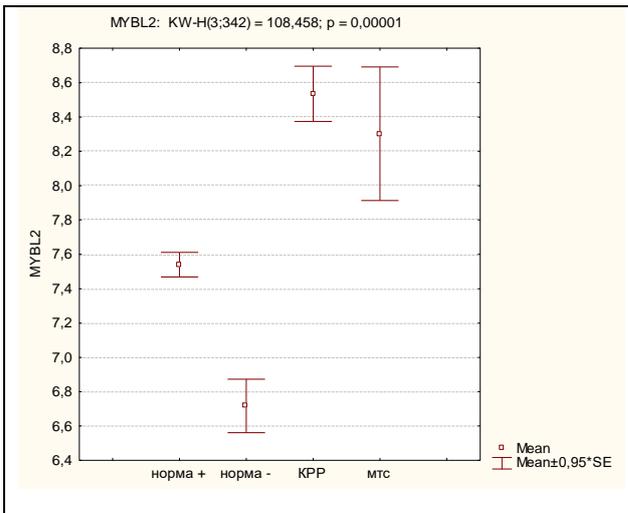


Диаграмма 1.1 Уровень экспрессии MYBL2 в зависимости от типа тканей.

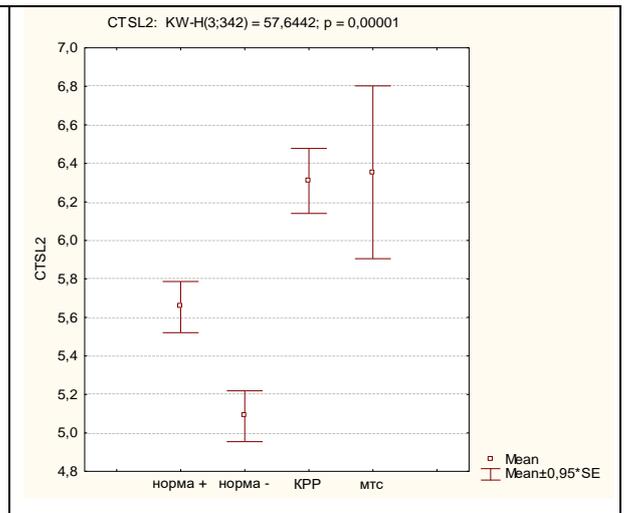


Диаграмма 1.2 Уровень экспрессии CTSL2 в зависимости от типа тканей.

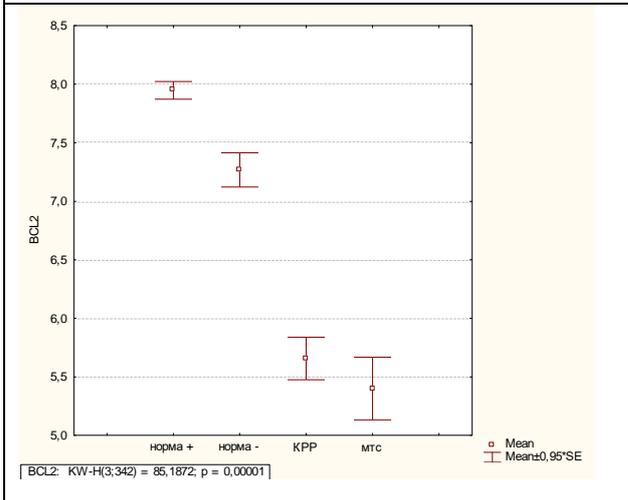


Диаграмма 1.3 Уровень экспрессии BCL2 в зависимости от типа тканей.

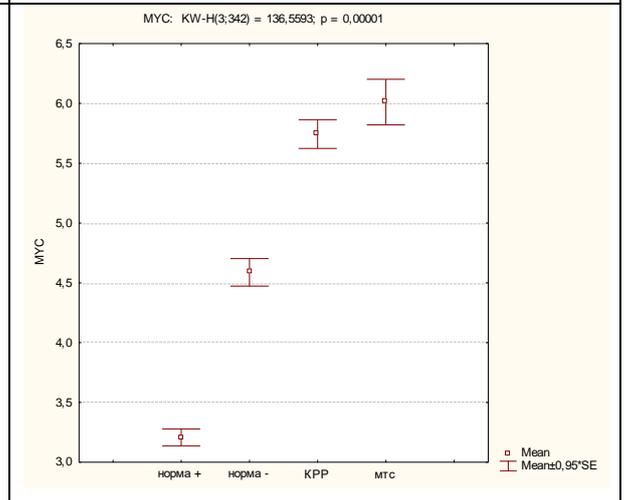


Диаграмма 1.4 Уровень экспрессии MYC в зависимости от типа тканей.

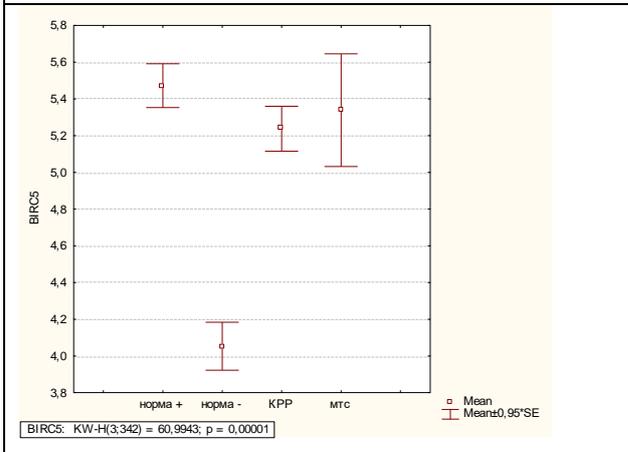


Диаграмма 1.5 Уровень экспрессии BIRC5 в зависимости от типа тканей.

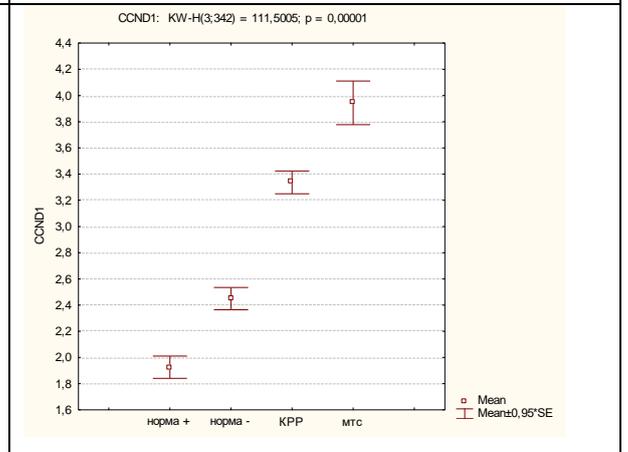


Диаграмма 1.6 Уровень экспрессии CCND1 в зависимости от типа тканей.

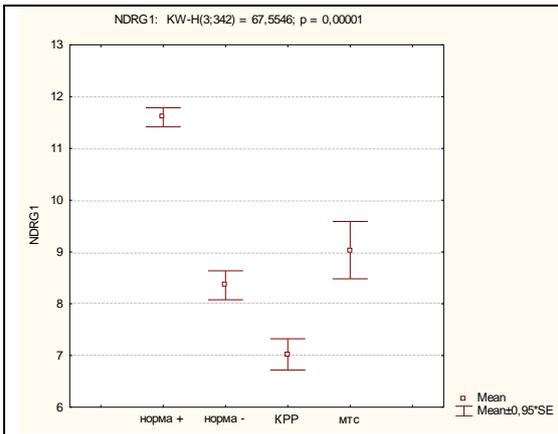


Диаграмма 1.7 Уровень экспрессии NDRG1 в зависимости от типа тканей.

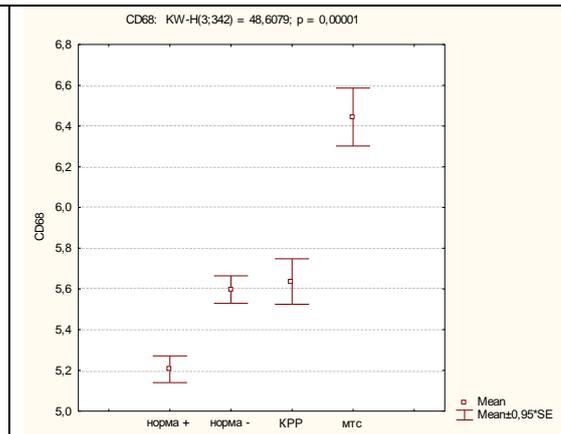


Диаграмма 1.8 Уровень экспрессии CD68 в зависимости от типа тканей.

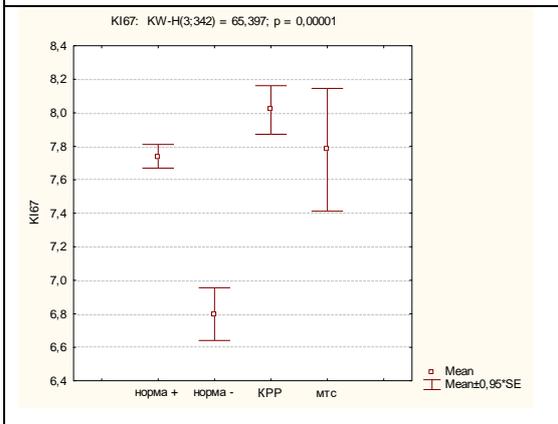


Диаграмма 1.9 Уровень экспрессии Ki-67 в зависимости от типа тканей.

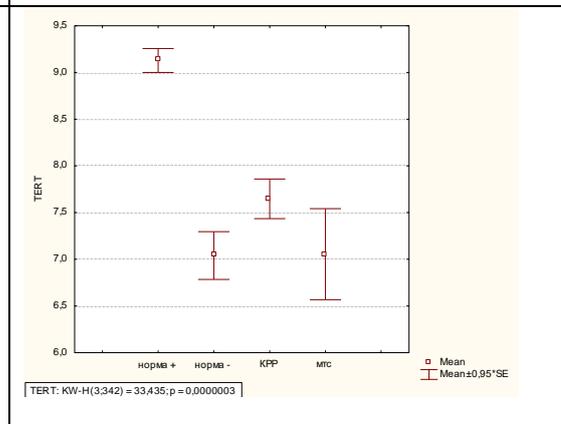


Диаграмма 1.10 Уровень экспрессии TERT в зависимости от типа тканей.

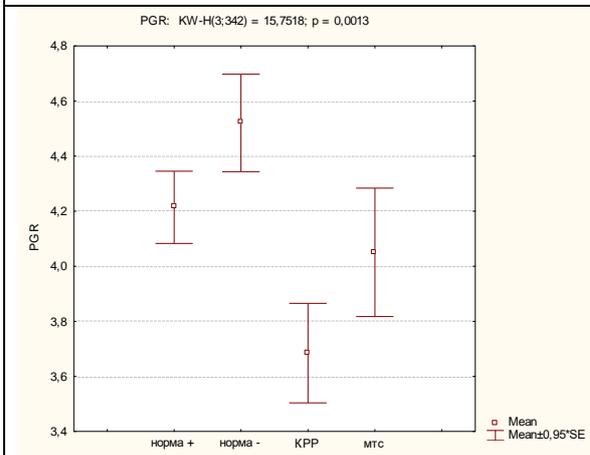


Диаграмма 1.11 Уровень экспрессии PGR в зависимости от типа тканей.

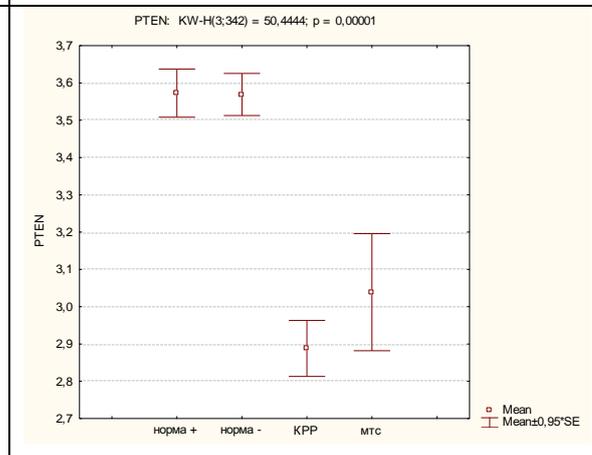


Диаграмма 1.12 Уровень экспрессии PTEN в зависимости от типа тканей.

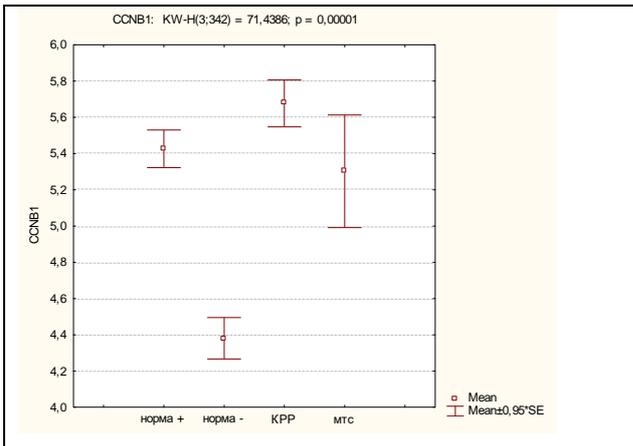


Диаграмма 1.13 Уровень экспрессии CCNB1 в зависимости от типа тканей.

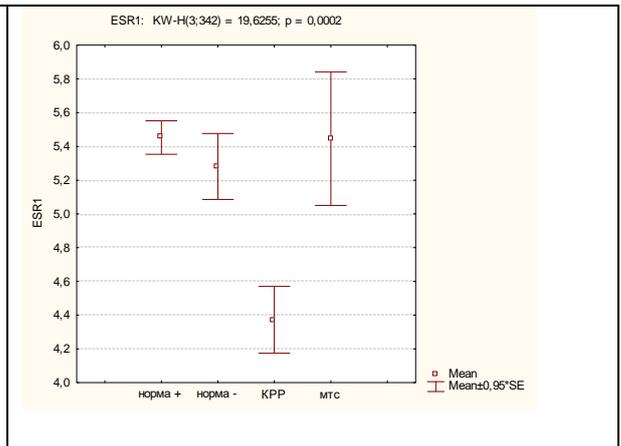


Диаграмма 1.14 Уровень экспрессии ESR1 в зависимости от типа тканей.

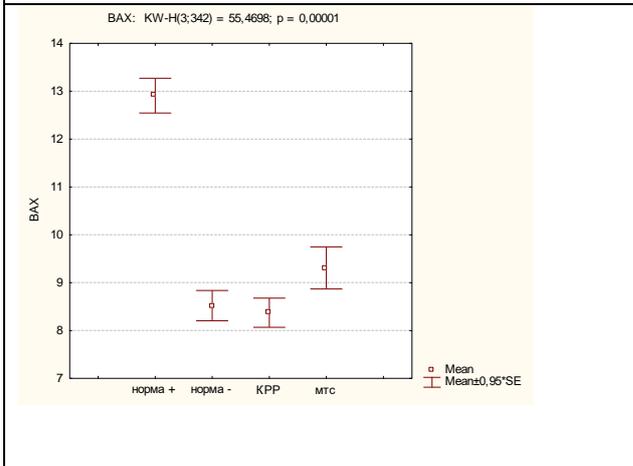


Диаграмма 1.15 Уровень экспрессии BAX в зависимости от типа тканей.

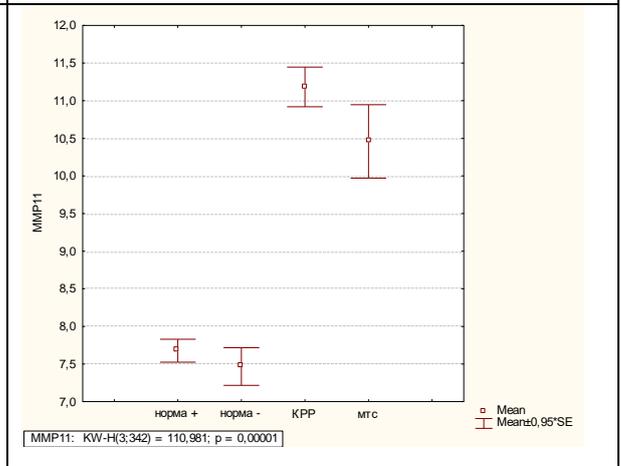


Диаграмма 1.16 Уровень экспрессии MMP11 в зависимости от типа тканей.

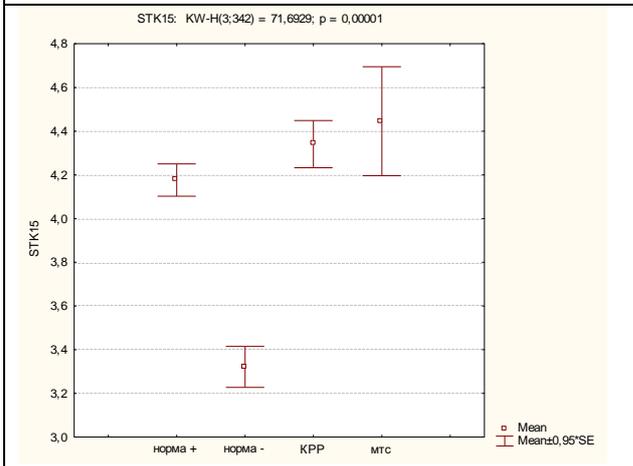


Диаграмма 1.17 Уровень экспрессии STK15 в зависимости от типа тканей.

