

Гончаров Сергей Владимирович

**КЛИНИКО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФЕНОТИПЫ
КАК ОСНОВА ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ПОДХОДА
К ЛЕЧЕНИЮ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

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

Москва – 2024

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

Научный консультант:

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор
Солодкий Владимир Алексеевич

Официальные оппоненты:

- доктор медицинских наук **Кузьмичев Дмитрий Владимирович**, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отделение абдоминальной онкологии №3 (колопроктологии), ведущий научный сотрудник;
- доктор медицинских наук **Новикова Инна Арнольдовна**, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель генерального директора по науке;
- доктор медицинских наук **Цуканов Алексей Сергеевич**, ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел лабораторной генетики, руководитель отдела.

Ведущая организация: ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « 24 » июня 2024 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.056.01 при ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул. Профсоюзная, д.86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул. Профсоюзная, д.86 (www.mncrr.ru)

Автореферат разослан « ___ » мая 2024 г.

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

Цаллагова З.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Проблемы диагностики и лечения колоректального рака остаются актуальными ввиду сохранения его лидирующих позиций в структуре онкологической заболеваемости. Распространенность КРР, если оценивать эпидемиологические показатели рака ободочной кишки, за последние 10 лет в РФ выросла с 116,7 до 161,0 чел. на 100 тыс. населения, а прямой кишки, соответственно, с 90,4 до 121,1 чел. [Каприн А.Д. и соавт., 2022]. Эти данные свидетельствуют о том, что задача его своевременного выявления так окончательно и не решена.

Приступая к данной работе, мы исходили из того, что должны максимально приблизиться к решению задач вторичной и третичной профилактики колоректального рака, связанных со своевременным выявлением предраковых заболеваний и самой колоректальной аденокарциномы, а также потенциальной метастатической болезни возможно, оценивая патологические изменения, происходящие в слизистой оболочке толстой кишки как системные. Толстая кишка является как анатомически, так и фенотипически неоднородным органом, что обусловлено вовлечением всех трех зародышевых листков в ее эмбриогенез. Начиная с процесса гаструляции, эти листки развиваются одновременно, непрерывно передавая друг другу молекулярные сигналы до окончательного формирования толстой кишки как органа. Процессы формирования толстой кишки контролируются различными молекулярными путями (Wnt, BMP, системы Notch и Hedgehog), физиологическое функционирование которых имеет решающее значение для нормального развития кишечника. Результаты молекулярно-генетических исследований позволяют лучше понять закономерности канцерогенеза и развития прогрессирования при КРР.

Внедрение молекулярных методов в клиническую практику является необходимым условием повышения качества диагностики КРР. Исследование фенотипов колоректальной аденокарциномы может послужить основой для определения новых подходов к совершенствованию программ лечения и прогноза. В настоящее время уже существует ряд систем молекулярной диагностики КРР, однако наиболее распространенными методами диагностики патологии толстой кишки по-прежнему остаются фиброэндоскопия и фекальные тесты на скрытую кровь с присущими им недостатками.

Варианты лечения колоректального рака, согласно основным отечественным и международным рекомендациям, зависят от его стадии в системе TNM. Но очевидно также, что в пределах одной и той же стадии и гистологического варианта аденокарциномы скрывается несколько молекулярных разновидностей КРР, которые формируют его биологическое разнообразие вследствие комбинации нарушений в различных молекулярных сигнальных путях, запускающих механизмы канцерогенеза.

Вариабельность данных изменений в существенной мере определяет прогноз течения колоректального рака, а также диктует необходимость учитывать его молекулярные характеристики при разработке стратегии лечения и последующего наблюдения. Как ни парадоксально, но существенные сложности в выборе тактики лечения представляют пациенты с второй стадией КРР (при $pT_3N_0M_0$ и особенно в сочетании с «факторами риска прогрессирования»). Именно у пациентов данной группы оценка дополнительных молекулярных характеристик КРР представляется особенно перспективной. В ряде научных публикаций, посвященных оценке эффективности терапии КРР показано, что отдаленные результаты лечения ПВ/ПС стадии часто хуже, чем ПС [Pei JP et al., 2021]. Не будет преувеличением сказать, что на сегодняшний день существует острая практическая необходимость оценки прогноза и риска прогрессирования КРР в целях формирования индивидуальных подходов при построении стратегии лечения и наблюдения для своевременного выявления метастатической болезни. Необходимым условием при этом является определение новых характеристик злокачественной опухоли вне патоморфологической стадии И здесь основная роль принадлежит молекулярно-генетическим исследованиям, которые не ограничились изучением непосредственно самой опухоли, но и распространились на ее окружение, выявляя механизмы, которыми они взаимодействуют между собой.

Интеграция молекулярно-генетических данных в комплексные программы диагностики и оценки прогноза при КРР позволит существенно повысить их информативность, а, значит, позволит влиять на результаты лечения. Внедрение в клиническую практику новых диагностических алгоритмов и методов, направленных на индивидуализацию подходов при выборе стратегии терапии и наблюдения пациентов, является актуальной задачей современной онкопроктологии.

Цель исследования

Реализация возможностей дифференцированного подхода к лечению и профилактике прогрессирования колоректального рака на основе определения молекулярно-генетических показателей различных эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки.

Задачи исследования

1. Изучить экспрессионный статус морфологически неизменной слизистой эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки в норме, при возникновении гиперпролиферативных изменений в ней и при развитии колоректального рака;
2. Выявить молекулярно-генетические особенности колоректальной аденокарциномы, связанные с ее расположением в различных эмбрионально-анатомических отделах толстой кишки;

3. Улучшить возможности выявления патологических изменений слизистой толстой кишки на основе исследования экспрессионного профиля клеточного материала слизистой прямой кишки;
4. Уточнить влияние соматических мутаций генов семейства *RAS* на молекулярный фенотип колоректального рака в локальных стадиях;
5. Изучить взаимосвязь клинико-морфологических и молекулярно-генетических характеристик аденокарциномы с отдаленными результатами лечения КРР для прогнозирования риска его прогрессирования;
6. Провести объективную стратификацию риска прогрессирования колоректального рака с разработкой математических прогностических моделей и кластеризацию полученных данных с формированием молекулярных фенотипов на основании изучения морфологических данных, экспрессионного и мутационного профиля опухоли;
7. Определить критические значения показателей экспрессии мРНК генов, формирующих прогностическую математическую модель прогрессирования колоректального рака;
8. Разработать предложения и рекомендации по совершенствованию третичной профилактики КРР на основе использования разработанных клинико-молекулярных фенотипов и математических моделей оценки риска его прогрессирования.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное молекулярно-генетическое исследование у пациентов с КРР локальных стадий, включившее оценку фенотипических профилей аденокарциномы и морфологически неизменной слизистой по уровню экспрессии мРНК 62 генов; определение мутационного статуса генов *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и оценку микросателлитной нестабильности (MSI) в образцах колоректальной аденокарциномы; оценку экспрессионных профилей в материале щеточной биопсии слизистой прямой кишки, а также сопоставление полученных данных с результатами исследований, проведенных в контрольных группах.

Определены особенности экспрессии образцов щеточного соскоба неизменной слизистой оболочки прямой кишки при колоректальном раке, предраковых, гиперпролиферативных, воспалительных заболеваниях толстой кишки, а также при отсутствии патологии слизистой в ней.

Обоснована целесообразность проведения молекулярно-генетического исследования с определением уровней экспрессии мРНК ряда генов в образцах щеточной биопсии слизистой нижнеампулярного отдела прямой кишки.

Разработан новый метод молекулярно-генетической диагностики патологии толстой кишки, включающий выявление КРР, неспецифического язвенного колита, а также предраковых заболеваний в виде аденоматозных полипов.

Получены значимые результаты, свидетельствующие о появлении молекулярно-генетических изменений в опухоли, зависящие от эмбрионально-анатомического отдела толстой кишки, в котором она возникла, и формирующих прогноз течения КРР.

На основании показателей экспрессии 10 генов: *MYC*, *BAG1*, *ESR1*, *STK15*, *PAPPA*, *IL1b*, *IFNG*, *CD56*, *CD69*, *HLA-G5* разработана прогностическая математическая модель прогнозирования факторов риска у пациентов со II стадией КРР с точностью 93,8%, специфичностью 97,8% и чувствительностью 85%, позволяющая реализовать дифференцированную лечебную тактику в этой подгруппе: рассматривать возможность отказа от проведения адъювантной химиотерапии при отсутствии молекулярных факторов риска.

Для относительных уровней экспрессии мРНК генов *GRB7*, *Ki67*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3*, являющихся объясняющими переменными в разработанной модели, определены критические пороговые значения, которые определяют прогноз при колоректальном раке.

Охарактеризована неоднородность влияния на прогрессирование колоректального рака после лечения соотношения числа пораженных лимфатических узлов к общему числу удаленных в операционном препарате, определяемая относительным уровнем экспрессии *CD58* в аденокарциноме.

Изучена и оценена гетерогенность влияния на риск прогрессирования клиничко-морфологических факторов высокого риска, выделенных международными и национальными клиническими рекомендациями (степень дифференцировки, лимфоваскулярная инвазия, кишечная непроходимость, наличие перфорации или положительного края резекции), зависящая от изменения экспрессии *CTSL2*.

Установлены статистически значимые отличия уровней экспрессии мРНК генов: *MGB*, *HER2*, *BAG1*, *PGR*, *SCUBE2*, *MMP2*, *PAPPA*, *IL12a*, *IL7*, *IL15*, *IL8*, *IL1b*, *CD45*, *VEGFA189*, *TLR7*, *GATA3* в неизменной слизистой оболочке толстой кишки в зависимости от эмбрионально-анатомического отдела толстой кишки и определены пороговые значения для: *VEGFA189* (пороговое значение 8,508) и *MMP2* (пороговое значение 13,364). Снижение относительного уровня экспрессии ниже выявленных пороговых значений характерно для левых отделов толстой кишки.

Впервые обнаружено проявление гиперэкспрессии гена *HER2* в колоректальной аденокарциноме, характерное для «дикого» типа *KRAS*.

Эффективность мер третичной профилактики колоректального рака в отношении своевременного выявления прогрессирования заболевания повышается при исследовании уровней экспрессии мРНК генов *GRB7*, *Ki67*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* в образцах из аденокарциномы. Профиль экспрессии этих генов участвует в формировании индивидуального прогноза пациентов с КРР, реализуя таким образом дифференцированную лечебно-диагностическую стратегию в локальных стадиях этого заболевания.

Практическая значимость работы

В результате проведенной работы разработаны комплексные предложения, направленные на повышение эффективности мер вторичной и третичной профилактики колоректального рака.

Усовершенствование вторичной профилактики достигнуто путем разработки нового метода молекулярно-генетической дифференциальной диагностики патологии толстой кишки, включающей в себя как выявление колоректального рака, так и неопухолевых, а также воспалительных заболеваний ободочной и прямой кишки. Разработанный метод может быть использован при обследовании контингентов фокусных групп риска путем молекулярно-генетического исследования клеточного материала щеточной биопсии слизистой прямой кишки, полученного в простых амбулаторных условиях, не требующих специального оснащения и предварительной подготовки пациента с подозрением на патологию в толстой кишке.

Повышение эффективности мер третичной профилактики колоректального рака достигается использованием разработанной прогностической математической модели риска его прогрессирования с включением клинико-патоморфологических показателей аденокарциномы и оценкой экспрессии мРНК генов *GRB7*, *Ki67*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* в опухолевых образцах, для которых определены критические пороговые значения, формирующие индивидуальный прогноз при КРР.