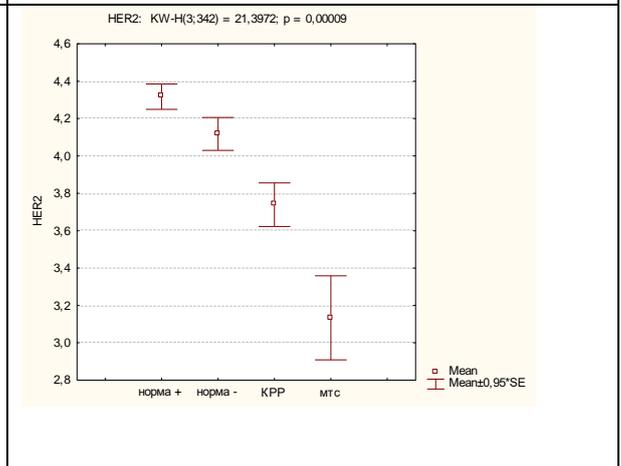


Диаграмма 1.18 Уровень экспрессии HER2 в зависимости от типа тканей.

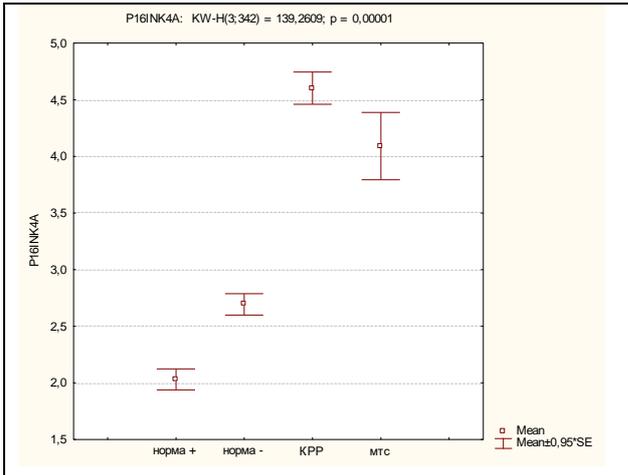


Диаграмма 1.19 Уровень экспрессии P16 в зависимости от типа тканей.

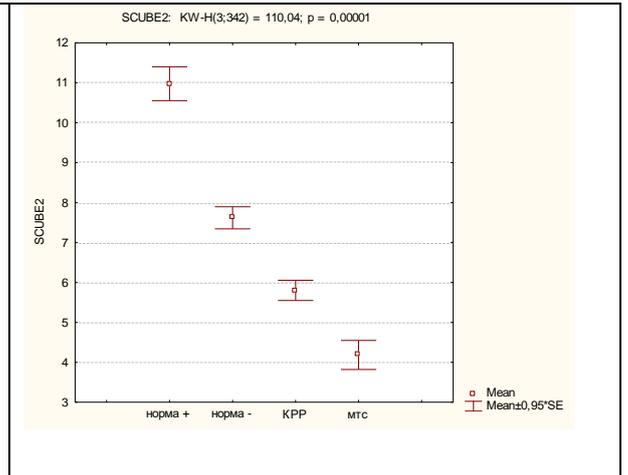


Диаграмма 1.20 Уровень экспрессии SCUBE2 в зависимости от типа тканей.

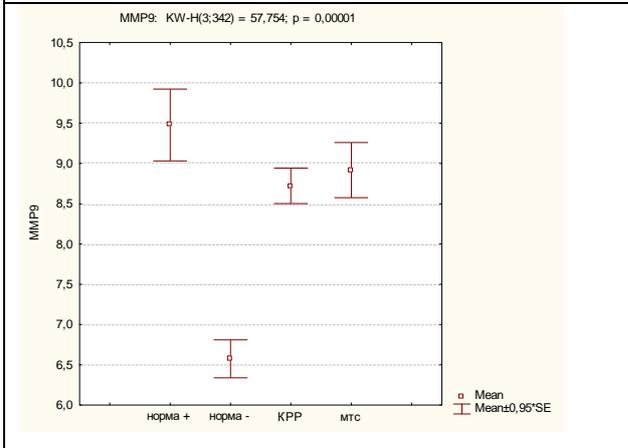


Диаграмма 1.21 Уровень экспрессии MMP9 в зависимости от типа тканей.

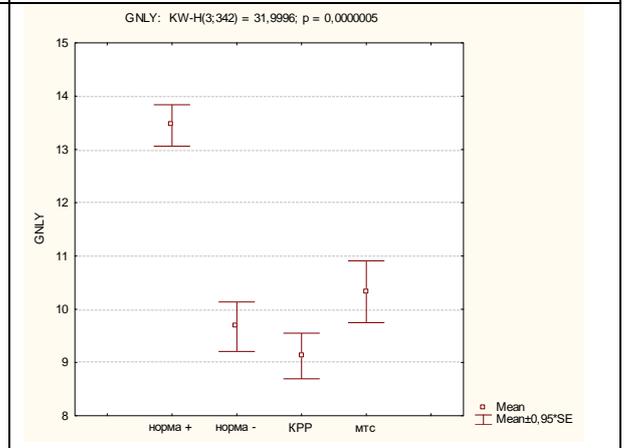


Диаграмма 2.22 Уровень экспрессии GNLY в зависимости от типа тканей.

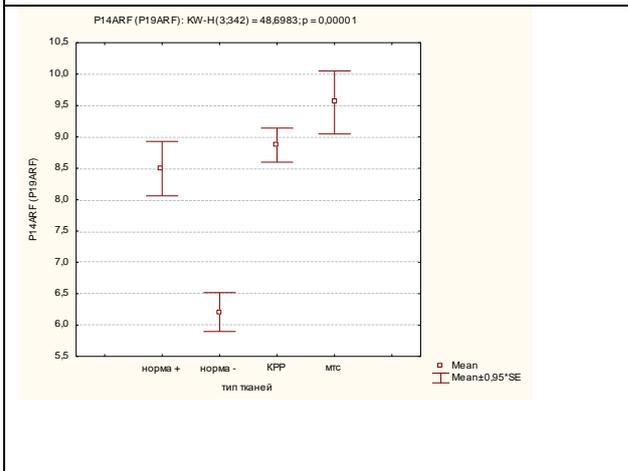


Диаграмма 1.23 Уровень экспрессии P14 в зависимости от типа тканей.

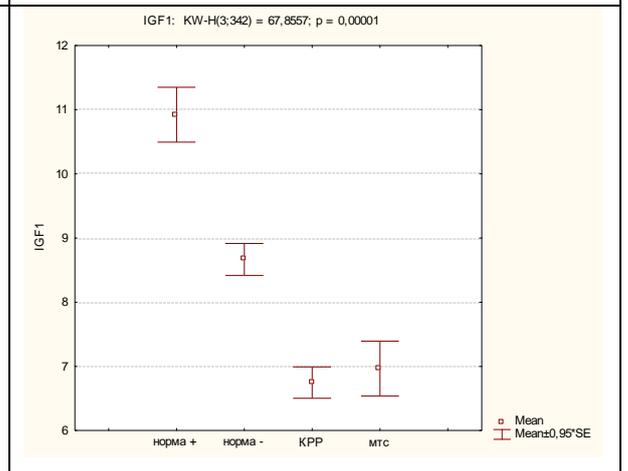


Диаграмма 1.24 Уровень экспрессии IGF1 в зависимости от типа тканей.

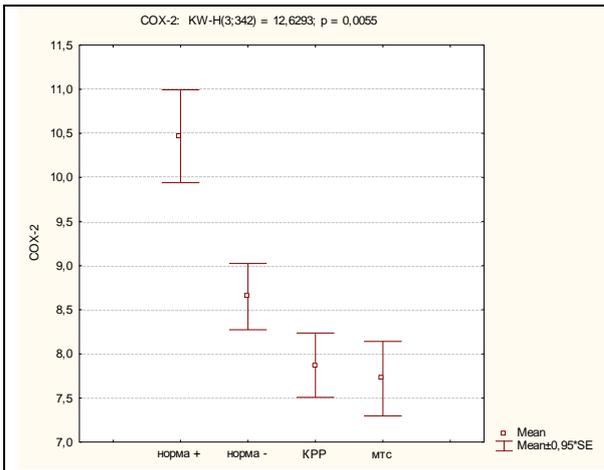


Диаграмма 1.25 Уровень экспрессии СОХ-2 в зависимости от типа тканей.

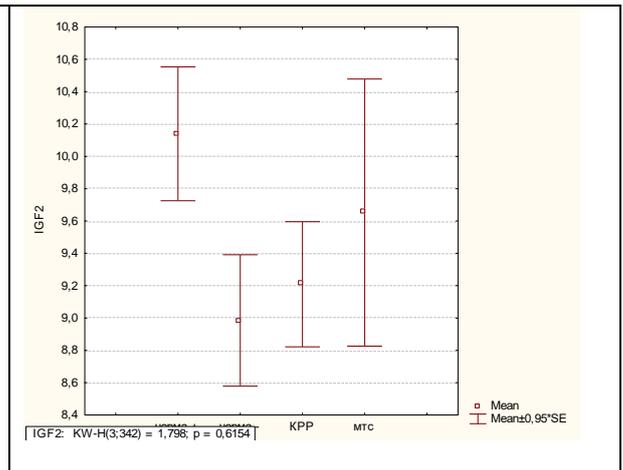


Диаграмма 1.26 Уровень экспрессии IGF2 в зависимости от типа тканей.

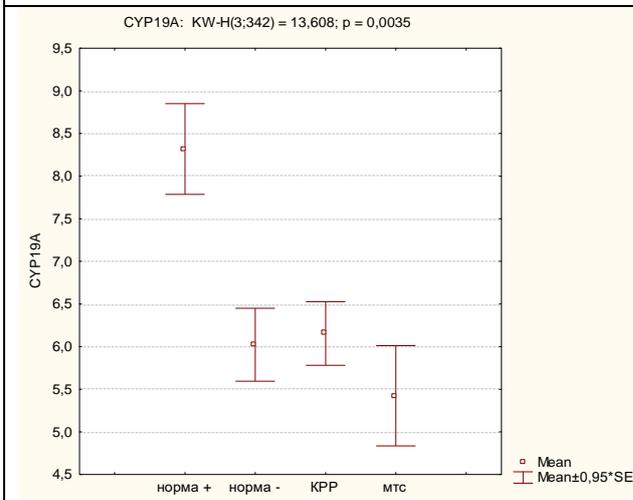


Диаграмма 1.27 Уровень экспрессии СУР19А в зависимости от типа тканей.

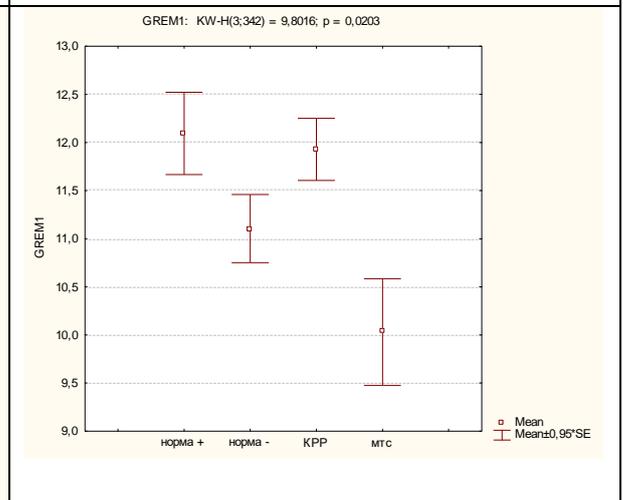


Диаграмма 1.28 Уровень экспрессии GREM1 в зависимости от типа тканей.

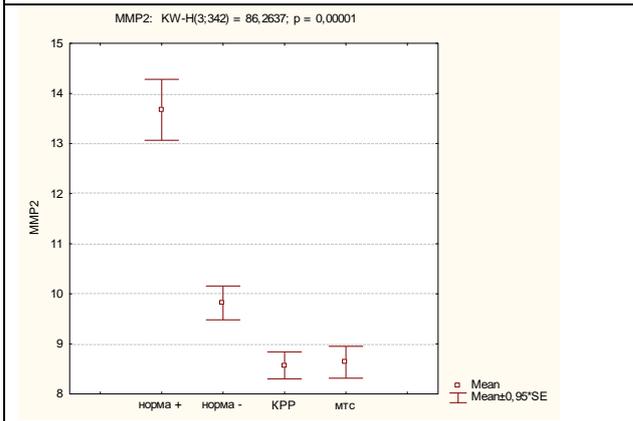


Диаграмма 1.29 Уровень экспрессии MMP2 в зависимости от типа тканей.

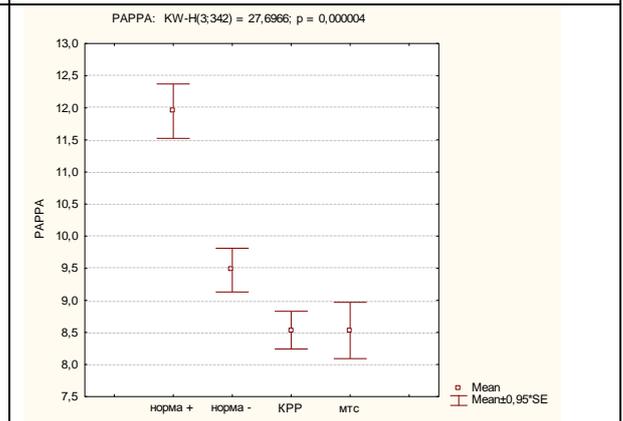


Диаграмма 1.30 Уровень экспрессии PAPPA в зависимости от типа тканей.

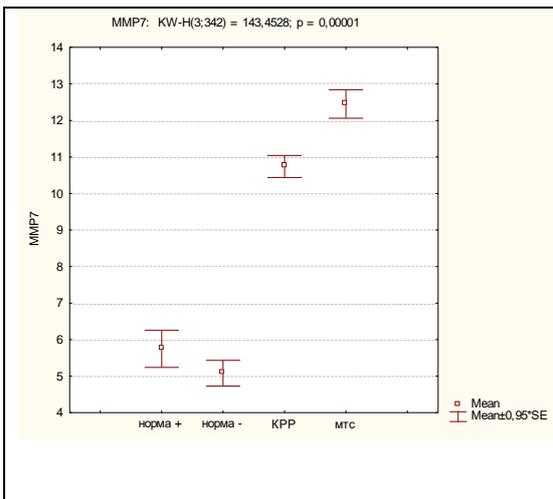


Диаграмма 1.31 Уровень экспрессии MMP7 в зависимости от типа тканей.

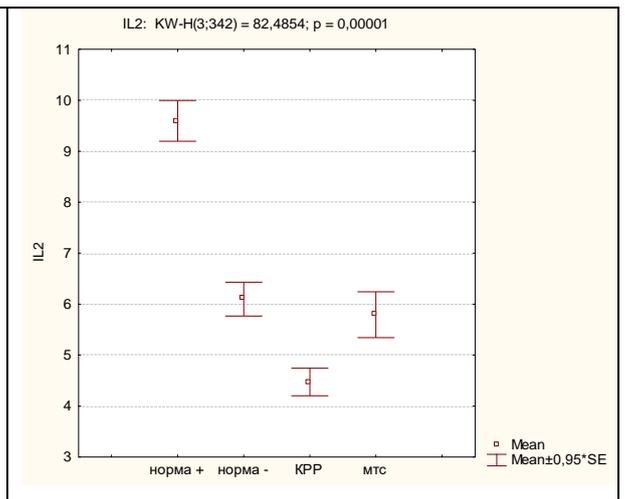


Диаграмма 1.32 Уровень экспрессии IL-2 в зависимости от типа тканей.

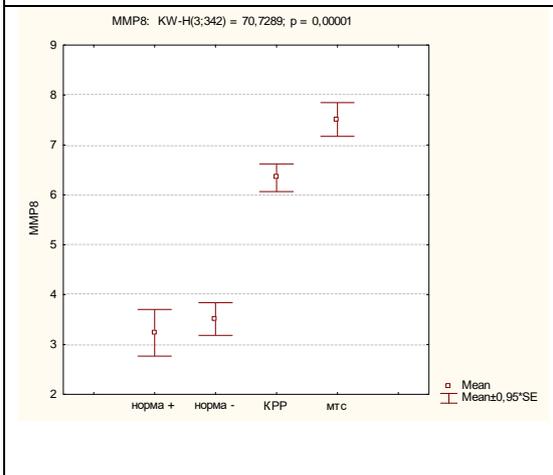


Диаграмма 1.33 Уровень экспрессии MMP8 в зависимости от типа тканей.

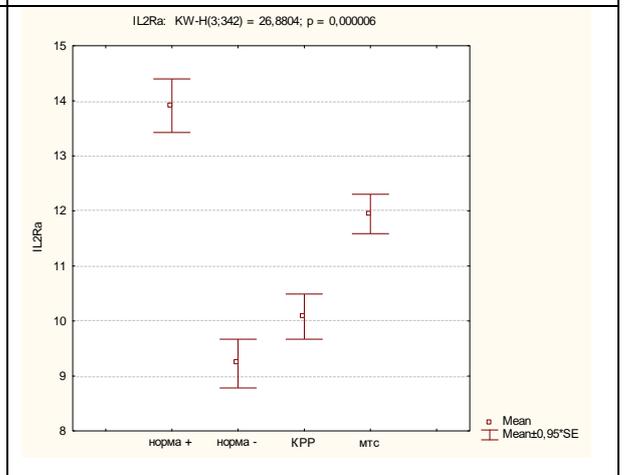


Диаграмма 1.34 Уровень экспрессии IL-2R в зависимости от типа тканей.

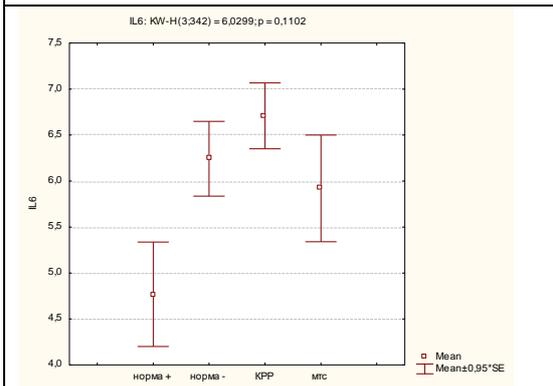


Диаграмма 1.35 Уровень экспрессии IL-6 в зависимости от типа тканей.

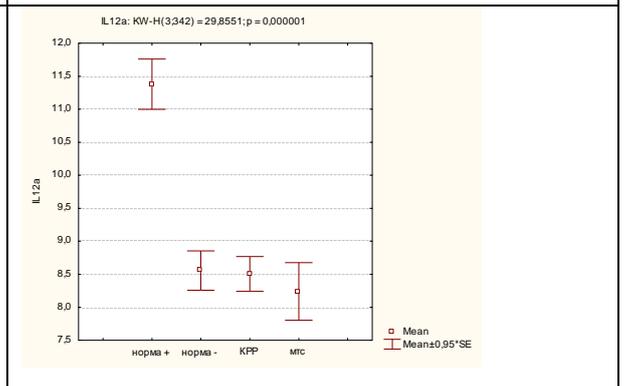


Диаграмма 1.36 Уровень экспрессии IL-12a в зависимости от типа тканей.

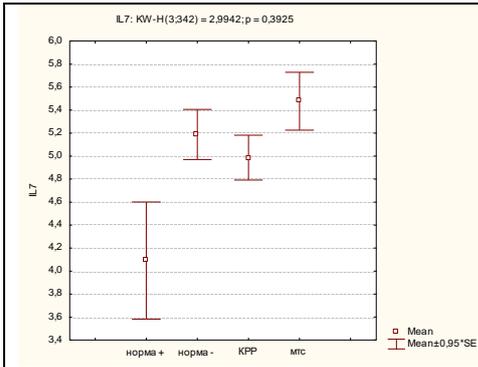


Диаграмма 1.37 Уровень экспрессии IL-7 в зависимости от типа тканей.

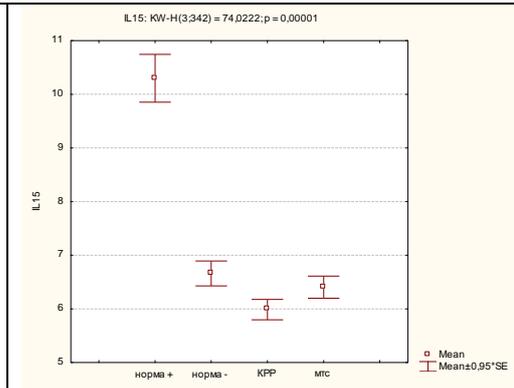


Диаграмма 1.38 Уровень экспрессии IL-15 в зависимости от типа тканей.

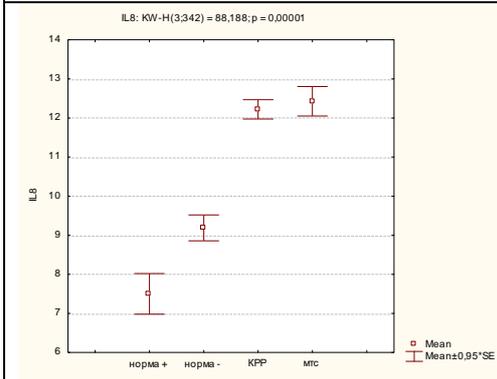


Диаграмма 1.39 Уровень экспрессии IL-8 в зависимости от типа тканей.

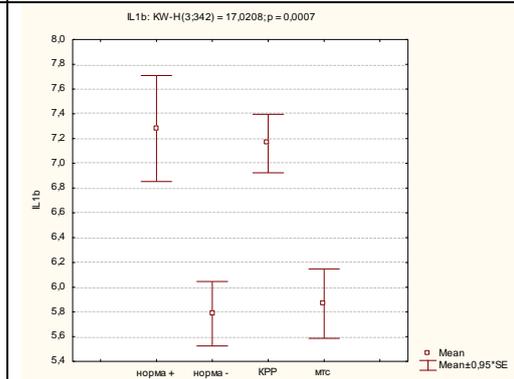


Диаграмма 1.40 Уровень экспрессии IL-1b в зависимости от типа тканей.

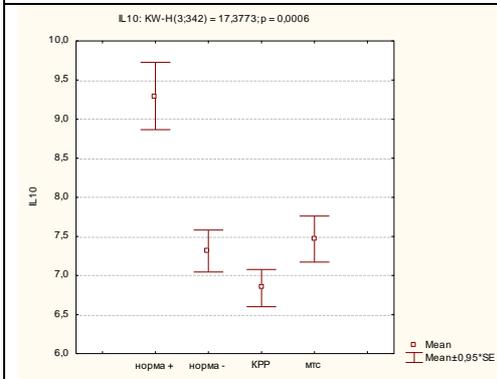


Диаграмма 1.41 Уровень экспрессии IL-10 в зависимости от типа тканей.

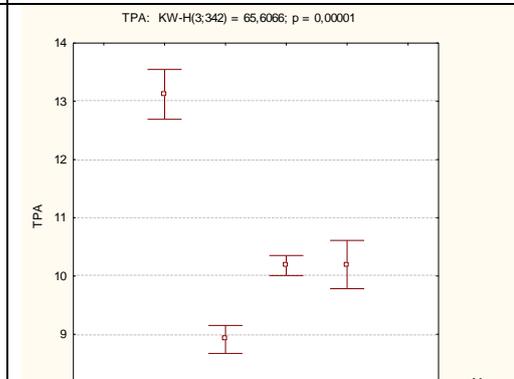


Диаграмма 1.42 Уровень экспрессии tPA в зависимости от типа тканей.

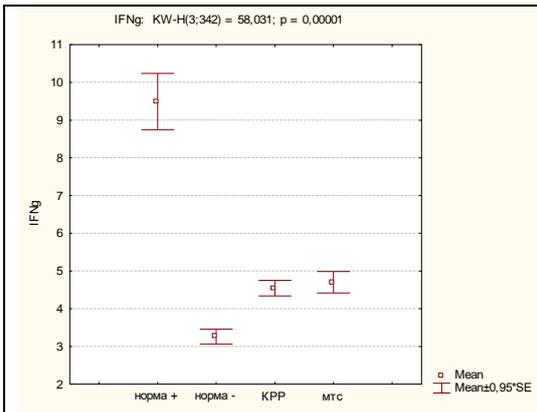


Диаграмма 1.43 Уровень экспрессии IFN γ в зависимости от типа тканей.

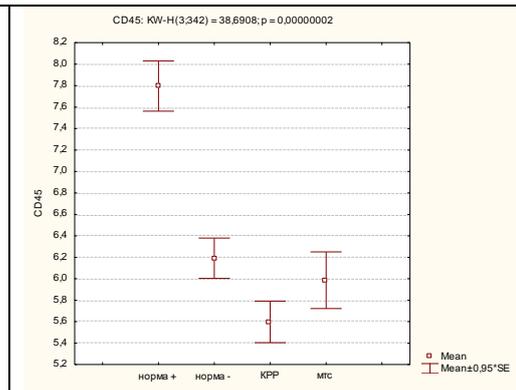


Диаграмма 1.44 Уровень экспрессии CD45 в зависимости от типа тканей.

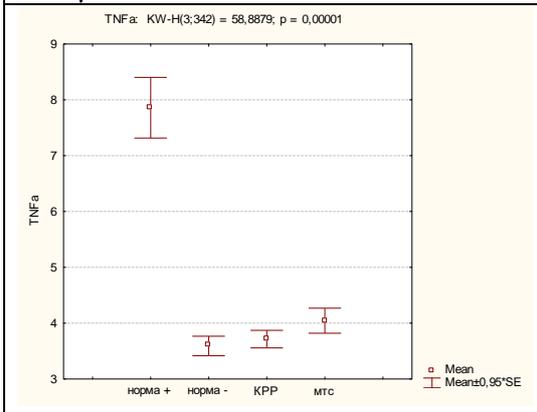


Диаграмма 1.45 Уровень экспрессии TNF α в зависимости от типа тканей.

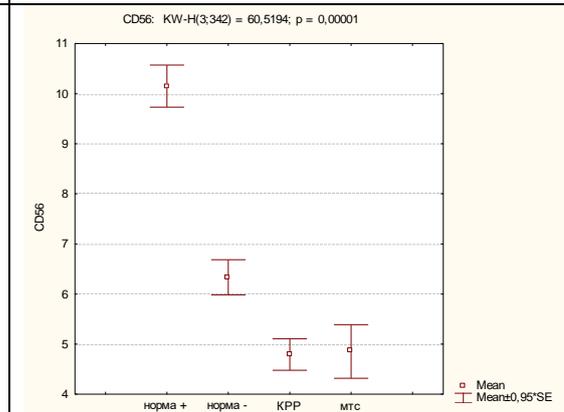


Диаграмма 1.46 Уровень экспрессии CD56 в зависимости от типа тканей.

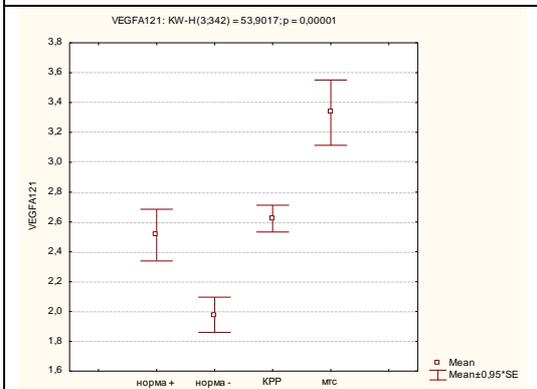


Диаграмма 1.47 Уровень экспрессии VEGFA121 в зависимости от типа тканей.

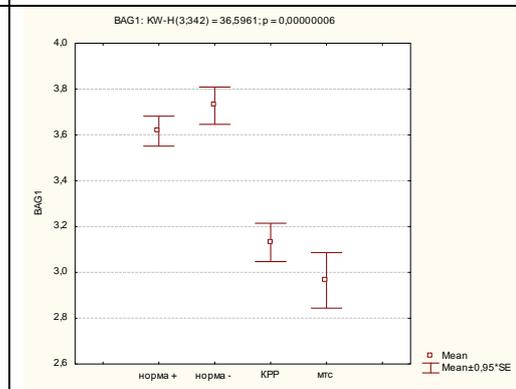


Диаграмма 1.48 Уровень экспрессии BAG1 в зависимости от типа тканей.

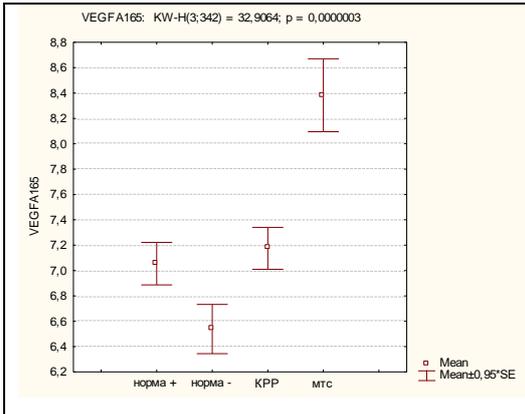


Диаграмма 1.49 Уровень экспрессии VEGFA165 в зависимости от типа тканей.

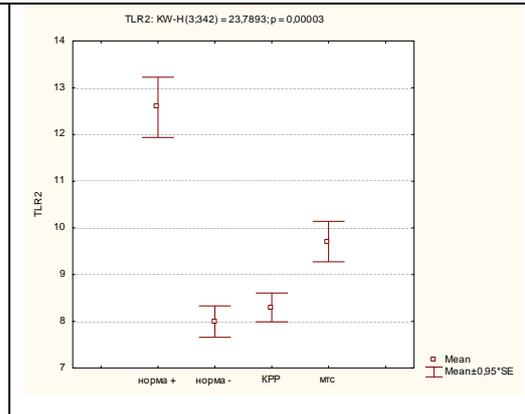
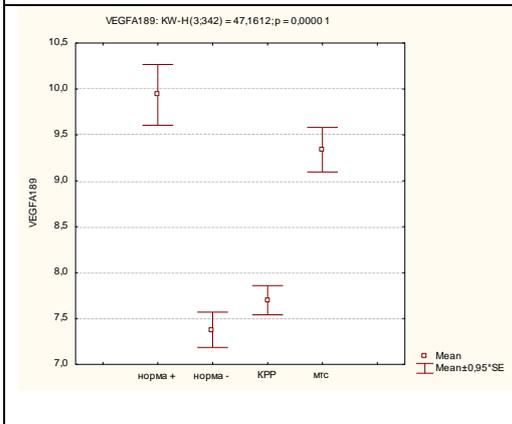


Диаграмма 1.50 Уровень экспрессии TLR2 в зависимости от типа тканей.



У Диаграмма 1.51 уровень экспрессии VEGFA189 в зависимости от типа тканей.

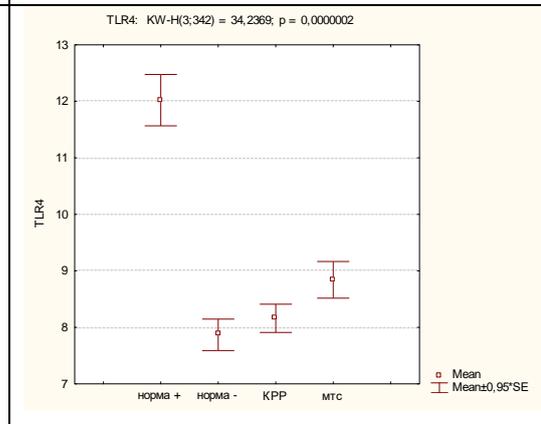


Диаграмма 1.52 уровень экспрессии TLR4 в зависимости от типа тканей.

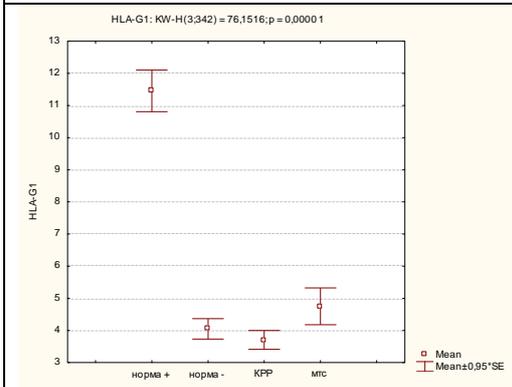


Диаграмма 1.53 уровень экспрессии HLA-G1 в зависимости от типа тканей.

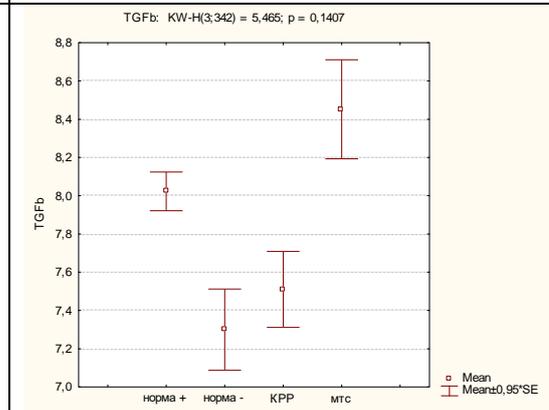


Диаграмма 1.54 Уровень экспрессии TGF-β в зависимости от типа тканей.

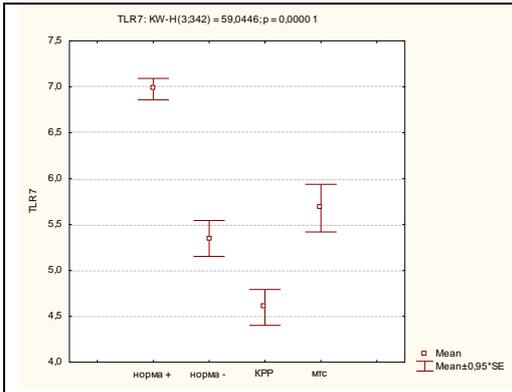


Диаграмма 1.55 Уровень экспрессии TLR7 в зависимости от типа тканей.

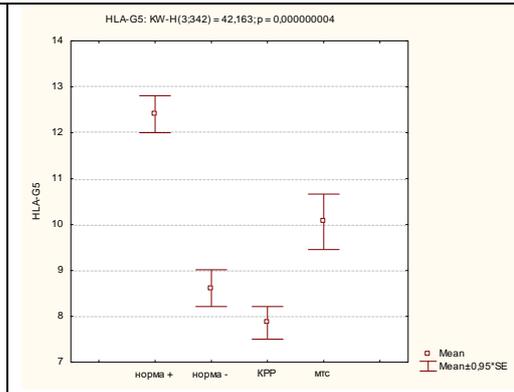


Диаграмма 1.56 Уровень экспрессии HLA-G5 в зависимости от типа тканей.