Обоснована необходимость исследования уровней экспрессии 15 генов для формирования молекулярных фенотипов КРР, формирующих группы риска по его прогрессированию. В том числе 7 генов из образцов опухоли: *MMP7*, *MMP11*, *MMP2*, *IL8*, *IGF2*, *MYC*, *CD68* и 8 генов из образцов неизменной слизистой оболочки толстой кишки при КРР: *GREM1*, *MMP8*, *HLA-G5*, *LGALS1*, *BAX*, *CCND1*, *BAG1*, *TLR2*.

Выявленное в результате работы появление гиперэкспрессии гена *HER2* в колоректальной аденокарциноме, характерное для «дикого» типа *KRAS*, формирует специфический молекулярный фенотип.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. Профили экспрессии мРНК в панели 62 изученных генов, участников основных сигнальных путей канцерогенеза при колоректальном раке значимо различаются во всех трех эмбрионально-анатомических отделах толстой кишки и достоверно меняются с возрастом. Показатели экспрессии генов *TERT*, *HLA-G5*, *P14ARF*, *GNLV* формируют молекулярный профиль, характерный для возрастной подгруппы «старше 60 лет» с высокими эпидемиологическими показателями выявления КРР.

2. Изменение профилей экспрессии мРНК в образцах из опухоли и слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста при КРР может быть использовано в качестве объясняющих переменных математических моделей оценки риска прогрессирования наряду с патоморфологическими показателями

колоректальной аденокарциномы. Комплексная оценка результатов молекулярно-генетического и патоморфологического исследований этих образцов значительно повышает точность прогностических математических моделей исхода течения КРР.

3. Во всех эмбрионально-анатомических отделах толстой кишки слизистая оболочка при инициации процесса канцерогенеза, начиная с предопухолевых изменений, характеризуется особым профилем экспрессии генов-участников сигнальных путей, который значимо отличается от такового в нормальной слизистой здоровых людей и коррелирует с глубиной инвазии колоректальной аденокарциномы, характером регионарного метастазирования (показатели Т и N по системе TNM), а также частотой прогрессирования.

4. Экспрессионные профили, характерные для каждого эмбрионально-анатомического отдела толстой кишки и значимо различающиеся в норме, при развитии колоректального рака теряют эти различия, формируя новый специфический профиль, характерный для КРР, что позволяет характеризовать его как системное заболевание с возникновением молекулярных изменений на всем протяжении слизистой оболочки.

5. Патоморфологические и клинические предикторы риска прогрессирования (метастазирования) при колоректальном раке, такие как низкая дифференцировка опухоли (G3), ангиолимфатическая и периневральная инвазия, менее 12 лимфатических узлов в удаленном препарате, положительный край резекции препарата, определяют этот риск с точностью прогноза до 50,62% и могут быть описаны прогностической математической моделью. Включение в прогностическую математическую модель в качестве объясняющих переменных показателей экспрессии мРНК в образцах из аденокарциномы генов *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* повышает точность прогноза развития прогрессирования КРР до 80,6% на 36-месячном периоде наблюдения от момента установки диагноза.

6. Изучение молекулярно-генетических характеристик аденокарциномы и слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста при колоректальном раке позволяет сформировать его фенотипы с благоприятным, неблагоприятным и неопределенным прогнозом в отношении развития метастатической болезни, которые необходимо учитывать при оценке эффективности стратегий лечения.

7. Повышение эффективности мер вторичной профилактики колоректального рака в части создания диагностических тестов, направленных на выявление КРР и предопухолевых заболеваний толстой кишки любой локализации, может быть достигнуто молекулярно-генетическим исследованием образцов слизистой нижнеампулярного отдела прямой кишки, полученной путем щеточной биопсии.

8. Комплекс мер, направленных на своевременное выявление метастатической болезни, может быть усовершенствован использованием прогностических математических моделей оценки риска прогрессирования, точность которых повышается включением в них в качестве объясняющих переменных молекулярно-генетических показателей колоректальной аденокарциномы и неизменной слизистой оболочки толстой кишки при колоректальном раке.

Внедрение результатов работы

Результаты исследования внедрены в клиническую практику научно-исследовательского отдела хирургии и хирургических технологий в онкологии ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» МЗ РФ. Материалы диссертации используются в лекциях и практических занятиях со студентами кафедры онкологии и рентгенодиагностики Российского университета дружбы народов (РУДН).

Апробация работы

Результаты исследования обсуждены на съезде хирургов юга России: «Симультанные операции при синхронном метастатическом поражении печени колоректальным раком» г. Пятигорск, 21-22 октября 2021 г., V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, Москва, 18 декабря 2019 г., международном онкологическом форуме «Белые ночи 2019», Санкт-Петербург, 20-23 июня 2019 г., Общероссийской конференции «Современная онкология из центра в регионы- II», Курск, 26 мая 2022 г., ASCO Annual Meeting June 3-7, 2022, McCormick Place, Chicago, IL, V Международном Форуме Онкологии и Радиотерапии, Москва, 19-23 сентября 2022, VI Международном Форуме Онкологии и Радиотерапии, Москва, 11-14 сентября 2023.

Апробация диссертации состоялась 20 апреля 2023 года на заседании Ученого совета ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России.

Публикации

По результатам диссертации опубликовано 18 печатных работ: из них 11 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации

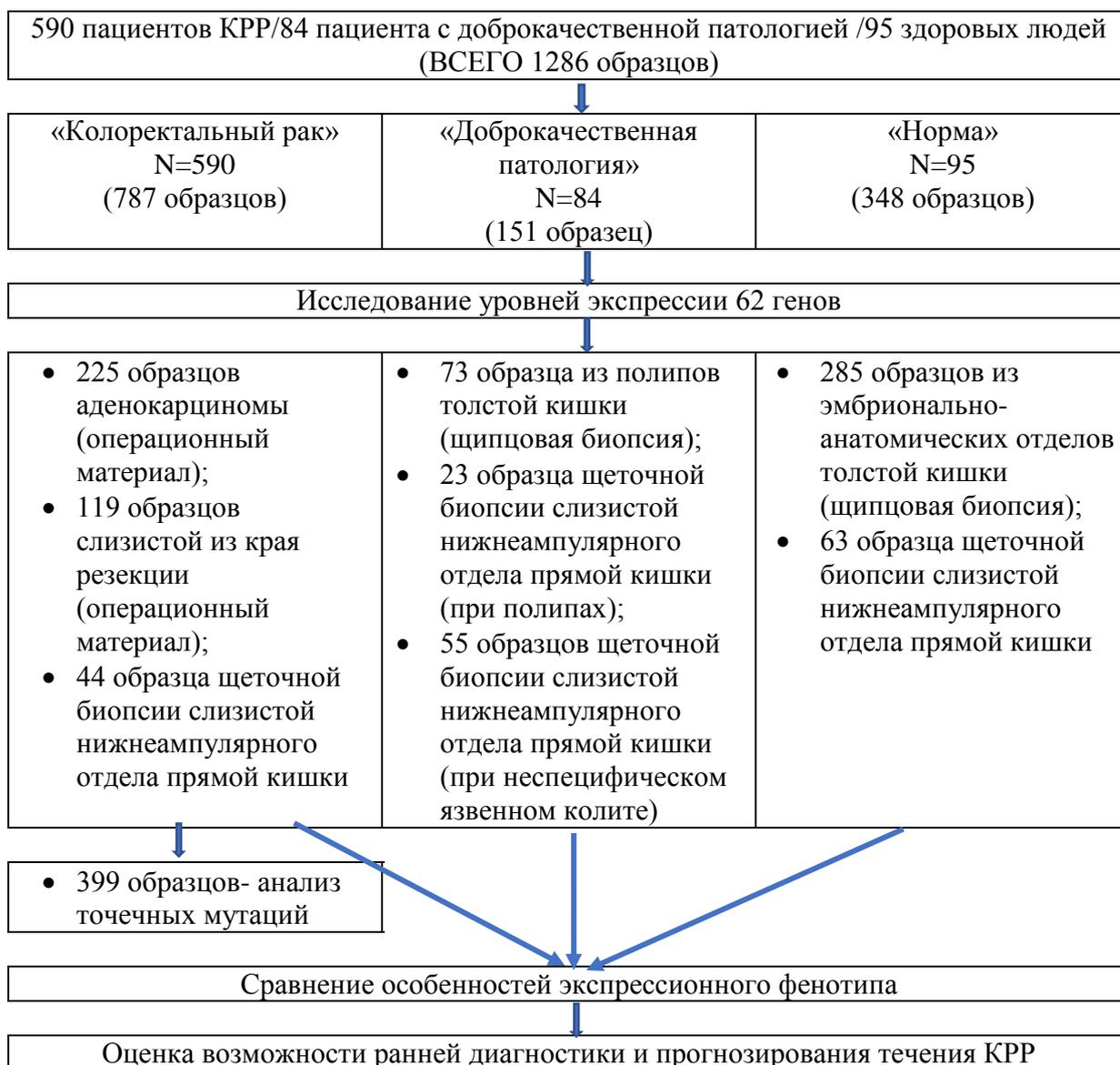
Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материал и методы исследования, клиничко-морфологическая характеристика обследованных пациентов, молекулярно-генетическая характеристика слизистой толстой кишки в норме и патологии), выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Текст диссертации изложен на 285 страницах машинописного текста, иллюстрирован 76 таблицами, 19 диаграммами, 26 рисунками. Библиографический указатель включает 338 источников: из них 14 русскоязычных, 314 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общая характеристика работы

В работе изучены и обобщены результаты молекулярно-генетических исследований 1286 биологических образцов, полученных от пациентов с колоректальным раком, полипами толстой кишки различных гистологических форм, больных, страдающих от неспецифического язвенного колита и здоровых людей (**рисунок 1**).