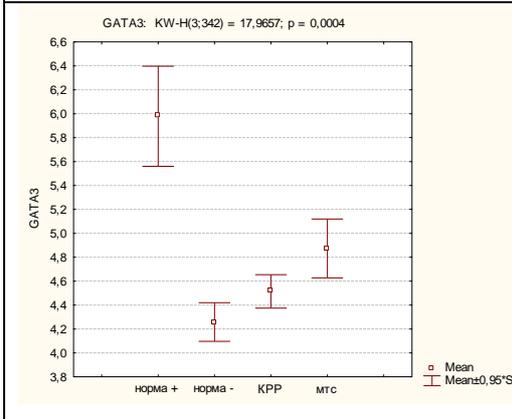


Диаграмма 1.57 Уровень экспрессии GATA3 в зависимости от типа тканей.

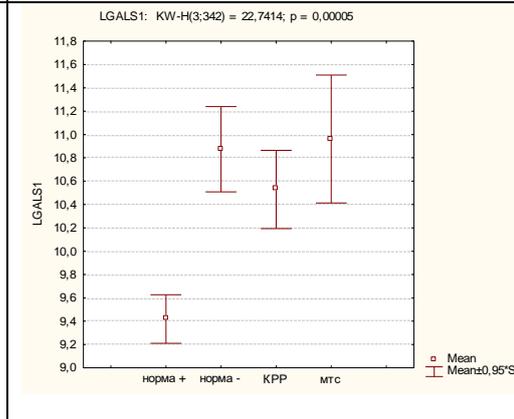


Диаграмма 1.58 Уровень экспрессии LGALS1 в зависимости от типа тканей.

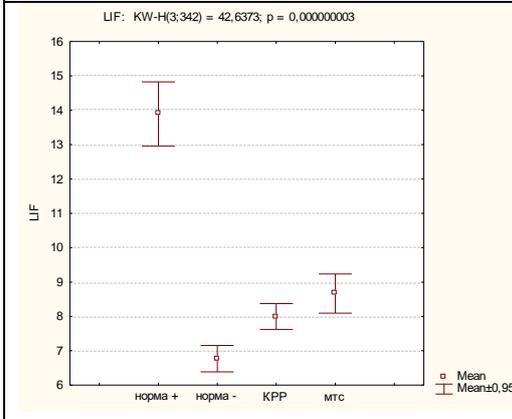


Диаграмма 1.59 Уровень экспрессии LIF в зависимости от типа тканей.

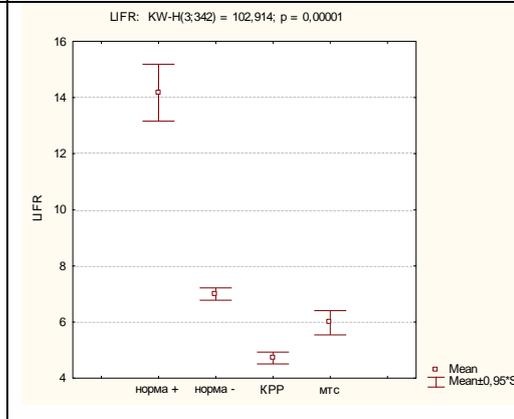


Диаграмма 1.60 Уровень экспрессии LIFR в зависимости от типа тканей.

Список литературы

1. Binefa G., Rodríguez-Moranta F., Teule A., Medina-Hayas M. Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*. 2014 г., Т. 20, 22, стр. 6786–6808.
2. Colorectal Cancer. *Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. [В Интернете] IARC WHO, 2012 г. [Цитировано: 11 10 2015 г.] http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
3. Каприн А.Д., Старинский В.В. Петрова Г.В. *Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность)*. Москва : МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. стр. 250. 978-5-85502-227-8.
4. Bode Z., Dong A. M.. Cancer Prevention Research—Then and Now. *Nature Reviews Cancer*. 2010 г., Т. 9, стр. 508-516.
5. Gray R., Barnwell J., McConkey C., Hills R.K., Williams N.S., Kerr D.J. Quasar Collaborative Group, Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007 г., Т. 370, стр. 2020–2029.
6. Schrag D., Rifas-Shiman S., Saltz L., Bach P.B., Begg C.B. Adjuvant chemotherapy use for Medicare beneficiaries with stage II colon cancer. *Journal of clinical oncology*. 2002 г., Т. 20, стр. 3999–4005.
7. Figueredo A., Coombes M.E., Mukherjee S. Adjuvant therapy for completely resected stage II colon cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 г., Т. 16, 3, стр. CD005390.
8. Labianca R., Nordlinger B., Beretta G.D., Mosconi S., Mandalà M., Cervantes A., Arnold D/. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2013 г., Т. 24, 6, стр. vi64–vi72.
9. Oncology, NCCN Clinical Practice Guidelines in. *Colorectal cancer screening version 1.2015*. 6.м. : National Comprehensive Cancer Network, 2015.
10. Barrier A., Roser F., Boëlle P.Y., Franc B., Tse C., Brault D., Lacaine F., Houry S., Callard P., Penna C., Debuire B., Flahault A., Dudoit S., Lemoine A. Prognosis of stage II colon cancer by non-neoplastic mucosa gene expression profiling. *Oncogene*. 2007 г., Т. 26, 18, стр. 2642-8.
11. Barrier A., Boelle P.Y., Lemoine A., Flahault A., Dudoit S., Huguier M. Gene expression profiling in colon cancer. *Bulleitein de l'Academie nationale de medecine*. 2007 г., Т. 191, 6, стр. 1091-101.
12. Wang Y., Lin X. Relationship between cathepsin B, cathepsin D expression and biological behaviour in mucinous colorectal carcinoma. *Chinese medical sciences journal*. 2004 г., Т. 19, 1, стр. 12.
13. Brenner B., Geva R., Rothney M., Beny A., Dror Y., Steiner M., Hubert A., Idelevich E., Gluzman A., Purim O., Shacham-Shmueli E., Shulman K., Mishaeli M., Man S., Soussan-Gutman L., Tezcan H., Chao C., Shani A., Liebermann N. Impact of the 12-Gene Colon Cancer Assay on Clinical Decision Making for Adjuvant Therapy in Stage II Colon Cancer Patients. *Value in health*. 2016 г., Т. 19, 1, стр. 82-7.
14. Goel G., Evolving role of gene expression signatures as biomarkers in early-stage colon cancer. *Journal of Gastrointestinal Cancer*. 2014 г., Т. 45, 4, стр. 399-404.

15. Kopetz S., Tabernero J., Rosenberg R., Jiang Z.Q., Moreno V., Bachleitner-Hofmann T., Lanza G., Stork-Sloots L., Maru D., Simon I., Capellà G., Salazar R. Genomic classifier ColoPrint predicts recurrence in stage II colorectal cancer patients more accurately than clinical factors. *The oncologist*. 2015 г., Т. 20, 2, стр. 127-33.
16. Barrier A., Boelle P.Y., Lemoine A., Tse C., Brault D., Chiappini F., Lacaine F., Houry S., Huguier M., Flahault A., Dudoit S. Gene expression profiling of nonneoplastic mucosa may predict clinical outcome of colon cancer patients. *Diseases of the colon and rectum*. 2005 г., Т. 48, 12, стр. 2238-48.
17. Lax S., Schauer G., Prein K., Kapitan M., Silbert D., Berghold A., Berger A., Trauner M. Expression of the nuclear bile acid receptor/farnesoid X receptor is reduced in human colon carcinoma compared to nonneoplastic mucosa independent from site and may be associated with adverse prognosis. *International journal of cancer*. 2012 г., Т. 130, 10, стр. 2232-9.
18. Phelps P.C., Toker C., Trump B.F. Surface ultrastructure of normal, adenomatous, and malignant epithelium from human colon. *Scanning electron microscopy*. 1979 г., 3, стр. 169-75.
19. Jimenez Cardoso J.M., Ambrosius Diener K., Echeverria Alvarez E., Mravko Maldonado E. Electronic microscopy of adenocarcinoma of the colon. *American journal of proctology*. 1971 г., Т. 22, 5, стр. 301-7.
20. Motta P.M., Fujita H., Correr S. *Ultrastructure of digestive tract*. Boston : Martinus Nijhoff Publishers, 1988. 13: 978-1-4612-9229-6.
21. Stewart, B.W., Wild, C.P. *World cancer report*. Lyon : IARC, 2014. стр. 916. 978-92-832-0432-9.
22. Чисов В.И., Дарьялова С.Л. *Руководство по онкологии*. Москва : Медицинское информационное агенство, 2008. 978-5-8949-1676-0.
23. Azeem S., Gillani S.W., Siddiqui A., Jandrajupalli S.B., Poh V., Syed Sulaiman S.A. Diet and Colorectal Cancer Risk in Asia--a Systematic Review. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2015 г., Т. 16, 13, стр. 5389-96.
24. DeVita V.T., Lawrence T.S., Rosenberg S.A. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. Philadelphia : Wolters Kluwer, 2015. стр. 2280. 978-1-4511-9294-0.
25. Roncucci L., Mariani F.. Prevention of colorectal cancer: How many tools do we have in our basket? <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2015.08.019>. [В Интернете] 2015 г.
26. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. *Состояние онкологической помощи населению России в 2014 г.* Москва : МНИОИ им. А.П. Герцена - филиал ФГБЦ "НМИРЦ" Минздрава России, 2014. стр. 236.
27. Chan A.T., Giovannucci E.L. Primary Prevention of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010 г., Т. 138, 6, стр. 2029–2043.
28. Ялкупт С. И. *Профилактика опухолей*. Москва : Книга плюс, 2006. 5-93268-017-2.
29. Faïs T., Delmas J., Cougnoux A., Dalmasso G., Bonnet R. Targeting colorectal cancer-associated bacteria: A new area of research for personalized treatments. 2016 г., Т. 23, стр. 1-5.

30. Andersen V., Ostergaard M., Christensen J., Overvad K., Tjønneland A., Vogel U. Polymorphisms in the xenobiotic transporter Multidrug Resistance 1 (MDR1) and interaction with meat intake in relation to risk of colorectal cancer in a Danish prospective case-cohort study. *BMC cancer*. 2009 г., Т. 9, 407.
31. Andersen V., Holst R., Vogel U. Systematic review: diet-gene interactions and the risk of colorectal cancer. *Alimentary pharmacology and therapeutich*. 2013 г., Т. 37, 4, стр. 383-91.
32. Wang Y., Duan H., Yang H., Lin J. *A pooled analysis of alcohol intake and colorectal cancer*. 5, 2015 г., International journal of clinical and experimental medicine, Т. 8, стр. 6878–6889.
33. Rashkis H.A. Systemic stress as an inhibitor of experimental tumors in Swiss mice. *Science*. 1952 г., Т. 116, 3007, стр. 169-71.
34. Moore L.L., Chadid S., Singer M.R., Kreger B.E., Denis G.V. Metabolic Health Reduces Risk of Obesity-Related Cancer in Framingham Study Adults. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2014 г., Т. 23, 10, стр. 2057–2065.
35. Wolin K.Y., Yan Y., Colditz G.A., Lee I-M. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 2009 г., Т. 100, 4, стр. 611–616.
36. Дехисси Е.И. *Изучение влияния степени, характера отложения и метаболической активности жировой ткани на прогноз колоректального рака Автореф. дисс. ... к.м.н.* Москва : б.н., 2015. стр. 19.
37. Giovannucci E., Willett W.C. Dietary factors and risk of colon cancer. *Annals of medicine*. 1994 г., Т. 26, 6, стр. 443-52.
38. *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Renehan A.G., Tyson M., Egger M., Heller R.F., Zwahlen M. 9612, 2008 г., Lancet, Т. 371, стр. 569-78.
39. World Health Organization. *Obesity and overweight*. *Newsletter*. 2011. V.311.
40. Park S.W., Lee H.L., Doo E.Y., Lee K.N., Jun D.W., Lee O.Y., Han D.S., Yoon B.C., Choi H.S., Lee K.H. Visceral obesity predicts fever lymph node metastases and better overall survival in colon cancer. *Journal of gastrointestinal surgery*. 2015 г., Т. 19, 8, стр. 1513-21.
41. Лядов В.К., Егиев В.Н., Серяков А.П., Кучерук О.В., Дарда Е.С., Негардинов А.З. Сакропения и распределение жировой ткани у пациентов с колоректальным раком. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2012 г., Т. 22, 3, стр. 33-37.
42. Чубриева С.Ю., Глухов Н.В., Зайчик А.М. Жировая ткань как эндокринный регулятор. *Вестник Санкт-Петербургского университета*. 11, 2008 г., 1, стр. 32-43.
43. Donohoe C., Doyle S., Reynolds J. Visceral adiposity, insulin resistance and cancer risk. *Diabetology and metabolic syndrome*. 2011 г., Т. 3, 12.
44. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Романцова Т.И. Патогенетические аспекты ожирения. *Ожирение и метаболизм*. 2004 г., Т. 1, 4.

45. Fruhbeck G., Jebb S., Prentice A. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clinical phatology*. 1998 г., 18, стр. 399-419.
46. Galic S., Oakhill J. Adipose tissue as an endocrine organ. *Steinberg GRMol Cell Endocrinology*. 2010 г., Т. 316, 2, стр. 129-39.
47. Donovan E., Kummar S. Role of insulin-like growth factor-1R system in colorectal carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology Hematology*. 2008 г., Т. 66, 2, стр. 91-98.
48. Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G., Semenza G.L. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer research*. 1999 г., Т. 59, 16, стр. 3915-28.
49. Brakenhielm E, Veitonmäki N., Renhai C., Shinji K., Matsuzawa Y., Zhivotovsky B., Funahashi T., Cao Y. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proceedings of the National. Academy of Sciences of the USA*. 2004 г., Т. 101, 8, стр. 2476–2481.
50. Frasca F., Pandini G., Sciacca L. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Archives of the Physiology and Biochemistry*. 2008 г., Т. 114, 1, стр. 23-37.
51. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *The journal of nutrition*. 2001 г., Т. 131, 11, стр. 3109S-20S.
52. Johnson SM, Gulhati P. Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *Journal of the American college of the surgeons*. 2010 г., Т. 210, 5, стр. 767-78.
53. Hauptmann S, Grunewald V, Molls D. Glucose transporter GLUT1 in colorectal adenocarcinoma cell lines is inversely correlated with tumour cell proliferation. *Anticancer research*. 2005 г., Т. 25, 5, стр. 3431-6.
54. Gatenby R.A., Smallbone K., Maini P.K. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *British journal of cancer*. 2007 г., Т. 97, 5, стр. 646–653.
55. Farina A.R., Mackay A.R. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. *Cancers*. 2014 г., Т. 6, 1, стр. 240–296.
56. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*. 2010 г., Т. 141, 1, стр. 52–67.
57. Станоевич И.В. *Доброкачественные гиперпластические заболевания матки: патогенез, диагностика, лечение и профилактика. Автореферат дисс... д.м.н.* Москва : б.н., 2013. стр. 48С.
58. Sethi G., Sung B., Aqqarwal B.B. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Frontiers in bioscience*. 2008 г., 13, стр. 5094-107.
59. Aqqarwal B.B., Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Current opinion in pharmacology*. 2009 г., Т. 9, 4, стр. 351-69.

60. Chaturvedi M.M., Sung B., Yadav V.R., Kannappan R., Aggarwal B.B. NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene*. 2011 г., Т. 30, 14, стр. 1615-30.
61. Aggarwal B.B., Gupta S.C., Kim J.H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012 г., 119, стр. 651-665.
62. Coditz G.A., Wolin K.Y., Gehlert S. Applying what we know to accelerate cancer prevention. *Science Translational Medicine*. 2012 г., Т. 4, 127, стр. 127rv4.
63. Breuer-Katschinski B., Nemes K., Rump B., Leiendecker B., Marr A., Breuer N., Goebell H. Long-term use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of colorectal adenomas. The Colorectal Adenoma Study Group. *Digestion*. 2000 г., Т. 61, 2, стр. 129-34.
64. Friis S., Poulsen A.H., Sørensen H.T., Tjønneland A., Overvad K., Vogel U., McLaughlin J.K., Blot W.J., Olsen J.H. Aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer: a Danish cohort study. *Cancer Causes Control*. 2009 г., Т. 20, 5, стр. 731-40.
65. Pommergaard H.C., Burcharth J., Rosenberg J., Raskov H. Aspirin, Calcitriol, and Calcium do not Prevent Adenoma Recurrence in a Randomized Controlled Trial. [В Интернете] 21 September 2015 г. [Цитировано: 13 10 2015 г.] <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.010>.
66. Dukes C.E. The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1932 г., Т. 35, стр. 325-323.
67. Astler V.B., Collier F.A. The Prognostic Significance of Direct Extension of Carcinoma of the Colon and Rectum. *Annals of Surgery*. 1954 г., Т. 139, 6, стр. 846–851.
68. Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., Theise N.D. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Lyon : IARC, 2010. 978-92-832-2432-7.
69. Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition*. б.м. : Wiley-Blackwell, 2009. стр. 336. 978-1-4443-3241-4.
- 70., Oncotype DX. *Oncotype DX colon cancer*. 2016 г.
71. Краевский Н.А., Смольникова А.В., Саркисова Д.С. *Патологоанатомическая диагностика опухолей человека*. Москва : Медицина, 1993. стр. 560. 5-225-00684-1.
72. Струков А.И., Серов В.В., Саркисова Д.С. *Общая патология человека: руководство для врачей*. Москва : Медицина, 1990. стр. 448. 5-225-00700-7.
73. Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 г., 61, стр. 759–767.
74. Ashktorab H., Schäffer A.A., Darempouran M., Smoot D.T., Lee E., Brim H. Distinct genetic alterations in colorectal cancer. *PLoS One*. 2010 г., Т. 5, 1, стр. e8879.
75. Nakao M., Kawauchi S., Uchiyama T., Adachi J., Ito H., Chochi Y., Furuya T., Oga A., Sasaki K. DNA copy number aberrations associated with the clinicopathological features of colorectal cancers: Identification of genomic biomarkers by array-based comparative genomic hybridization. *Oncology reports*. 2011 г., Т. 25, 6, стр. 1603-11.

76. Muñoz-Bellvis L., Fontanillo C., González-González M., Garcia E., Iglesias M., Esteban C., Gutierrez M.L., Abad M.M., Bengoechea O., De Las Rivas J., Orfao A., Sayagués J.M. Unique genetic profile of sporadic colorectal cancer liver metastasis versus primary tumors as defined by high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Modern pathology*. 2012 г., Т. 25, 4, стр. 590-601.
77. González-González M., Muñoz-Bellvis L., Mackintosh C., Fontanillo C., Gutiérrez M.L., Abad M.M., Bengoechea O., Teodosio C., Fonseca E., Fuentes M., De Las Rivas J., Orfao A., Sayagués J.M. Prognostic Impact of del(17p) and del(22q) as assessed by interphase FISH in sporadic colorectal carcinomas. *PLoS One*. 2012 г., Т. 7, 8, стр. e42683.
78. Pino M.S., Chung D.C. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology*. May 2010 г., Т. 138, 6, стр. 2059–2072.
79. Markowitz S.D., Bertagnolli M.M. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *The new england journal of medicine*. 2010 г., Т. 361, 25, стр. 2449-60.
80. Fleming N.I., Jorissen R.N., Mouradov D., Christie M., Sakthianandeswaren A., Palmieri M. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer research*. 2013 г., 73, стр. 725-35.
81. Watanabe T., Kobunai T., Yamamoto Y., Konishi T., Yano H., Inuma H., Hayama T., Nozawa K., Ishihara S., Matsuda K. Prognostic significance of 18q loss of heterozygosity in microsatellite-stable colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*. 2010 г., Т. 28, 7, стр. e119.
82. Zhang B., Halder S.K., Kashikar N.D., Cho Y.J., Datta A., Gorden D.L., Datta P.K. Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 г., Т. 138, 3, стр. 969-80.
83. Walther A., Houlston R., Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut*. 2008 г., 57, стр. 941-950.
84. Kohzoh I., Hiroyuki Y. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*. 2008 г., Т. 29, 4, стр. 673–680.
85. Walther A., Johnstone E., Swanton C., Midgley R., Tomlinson I., Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2009 г., 9, стр. 489-499.
86. Losso G.M., Moraes Rda S., Gentili A.C., Messias-Reason I.T. Microsatellite instability--MSI markers (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250) in rectal cancer. *Brazilian archives of digestive surgery*. 2012 г., Т. 25, 4, стр. 240-4.
87. Guastadisegni C., Colafranceschi M., Ottini L., Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *European journal of cancer*. 2010 г., Т. 46, 15, стр. 2788-98.
88. Grady W.M. Genomic instability and colon cancer. *Cancer and Metastasis Review*. 2004 г., 23, стр. 11-27.
89. Kocarnik J.M., Shiovitz S., Phipps A.I. Molecular phenotypes of colorectal cancer and potential clinical applications. *Gastroenterology Report*. 2015 г., стр. 1-8.
90. Grady W.M., Carethers J.M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008 г., 135, стр. 1079–1099.

91. Kloor M., Staffa L., Ahadova A., von Knebel Doeberitz M. Clinical significance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Langenbecks Archives of Surgery*. 2014 г., Т. 399, 1, стр. 23-31.
92. Poynter J.N., Haile R.W., Siegmund K.D., Campbell P.T., Figueiredo J.C., Limburg P., Young J., Le Marchand L., Potter J.D., Cotterchio M., Casey G., Hopper J.L., Jenkins M.A., Thibodeau S.N., Newcomb P.A., Baron J.A. Associations between smoking, alcohol consumption, and colorectal cancer, overall and by tumor microsatellite instability status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 г., 18, стр. 2745–50.
93. Slattery M.L., Curtin K., Anderson K., Ma K.N., Ballard L., Edwards S., Schaffer D., Potter J., Leppert M., Samowitz W.S. Associations between cigarette smoking, lifestyle factors, and microsatellite instability in colon tumors. *Journal of the national cancer institute*. 2000 г., Т. 92, 22, стр. 1831-6.
94. Campbell P.T., Jacobs E.T., Ulrich C.M., Figueiredo J.C., Poynter J.N., McLaughlin J.R., Haile R.W., Jacobs E.J., Newcomb P.A., Potter J.D., Le Marchand L., Green R.C., Parfrey P., Younghusband H.B., Cotterchio M., Gallinger S., Jenkins M.A., Hopper J.L.,. Case-control study of overweight, obesity, and colorectal cancer risk, overall and by tumor microsatellite instability status. *Journal of the national cancer institute*. 2010 г., Т. 102, 6, стр. 391-400.
95. Sargent D.J., Marsoni S., Monges G., Thibodeau S.N., Labianca R., Hamilton S.R., French A.J., Kabat B., Foster N.R., Torri V., Ribic C., Grothey A., Moore M., Zaniboni A., Seitz J.F., Sinicrope F., Gallinger S. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *Journal of clinical oncology*. 2010 г., 28, стр. 3219–3226.
96. Sinicrope F.A., Foster N.R., Thibodeau S.N., Marsoni S., Monges G., Labianca R., Kim G.P., Yothers G., Allegra C., Moore M.J., Gallinger S., Sargent D.J. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *Journal of the Nationale Cancer Institute*. 2011 г., Т. 103, 11, стр. 863-75.
97. Bae J.M., Kim J.H, Cho N-Y, Kim T-Y, Kang G.H. Prognostic implication of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancers depends on tumour location. *British Journal of Cancer*. 2013 г., 109, стр. 1004–1012.
98. Curtin K., Slattery M.L., Samowitz W.S. CpG Island Methylation in Colorectal Cancer: Past, Present and Future. *Pathology Research International*. 2011 г., Т. 2011, стр. 8.
99. Slattery M.L., Curtin K., Sweeney C., Levin T.R., Potter J., Wolff R.K., Albertsen H., Samowitz W.S. Diet and lifestyle factor associations with CpG island methylator phenotype and BRAF mutations in colon cancer. *International journal of cancer*. 2007 г., Т. 120, 3, стр. 656-63.
100. Ogino S., Nosho K., Kirkner G.J., Kawasaki T., Meyerhardt J.A., Loda M., Giovannucci E.L., Fuchs C.S. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*. 2009 г., Т. 58, 1, стр. 90-6.
101. Lee S., Cho N.Y., Choi M., Yoo E.J., Kim J.H., Kang G.H. Clinicopathological features of CpG island methylator phenotype-positive colorectal cancer and its adverse prognosis in relation to KRAS/BRAF mutation. *Phatology international*. 2008 г., Т. 58, 2, стр. 104-13.

102. Coppedè F., Lopomo A., Spisni R., Migliore L. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World journal of Gastroenterology*. 2014 г., Т. 20, 4, стр. 943–956.
103. Snover D.C. Update on the serrated pathway to colorectal. *Huan pathology*. 2011 г., Т. 41, 1, стр. 1-10.
104. Leggett B., Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010 г., 138, стр. 2088–100.
105. Najdi R., Holcombe R.F., Waterman M.L. Wnt signaling and colon carcinogenesis: Beyond APC. *Journal of carcinogenesis*. 2011 г., Т. 10, 5.
106. Liang J., Lin C., Hu F., Wang F., Zhu L., Yao X., Wang Y., Zhao Y. APC polymorphisms and the risk of colorectal neoplasia: a HuGE review and meta-analysis. *American journal of epidemiology*. 2013 г., Т. 177, 11, стр. 1169-79.
107. Ting W.C., Chen L.M., Pao J.B., Yang Y.P., You B.J., Chang T.Y., Lan Y.H., Lee H.Z., Bao B.Y. Common genetic variants in Wnt signaling pathway genes as potential prognostic biomarkers for colorectal cancer. *PLoS One*. 2013 г., Т. 8, 2, стр. e56196.
108. Samowitz W.S., Powers M.D., Spirio L.N., Nollet F., van Roy F., Slattery M.L. Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer research*. 1999 г., 59, стр. 1442–1444.
109. Кит О.И., Водолажский Д.И. Молекулярная биология колоректального рака в клинической практике. *Молекулярная биология*. 2015 г., Т. 49, 4, стр. 531-540.
110. Ramamoorthi G., Sivalingam N. Molecular mechanism of TGF- β signaling pathway in colon carcinogenesis and status of curcumin as chemopreventive strategy. *Tumor biology*. 2014 г., Т. 35, 8, стр. 7295-305.
111. Lampropoulos P., Zizi-Sermpetzoglou A., Rizos S., Kostakis A., Nikiteas N., Papavassiliou A.G. TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer letters*. 2012 г., Т. 314, 1, стр. 1-7.
112. Valderrama-Carvajal H., Cocolakis E., Lacerte A., Lee E.H., Krystal G. Ali S. Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nature cell biology*. 2002 г., Т. 4, 12, стр. 963-9.
113. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 г., Т. 100, 1, стр. 57-70.
114. Elliott R.L., Blobel G.C. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *Journal of clinical cancer*. 2005 г., Т. 23, 9, стр. 2078-93.
115. Zhang B, Halder SK, Kashikar ND, Cho YJ, Datta A, Gorden DL. Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 г., 138, стр. 969–80.
116. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. *Успехи биологической химии*. 2007 г., Т. 47, стр. 3-52.

117. Leslie A., Carey F.A., Pratt N.R., Steele R.J. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *The British journal of surgery*. 2002 г., Т. 89, 7, стр. 845-60.
118. Santini D1, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist*. 2008 г., Т. 13, 12, стр. 1270-5.
119. Писарева Е.Е., Любченко Л.Н., Коваленко С.П., Шаманин В.А. Анализ мутаций в генах KRAS и BRAF при раке толстой и прямой кишки в российской популяции. *Сибирский онкологический журнал*. 2016 г., Т. 15, 2, стр. 36-41.
120. Pretlow T.P., Pretlow T.G. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta*. 2005 г., 1756, стр. 83-96.
121. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*. 2003 г., 3, стр. 11–22.
122. Водолажский Д.И., Антонец А.В., Двадненко К.В., Владимирова Л.Ю., Геворкян Ю.А., Касаткин В.Ф., Максимов А.Ю. *Международный журнал экспериментального образования*. 2014 г., 1, стр. 65-69.
123. Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM, Gambi V, Sarnataro CS, Gambacorta M, Lauricella C, Siena S. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*. Т. 26, 25, стр. 4217-9.
124. Hynes N.E., Lane H.A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Rev Cancer*. 2005 г., Т. 5, 5, стр. 341–354.
125. Tol J., Nagtegaal I.D., Punt C.J. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2009 г., 361, стр. 98-99.
126. Yang Z.Y., Wu X.Y., Huang Y.F., Di M.Y., Zheng D.Y., Chen J.Z., Ding H., Mao C., Tang J.L. Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a systematic review with meta-analysis. *International journal of cancer*. 2013 г., Т. 133, 8, стр. 1914-25.
127. Lo Nigro C., Ricci V., Vivenza D., Granetto C., Fabozzi T., Miraglio E., Merlano M.C. Prognostic and predictive biomarkers in metastatic colorectal cancer anti-EGFR therapy. *World journal of gastroenterology*. 14, 2016 г., Т. 22, 30, стр. 6944-54.
128. Bardhan K., Liu K. Epigenetics and Colorectal Cancer Pathogenesis. *Cancer*. 2013 г., Т. 5, 2, стр. 676–713.
129. Grady W.M., Pritchard C.C. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol Pathology*. 2014 г., Т. 42, 1, стр. 124–139.
130. Crobach S., Ruano D., van Eijk R., Schruppf M. и PALGA group, Fleuren G., van Wezel T., Morreau H. Somatic mutation profiles in primary colorectal cancers and matching ovarian metastases: Identification of driver and passenger mutations. *The journal of pathology. Clinical research*. 15, 2016 г., Т. 2, 3, стр. 166-74.

131. Пальцев М.А., Залетаев Д.В. *Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний*. Москва : Медицина, 2009. стр. 384. 5-225-03384-9.
132. Bretthauer M. Evidence for colorectal cancer screening. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2010 г., Т. 4, 24, стр. 417–25.
133. Примак Н.В., Гришков С.М., Цаллагова З.С., Котляров П.М., Солодкий В.А. МСКТ колонография в диагностике рака и полипов толстой кишки. *Вестник "РНЦПР"*. [В Интернете] 12 10 2012 г. [Цитировано: 19 10 2015 г.] http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/prim_v12.htm..
134. Atkin W.S., Edwards R., Kralj-Hans I., Wooldrage K., Hart A.R., Northover J.M., Parkin D.M., Wardle J., Duffy S.W., Cuzick J. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 г., 375 (9726), стр. 1624–1633.
135. Group, European Colorectal Cancer Screening Guidelines Working. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: Overview and introduction to the full Supplement publication. *Endoscopy*. 2013 г., Т. 45, 1, стр. 51–59.
136. Кит О.И., Бурцев Д.В., Максимов А.Ю. Диагностическая эффективность серологических и эпигенетических методов скрининга рака толстой кишки. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014 г., 5, стр. 51-57.
137. Winawer S.J., Stewart E.T., Zauber A.G., Bond J.H., Ansel H., Waye J.D., Hall D., Hamlin J.A., Schapiro M., O'Brien M.J., Sternberg S.S., Gottlieb L.S. A comparison of colonoscopy and double-contrast barium enema for surveillance after polypectomy. National Polyp Study Work Group. *The New England journal of medicine*. 2000 г., Т. 342, 24, стр. 1766-72.
138. Garborg K. Colorectal Cancer Screening. *The Surgical clinics of North America*. 2015 г., Т. 95, 5, стр. 979-89.
139. Cotterchio M., Manno M., Klar N., McLaughlin J., Gallinger S. Colorectal screening is associated with reduced colorectal cancer risk: a case-control study within the population-based Ontario Familial Colorectal Cancer Registry. *Cancer Causes Control*. 2005 г., Т. 16, 7, стр. 865-75.
140. Bretthauer M. Colorectal cancer screening. *Journal of internal medicine*. 2011 г., Т. 270, 2, стр. 87-98.
141. Mandel J.S., Church T.R., Ederer F., Bond J.H. Colorectal cancer mortality: effectiveness of biennial screening for fecal occult blood. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999 г., Т. 91, 5, стр. 434-7.
142. Shaikat A., Mongin S.J., Geisser M.S., Lederle F.A., Bond J.H., Mandel J.S., Church T.R. Long-term mortality after screening for colorectal cancer. *The New England journal of Medicine*. 2013 г., Т. 369, 12, стр. 1106-14.
143. Scholefield J.H., Moss S.M., Mangham C.M., Whyne D.K., Hardcastle J.D. Nottingham trial of faecal occult blood testing for colorectal cancer: a 20-year follow-up. *Gut*. 2012 г., Т. 61, 7, стр. 1036-40.

144. Kronborg O., Jørgensen O.D., Fenger C., Rasmussen M. Randomized study of biennial screening with a faecal occult blood test: results after nine screening rounds. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2004 г., Т. 39, 9, стр. 846-51.
145. Lindholm E., Brevinge H., Haglund E. Survival benefit in a randomized clinical trial of faecal occult blood screening for colorectal cancer. *The British Journal of surgery*. 2008 г., Т. 95, 8, стр. 1029-36.
146. Grazzini G., Visioli C.B., Zorzi M., Ciatto S., Banovich F., Bonanomi A.G., Bortoli A., Castiglione G., Cazzola L., Confortini M., Mantellini P., Rubeca T., Zappa M. Immunochemical faecal occult blood test: number of samples and positivity cutoff. What is the best strategy for colorectal cancer screening? *British journal of cancer*. 2009 г., Т. 100, 2, стр. 259-65.
147. Levi Z., Rozen P., Hazazi R., Vilkin A., Waked A., Maoz E., Birkenfeld S., Leshno M., Niv Y. A quantitative immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia. *Annals of internal medicine*. 2007 г., Т. 146, 4, стр. 244-55.
148. Syful Azlie M.F., Hassan M.R., Junainah S., Rugayah B.. Immunochemical faecal occult blood test for colorectal cancer screening: a systematic review. *The medical journal of Malaysia*. 2015 г., Т. 70, 1, стр. 24-30.
149. Burch J.A., Soares-Weiser K., St John D.J., Duffy S., Smith S., Kleijnen J., Westwood M. Diagnostic accuracy of faecal occult blood tests used in screening for colorectal cancer: a systematic review. *Journal of medical screening*. 2007 г., Т. 14, 3, стр. 132-7.
150. Read T.E., Read J.D., Butterly L.F. Importance of adenomas 5 mm or less in diameter that are detected by sigmoidoscopy. *The New England Journal of Medicine*. 1997 г., Т. 335, 1, стр. 8-12.
151. Elmunzer B.J., Hayward R.A., Schoenfeld P.S., Saini S.D., Deshpande A., Waljee A.K. Effect of flexible sigmoidoscopy-based screening on incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Medicine*. 2012 г., Т. 9, 12.
152. Littlejohn C., Hilton S., Macfarlane G.J., Phull P. Systematic review and meta-analysis of the evidence for flexible sigmoidoscopy as a screening method for the prevention of colorectal cancer. *The British journal of surgery*. 2012 г., Т. 99, 11, стр. 1488-500.
153. Kato J., Morikawa T., Kuriyama M., Yamaji Y., Wada R., Mitsushima T., Yamamoto K. Combination of sigmoidoscopy and a fecal immunochemical test to detect proximal colon neoplasia. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2009 г., Т. 7, 12, стр. 1341-6.
154. Имянитов Е.Н. Клинико-молекулярные аспекты колоректального рака: этиопатогенез, профилактика, индивидуализация лечения. *Практическая онкология*. 2005 г., Т. 6, 2, стр. 65-70.
155. Sharaf R.N., Ladabaum U. Comparative effectiveness and cost-effectiveness of screening colonoscopy vs. sigmoidoscopy and alternative strategies. *The American journal of gastroenterology*. 2013 г., Т. 108, 1, стр. 120-32.
156. Stock C., Ihle P., Sieg A., Schubert I., Hoffmeister M., Brenner H. Adverse events requiring hospitalization within 30 days after outpatient screening and non-screening colonoscopy. *Gastrointestinal endoscopy*. 2013 г., Т. 77, 3, стр. 419-29.