Рисунок 1. Дизайн исследования



Основная исследуемая группа («Колоректальный рак») представлена 787 биологическими образцами, полученными от 590 человек, проходивших в ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ с 2011 по 2021 год лечение резектабельного колоректального рака 0-III стадии различных локализаций (**диаграмма 1**, **диаграмма 2**). В анализируемый материал группы «Доброкачественная патология» вошли 73 образца неизменной слизистой у пациентов с выявленными полипами ободочной кишки и 55 образцов от пациентов с

верифицированным диагнозом неспецифического язвенного колита. 348 образцов слизистой получены от 95 здоровых людей (группа «Норма»), сопоставимых по полу и возрасту с пациентами КРР (285 образцов биопсийного материала из неизменной слизистой при колоноскопии: по 3 образца, соответственно, из правой, левой половины ободочной и нижнеампулярного отдела прямой кишки и 63 дополнительных образца слизистой, полученных путем щеточной биопсии нижнеампулярного отдела прямой кишки)

Диаграмма 1. Структура локальных стадий КРР (%), N= 590

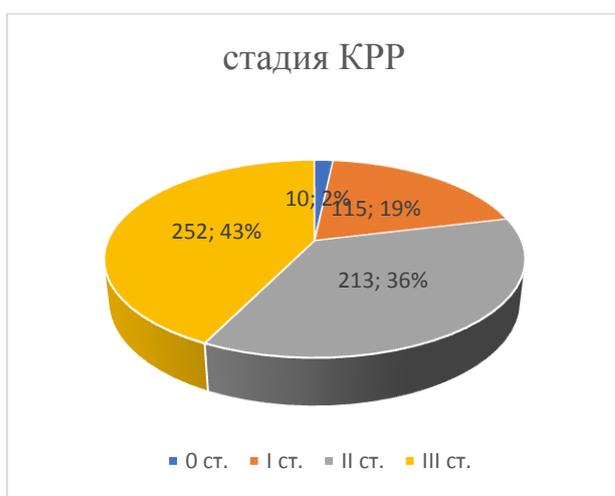
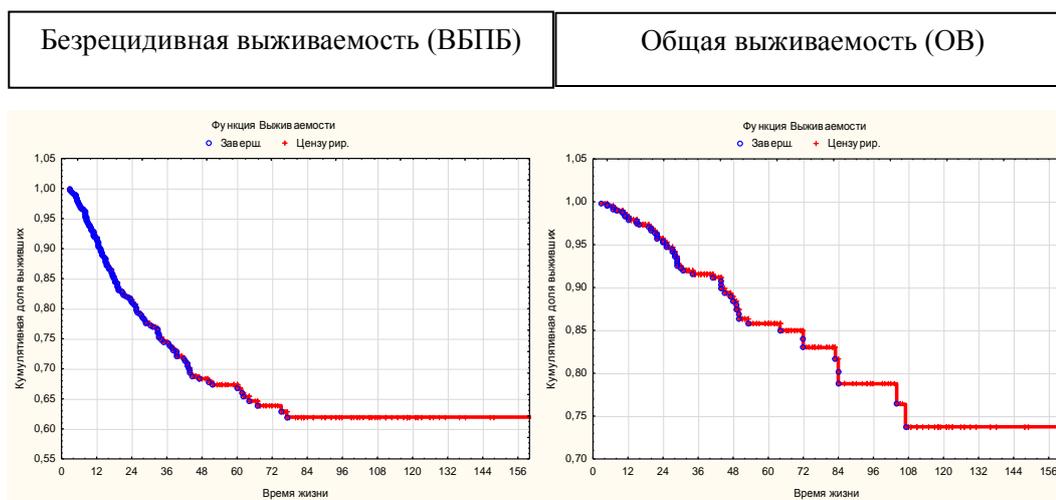


Диаграмма 2. Локализация опухоли по отделам толстой кишки (%), N= 590



На рисунке 2 представлена общая и безрецидивная выживаемости пациентов с КРР, включенных в исследование.

Рисунок 2. Общая (ОВ) и безрецидивная выживаемость (ВБПБ) в исследовании



План лечения каждого пациента с КРР утверждался онкологическим консилиумом в соответствии с собственными, утвержденными Ученым

Советом РНЦРР, протоколами лечения рака ободочной и прямой кишки. Протоколы соответствуют Клиническим Рекомендациям Минздрава РФ и Практическим рекомендациям Российского общества клинической онкологии, являясь актуальными на момент проведения лечения. За 10-летний период лечения пациентов в нашем исследовании (с 2011 по 2021 гг.), безусловно, произошло совершенствование соответствующих стратегий лечения. Согласно задачам исследования, отдаленные результаты отслежены у всех 590 (100%) пациентов, в него включенных. Средние сроки наблюдения составили $44,2 \pm 27,56$ мес. (от 13 до 161 месяца). В настоящий момент дифференцированная стратегия лечения КРР во II стадии реализуется при оценке клиничко-морфологических факторов риска и микросателлитной нестабильности.

Методика расчета уровня относительной экспрессии мРНК исследуемых генов по контрольным генам

Образцы биологического материала сразу после получения помещали в раствор Ever Fresh RNA (“Клоноген”, Россия), позволяющий предотвратить разрушение РНК. Выделение суммарной РНК проводили по протоколу производителя с помощью набора RNeasy Mini Kit (“QIAGEN”, Германия). РНК элюировали в 100 мкл DEPC-обработанной воды. Концентрация РНК в конечном растворе составляла 35-40 мкг/мл. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР проводили, используя ген-специфичные праймеры, наборы реагентов, протоколы и оборудование «НПФ ДНК-Технология» (Россия). Транскрипцию комплементарной ДНК проводили при температуре 40°C в течение 30 мин, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 мин. Методом ПЦР «в реальном времени» мы провели исследование уровня экспрессии мРНК панели генов – маркеров пролиферации, апоптоза, транскрипции, дифференцировки, межклеточных взаимодействий, иммунного статуса, факторов роста и многофункциональных генов (63 функциональных гена и 3 контрольных).

Аmplификацию выполняли в режиме «реального времени» в объеме 12 мкл по следующей программе: 15 циклов – 80°C 5 сек, 94°C 5 сек; 1 цикл – 94°C 5 мин; 5 циклов – 94°C 30 сек, 64°C 20 сек; 45 циклов – 94°C 10 сек, 64°C 20 сек. ДНК-зонды, которые использовали для детекции, были помечены флуоресцентным красителем FAM. Измерение уровня флуоресценции продуктов амплификации исследуемых и контрольных генов проводили на каждом цикле при температуре 64°C. Контрольные гены *GUSB*, *B2M* и *HPRT1* были подобраны экспериментально таким образом, чтобы диапазон экспрессии контрольных генов перекрывал диапазон экспрессии всех исследуемых генов. По контрольным генам методом сравнения индикаторных циклов (Cp) рассчитывали уровень экспрессии мРНК в каждом исследуемом биологическом образце, используя стандартную методику, предложенную в работе Vandesompele [Vandesompele J. et al., 2002].

Методы статистического анализа данных

Статистическая обработка выполнена с использованием программ StatSoft Statistica v.10 и Jamovi v.2.3.28. При описании количественных переменных использовались медиана и межквартильный размах в формате Me [LQ;UQ] в случае ненормального распределения изучаемого признака, а также средние значения со стандартным отклонением ($M \pm SD$) в случае его нормального распределения. Сравнение признаков в случае ненормального распределения проводилось с помощью 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 критерия Краскела-Уоллиса для множественных сравнений, а также дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бонферрони или Тьюки 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-Уилкса. Для анализа общей и безрецидивной выживаемости использовались методы Каплан-Майера, сравнение кривых выживаемости выполнялось методом Log-Rank.

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 $p < 0,05$.

Для построения регрессионных моделей использовался метод PLS-SEM (partial least squares - structural equation modeling) который позволяет избежать негативного влияния включения в модель сильно коррелирующихся параметров. Данная модель не чувствительна к характеристикам распределения переменных. Латентными переменными являлись показатели экспрессии панели исследуемых генов, полученные при анализе образцов как самой опухоли так и максимально удаленного от опухоли края резекции, который считали и подтверждали данными гистологического исследования как морфологически неизменную слизистую толстой кишки. Эти данные, наряду с традиционно значимыми для прогнозирования показателями (гистологическая форма КРР, степень дифференцировки аденокарциномы, наличие ангиолимфатической и лимфоваскулярной инвазии, лимфогенного

метастазирования, наличия/отсутствия мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и микросателлитной нестабильности, локализация опухоли в различных отделах толстой кишки), были положены в основу прогностических моделей.

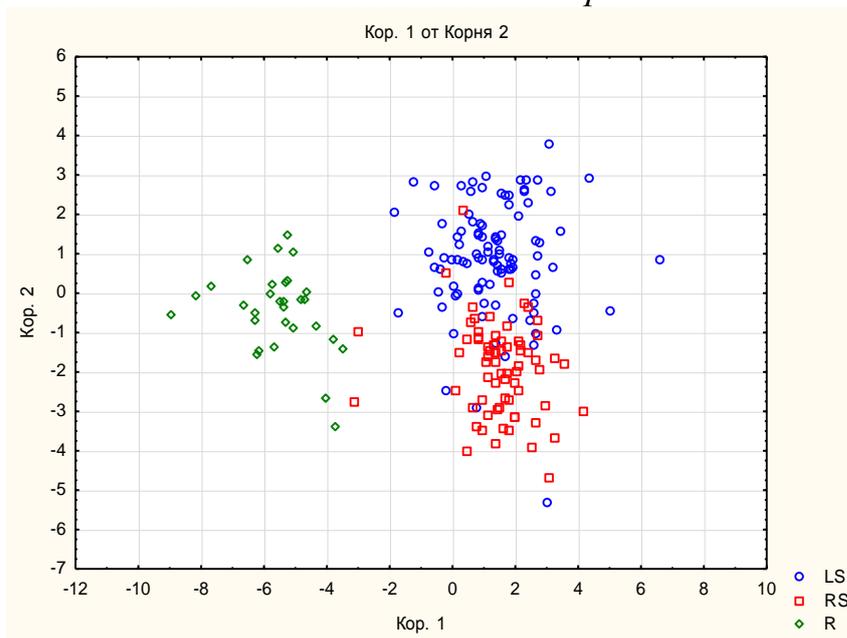
Для детальной оценки результатов применялся анализ IMPA (Importance-Performance Map Analysis) [Rigdon E., 2011]. Он использовался в финальной части анализа и позволял строить точечные графики, одна ось которых представляет производительность (performance) или же реальное влияние переменных, а вторая – их значимость в целом.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Молекулярно-генетическая оценка образцов неизменной слизистой оболочки толстой кишки в норме и при КРР

Сравнение профилей экспрессии образцов неизменной слизистой оболочки толстой кишки у здоровых людей методом дискриминантного анализа, отобранных путем щипцовой биопсии во время колоноскопии из трех эмбрионально-анатомических отделов, выявило четкое разделение молекулярных экспрессионных фенотипов слизистой, характерных для естественной эмбрионально-анатомической асимметрии толстой кишки **рисунок 3**.

Рисунок 3. График двух канонических функций для образцов *из* различных отделов толстой кишки в норме

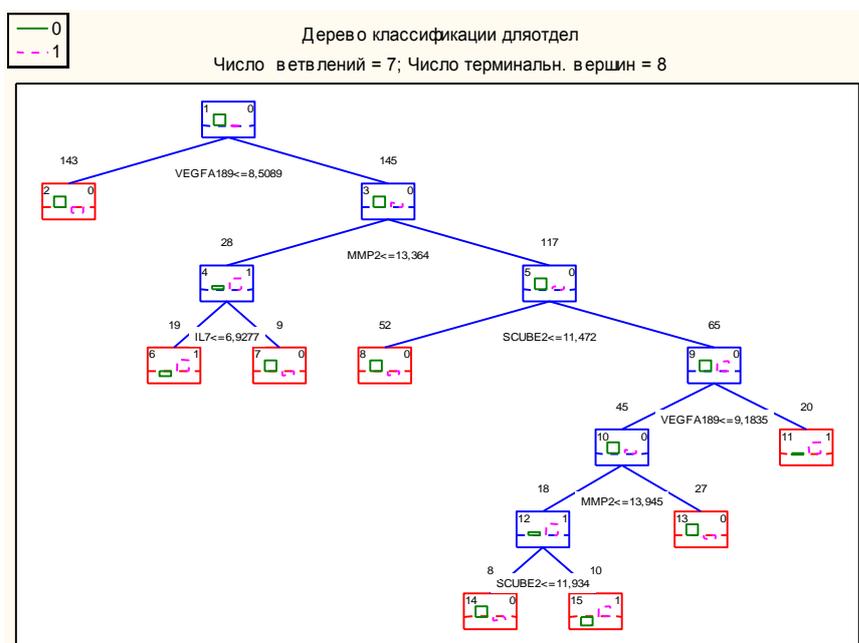


Где: LS- образцы из левой ободочной кишки, R- образцы из правой ободочной кишки, R- образцы из прямой кишки

Нами была сформирована математическая модель определения принадлежности исследуемых образцов нормальной слизистой оболочки к эмбрионально-анатомическому отделу толстой кишки, используя в качестве объясняющих переменных показатели экспрессии в них мРНК генов. Значимые различия были получены для уровней экспрессии 16 генов: *MGB*,

HER2, BAG1, PGR, SCUBE2, MMP2, PAPP, IL12a, IL7, IL15, IL8, IL1b, CD45, VEGFA189, TLR7, GATA3. Используя выявленные различия, было построено бинарное дерево классификации, для выявления пороговых значений экспрессии генов, статистически значимо различающихся в эмбрионально-анатомических отделах.