157. Cooper G.S., Kou T.D., Rex D.K. omplications following colonoscopy with anesthesia assistance: a population-based analysis. *JAMA internal medicine*. 2013 г., Т. 173, 7.
158. Castro G., Azrak M.F., Seeff L.C., Royalty J. Outpatient colonoscopy complications in the CDC's Colorectal Cancer Screening Demonstration Program: a prospective analysis. *Cancer*. 2013 г., Т. 119, 15, стр. 2849-54.
159. Машкин А.М., Шаназаров Н.А., Батырбеков К.У. Роль эндоскопических методов в ранней диагностике колоректального рака. *Фундаментальные исследования*. 2014 г., 7-4, стр. 843-847.
160. Kaminski M.F., Bretthauer M., Zauber A.G., Kuipers E.J., Adami H.O., van Ballegooijen M., Regula J., van Leerdam M., Stefansson T., Pahlman L., Dekker E., Hernán M.A., Garborg K., Hoff G. The NordICC Study: rationale and design of a randomized trial on colonoscopy screening for colorectal cancer. *Endoscopy*. 2012 г., Т. 44, 7, стр. 695-702.
161. Johnson C., Chen M., Toledano A. Accuracy of CT colonography for detection of large adenomas and cancer. *The New England journal of cancer*. 2008 г., Т. 359, 12, стр. 1207–17.
162. Зароднюк И.В., Тихонов А.А., Кузьминов А.М., Веселов В.В., Маркова Е.В. Опвт применения виртуальной колоноскопии при семейном аденоматозе. *Колопроктология*. 2014 г., Т. 53, стр. 15-19.
163. Iannaccone R., Laghi A., Catalano C., Mangiapane F., Lamazza A., Schillaci A., Sinibaldi G., Murakami T., Sammartino P., Hori M., Piacentini F., Nofroni I., Stipa V., Passariello R. Computed tomographic colonography without cathartic preparation for the detection of colorectal polyps. *Gastroenterology*. 2004 г., Т. 127, 5, стр. 1300-11.
164. Dominitz J., Robertson D. Colorectal cancer screening with computed tomographic colonography. *Gastroenterology*. 2009 г., Т. 136, 4, стр. 1451–3.
165. Ahlquist D. Molecular detection of colorectal neoplasia. *Gastroenterology*. 2010 г., Т. 138, 6, стр. 2127–39.
166. Chang E., Park D.I., Kim Y.J., Kim B.K., Park J.H., Kim H.J., Cho Y.K., Sohn C.I., Jeon W.K., Kim B.I., Kim H.D., Kim D.H., Kim Y.H. Detection of colorectal neoplasm using promoter methylation of ITGA4, SFRP2, and p16 in stool samples: a preliminary report in Korean patients. *Hepatogastroenterology*. 2010 г., Т. 57, 101, стр. 720-7.
167. Tang D., Liu J., Wang D. Diagnostic and prognostic value of the methylation status of secreted frizzled-related protein 2 in colorectal cancer. *Clinical and investigative medicine*. 2011 г., Т. 34, 2, стр. E88-95.
168. Imperiale T.F., Ransohoff D.F., Itzkowitz S.H., Levin T.R., Lavin P., Lidgard G.P., Ahlquist D.A., Berger B.M. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *The New England journal of medicine*. 2014 г., Т. 370, 14, стр. 1287-97.
169. Оношко М.В. Основные направления развития хирургии колоректального рака. *Практическая онкология*. 2013 г., Т. 14, 1, стр. 13-22.
170. Nestorovic M., Petrovic D., Stanojevic G., Miljkovic D., Mihajlovic D., Brankovic B., Pecic V. One hundred years of Miles' operation- what has changed? *Acta Medica Mediana*. 2008 г., 47, стр. 43-46.

171. Dixon C.F. Anterior resection for malignant lesions of the upper part of the rectum and lower part of the sigmoid. *Annals of Surgery*. 1948 г., 128, стр. 425-42.
172. Heald R.J., Moran B.J., Ryall R.D.H., Sexton R., MacFarlane J.K. Rectal Cancer: The Basingstoke Experience of Total Mesorectal Excision, 1978-1997. *Archives of Surgery*. 1998 г., Т. 133, 8, стр. 894-899.
173. Van Geste Y.R.B.M., Hingh I.H.J.T., van Herk-Suke M.P.P., van Erning F.N., Beerepoot L.V., Wijsman J.H., Slooter G.D., Rutten H.J.T., Creemers G-J.M, Lemmens V.E.P.P. Patterns of metachronous metastases after curative treatment of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology*. 2014 г., Т. 38, 4, стр. 448–454.
174. Woodington G.F., WAUGH J.M. Results of resection of metastatic tumors of the liver. *The American Journal of Surgery*. 1963 г., 105, стр. 24-29.
175. Wilson S.M., Adson M.A. Surgical treatment of hepatic metastases from colorectal cancer. *Archives of surgery*. 1976 г., 111, стр. 330-334.
176. Бойко В.В., Тищенко А.М., Скорый Д.И., Смачило Р.М., Козлова Т.В., Писецкая М.Э., Мангов А.В., Кульпина Е.А., Волченко И.В. Метастатический колоректальный рак печени. Особенности диагностики и хирургической техники. *Украинский журнал хирургии*. 2013 г., Т. 22, 3, стр. 14-24.
177. Akgül Ö., Çetinkaya E., Ersöz Ş., Tez M. Role of surgery in colorectal cancer liver metastases. *World Journal of Gastroenterology*. 2014 г., Т. 20, 20, стр. 6113-22.
178. Matias M., Casa-Nova M., Faria M., Pires R., Tato-Costa J., Ribeiro L., Costa L. Prognostic Factors after Liver Resection for Colorectal Liver Metastasis. *Acta Medica Portuguesa*. 2015 г., Т. 28, 3, стр. 357-69.
179. Секачева М.И. *Периоперационная терапия при метастазах колоректального рака в печень*. Дисс... док.мед.наук//2014. стр. 198.
180. Трякин А.А. Таргетная терапия колоректального рака, рака желудка поджелудочной железы. *Практическая онкология*. 2010 г., Т. 11, 3, стр. 143-150.
181. Allegra C.J., Yothers G., O'Connell M.J., Sharif S., Petrelli N.J., Lopa S.H., Wolmark N. Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the national surgical adjuvant breast and bowel project C-08 trial. *Journal of clinical oncology*. 2013 г., Т. 31, 3, стр. 359-364.
182. Gramont A., Van Cutsem E., Schmoll H.J., Tabernero J., Clarke S., Moore M.J., Cunningham D., Cartwright T.H., Hecht J.R., Rivera F., Im S.A., Bodoky G., Salazar R., Maindrault-Goebel F., Shacham-Shmueli E, Bajetta E, Makrutzki M, Shang A, André T, Hoff PM. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet. Oncology*. 2012 г., Т. 13, 12, стр. 1225-33.
183. Van Cutsem E., Lenz H-J., Kohne C-H., Heinemann V., Tejpar S., Melezinek I., Beier F., Stroh C., Rougier P., Van Krieken J.H., Ciardiello F. Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan plus Cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*. 2015 г., стр. 1-11.

184. Liang R., Zheng L. The efficacy and safety of panitumumab in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis from five randomized controlled trials. *Drug Desing, Development and Therapy*. 2015 г., 9, стр. 4471-4478.
185. National Comprehensive Cancer Network. *National Comprehensive Cancer Network*. [В Интернете] 2016 г. <https://www.nccn.org/>.
186. Schmoll H.J., Van Cutsem E., Stein A., Valentini V., Glimelius B., Haustermans K., Nordlinger B., van de Velde C.J., Balmana J., Regula J., Nagtegaal I.D., Beets-Tan R.G, Arnold D, Ciardiello F., Hoff P., Kerr D., Köhne C.H., Labianca R., Price T. et all. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Annals of oncology*. 2012 г., Т. 23, 10, стр. 2479-516.
187. Делекторская В.В., *Молекулярно-биологические маркеры метастазирования и прогноза при раке толстой кишки: Дисс. ... д.м.н.*. Москва : б.н., 2007 г., стр. С247.
188. Зорина Е.Ю. *Индивидуализированная химиотерапия ююльных с диссеминированным колоректальным раком на основе предиктивных маркеров противоопухолевоы терапии.//Дисс. ... к.м.н.* Москва : б.н., 2014. стр. 143.
189. Norton S.E., Ward-Hartstonge K.A., Taylor E.S., Kemp R.A. Immune cell interplay in colorectal cancer prognosis. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2015 г., Т. 7, 10, стр. 221-32.
190. Srivastava G., Renfro L.A., Behrens R.J., Lopatin M., Chao C., Soori G.S., Dakhil S.R., Mowat R.B., Kuebler J.P., Kim G., Mazurczak M., Lee M., Alberts S.R. Prospective multicenter study of the impact of oncoTYPE DX colon cancer assay results on treatment recommendations in stage II colon cancer patients. *The oncologist*. 2014 г., Т. 19, 5, стр. 492-7.
191. Clinical practice guidelines in oicology. *Colon cancer*. 2, 2015 г., version 2.2015.
192. Renfro L.A., Zhang N., Lopatin M., Chao C., Alberts S.R. Prospective Evaluation of a 12-Gene Assay on Patient Treatment Decisions and Physician Confidence in Mismatch Repair Proficient Stage IIA Colon Cancer. *Clinical colorectal cancer*. S1533-0028(16)30123-2, 2016 г.
193. Jeong D.H., Kim W.R., Min B.S., Kim Y.W., Song M.K., Kim N.K. Validation of a quantitative 12-multigene expression assay (OncoTYPE DX[®]) Colon Cancer Assay) in Korean patients with stage II colon cancer: implication of ethnic differences contributing to differences in gene expression. *Onco targets and therapy*. 17, 2015 г., Т. 8, стр. 3817-25.
194. You Y.N., Rustin R.B., Sullivan J.D. OncoTYPE DX[®]) colon cancer assay for prediction of recurrence risk in patients with stage II and III coloncancer: A review of the evidence. *Surgical oncology*. 2015 г., Т. 24, 2, стр. 61-6.
195. Maak M., Simon I., Nitsche U., Roepman P., Snel M., Glas A.M., Schuster T., Keller G., Zeestraten E., Goossens I., Janssen K.P., Friess H., Rosenberg R. Independent validation of a prognostic genomic signature (ColoPrint) for patients with stage II colon cancer. *Annals of surgery*. 2013 г., Т. 257, 6, стр. 1053-8.
196. Gyparaki M.T., Basdra E.K., Papavassiliou A.G. DNA methylation biomarkers as diagnostic and prognostic tools in colorectal cancer. *Journal of molecular medicine*. 2013 г., Т. 91, 11, стр. 1249-56.

197. Carlson M.R. Previstage GCC colorectal cancer staging test: a new molecular test to identify lymph node metastases and provide more accurate information about the stage of patients with colorectal cancer. *Molecular diagnosis and therapy*. 2009 г., Т. 13, 1, стр. 11-14.
198. Wang H., Zhang X., Wang L., Zheng G., Du L., Yang Y., Dong Z., Liu Y., Qu A., Wang C. Investigation of cell free BIRC5 mRNA as a serum diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*. 2014 г., Т. 109, 6, стр. 574-9.
199. Wangpu X., Yang X., Zhao J., Lu J., Guan S., Lu J., Kovacevic Z., Liu W., Mi L., Jin R., Sun J., Yue F., Ma J., Lu A., Richardson D.R., Wang L., Zheng M. The metastasis suppressor, NDRG1, inhibits "stemness" of colorectal cancer via down-regulation of nuclear β -catenin and CD44. *Oncotarget*. 2015 г., Т. 6, 32, стр. 33893-911.
200. Song Y., Lv L., Du J., Yue L., Cao L. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 subcellular localization and lymph node metastases of colorectal neoplasms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013 г., Т. 239, 2, стр. 241-6.
201. Mao Z., Sun J., Feng B., Ma J., Zang L., Dong F., Zhang D., Zheng M. The metastasis suppressor, N-myc downregulated gene 1 (NDRG1), is a prognostic biomarker for human colorectal cancer. *PLoS One*. 2013 г., Т. 8, 7, стр. e68206.
202. Melling N., Kowitz C.M., Simon R., Bokemeyer C., Terracciano L., Sauter G., Izbicki J.R., Marx A.H. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *BMJ*. [В Интернетe] 17 08 2015 г. [Цитировано: 4 12 2015 г.]
<http://jcp.bmj.com/content/early/2015/08/17/jclinpath-2015-202985>.
203. Goktas S., Yildirim M., Suren D., Alikanoglu A.S., Dilli U.D., Bulbuller N., Sezer C., Yildiz M. Prognostic role of Aurora-A expression in metastatic colorectal cancer patients. *Journal of Balkan Union of Oncology*. 2014 г., Т. 19, 3, стр. 686-91.
204. Karagiannis G.S., Musrap N., Saraon P., Treacy A., Schaeffer D.F., Kirsch R., Riddell R.H., Diamandis E.P. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin-1 regulates colon cancer progression. *Biological chemistry*. 2015 г., Т. 396, 2, стр. 163-83.
205. Guo Z.Y., Lv Y.G., Wang L., Shi S.J., Yang F., Zheng G.X., Wen W.H., Yang A.G. Predictive value of HLA-G and HLA-E in the prognosis of colorectal cancer patients. *Cellular immunology*. 2015 г., Т. 293, 1, стр. 10-16.
206. Reimers M.S., Engels C.C., Putter H., Morreau H., Liefers G.J., van de Velde C.J., Kuppen P.J. Prognostic value of HLA class I, HLA-E, HLA-G and Tregs in rectal cancer: a retrospective cohort study. *BMC cancer*. 14, стр. 486.
207. Литвицкий П.Ф. *Патофизиология. Курс Лeуций*. Москва : Медицина, 1997. стр. 752. 5-225-04521-9.
208. Abdelmaksoud-Damak R., Miladi-Abdennadher I., Triki M., Khabir A., Charfi S., Ayadi L., Frikha M., Sellami-Boudawara T., Mokdad-Gargouri R. Expression and mutation pattern of β -catenin and adenomatous polyposis coli in colorectal cancer patients. *Archives of medical research*. 2015 г., Т. 46, 1, стр. 54-62.

209. Morikawa T., Kuchiba A., Yamauchi M., Meyerhardt J.A., Shima K., Nosho K., Chan A.T., Giovannucci E., Fuchs C.S., Ogino S. Association of CTNNB1 (beta-catenin) alterations, body mass index, and physical activity with survival in patients with colorectal cancer. *JAMA*. 27, 2011 г., Т. 35, 16, стр. 1685-94.
210. Jung A., Schrauder M., Oswald U., Knoll C., Sellberg P., Palmqvist R., Niedobitek G., Brabletz T., Kirchner T. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *The American Journal of Pathology*. 2001 г., Т. 159, 5, стр. 1613-1617.
211. Zhao L., Vogt P.K. Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 19, 2008 г., Т. 105, 7, стр. 2652-7.
212. Liao X., Morikawa T., Lochhead P., Imamura Y., Kuchiba A., Yamauchi M., Nosho K., Qian Z.R., Nishihara R., Meyerhardt J.A., Fuchs C.S., Ogino S. Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Clinical cancer research*. 15, 2012 г., Т. 18, 8, стр. 2257-68.
213. Liao X., Lochhead P., Nishihara R., Morikawa T., Kuchiba A., Yamauchi M., Imamura Y., Rong Z.Q., Baba Y., Shima K., Sun R., Nosho K., Meyerhardt J.A., Giovannucci E., Fuchs C.S., Chan A.T., Ogino S. Aspirin Use, Tumor PIK3CA Mutation, and Colorectal-Cancer Survival. *The New England Journal of Medicine*. 2012 г., Т. 367, стр. 1596-1606.
214. Tural D1, Batur S, Erdamar S, Akar E, Kepil N, Mandel NM, Serdengeçti S. Analysis of PTEN, BRAF and PI3K status for determination of benefit from cetuximab therapy in metastatic colorectal cancer patients refractory to chemotherapy with wild-type KRAS. *Tumor biology*. 2013 г., Т. 35, 2, стр. 1041-9.
215. Sood A., McClain D., Maitra R., Basu-Mallick A., Seetharam R., Kaubisch A., Rajdev L., Mariadason J.M., Tanaka K., Goel S. PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*. 2012 г., Т. 11, 2, стр. 143-50.
216. Ren F., Wang L., Shen X., Xiao X., Liu Z., Wei P., Wang Y., Qi P., Shen C., Sheng W., Du X. MYBL2 is an independent prognostic marker that has tumor-promoting functions in colorectal cancer. *American journal of cancer research*. 15, 2015 г., Т. 5, 4, стр. 1542-52.
217. Huang F., Xu L.A., Khambata-Ford S. Correlation between gene expression of IGF-1R pathway markers and cetuximab benefit in metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research*. 15, 2012 г., Т. 18, 4, стр. 1156-66.
218. Sayagués J.M., Corchete L.A., Gutiérrez M.L., Sarasquete M.E., Del Mar Abad M., Bengoechea O., Fermiñán E., Anduaga M.F., Del Carmen S., Iglesias M. Esteban C., Angoso M., Alcazar J.A., García J., Orfao A., Muñoz-Bellvis L. Genomic characterization of liver metastases from colorectal cancer patients. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.12140, 2016 г.
219. Rogojanu R., Thalhammer T., Thiem U., Heindl A., Mesteri I., Seewald A., Jäger W., Smochina C., Ellinger I., Bises G. Quantitative Image Analysis of Epithelial and Stromal Area in Histological Sections of Colorectal Cancer: An Emerging Diagnostic Tool. *BioMed international research*. 2015 г., стр. 2015:569071.