Рисунок 4. Дерево классификации экспрессионных отличий по эмбрионально-анатомическим отделам толстой кишки в норме



Первый «узел» деления на отделы связан с низким уровнем экспрессии *VEGFA189* - ниже порогового значения 8,508. Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) является высокоспецифичным фактором для эндотелиальных клеток сосудов [Nakamura M. et al. 2002]. На этапе формирования толстой кишки у зародыша *VEGFA189* влияет на эпителиально-мезенхимальные взаимодействия слоев первичной кишечной трубки, чем и объясняется различные уровни его экспрессии в зависимости от эмбрионально анатомического отдела. Второй ген, оказывающий высокое влияние - *MMP2*. Снижение ее экспрессии ниже 13,364 классифицирует образец как принадлежащий к «левым» отделам кишки. Общая точность классификации составила 92%. Оценивая полученные результаты, отметим, что в образцах слизистой толстой кишки у здоровых людей обнаружены характерные отличия профилей экспрессии мРНК вышеуказанных генов для правых и левых отделов ободочной кишки между собой и особый молекулярный профиль, характерный для прямой кишки и определяющийся с точностью до 100%.

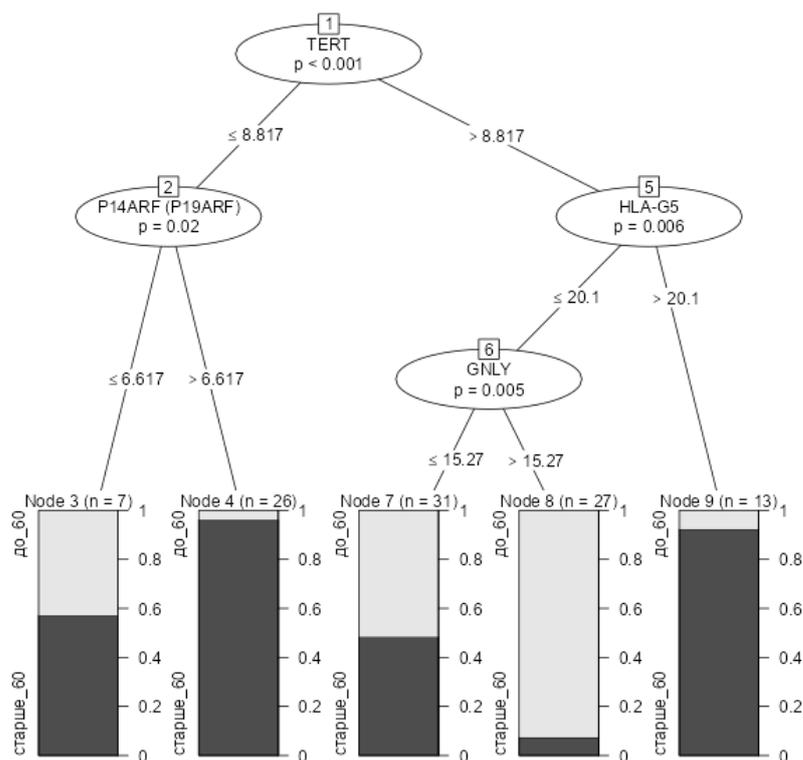
Здоровые люди, образцы слизистой толстой кишки которых изучался в работе, имели возраст от 39 до 75 лет (средний 60,1+7,25 года). Пожилой возраст является одним из наиболее изученных факторов риска развития рака, в том числе колоректального. Мы предположили, что исследование и

понимание механизмов тканевого старения слизистой толстой кишки может иметь большое клиническое значение в отношении вторичной профилактики колоректального рака.

Ориентируясь на эпидемиологические данные о повышении риска развития КРР после 60 лет, мы решили выяснить, как различаются профили экспрессии до и после достижения этого возраста. С этой целью нами была сформирована математическая модель, где целевой переменной служил пороговый возраст здорового человека, определенный нами в 60 лет. Модель в качестве объясняющих переменных сформировали показатели экспрессии 12 генов: *TERT*, *HER2*, *GNLY*, *P14ARF* (*P19ARF*), *PAPPA*, *IL1b*, *TNFa*, *VEGFA121*, *VEGFA189*, *HLA-G5*, *GATA3*, *LGALS1*.

Для решения задачи возможности разделения пациентов на возрастные подгруппы до и после 60 лет мы построили дерево бинарной классификации (рисунок 5).

Рисунок 5. Дерево бинарной классификации по пороговому возрасту «60 лет»



Можно предположить, что с увеличением возраста в слизистой толстой кишки у здоровых людей происходят изменения уровня экспрессии ряда генов. Данные изменения имеют определенные закономерности, которые можно характеризовать не только как естественно возрастные (эпигенетические), но и характерные для увеличения риска развития КРР. Помимо гетерогенности молекулярных и биологических вариантов КРР, выявлено, что опухолевые клетки могут также обходить репликативное старение и приобретать способность поддерживать неограниченную

пролиферацию. Взаимодействие теломер/теломеразы является важным механизмом, участвующим в клеточном репликативном потенциале, и его дисфункция играет ключевую роль в онкогенезе. Сокращение теломер из-за клеточной пролиферации может быть ускорено специфическими изменениями в генах, вовлеченных в канцерогенез при КРР, таких как *APC* и *MSH2*. Активация теломеразной обратной транскриптазы (*TERT*), каталитического компонента теломеразного комплекса, позволяет опухолевым клеткам неограниченно расти за счет сохранения длины теломер, что способствует образованию/прогрессированию опухоли [Bertorelle R et al., 2014]. Обращает на себя внимание гиперэкспрессия гена *GNLY* с критическим значением более 15,27 в группе здоровых людей моложе 60 лет. Кодируемый им белок является членом семейства сапозиноподобных белков (*SAPLIP*) и находится в цитотоксических гранулах Т-клеток, которые высвобождаются при стимуляции антигеном. Этот белок обладает антимикробной активностью, что может объяснить более частые нарушения микробиоты в старшей возрастной группе. Участие в этом каскаде гена-онкосупрессора *PI4ARF* позволяет предположить повышенную митогенную стимуляцию в этой группе и инициацию апоптоза р53-зависимого клеточного цикла. Анализируя состав генов-участников созданной логистической модели с целевой переменной «возраст 60 лет», мы обратили внимание, что одним из таковых является показатель экспрессии *HLA-G*. Известно, что его гиперэкспрессия в аденокарциноме позволяет ей уклоняться от иммунологического надзора [P. Paul et al., 1998]. Наши данные подтверждают причинно-следственную связь между изменениями экспрессии вышеперечисленных генов, обнаруженной нами в группе здоровых людей старше 60 лет, и увеличением частоты встречаемости КРР в этой возрастной подгруппе.

Мы провели оценку экспрессионных профилей образцов неизменной слизистой при наличии гиперпролиферативных и воспалительных процессов в ней в зависимости от эмбрионально-анатомического отдела, построив соответствующую математическую модель. Ее сформировали показатели экспрессии 6 генов: *CCND1*, *IL12a*, *IL15*, *IL1b*, *TNFa*, *TGFb*. Общая точность молекулярной классификации образцов при наличии гиперпролиферативных и воспалительных процессов толстой кишки в сравнении с нормой снизилась с 92% до 86,5%.

Пролиферативная активность аденом ассоциирована со степенью дисплазии [Агейкина Н.В., 2011]. Мы разделили имеющиеся образцы пациентов с аденомами на 2 подгруппы. В группу со слабой дисплазией вошел 31 образец, в группу с умеренной дисплазией вошло 27 образцов. Выявлены отличия средних значений экспрессии 22 генов, включающих функциональные группы: пролиферации (*TERT*, *PTEN*, *GATA3*), митохондриального апоптоза (*BCL2*, *BAG1*, *NDRG1*), факторов иммунного ответа (*IL2*, *IL12a*, *TLR2*, *GNLY*, *COX-2*), факторов роста (*IGF2*, *TGFb*, *SCUBE2*, *VEGFA165*), рецепторного статуса и дифференцировки (*PGR*,

CYP19A, *CD56*, *CD69*), формирования межклеточного матрикса (*MMP2*, *MMP11*, *LGALS1*). В литературе имеются сведения, что апоптотическая активность также изменяется со степенью дисплазии [M. Sada et al., 1999 **Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. В нашем исследовании в образцах из неизменной слизистой оболочки, отобранных вне аденом с умеренной дисплазией, отмечен более высокий уровень экспрессии всех 22 генов, чем в неизменной слизистой, взятой при аденомах со слабой дисплазией.

Таблица 1. Сравнение образцов из неизменной слизистой в зависимости от степени дисплазии аденомы (Т- критерий Стьюдента, средние значения)

ген	дисплазия	N	среднее	SD	SE	ген	N	среднее	SD	SE
<i>BCL2</i>	слабая	33	8.69	1.030	0.18	<i>CYP19A</i>	34	6.46	2.825	0.48
	умерен	40	7.91	1.082	0.17		34	5.88	2.606	0.45
<i>NDRG1</i>	слабая	33	13.30	1.947	0.34	<i>MMP2</i>	34	13.28	1.239	0.21
	умерен	40	11.07	2.093	0.33		40	12.05	1.640	0.25
<i>TERT</i>	слабая	33	8.96	1.332	0.23	<i>IL2</i>	28	7.17	1.925	0.36
	умерен	40	8.02	1.444	0.23		25	6.87	1.135	0.23
<i>PTEN</i>	слабая	33	17.52	0.498	0.09	<i>IL12a</i>	34	11.13	2.438	0.42
	умерен	40	17.90	0.523	0.08		40	9.04	3.065	0.48
<i>BAG1</i>	слабая	33	3.90	0.689	0.12	<i>CD56</i>	34	9.22	1.670	0.29
	умерен	40	3.57	0.590	0.09		39	7.54	1.827	0.29
<i>PGR</i>	слабая	33	10.42	1.377	0.24	<i>TGFb</i>	34	8.64	1.120	0.19
	умерен	40	9.09	1.477	0.23		40	7.48	1.251	0.21
<i>MMP11</i>	слабая	33	12.14	1.331	0.23	<i>CD69</i>	34	5.58	0.826	0.14
	умерен	40	10.84	1.131	0.18		40	5.09	1.015	0.16
<i>SCUBE2</i>	слабая	34	10.57	1.603	0.28	<i>VEGFA165</i>	34	7.55	0.506	0.09
	умерен	40	8.63	2.015	0.32		40	7.18	0.710	0.11
<i>MMP9</i>	слабая	34	12.75	1.598	0.27	<i>TLR2</i>	34	9.73	1.242	0.21
	умерен	40	11.97	1.261	0.21		40	8.50	1.769	0.27
<i>GNLY</i>	слабая	34	14.85	2.035	0.35	<i>GATA3</i>	34	6.35	0.983	0.17
	умерен	37	13.09	2.199	0.36		40	5.44	1.200	0.19
<i>IGF2</i>	слабая	32	10.76	1.983	0.35	<i>LGALS1</i>	34	13.20	1.849	0.32
	умерен	36	8.44	2.724	0.45		40	11.09	2.995	0.47

Также нами был изучен уровень экспрессии в образцах неизменной слизистой при наличии в толстой кишке аденом умеренной и легкой дисплазии (n=58) и при гиперпластических полипах (n=15). Были определены статистически значимые отличия значений экспрессии 6 генов в зависимости от гистологического варианта: *BAG1*, *MYBL2*, *MMP9*, *MMP7*, *IL8*, *HLA-G5*. В группе «аденома» нами отмечен более высокий уровень экспрессии цитокина *IL8* и генов межклеточной адгезии *MMP7* и *MMP9* (таблица 2).