220. Geis A.L., Fan H., Wu X., Wu S., Huso D.L., Wolfe J.L., Sears C.L., Pardoll D.M., Housseau F. Regulatory T-cell Response to Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Colonization Triggers IL17-Dependent Colon Carcinogenesis. *cancer discovery*. 2015 г., T. 5, 10, стр. 1098-109.
221. Noshō K., Sukawa Y., Adachi Y., Ito M., Mitsuhashi K., Kurihara H., Kanno S., Yamamoto I., Ishigami K., Igarashi H., Maruyama R., Imai K., Yamamoto H., Shinomura Y. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*. 14, 2016 г., T. 22, 2, стр. 557-66.
222. Grivennikov S.I., Wang K., Mucida D., Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, Taniguchi K., Yu G.Y., Osterreicher C.H., Hung K.E., Datz C., Feng Y., Fearon E.R., Oukka M., Tessarollo L., Coppola V., Yarovinsky F., Cheroutre H., Eckmann L., Trinchieri G., Karin M. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 8, 2012 г., T. 491, 7423, стр. 254-8.
223. Li T.T., Ogino S., Qian Z.R. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: carcinogenesis to cancer therapy. *World journal of gastroenterology*. 21, 2014 г., T. 20, 47, стр. 17699-708.
224. Tosolini M., Kirilovsky A., Mlecnik B., Fredriksen T., Mauger S., Bindea G., Berger A., Bruneval P., Fridman W.H., Pagès F., Galon J. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Clinical research*. 15, 2011 г., T. 71, 4, стр. 1263-71.
225. Camus M., Tosolini M., Mlecnik B., Pagès F., Kirilovsky A., Berger A., Costes A., Bindea G., Charoentong P., Bruneval P., Trajanoski Z., Fridman W.H., Galon J. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Clinical research*. 15, 2009 г., T. 69, 6, стр. 2685-93.
226. Zhuo C., Xu Y., Ying M., Li Q., Huang L., Li D., Cai S., Li B. FOXP3+ Tregs: heterogeneous phenotypes and conflicting impacts on survival outcomes in patients with colorectal cancer. *immunologic research*. 2015 г., T. 61, 3, стр. 338-47.
227. French C.L., Ye F., Revetta F., Zhang B., Coffey R.J., Washington M.K., Deane N.G., Beauchamp R.D., Weave A.M. Linking patient outcome to high throughput protein expression data identifies novel regulators of colorectal adenocarcinoma aggressiveness. *F1000Res*. 24, 2015 г., T. 4, 99.
228. Luddy K.A., Robertson-Tessi M., Tafreshi N.K., Soliman H., Morse D.L. The role of toll-like receptors in colorectal cancer progression: evidence for epithelial to leucocytic transition. *Frontiers in immunology*. 2014 г., T. 20, 5, стр. 429.
229. Hölzel M., Bovier A., Tüting T. Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nature reviews. Cancer*. 2013 г., T. 13, 5, стр. 365-76.
230. Gurzu S., Turdean S., Kovacs A., Contac A.O., Jung I. Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: An update. *World journal of clinical cases*. 2015 г., T. 3, 5, стр. 393-404.
231. Liu J., Yu H., Hu W. LIF is a new p53 negative regulator. *Journal of nature and science*. 2015 г., T. 1, 7, стр. e131.

232. Rahbari N.N., Kedrin D., Incio J., Liu H., Ho W.W., Nia H.T., Edrich C.M., Jung K., Daubriac J., Chen I., Heishi T., Martin J.D., Huang Y.3, Maimon N3., Reissfelder C., Weitz J., Boucher Y., Clark J.W., Grodzinsky A.J., Duda D.G., Jain R.K., Fukumura D. Anti-VEGF therapy induces ECM remodeling and mechanical barriers to therapy in colorectal cancer liver metastases. *Science Translation Medicine*. 12, 2016 г., Т. 8, 360.
233. Langers A.M., Verspaget H.W., Hawinkels L.J., Kubben F.J., van Duijn W., van der Reijden J.J., Hardwick J.C., Hommes D.W., Sier C.F. MMP-2 and MMP-9 in normal mucosa are independently associated with outcome of colorectal cancer patients. *British journal of cancer*. 24, 2012 г., Т. 106, 9, с. 1495-8.
234. Zeng Z.S., Huang Y., Cohen A.M., Guillem J.G. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *Journal of clinical oncology*. 1996 г., Т. 14, 12, с. 3133-40.
235. Chen H., Hu Y., Xiang W., Cai Y., Wang Z., Xiao Q, Liu Y., Li Q., Ding K. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 7 immunohistochemical expression in colorectal cancer: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 15, 2015 г., Т. 8, 3, с. 3281-90.
236. Li C.Y., Yuan P., Lin S.S., Song C.F., Guan W.Y., Yuan L., Lai R.B., Gao Y., Wang Y. Matrix metalloproteinase 9 expression and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Tumor biology*. 2013 г., Т. 34, 2, с. 735-41.
237. Shi M., Yu B., Gao H., Mu J., Ji C. Matrix metalloproteinase 2 overexpression and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2013 г., Т. 40, 1, с. 617-23.
238. Song J., Su H., Zhou Y.Y., Guo L.L. Prognostic value of matrix metalloproteinase 9 expression in breast cancer patients: a meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013 г., Т. 14, 3, с. 1615-1621.
239. Said A.H., Raufman J.P., Xie G. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Cancers*. 10, 2014 г., Т. 6, 1, с. 366-75.
240. López-Otín C., Palavalli L.H., Samuels Y. Protective roles of matrix metalloproteinases: from mouse models to human cancer. *Cell cycle*. 15, 2009 г., Т. 8, 22, с. 3657-62.
241. Liang X., Liu T., Zhang W., Zhang K., Guo S., Liang J. Lentivirus-mediated knockdown of M-phase phosphoprotein 8 inhibits proliferation of colon cancer cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. doi: 10.1002/bab.1504, 2016 г.
242. Dan L.A., Werdyani S., Xu J., Shestopaloff K., Hyde A., Dicks E., Younghusband B., Green J., Parfrey P., Xu W., Savas S. No associations of a set of SNPs in the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Matrix Metalloproteinase (MMP) genes with survival of colorectal cancer patients. *Cancer medicine*. 2016 г., Т. 5, 9, с. 2221-31.
243. Xu C.J., Xu F. MMP-11 and VEGF-C expression correlate with clinical features of colorectal adenocarcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2014 г., Т. 7, 9, с. 2883-2888.

244. Zhang H., Xue J., Hessler P., Tahir S.K., Chen J., Jin S., Souers A.J., Levenson J.D., Lam L.T. Genomic analysis and selective small molecule inhibition identifies BCL-X(L) as a critical survival factor in a subset of colorectal cancer. *Molecular Cancer*. DOI: 10.1186/s12943-015-0397-y, 2015 г.
245. Pereira H., Silva S., Julião R., Garcia P., Perpétua F. Prognostic markers for colorectal cancer: expression of P53 and BCL2. *World journal of surgery*. 1997 г., T. 21, 2, стр. 210-3.
246. Katkooori V.R., Suarez-Cuervo C., Shanmugam C., Jhala N.C., Callens T., Messiaen L., Posey J. 3rd, Bumpers H.L., Meleth S., Grizzle W.E., Manne U. Bax expression is a candidate prognostic and predictive marker of colorectal cancer. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2010 г., T. 1, 2, стр. 76-89.
247. Lindner A.U., Concannon C.G., Boukes G.J., Cannon M.D., Llambi F., Ryan D., Boland K., Kehoe J., McNamara D.A., Murray F., Kay E.W., Hector S., Green D.R., Huber H.J., Prehn J.H. Systems analysis of BCL2 protein family interactions establishes a model to predict responses to chemotherapy. *Cancer research*. 15, 2013 г., T. 73, 2, стр. 519-28.
248. Penney R.B., Lundgreen A., Yao-Borengasser A., Edavana V.K., Williams S., Dhakal I., Wolff R.K., Kadlubar S., Slattery M.L. CYP19A1 single nucleotide polymorphism associations with CYP19A1, NFkB1, and IL6 gene expression in human normal colon and normal liver samples. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2014 г., T. 14, 7, стр. 163-71.
249. Sato R., Suzuki T., Katayose Y., Miura K., Shiiba K., Miki Y., Kamogawa Y., Yamamoto K., Takayuki I., Egawa S., Unno M., Sasano H. Aromatase in colon carcinoma. *Anticancer research*. 2012 г., T. 32, 8, стр. 3069-75.
250. Lui D. Gene signatures of estrogen and progesterone receptor pathways predict the prognosis of colorectal cancer. *The FEBS journal*. 2016 г., T. 283, 16, стр. 3115-33.
251. Xu Z., Liu J., Gu L., Ma X., Huang B., Pan X. Research progress on the reproductive and non-reproductive endocrine tumors by estrogen-related receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2016 г., T. 158, стр. 22-30.
252. Nguyen-Vu T., Wang J., Mesmar F., Mukhopadhyay S., Saxena A., McCollum C.W., Gustafsson J.Å., Bondesson M., Williams C. Estrogen receptor beta reduces colon cancer metastasis through a novel miR-205 - PROX1 mechanism. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.9895, 2016 г.
253. Millis S.Z., Ikeda S., Reddy S., Gatalica Z., Kurzrock R. Landscape of Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway Alterations Across 19 784 Diverse Solid Tumors. *JAMA oncology*. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.0891, 2016 г.
254. Kuo C.T., Lee W.S. Progesterone receptor activation is required for folic acid-induced anti-proliferation in colorectal cancer cell lines. *Cancer letters*. 10, 2016 г., T. 378, 2, стр. 104-10.
255. Vigneri P.G., Tirrò E., Pennisi M.S., Massimino M., Stella S., Romano C., Manzella L. The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy. *Frontiers in oncology*. 15, 2015 г., T. 5, 230.

256. Teng J.A., Wu S.G., Chen J.X., Li Q., Peng F., Zhu Z., Qin J., He Z.Y. The Activation of ERK1/2 and JNK MAPK Signaling by Insulin/IGF-1 Is Responsible for the Development of Colon Cancer with Type 2 Diabetes Mellitus. *PLoS One*. 2016 г., Т. 11, 2.
257. Shanmugalingam T., Bosco C., Ridley A.J., Van Hemelrijck M. Is there a role for IGF-1 in the development of second primary cancers? *Cancer medicine*. doi: 10.1002/cam4.871, 2016 г.
258. Ding J., Li C., Tang J., Yi C., Liu J.Y., Qiu M. Higher Expression of Proteins in IGF/IR Axes in Colorectal Cancer is Associated with Type 2 Diabetes Mellitus. *Phatology oncology research*. 2016 г., Т. 22, 4, стр. 773-9.
259. Dowling C.M., Phelan J., Callender J.A., Cathcart M.C., Mehigan B., McCormick P., Dalton T., Coffey J.C., Newton A.C., O'Sullivan J., Kiely P.A. Protein kinase C beta II suppresses colorectal cancer by regulating IGF-1 mediated cell survival. *Oncotarget*. 2016 г., Т. 7, 15, стр. 20919-33.
260. Nowell P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 г., Т. 194, 4260, стр. 23-8.
261. Шапот В.С. *Биохимические аспекты опухолевого роста*. Москва : Медицина, 1975. стр. 304.
262. Дильман В.М. *Эндокринологическая онкология*. Ленинград : Медицина, 1983. стр. 312.
263. Агеенко А.Н. *Лицо рака*. Москва : Медицина, 1994. стр. 240. 5-225-02837-3.
264. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. *Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника*. Москва : ТриадаХ, 1998. стр. 496. 5-8249-0004-3.
265. Баранов В.С. *Генетический паспорт - основа индивидуальной и предиктивной медицины*. СПб : Н-Л, 2009. стр. 528. 978-5-94869-084-1.
266. Моисеенко М.В., Урманчеева А.Ф., Хансон К.П. *Лекции по фундаментальной онкологии*. Санкт Петербург : Издательство Н-Л, 2004. 5-94869-018-0.
267. Виноградов А.В. *Дифференциальный диагноз внутренних болезней: справочное руководство для врачей. 2*. Москва : Медицина, 1987. стр. 592.
268. Важенин А.В., Бехтерева Е.И., Бехтерева С.А., Гюлов Х.Я. *Очерки первичной множественности злокачественных опухолей*. Челябинск : б.н., 2000. стр. 170. 616-006.04.
269. McSorley S.T., Horgan P.G., McMillan D.C. The impact of the type and severity of postoperative complications on long-term outcomes following surgery for colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016 г., 97, стр. 168-77.
270. Samaiya A. To Drain or Not to Drain after Colorectal Cancer Surgery. *The Indian journal of surgery*. 2015 г., Т. 77, suppl3, стр. 1363-8.
271. Jass J.R. Molecular heterogeneity of colorectal cancer: Implications for cancer control. *Surgical oncology*. 2007 г., Т. 16 Suppl 1, стр. 7-9.
272. Shang B., Liu Y., Jiang S.J., Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. 2015 г., Т. 14, 5, стр. 15179.

273. Suraweera N., Mouradov D., Li S., Jorissen R.N., Hampson D., Ghosh A., Sengupta N., Thaha M., Ahmed S., Kirwan M., Aleva F., Propper D., Feakins R.M., Vulliamy T., Elwood N.J., Tian P., Ward R.L., Hawkins N.J., Xu Z.Z., Molloy P.L., Jones I.T. Relative telomere lengths in tumor and normal mucosa are related to disease progression and chromosome instability profiles in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 г., 26, стр. doi: 10.18632.
274. Dawson P.A., Filipe M.I. An ultrastructural and histochemical study of the mucous membrane adjacent to and remote from carcinoma of the colon. *Cancer*. 1976 г., Т. 37, 5, стр. 2388-98.
275. Uptake of [35S]sulphate in human colonic mucosa associated with carcinoma: an autoradiographic analysis at the ultrastructural level. *The Histochemical journal*. 1983 г., Т. 15, 1, стр. 3-13.
276. Filipe M.I., Cooke K.B. Changes in composition of mucin in the mucosa adjacent to carcinoma of the colon as compared with the normal: a biochemical investigation. *Journal of clinical Pathology*. 1974 г., Т. 27, 4, стр. 315-8.
277. Shinde A.V., Frangogiannis N.G.. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014 г., 70, стр. 74-82.
278. Pinto M.T., Covas D.T., Kashima S., Rodrigues C.O.. Endothelial Mesenchymal Transition: Comparative Analysis of Different Induction Methods. *Biological procedures online*. 2016 г., Т. 27, 18, стр. 10.
279. Lee S.L., Ryu H., Son A.R., Seo B., Kim J., Jung S.Y., Song J.Y., Hwang S.G., Ahn J. TGF- β and Hypoxia/Reoxygenation Promote Radioresistance of A549 Lung Cancer Cells through Activation of Nrf2 and EGFR. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016 г., стр. 2016:6823471.
280. Heim C, Bernhardt W., Jalilova S., Wang Z., Motsch B., Ramsperger-Gleixner M., Burzlaff N., Weyand M., Eckardt K.U., Ensminger S.M. Prolyl-hydroxylase inhibitor activating hypoxia-inducible transcription factors reduce levels of transplant arteriosclerosis in a murine aortic allograft model. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2016 г., Т. 22, 5, стр. 561-70.
281. Zhang F., Luo Y., Shao Z., Xu L., Liu X., Niu Y., Shi J., Sun X., Liu Y., Ding Y., Zhao L. MicroRNA-187, a downstream effector of TGF β pathway, suppresses Smad-mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Cancer letters*. 10, 2016 г., Т. 373, 2, стр. 203-13.
282. Li C., Wang J., Kong J., Tang J., Wu Y., Xu E., Zhang H., Lai M. GDF15 promotes EMT and metastasis in colorectal cancer. *Oncotarget*. 5, 2016 г., Т. 7, 1, стр. 860-72.
283. Huang C.Y., Tsai C.W., Hsu C.M., Chang W.S., Shui H.A., Bau D.T. The significant association of CCND1 genotypes with colorectal cancer in Taiwan. *Tumor biology*. 2015 г., Т. 36, 8, стр. 6533-40.
284. GeneCards®: The Human Gene Database. *GeneCards®: The Human Gene Database*. [В Интернете] Weizmann Institute of Science., 1996-2016 г. [Цитировано: 15 02 2016 г.] <http://www.genecards.org/>.
285. Potter J.D., Lindor N.M. *Genetics of Colorectal Cancer*. б.м. : Springer, 2009. 978-0-387-09567-7.

286. Skeen V.R., Collard T.J., Southern S.L., Greenhough A., Hague A., Townsend P.A., Paraskeva C., Williams A.C. BAG-1 suppresses expression of the key regulatory cytokine transforming growth factor β (TGF- β 1) in colorectal tumour cells. *Oncogene*. 19, 2013 г., Т. 32, 38, стр. 4490-9.
287. Bai Y.X., Yi J.L., Li J.F., Sui H. Clinicopathologic significance of BAG1 and TIMP3 expression in colon carcinoma. *World journal of gastroenterology*. 28, 2007 г., Т. 13, 28, стр. 3883-5.
288. Song I.S., Jeong Y.J., Jeong S.H., Heo H.J., Kim H.K., Bae K.B., Park Y.H., Kim S.U., Kim J.M., Kim N., Ko K.S., Rhee B.D., Han J. FOXM1-Induced PRX3 Regulates Stemness and Survival of Colon Cancer Cells via Maintenance of Mitochondrial Function. *Gastroenterology*. 2015 г., Т. 149, 4, стр. 1006-16.
289. Oliveira C.S., Pereira H., Alves S., Castro L., Baltazar F., Chaves S.R., Preto A., Côrte-Real M. Cathepsin D protects colorectal cancer cells from acetate-induced apoptosis through autophagy-independent degradation of damaged mitochondria. *Cell death and disease*. 2015 г., Т. 18, 6, стр. e1788.
290. Morikawa T., Kuchiba A., Liao X., Imamura Y., Yamauchi M., Qian Z.R., Nishihara R., Sato K., Meyerhardt J.A., Fuchs C.S., Ogino S. Tumor TP53 expression status, body mass index and prognosis in colorectal cancer. *International journal of cancer*. 1, 2012 г., Т. 131, 5, стр. 1169-78.
291. Verdaguer H., Taberero J., Macarulla T. Ramucirumab in metastatic colorectal cancer: evidence to date and place in therapy. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2016 г., Т. 8, 3, стр. 230-42.
292. Pei X., Liu Y., Sun L., Zhang J., Fang Y., Liao X., Liu J., Zhang C., Yin T. Outcome of Molecular Targeted Agents Plus Chemotherapy for Second-Line Therapy of Metastatic Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Randomized Trials. *Clinical colorectal cancer*. 2016 г., 31.
293. Takahashi N., Iwasa S.I., Taniguchi H., Sasaki Y., Shoji H., Honma Y., Takashima A., Okita N., Kato K., Hamaguchi T., Shimada Y., Yamada Y. Prognostic role of ERBB2, MET and VEGFA expression in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR antibodies. *British journal of cancer*. 26, 2016 г., Т. 114, 9, стр. 1003-11.
294. Langenskiöld M., Holmdahl L., Falk P., Ivarsson M.L. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *International journal of colorectal disease*. 2005 г., Т. 20, 3, стр. 245-52.
295. BioGPS. *BioGPS*. [В Интернете] 2016 г. <http://biogps.org/>.
296. Björklund M., Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica Biophysica Acta*. 25, 2005 г., Т. 1755, 1, стр. 37-69.
297. Mook O.R., Frederiks W.M., Van Noorden C.J. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014 г., Т. 1705, 2, стр. 69-89.
298. Sund R., Kalluri M. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2009 г., Т. 28, 1-2, стр. 177-83.
299. Brabletz T., Hlubek F., Spaderna S., Schmalhofer O., Hiendlmeyer E., Jung A., Kirchner T. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells, tissues, organs*. 2005 г., Т. 179, 1-2, стр. 56-65.

300. Arnold C.N., Goel A., Blum H.E., Boland C.R. Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer*. 15, 2005 г., T. 104, 10, стр. 2035-47.
301. Ahmed F.E., Ahmed N.C., Vos P.W., Bonnerup C., Atkins J.N., Casey M., Nuovo G.J., Naziri W., Wiley J.E., Mota H., Allison R.R. Diagnostic microRNA markers to screen for sporadic human colon cancer in stool: I. Proof of principle. *Cancer Genomics Proteomics*. 2013 г., T. 10, 3, стр. 93-113.
302. West N.P., Dattani M., McShane P., Hutchins G., Grabsch J., Mueller W., Treanor D., Quirke P., Grabsch H. The proportion of tumour cells is an independent predictor for survival in colorectal cancer patients. *British journal of cancer*. 11, 2010 г., T. 102, 10, стр. 1519-23.
303. Zhang Q.W., Liu L., Gong C.Y., Shi H.S., Zeng Y.H., Wang X.Z., Zhao Y.W., Wei Y.Q. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *Plos*. 2012 г., T. 7, 12, стр. e50946.
304. Ye S.R., Yang H., Li K., Dong D.D., Lin X.M., Yie S.M. Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Modern pathology*. 2007 г., T. 20, 3, стр. 375-83.
305. Wu L., Yu H., Zhao Y., Zhang C., Wang J., Yue X., Yang Q., Hu W. HIF-2 α mediates hypoxia-induced LIF expression in human colorectal cancer cells. *Oncotarget*. 28, 2015 г., T. 6, 6, стр. 4406-17.
306. Cho Y.G., Chang X., Park I.S., Yamashita K., Shao C., Ha P.K., Pai S.I., Sidransky D., Kim M.S. Promoter methylation of leukemia inhibitory factor receptor gene in colorectal carcinoma. *International journal of oncology*. 2011 г., T. 39, 2, стр. 337-44.
307. Mao H., Pan F., Guo H., Bu F., Xin T., Chen S., Guo Y. Feedback mechanisms between M2 macrophages and Th17 cells in colorectal cancer patients. *Tumour biology*. 2016 г., 28.
308. Miller S., Senior P.V., Prakash M., Apostolopoulos V., Sakkal S., Nurgali K. Leukocyte populations and IL-6 in the tumor microenvironment of an orthotopic colorectal cancer model. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2016 г., T. 48, 4, стр. 334-41.
309. Fernández-Marcelo T., Sánchez-Pernaute A., Pascua I., De Juan C., Head J., Torres-García A.J., Iñiesta P. Clinical Relevance of Telomere Status and Telomerase Activity in Colorectal Cancer. *Plos One*. 25, 2016 г., T. 11, 2, стр. e0149626.
310. Jannuzzi A.T., Karaman E., Oztas E., Yanar H.T., Özhan G. Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Gene Variations and Susceptibility of Colorectal Cancer. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2015 г., T. 19, 12, стр. 692-7.
311. Park S.K., Song C.S., Yang H.J., Jung Y.S., Choi K.Y., Koo D.H., Kim K.E., Jeong K.U., Kim H.O., Kim H., Chun H.K., Park D.I. Field Cancerization in Sporadic Colon Cancer. *Gut and liver*. 2016 г., 28.
312. Ostrand-Rosenberg S., Horn L.A., Alvarez J.A. Novel strategies for inhibiting PD-1 pathway-mediated immune suppression while simultaneously delivering activating signals to tumor-reactive T cells. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2015 г., T. 64, 10, стр. 1287-93.
313. Yuan L., Zhou C., Lu Y., Hong M., Zhang Z., Zhang Z., Chang Y., Zhang C., Li X. IFN- γ -mediated IRF1/miR-29b feedback loop suppresses colorectal cancer cell growth and metastasis by repressing IGF1. *Cancer letters*. 1, 2015 г., T. 359, 1, стр. 136-47.

314. Sconocchia G., Eppenberger S., Spagnoli G.C., Tornillo L., Droeser R., Caratelli S., Ferrelli F., Coppola A., Arriga R., Lauro D., Iezzi G., Terracciano L., Ferrone S. NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 3, 2014 r., T. 3, 8, стр. e952197.
315. Song Q., Li C., Feng X., Yu A., Tang H., Peng Z., Wang X. Decreased expression of SCUBE2 is associated with progression and prognosis in colorectal cancer. *Oncology reports*. 2015 r., T. 33, 4, стр. 1956-64.
316. Sheffer M., Bacolod M.D., Zuk O., Giardina S.F., Pincas H., Barany F., Paty P.B., Gerald W.L., Notterman D.A., Domany E. Association of survival and disease progression with chromosomal instability: a genomic exploration of colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*. 28, 2009 r., T. 106, 17, стр. 1731-6.
317. Fang Y., Liang X., Jiang W., Li J., Xu J., Cai X. Cyclin b1 suppresses colorectal cancer invasion and metastasis by regulating e-cadherin. *Plos One*. 11, 2015 r., T. 10, 5, стр. e0126875.
318. Fang Y., Yu H., Liang X., Xu J., Cai X. Chk1-induced CCNB1 overexpression promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer. *Cancer biology and therapy*. 2014 r., T. 15, 9, стр. 1268-79.
319. Liu F., Ji F., Ji Y., Jiang Y., Sun X., Lu Y., Zhang L., Han Y., Liu X. In-depth analysis of the critical genes and pathways in colorectal cancer. *International journal of molecular medicine*. 2015 r., T. 36, 4, стр. 923-30.
320. Hollingsworth S.J., Drye E.R., Tou S.I., Boulos P.B. Expression of angiogenic VEGF-A (soluble isoforms 121, 165) and lymphangiogenic VEGF-C in colorectal cancers with micro-satellite instability. *Journal of surgical oncology*. 15, 2005 r., T. 92, 4, стр. 317-25.
321. Rennoll S.A., Eshelman M.A., Raup-Konsavage W.M., Kawasawa Y.I., Yochum G.S. The MYC 3' Wnt-Responsive Element Drives Oncogenic MYC Expression in Human Colorectal Cancer Cells. *Cancers*. 23, 2016 r., T. 8, 5, стр. E52.
322. Kim H.J., Lee S.Y., Oh S.C. The Inositide Signaling Pathway As a Target for Treating Gastric Cancer and Colorectal Cancer. *Frontiers in physiology*. 9, 2016 r., T. 7, 168.
323. Li Q., Liang X., Wang Y., Meng X., Xu Y., Cai S., Wang Z., Liu J., Cai G. miR-139-5p Inhibits the Epithelial-Mesenchymal Transition and Enhances the Chemotherapeutic Sensitivity of Colorectal Cancer Cells by Downregulating BCL2. *Scientific reports*. 31, 2016 r., T. 6, 27157.
324. Williams C., DiLeo A., Niv Y., Gustafsson J.Å. Estrogen receptor beta as target for colorectal cancer prevention. *Cancer letters*. 1, 2016 r., T. 372, 1, стр. 48-56.
325. Caiazza F., Ryan E.J., Doherty G., Winter D.C., Sheahan K. Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis. *Frontiers in oncology*. 2, 2015 r., T. 5, 19.
326. Barzi A., Lenz A.M., Labonte M.J., Lenz H.J. Molecular pathways: Estrogen pathway in colorectal cancer. *Clinical cancer research*. 1, 2-13 r., T. 19, 21, стр. 5842-8.
327. Lin J.H., Manson J.E., Kraft P., Cochrane B.B., Gunter M.J., Chlebowski R.T., Zhang S.M. Estrogen and progesterone-related gene variants and colorectal cancer risk in women. *BMC medical genetics*. 31, 2011 r., T. 12, 78.

328. Sun S.J., Lin Q., Sun Q., Li J., Zhang X.Y., Tan Z.G., Song Y., Guo Y.T., Li Y. High HER-2 protein levels correlate with clinicopathological features in colorectal cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2016 г., Т. 12, 1, стр. 323-33.
329. van Harten-Gerritsen A.S., Balvers M.G., Witkamp R.F., Kampman E., van Duijnhoven F.J. Vitamin D, Inflammation, and Colorectal Cancer Progression: A Review of Mechanistic Studies and Future Directions for Epidemiological Studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2015 г., Т. 24, 12, стр. 1820-8.
330. Jin W.J., Xu J.M., Xu W.L., Gu D.H., Li P.W. Diagnostic value of interleukin-8 in colorectal cancer: a case-control study and meta-analysis. *World journal of gastroenterology*. 21, 2014 г., Т. 20, 43, стр. 16334-42.
331. Basu S., Haase G., Ben-Ze'ev A. Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis. *F1000research*. 2016 г., Т. 19, 5.
332. Xu M., Wang S., Song Y.U., Yao J., Huang K., Zhu X. Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncology letters*. 2016 г., Т. 11, 5, стр. 3075-80.
333. Wickström M., Dyberg C., Milosevic J., Einvik C., Calero R., Sveinbjörnsson B., Sandén E., Darabi A., Siesjö P., Kool M., Kogner P., Baryawno N., Johnsen J.I. Wnt/ β -catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance. *Nature communications*. 25, 2015 г., Т. 6, 8904.
334. Medema J.P., Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*. 15, 2011 г., Т. 474, 7351, стр. 318-26.
335. Tian H., Biehs B., Warming S., Leong K.G., Rangell L., Klein O.D., de Sauvage F.J. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*. 18, 2011 г., Т. 478, 7368, стр. 255-9.
336. Новик А.А., Камлова Т.А., Цыган В.Н. и Шевченко, Под ред. Ю.Л. *Введение в молекулярную биологию канцерогенеза*. Москва : ГЭОТАР-МЕД, 2004. 5-9231-0364-8.
337. Mughal S., Filipe M.I. Ultrastructural study of the normal mucosa-adenoma-cancer sequence in the development of familial polyposis coli. *Journal of the National cancer institute*. 1978 г., Т. 60, 4, стр. 753-68.
338. Traynor O.J., Costa N.L., Blumgart L.H., Wood C.B. A scanning electron microscopy study of ultrastructural changes in the colonic mucosa of patients with large bowel tumours. 1981 г., Т. 68, 10, стр. 701-4.
339. Schiltz P.M., Beutel L.D., Nayak S.K., Dillman R.O. Characterization of tumor-infiltrating lymphocytes derived from human tumors for use as adoptive immunotherapy of cancer. *Journal of immunotherapy*. 1997 г., Т. 20, 5, стр. 377-86.
340. Smith C.L., Dulphy N., Salio M., Cerundolo V. Immunotherapy of colorectal cancer. *British medical bulletin*. 2002 г., 64, стр. 181-200.

341. Strauss J.F., Barbieri R.L. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*. Philadelphia : Saunders, 2009. 978-1-4160-4907-4.
342. Li Z., Zhang W., Mulholland M.W. LGR4 and Its Role in Intestinal Protection and Energy Metabolism. *Frontiers in endocrinology*. 25, 2015 г., Т. 6, 131.
343. Łukasiewicz D., Chodorowska M., Jakubowska I. Obesity as a factor in the development of cancer in type 2 diabetes. *Polski Merkurusz Lekarski*. 2015 г., Т. 38, 225, стр. 135-9.
344. Jonchère B., Vétillard A., Toutain B., Guette C., Coqueret O.. Contribution to tumor escape and chemotherapy response: A choice between senescence and apoptosis in heterogeneous tumors. *Bulletin du cancer*. 2016 г., Т. 103, 1, стр. 73-86.
345. Sturm I., Petrowsky H., Volz R., Lorenz M., Radetzki S., Hillebrand T., Wolff G., Hauptmann S., Dörken B., Daniel P.T. Analysis of p53/BAX/p16(ink4a/CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16(ink4a/CDKN2) identifies patients with good prognosis. *Journal of clinical oncology*. 15, 2001 г., Т. 19, 8, стр. 2272-81.
346. Tamm I., Schumacher A., Karawajew L., Ruppert V., Arnold W., Nüssler A.K., Neuhaus P., Dörken B., Wolff G. Adenovirus-mediated gene transfer of P16INK4/CDKN2 into bax-negative colon cancer cells induces apoptosis and tumor regression in vivo. *Cancer gene therapy*. 2002 г., Т. 9, 8, стр. 641-50.
347. Jagadish N., Parashar D., Gupta N., Agarwal S., Purohit S., Kumar V., Sharma A., Fatima R., Topno A.P., Shaha C., Suri A. A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) a promising therapeutic target of colorectal cancer. *Journal of experimental and clinical cancer research*. 21, 2015 г., Т. 34, 142.
348. Korenaga D1, Orita H, Maekawa S, Itasaka H, Ikeda T, Sugimachi K. Relationship between hormone receptor levels and cell-kinetics in human colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 1007 г., Т. 44, 13, стр. 78-83.
349. Селье Г. *Стресс без дистресса*. Москва : Прогресс, 1979. стр. 123.
350. Федянин М.Ю., Хмелькова Д.Н., Серебрянская Т.С., Никольская Т.А., Тюляндин С.А. Стволовые опухолевые клетки рака толстой кишки. *Злокачественные опухоли*. 2015 г., 4, спецвыпуск, стр. 71-81.
351. Maskens A.P., Deschner E.E. Tritiated thymidine incorporation into epithelial cells of normal-appearing colorectal mucosa of cancer patients. *Journal of the national cancer institute*. 1977 г., Т. 58, 5, стр. 1221-4.
352. Vose B.M., Moore M., Schofield P.F., Dymock I.W. Leucocytotoxicity in malignant and non-malignant colonic diseases. *Clinical and experimental immunology*. 1975 г., Т. 22, 3, стр. 393-8.
353. Dawson P.A., Filipe M.I. An ultrastructural and histochemical study of the mucous membrane adjacent to and remote from carcinoma of the colon. *Cancer*. 1976 г., Т. 37, 5, стр. 2388-98.
354. Filipe M.I. Mucous secretion in rat colonic mucosa during carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. A morphological and histochemical study. *British journal of cancer*. 1975 г., Т. 32, 1, стр. 60-77.