Завершая работу с образцами неизменной слизистой, мы выяснили ее молекулярные особенности при развившемся колоректальном раке, обнаружив, что образцы из прямой кишки отличались от левой ободочной по уровню экспрессии 19 генов: *P14ARF* (*P19ARF*), *IL6*, *MMP9*, *IL8*, *IL1b*, *CCNB1*, *IL10*, *MMP8*, *KI67*, *BIRC5*, *GREM1*, *TLR2*, *MYBL2*, *CYP19A*, *COX-2*, *LIF*, *MMP7*, *P16INK4A*, *LGALS1*. Образцы из левой ободочной кишки отличались от образцов правой ободочной по уровню экспрессии 20 генов: *P14ARF* (*P19ARF*), *IL6*, *MMP9*, *CCNB1*, *MMP8*, *KI67*, *BIRC5*, *GREM1*, *IL15*, *MYBL2*, *IL8*, *CYP19A*, *COX-2*, *MMP7*, *LIFR*, *IL1b*, *P16INK4A*, *LGALS1*, *TLR7*,

LIF. А вот образцы из прямой кишки и образцы их правой ободочной различались по уровню экспрессии 21 гена: *MMP11*, *PTEN*, *P14ARF* (*P19ARF*), *IL6*, *MMP9*, *IL8*, *IL1b*, *BCL2*, *BAG1*, *IL10*, *MMP8*, *NDRG1*, *GREM1*, *TLR2*, *MYBL2*, *CYP19A*, *COX-2*, *LIF*, *MMP7*, *P16INK4A*, *LGALS1*. Уровни экспрессии 14 генов: *MYBL2*, *P16INK4A*, *MMP9*, *P14ARF* (*P19ARF*), *COX-2*, *CYP19A*, *GREM1*, *MMP7*, *MMP8*, *IL6*, *IL8*, *IL1b*, *LGALS1*, *LIF* имели статистически значимые различия во всех трех эмбрионально-анатомических отделах. Отдельно отметим значимые отличия профилей экспрессии образцов из правой, левой ободочной и прямой кишки регуляторов клеточного цикла – циклинов *CCND1*, *CCNB1* и мембранного ко-рецептора *SCUBE2*, участвующего в VEGFR2-опосредованном ангиогенезе. Ранее нами уже было установлено, что уровень экспрессии *CCND1* у здоровых людей был самым высоким в прямой кишке. При наличии в кишке аденокарциномы эта закономерность сохраняется.

Таблица 2. – Сравнение значений экспрессии в образцах неизменной слизистой при гиперпролиферативных процессах в зависимости от гистологического типа. Т- критерий Стьюдента

ген	Среднее аденома	Среднее гиперпластический полип	t-знач.	p
<i>BAG1</i>	3,70311	4,05076	2,27305	0,025276
<i>MYBL2</i>	7,62511	7,22273	2,40119	0,018289
<i>MMP9</i>	12,29583	11,41894	2,43951	0,016543
<i>MMP7</i>	7,24778	5,43492	2,13132	0,035671
<i>IL8</i>	6,37917	4,98864	2,70712	0,008034
<i>HLA-G5</i>	16,21028	22,79259	-4,88678	0,000007

Убедившись, что экспрессионные профили образцов неизменной слизистой отличаются между собой и в зависимости от эмбрионально-анатомического отдела в норме, при наличии воспалительных и гиперпролиферативных заболеваний, а также при колоректальном раке, мы решили изучить молекулярно-генетические характеристики щеточной биопсии прямой кишки, молекулярные изменения в которой выявлялись при развитии любой патологии толстой кишки вне зависимости от локализации.

С этой целью нами были изучены профили экспрессии генов имеющейся в образцах щеточной биопсии слизистой у здоровых людей, пациентов с колоректальным раком (исключая локализацию аденокарциномы на высоте пальца), с неспецифическим язвенным колитом, наличием аденом и гиперпластических полипов толстой кишки. Для всех образцов было выполнено цитологическое исследование, подтвердившее отсутствие опухолевых клеток в них.

На этом этапе с использованием дискриминантного анализа (с пошаговым включением переменных) нами была оценена принципиальная возможность классификации образцов на группы: «норма», «аденома», «НЯК», «КРР» (таблица 3).

Таблица 3. Классификационная матрица образцов групп «норма», «аденома», «НЯК», «КРР»

группа	Частота совпадения классификации %	Распределение в группы согласно дискриминантной модели (n=185)			
		Норма	аденома	НЯК	КРР
Норма	92,06%	58	2	1	1
аденома	56,52%	9	13	0	1
НЯК	94,54%	2	0	52	1
КРР	90,09%	3	0	2	40
Всего	88,09%	72	15	55	43

В результате мы создали математическую модель (метод), позволяющую выявлять патологические изменения в толстой кишке при любой их локализации. Она включила в себя показатели экспрессии 11 генов из образцов щеточной биопсии прямой кишки: *ESR1*, *P16INK4A*, *GNLY*, *IL12a*, *IL7*, *IL8*, *IL1b*, *TNFa*, *CD69*, *TLR2* и *HLA-G5*. Точность разработанной модели составила 93,4%.

Продолжая решать задачу разработки метода дифференциальной диагностики патологии толстой кишки, мы проанализировали способность математических моделей, использующих показатели экспрессии мРНК генов нашей панели как объясняющие переменные, разделять образцы щеточной биопсии неизменной слизистой из прямой кишки здоровых людей и пациентов с КРР. При классификации двух групп методом дискриминантного анализа образцы нормальной слизистой здоровых людей распределились с точностью 100%, т.е. с отсутствием ложноположительных результатов, что важно с точки зрения применения метода как диагностического. Образцы у пациентов с КРР были правильно распределены в свою группу в 88,63%. Общая точность метода составила 94,39%. Для выявления генов-участников мы создали математическую модель, позволяющую выявлять наличие колоректального рака, в которую вошли показатели экспрессии 6 генов: *CTSL2*, *ESR1*, *GRB7*, *GNLY*, *MMP2*, *TERT* из групп апоптоза, пролиферации, межклеточных взаимодействий, иммунного ответа, дифференцировки. Особое внимание обратим на то, что статистически значимой переменной в модели оказался возраст испытуемого (выраженный в полном числе лет). О влиянии возраста на молекулярные характеристики слизистой в норме мы уже указывали выше. На основании полученных данных уровни экспрессии генов *CTSL2*, *ESR1*, *GRB7*, *GNLY*, *MMP2*, *TERT* можно рассматривать в

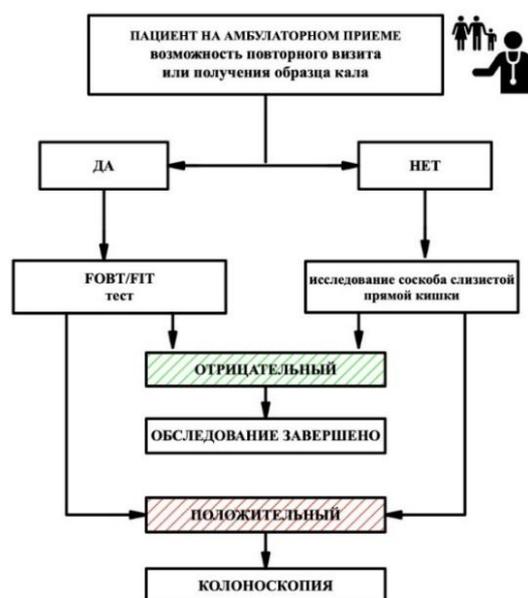
качестве диагностических для выявления КРР молекулярным методом. Точность метода (модели) составила 96,7%, специфичность 90%.

Используя полученные нами данные об изменении молекулярных характеристик неизменной слизистой толстой кишки при возникновении гиперпролиферативных процессов в ней, мы разработали математическую модель, позволяющую выявлять наличие аденом, исследуя образцы щеточного соскоба слизистой прямой кишки. Точность полученной модели составила 88,6%, специфичность 91,3%, чувствительность 83,3%. Модель в качестве объясняющих переменных включила уровни экспрессии 5 генов: *BCL2*, *CD68*, *MYC*, *TERT*, *STK15*. Как мы ранее подчеркивали, выявление аденом имеет меньшую точность в разработанных моделях ввиду предполагаемой их значительной молекулярной гетерогенности.

Предположив изменение молекулярных характеристик образцов слизистой толстой кишки, полученных путем щеточной биопсии при развитии неспецифического язвенного колита, мы оценили профили экспрессии в 55 таких образцах и создали математическую модель. Точность молекулярной диагностики с использованием математической модели составила 96%, специфичность 97,8%, чувствительность 92,6%. В панель вошли показатели экспрессии 5 генов: *CTSL2*, *BCL2*, *MYC*, *BIRC5*, *CD68*.

На завершающем этапе работы с образцами щеточной биопсии из прямой кишки мы разработали алгоритм ее применения на практике (**рисунок 6**). Уровень экспрессии гена является объясняющей переменной в математической модели. Используя рассчитанные коэффициенты регрессии для уровня экспрессии каждого гена и константу в соответствующей модели, можно с высокой точностью определить вероятность принадлежности исследуемого образца к определенной группе (условно норме, патологии толстой кишки в целом или дифференцированной патологии: наличие аденом, неспецифического язвенного колита или колоректального рака).

Рисунок 6. Алгоритм использования моделей молекулярной диагностики изменений слизистой толстой кишки



В зависимости от цели предлагаем использовать разные панели (таблица 4). Так, панель, включающая 6 генов (*CTSL2*, *ESR1*, *GRB7*, *GNLY*, *MMP2*, *TERT*), позволяет с помощью математической модели дифференцировать «условно норму» от колоректального рака. Чувствительность такого теста составила 96,7% при уровне специфичности 90%. При распределении в группу «КРР» пациент направляется на колоноскопию.

Таблица 4. Модели молекулярной диагностики патологии толстой кишки

Диагностическая модель	Гены-участники	Точность модели
«норма – патология»	<i>ESR1</i> , <i>P16INK4A</i> , <i>GNLY</i> , <i>IL12a</i> , <i>IL7</i> , <i>IL8</i> , <i>IL1b</i> , <i>TNFa</i> , <i>CD69</i> , <i>TLR2</i> и <i>HLA-G5</i>	93,4%.
«норма – КРР»	<i>CTSL2</i> , <i>ESR1</i> , <i>GRB7</i> , <i>GNLY</i> , <i>MMP2</i> , <i>TERT</i>	96,7%
«норма – аденома»	<i>BCL2</i> , <i>CD68</i> , <i>MYC</i> , <i>TERT</i> , <i>STK15</i>	88,6%
«норма – НЯК»	<i>CTSL2</i> , <i>BCL2</i> , <i>MYC</i> , <i>BIRC5</i> , <i>CD68</i>	96%

Подводя некоторые итоги работы, хотим здесь поделиться соображениями о причинах наших усилий по созданию нового метода молекулярной диагностики в условиях, когда, казалось бы, разработаны и опробованы другие методы, включая фекальные. Обсуждая основные проблемы вторичной профилактики, мы обратили внимание, что социальные и организационные аспекты ее проведения зачастую имеют не менее важное значение, чем технические. К ним относятся: отношение к диспансеризации, мотивация и интерес к профилактическим осмотрам. Причины низкой эффективности диагностических программ — это отсутствие

ответственности за собственное здоровье, слабое информационное сопровождение диспансерных осмотров, низкий уровень онконастороженности населения и эмоциональный барьер: мысли о раке вызывают страх, люди отрицают возможность возникновения КРР у себя и близких. Таким образом, мы считаем наш метод чрезвычайно удобным для пациентов и работников медицинских учреждений. Он реализован по принципу «здесь и сейчас», когда нет технической или организационной возможности обеспечения повторного визита пациента, подготовки кишечника для проведения колоноскопии или забора кала на фекальный тест.

Кроме того, биологический материал с согласия пациента может отбираться непрофильными специалистами, например при визитах к гинекологу или урологу. Часто именно необходимость сбора биологического материала дома и его последующая транспортировка отталкивает или заставляет откладывать диспансеризацию потенциального пациента. Кроме того, в ряде отдаленных населенных пунктов нашей страны и в условиях Крайнего Севера часто вообще отсутствует такая возможность. Предпринимаются попытки изменить ситуацию. Так, на сайте <https://онкопоисксаха.рф> жителям отдаленных северных районов предлагается пройти онлайн анкетирование для оценки возможности наличия злокачественного новообразования. При выявлении высокого риска онкологического заболевания при поддержке Правительства Республики Саха (Якутия) посетителю сайта предлагается пройти обследование в Якутском областном онкологическом диспансере. Мы считаем, что в подобных условиях, например при медицинских осмотрах жителей малых удаленных населенных пунктов силами даже среднего медицинского персонала наш метод может занять свое место в своевременной диагностике КРР с учетом технической простоты забора материала и нетребовательности к условиям его хранения.

Молекулярно-генетическая оценка образцов колоректальной аденокарциномы

На втором этапе мы провели всестороннюю молекулярную оценку образцов колоректальной аденокарциномы, исследовав профили экспрессии в ней мРНК генов на имеющейся в нашем распоряжении панели генов в зависимости от ее ключевых клиничко-морфологических характеристик: степени дифференцировки, размеров (показатель Т по системе TNM), наличия метастазов в операционном препарате (показатель N по системе TNM), соотношению числа метастатических лимфоузлов к общему числу удаленных и мутации генов системы *RAS*.

Сравнительный анализ экспрессии генов панели в образцах аденокарциномы по критерию «степень дифференцировки» выявил статистически значимые отличия уровней экспрессии *PTEN*, *MYBL2*, *CYP19A* и *MMP8*. Уровни экспрессии *PTEN*, *MYBL2* и *MMP8* различались в парах G1/G3 и G2/G3, а *CCNB1* только в паре G1/G3. Отметим, что гипоэкспрессия *PTEN* является одним из немногих супрессоров PI3K/AKT/mTOR-

сигнального пути. Профиль экспрессии в образцах колоректальной аденокарциномы различной степени дифференцировки отражает тенденцию к повышенной пролиферативной активности (*CCNB1*) и подавлению активности онкосупрессоров (*PTEN*).

Анализируя результаты сравнения показателей экспрессии в образцах колоректального рака в зависимости от его размеров и глубины инвазии, мы выявили статистически значимую разницу при попарном сравнении пары T1/T4 по уровням экспрессии *MMP11*, *MMP2*, *MMP7* и *TPA*. Уровень экспрессии *CYP19A* значимо отличался в паре T3/T4.

Оценивая уровни экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости от показателя N по классификации TNM, мы выявили при попарном сравнении статистически значимые различия в паре N0/N2 для показателей экспрессии 4 генов: *TGFb*, *NDRC1*, *MMP11*, *IGF2*. Пара N0/N1 отличалась по уровню экспрессии гена *PTEN*, а пара N1/N2 по экспрессии генов *BCL2*, *NDRC1*, *MMP11*. *NDRG1* явилась супрессором опухолевого роста и метастазирования. Его гиперэкспрессия отрицательно коррелирует с развитием прогрессирования. В образцах колоректальной аденокарциномы с поражением более чем 3 регионарных лимфоузлов в препарате (N2) выявлена гиперэкспрессия гена пролиферации *PTEN*, а также протеолитического фермента *MMP11* по сравнению с образцами, где поражение регионарных лимфоузлов не отмечено (N0). Предполагаем, что резкое увеличение экспрессии *MMP11* позволяет опухолевой клетке разрушать межклеточный матрикс и создает условия для метастазирования.

Таблица 5. Регрессионная модель зависимости профиля экспрессии ряда генов в образцах из неизменной слизистой и КРР и отношения числа метастатических лимфоузлов к общему числу удаленных

Ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность
Константа	-0.2247	0.27641	-0.813	0.419
<i>tumor</i> <i>CCND1</i>	0.0656	0.02240	2.930	0.004
<i>tumor</i> <i>CCNB1</i>	-0.0662	0.02130	-3.110	0.003
<i>tumor</i> <i>P16INK4A</i>	0.0446	0.01239	3.599	<.001
<i>tumor</i> <i>IL1b</i>	-0.0393	0.00730	-5.380	<.001
<i>tumor</i> <i>CD56</i>	-0.0269	0.00996	-2.700	0.008
<i>tumor</i> <i>LGALS1</i>	0.0297	0.00830	3.576	<.001
<i>mnt</i> <i>Ki67</i>	0.0759	0.02154	3.523	<.001
<i>mnt</i> <i>IGF2</i>	0.0398	0.01351	2.945	0.004
<i>mnt</i> <i>CYP19A</i>	-0.0200	0.00857	-2.337	0.022
<i>mnt</i> <i>PAPPA</i>	-0.0454	0.01697	-2.674	0.009
<i>mnt</i> <i>IL6</i>	0.0174	0.00935	1.861	0.066
<i>mnt</i> <i>IL15</i>	-0.0519	0.01451	-3.575	<.001
<i>mnt</i> <i>CD56</i>	-0.0444	0.01080	-4.113	<.001
<i>mnt</i> <i>TGFb</i>	0.1082	0.02607	4.152	<.001

Примечание: *tumor* «ген» - образец аденокарциномы; *mnt* «ген» - образец неизменной слизистой при КРР

Получив эти результаты, мы решили проверить, как морфологически подтвержденное регионарное метастазирование связано с молекулярной характеристикой КРР. Для этого мы провели регрессионный анализ, используя в качестве зависимой переменной отношение числа метастатических лимфоузлов к общему числу, удаленных (Кп) в операционном препарате. Этот показатель в нашей выборке варьировал от 0 до 1 и имел ненормальное распределение $Me\ 0[0;0,33]$. Уравнение регрессии было образовано показателями экспрессии 10 генов из образцов аденокарциномы: *CCND1*, *CCNB1*, *Ki67*, *PGR*, *MMP11*, *MYBL2*, *P16INK4A*, *IL1b*, *CD56*, *LGALS1*. Показатели соответствия этой регрессионной модели были низкими: $R^2=0.32$, тест Дурбина-Ватсона 1.21. Обратившись к уже полученным нами данным об имеющейся зависимости профилей экспрессии в образцах неизменной слизистой при колоректальном раке с наличием регионарных метастазов в операционном препарате, мы дополнительно использовали их в новой модели в качестве объясняющих переменных. Эта регрессионная модель включила в себя оценку экспрессии *CCND1*, *CCNB1*, *P16INK4A*, *IL1b*, *CD56*, *LGALS1* в образцах из опухоли и *Ki67*, *IGF2*, *CYP19A*, *PAPPA*, *IL6*, *IL15* в образцах неизменной слизистой (крае резекции) (таблица 5). Показатели этой модели оказались значительно лучше: $R^2=0.67$, тест Дурбина-Ватсона 1.87. Это еще раз подтвердило наличие связи профилей экспрессии генов в образцах из неизменной слизистой и непосредственно самой аденокарциномы с характером регионарного лимфогенного метастазирования. Включение в математические модели в качестве объясняющих переменных двух типов образцов значительно повышает их точность. Нельзя не отметить, что большее число переменных в регрессионной модели (8 из 14) сформировано показателями экспрессии образцов из неизменной слизистой.

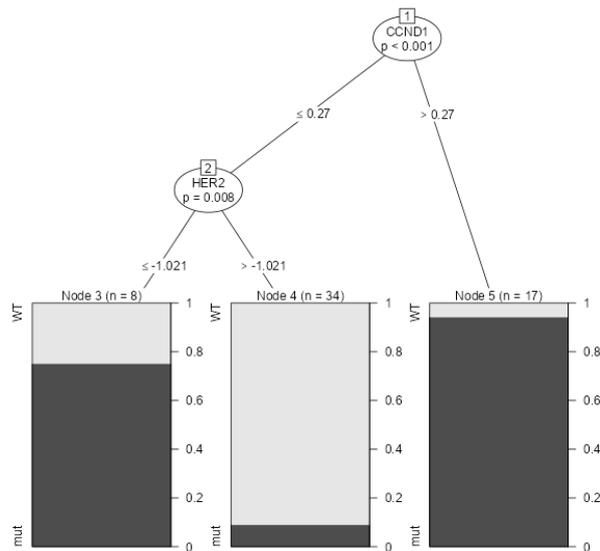
Исследуя особенности КРР в зависимости от локализации, мы выявили, что, опухоли прямой и левой ободочной кишки отличались по уровням экспрессии 14 генов: *CTSL2*, *TERT*, *ESR1*, *STK15*, *MYBL2*, *IGF1*, *IGF2*, *PAPPA*, *IL10*, *IFNg*, *CD45*, *CD56*, *CD69*, *GATA3*. Опухоли прямой и правой ободочной различались по уровням экспрессии 4 генов: *CCND1*, *BIRC5*, *IL7*, *BAX*. Опухоли левой и правой ободочной имели отличия по уровням 8 генов: *CD68*, *GRB7*, *IFNg*, *TNFa*, *CD69*, *VEGFA165*, *VEGFA189*, *GATA3*. Все отличия были статистически значимыми. Для оценки характера отличий мы провели анализ значений медианы (*Me*) экспрессии 62 генов в каждом из трех эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки. По сравнению с образцами нормальной слизистой у здоровых людей, в образцах аденокарциномы было обнаружено меньше отличий в зависимости от локализации опухоли: лишь 23 гена при КРР имели значимую разницу в уровне экспрессии по сравнению с 31 геном в норме. По результатам анализа уровень экспрессии лишь 12 генов в прямой кишке был выше в сравнении уровнем генов правой и левой половиной ободочной кишки. Эти гены также явились звеньями разных сигнальных путей. Но только по уровню

экспрессии 4 генов: *ESR1*, *IL10*, *IGF2*, *BAX*, *PGR* сохранилась тенденция к гиперэкспрессии в прямой кишке.

При проверке математической модели определения принадлежности исследуемого образца к эмбрионально-анатомическому отделу, разработанной на биологическом материале здоровых людей, на образцах колоректальной аденокарциномы отмечено снижение общей точности модели с 83,95% до 58,64%. Основные ошибки классификации происходят за счет образцов отобранных из опухолей, локализованных в правом эмбрионально-анатомическом отделе. Точность выделения этого отдела снижается с 75,86% до 25,0%. Качество дифференцировки образцов из опухолей, локализованных в левом эмбрионально-анатомическом отделе, снижается с 86,0% до 62,26%. При локализации в прямой кишке отмечено снижение точности дифференцировки с 93,1% до 71,0%.

Известно, что до 45% спорадического КРР возникает в результате мутации протоонкогена *KRAS*. Наличие мутации в гене *KRAS* при КРР связано с низкой выживаемостью, повышенной агрессивностью опухоли и устойчивостью к таргетной терапии, направленной против рецептора антиэпидермального фактора роста (*EGFR*). В настоящее время специфическое ингибирование онкогенного *RAS* уже одобрено для варианта G12C при раке легкого. Понимание того, как *KRAS* стимулирует уклонение опухоли от иммунологического надзора и как специфичное ингибирование мутированного *KRAS* влияет на микроокружение опухоли, может привести к новым подходам к сочетанию ингибирования *RAS* с иммунотерапией [Boumelha J, 2023]. Мы исследовали особенности молекулярного фенотипа в образцах из опухоли в зависимости от мутационного статуса *RAS* на основании анализа уровней экспрессии имеющейся у нас панели генов. Мы установили, что наличие мутации в генах *RAS* создает свой специфический экспрессионный фенотип. В математической модели его сформировали показатели экспрессии 10 генов: *CCND1*, *BCL2*, *HER2*, *MYBL2*, *MMP8*, *IL6*, *IL8*, *IL1b*, *TNFa*, *CD69*. Точность модели составила 90,4%, специфичность 85,7%, чувствительность 93,8%. Затем на основе выявленных генов-кандидатов было сформировано «дерево классификации» (рисунок 7), которое позволило оценить их для описания мутированного (*RAS-mut*) и «дикого» (*RAS-wt*) фенотипов.

Рисунок 7. Дерево молекулярной классификации фенотипа *RAS*



Можно предположить, что нарушения экспрессии генов *CCND1* и *HER2*, характерные для мутированного фенотипа (*RAS-mut*), могут влиять на другие сигнальные пути, в первую очередь на *PI3K*, кроме непосредственно *RAS/MAPK*, приводя к более глубоким молекулярно-генетическим изменениям. Также нельзя исключить, что одновременное проявление гиперэкспрессии *CCND1* и мутации *RAS* может синергетически усиливать рост опухоли, инвазию и метастазирование. Представляется интересным проявление гиперэкспрессии *HER2*, связанное с «диким» *RAS*. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять соответствующую роль и молекулярные механизмы *RAS* фенотипов при КРР.

При анализе характера экспрессии «*RAS-mut*» фенотипа выявлена высокая экспрессия *CCND1*, который кодирует белок циклин D1. Мутации, амплификация и гиперэкспрессия *CCND1* в комплексе с *CDK4/CDK6* регулируют клеточный цикл во время перехода G(1)/S. Механизмы амплификации гена *CCND1*, посттранскрипционные или посттрансляционные модификации, перестройки и варианты полиморфизмы могут приводить к аномальному уровню циклина D1 и увеличению риска развития КРР. В 2017 году были опубликованы данные мета-анализа [Xie M et al., 2017], где было продемонстрировано, что полиморфизм *CCND1 G870A* может быть связан с повышенным риском развития КРР. При этом анализ подгрупп по этнической принадлежности выявил значительные ассоциации между полиморфизмом *CCND1 G870A* и восприимчивостью к КРР у носителей А (АА или АG или АА + АG), особенно среди азиатских и кавказских популяций, в которых был установлен КРР. Это может обеспечить теоретическую основу для понимания влияния полиморфизма *CCND1 G870A* на патогенез и прогрессирование КРР.

Оценка риска прогрессирования колоректального рака с использованием молекулярно-генетических технологий

Для построения моделей риска прогрессирования КРР мы решили использовать морфологические и молекулярно-генетические характеристики аденокарциномы и ее окружения.

Таблица 6. Результаты логистической регрессии (образцы аденокарциномы и неизменной слизистой). Целевая переменная «прогрессирование КРР»

Ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность.
Константа	1.755	3.911	0.449	0.653
<i>tumor_CTSL2</i>	0.527	0.201	2.619	0.009
<i>tumor_NDRG1</i>	0.390	0.171	2.278	0.023
<i>tumor_IL1b</i>	-0.195	0.105	-1.856	0.063
<i>mnt_BIRC5</i>	1.871	0.866	2.160	0.031
<i>mnt_NDRG1</i>	-1.683	0.454	-3.709	< .001
<i>mnt_Ki67</i>	-2.094	0.955	-2.194	0.028
<i>mnt_IGF2</i>	0.767	0.247	3.108	0.002
<i>mnt_CYP19A</i>	-0.236	0.156	-1.512	0.131
<i>mnt_GNLY</i>	1.047	0.316	3.314	< .001
<i>mnt_MMP7</i>	-0.299	0.170	-1.761	0.078
<i>mnt_HLA.G5</i>	-0.256	0.104	-2.452	0.014

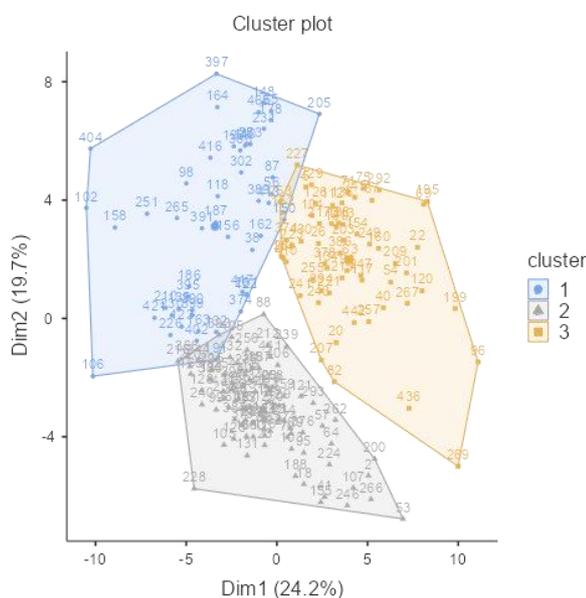
Примечание. *tumor_«ген»* - опухолевый образец; *mnt_«ген»*- образец неизменной слизистой

Используя метод бинарной логистической регрессии, мы построили прогностическую модель, предсказывающую возникновение прогрессирования в течение 36-месячного периода от установки диагноза. В модель вошли показатели экспрессии 8 генов в образцах аденокарциномы: *MYC*, *CCND1*, *CCNB1*, *CTSL2*, *NDRG1*, *IL1b*, *TNFa*, *VEGFA121*. Показатель R^2 этой модели оказался равен 0,31. Для повышения точности мы сформировали новую прогностическую модель, дополнительно включив в нее в качестве объясняющих переменных показатели экспрессии генов нашей панели в образцах неизменной слизистой у этих же пациентов. Показатель R^2 модели оказался равен 0,57. В прогностическую модель вошли показатели экспрессии 3-х генов панели из опухолевых образцов: *CTSL2*, *NDRG1*, *IL1b* и 8 генов из образцов неизменной слизистой: *BIRC5*, *NDRG1*, *Ki67*, *IGF2*, *CYP19A*, *GNLY*, *MMP7*, *HLA.G5*. (таблица 6).

Достаточно давно существует международная консенсусная молекулярно-генетическая классификация, учитывающая мутации и статус метилирования, характерные для каждого из 4 выделенных подтипов КРР. Благодаря данной классификации стало понятным, что подтипы КРР

отличаются между собой не только по своему клиническому течению, но, что самое важное, по чувствительности к химиотерапии [Sawayama H., et al. 2020,]. В ходе клинических исследований FIRE-3 и CRYSTAL было доказано, что локализация первичной опухоли в проксимальном отделе толстой кишки является неблагоприятным прогностическим фактором [Arnold D. et al., 2017]. Очевидно, что молекулярно-генетические исследования, направленные на выделение различных фенотипов КРР, являются своего рода платформой для создания и изучения эффективности существующих и перспективных лекарственных препаратов, в том числе таргетных, а также и объективной оценки прогноза при КРР. Это является фундаментом эффективной третичной профилактики колоректального рака.

Рисунок 8. Результаты кластерного анализа объединенного массива показателей экспрессии панели генов в образцах колоректального рака и неизменной слизистой (метод k-средних)



Методом кластеризации k-средних, используя данные объединенного массива показателей экспрессии панели генов, полученных для образцов колоректального рака и образцов неизменной слизистой, нами были выделены три молекулярно-генетические фенотипа (кластера) (рисунок 8). Мы провели оценку их клинической значимости с точки зрения прогнозирования результатов лечения (таблица 7). Можно условно назвать первый кластер «благоприятным»: 74,3% пациентов, которые в него попали, не имели признаков прогрессирования в течение всего 36-месячного периода наблюдения в нашем исследовании. Напротив, третий кластер можно расценить как «неблагоприятный»: у 85% пациентов, в него входящих, выявлено прогрессирование КРР. Оставшийся второй кластер мы условно назвали «неопределенным» в отношении прогноза прогрессирования. Пациенты этого кластера без прогрессирования и с таковым распределились как 62,5% и 37,5% соответственно.

Таблица 7. Частота прогрессирования КРР в выделенных кластерах

Кластер	Без прогрессирования	Прогрессирование	Всего
1	29 (74,3%)	10 (25,7%)	39
2	40 (62,5%)	24 (37,5%)	64
3	3 (15%)	17 (85%)	20
итого	72	51	123

Нами был проведен сравнительный анализ локализации опухоли, молекулярного фенотипа и точечных мутаций в выделенных кластерах и были отмечены статистически значимые различия между ними по этим признакам. Изучение информации о локализации опухоли в различных отделах ободочной и прямой кишки в зависимости от кластера показало, что в первом кластере у пациентов преобладали опухоли левой половины ободочной (38,5%) и прямой кишки (38,5%), а в третьем кластере опухоли правой половины (59,1%).

Таблица 8. Локализация аденокарциномы, консенсусный молекулярный фенотип и точечные мутации в кластерах

		кластер			p
		1 (N = 39)	2 (N = 69)	3 (N = 22)	
Локализация опухоли	Левая ободочная	15/39 (38,5%)	18/69 (26%)	3/22 (13,6%)	0,0503
	Прямая	15/39 (38,5%)	15/69 (21,7%)	6/22 (27,3%)	
	Правая ободочная	9/39 (23%)	36/69 (52,3%)	13/22 (59,1%)	
Молекулярный фенотип (консенсус)	CMS1	3/26 (11,5%)	4/43 (9,3%)	6/13 (46,2%)	0,8107
	CMS2	10/26 (38,5%)	9/43 (20,9%)	5/13 (38,5%)	
	CMS3	5/26 (19,2%)	6/43 (14,0%)	2/13 (15,4%)	
	CMS4	8/26 (30,8%)	24/43 (55,8%)	0/13 (0,0%)	
KRAS	wt	14/18 (77,8%)	22/32 (68,8%)	10/12 (83,3%)	0,0008
	mut	4/18 (22,2%)	10/32 (31,2%)	2/12 (16,7%)	
BRAF	wt	16/18 (88,9%)	29/32 (90,6%)	1/11 (9,1%)	0,91
	V600E	2/18 (11,1%)	3/32 (9,4%)	10/11 (90,9%)	
MSI	MSS	31/33 (93,9%)	54/57 (94,7%)	20/20 (100,0%)	0,7045
	MSI-H	2/33 (6,1%)	3/57 (5,3%)	0/20 (0,0%)	

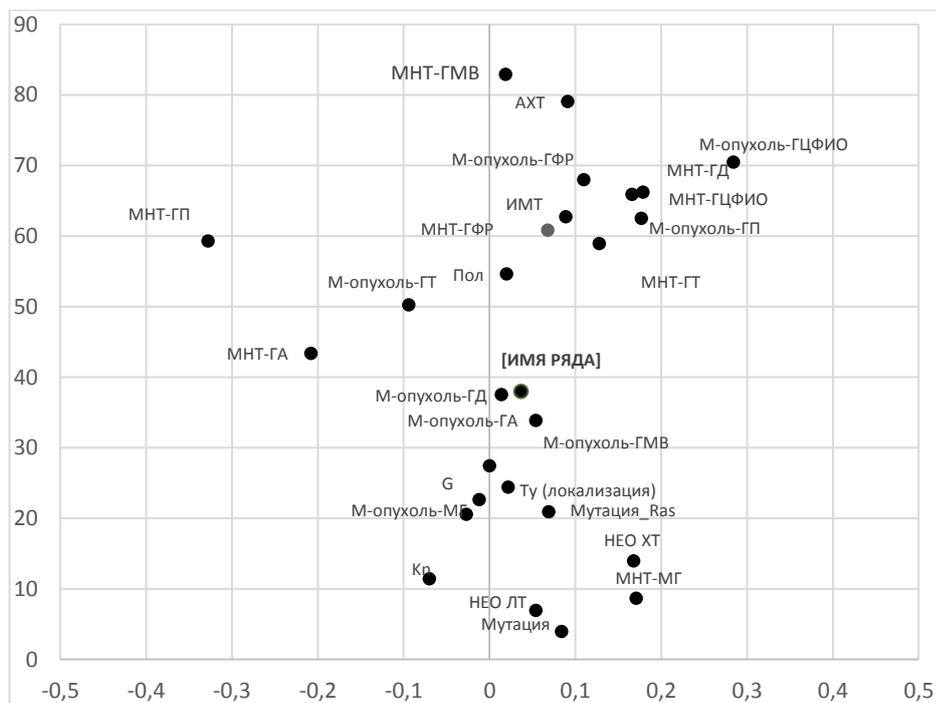
Различия между кластерами были статистически значимыми ($p=0,0503$). При этом процент пациентов с локализацией опухоли в прямой кишке в первом кластере составил 38,5%, во втором 21,7%, в третьем 27,3%. Среди пациентов первого кластера (23,1%) значимо реже выявлялась аденокарцинома правой половины ободочной кишки в сравнении со вторым и третьим кластерами (52,3% и 59,1% соответственно). Полученный метод кластеризации имеет самостоятельное значение ввиду того, что нами не было выявлено статистически значимых различий в частоте международных консенсусных молекулярных фенотипов в выделенных кластерах, тем не менее, в первом кластере преобладает CMS2-фенотип, отличающийся благоприятным течением. Количество рецидивов во втором кластере составило 37,5% по сравнению с первым и третьим кластерами, где оно составило 25,7% и 85% соответственно. Таким образом, в третий кластер вошли пациенты с самым неблагоприятным течением КРР (таблица 8).

Обратим внимание, что пациенты третьего кластера имеют плохой прогноз течения КРР в отношении развития метастатической болезни. В кластере преобладают такие показатели, как правосторонняя локализация аденокарциномы (59,1%) и *BRAF*-мутации (90,9%) в сравнении с первым кластером (11,1%). На наш взгляд, несмотря на установленную характеристику третьего кластера, особого внимания также требуют пациенты, включенные во второй кластер, где прогноз в отношении метастатической болезни нами расценивается как неопределенный.

Для решения задачи практического использования полученных молекулярных фенотипов мы обратились к дискриминантному анализу и разработали математический алгоритм (модель) распределения образца в кластер. В нее вошло 15 генов. 7 генов из образцов колоректальной аденокарциномы: *MMP7*, *MMP11*, *MMP2*, *IL8*, *IGF2*, *MYC*, *CD68* и 8 генов из образцов неизменной слизистой: *GREM1*, *MMP8*, *HLA-G5*, *LGALS1*, *BAX*, *CCND1*, *BAG1*, *TLR2*. Общая точность классификации составила 98,38%.

Затем мы решили выяснить, можно ли установить влияние не каждого имеющегося показателя экспрессии определенного гена в разных типах образцов, а объединить их в группы по ключевым признакам, характеристикам или функциональным свойствам. И далее включить в модель эти функциональные группы, которые эмпирически могут оказывать неоднородное влияние на срок безрецидивной выживаемости у пациентов с КРР. Сначала нами были определены следующие 9 влияющих факторов: пол пациента, индекс массы тела, оценку почкования опухоли, соотношение числа метастатических лимфоузлов к общему числу удаленных, факт проведения адьювантной полихимиотерапии, наличие точечной мутации в генах системы *RAS*, факт проведения неoadьювантной полихимиотерапии, факт проведения неадьювантной лучевой терапии, наличие любой точечной мутации в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*. Затем к этим 9 группам были добавлены показатели экспрессии генов использованной панели в составе 8 групп, объединенных функциональными свойствами: гены цитокинов и факторов иммунного ответа, межклеточного взаимодействия, транскрипции, апоптоза, пролиферации, факторов роста, дифференцировки и многофункциональные гены. Таким образом, нами оценивалось влияние 17 факторов (групп) на срок безрецидивной выживаемости у пациентов с КРР.

Рисунок 9. Результаты ИМРА для латентных переменных для зависимой переменной «безрецидивная выживаемость (ВБПБ)»



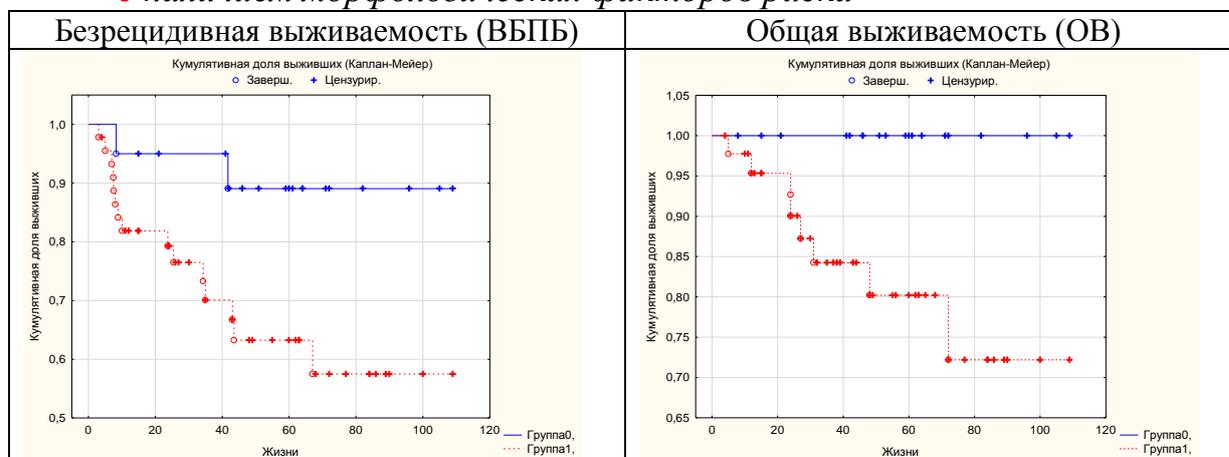
В этом разделе была использована регрессионная модель PLS-SEM с надстройкой IPMA (рисунок 9). Применение метода IPMA позволило более глубоко проанализировать влияние выделенных факторов и их групп на зависимую переменную, которой мы считали безрецидивную выживаемость.

Мы выявили, что максимальное влияние на безрецидивную выживаемость при КРР оказывает снижение уровня экспрессии генов пролиферации: *CCND1*, *PTEN*, *Ki67*, *CCNB1*, *P16INK4A* в неизменной слизистой оболочке толстой кишки при КРР и одновременное увеличение экспрессии генов цитокинов и факторов иммунного ответа: *IL-1b*, *IL-2*, *IL-6*, *IL-7*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12a*, *IL-15*, *IL-28*, *IL-29*; *COX-2*, *TNFa*, *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-7*, *IFNg*, *GNLY*, *GREM*, *HLA-G1*, *HLA-G5*, *LIF*, *LIFR*, *GATA3* в ней. Далее по степени влияния нами отмечено снижение уровня экспрессии генов апоптоза: *BCL2*, *BAX*, *BAG1*, *NDRG1*, *BIRC5*, *TERT* и увеличение экспрессии генов дифференцировки: *HER2*, *ESR*, *PGR*, *GRB7*, *CD 45,56, 68*, *LIF*, *LIFR* в образцах неизменной слизистой оболочке с увеличением экспрессии генов пролиферации в образцах колоректальной аденокарциномы: *CCND1*, *PTEN*, *Ki67*, *CCNB1*, *P16INK4A*. Влияние проведения адьювантной химиотерапии оказалось в модели лишь на 12 месте. Безусловно, этот факт нельзя рассматривать без связи с используемыми схемами, но достаточно низкий коэффициент влияния на безрецидивную выживаемость при КРР еще больше актуализирует вопрос об объективизации показаний к ее проведению, особенно при 2 и 3 стадиях. Модель демонстрирует слабый положительный коэффициент влияния мутаций *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*. Отметим, что факт проведения неoadьювантной химиотерапии имеет более высокий положительный коэффициент влияния на безрецидивную выживаемость на модели IPMA, хотя рандомизированными клиническими исследованиями не подтверждается увеличение выживаемости при проведении неoadьювантной

химиотерапии при опухолях ободочной кишки в II и III стадиях с факторами высокого риска, однако доказана ее безопасность [Karoui M. et al., 2021].

В нашей работе мы также решили проверить, существуют ли различия в профилях экспрессии образцов в зависимости от наличия или отсутствия факторов риска (согласно критериям NCCN и RUSSCO). Для этого при II стадии КРР мы изучили молекулярные особенности образцов от 65 пациентов нашей выборки. На основании результатов анализа показателей экспрессии мРНК нашей панели в этой подгруппе мы создали математическую модель, используя в качестве зависимой переменной наличие хотя бы одного фактора риска у пациентов II стадии КРР, а в качестве объясняющих – показатели экспрессии имеющейся панели генов в аденокарциноме. В модель вошли значения экспрессии 10 генов: *MYC*, *BAG1*, *ESR1*, *STK15*, *PAPPA*, *IL1b*, *IFNG*, *CD56*, *CD69*, *HLA-G5*. Показатели качества модели оказались удовлетворительными: $R^2=0.708$. Следует отметить, что при этом точность прогнозирования наличия факторов риска оказалась выше (97,8%), чем их отсутствия (85%). Оценив общую и безрецидивную выживаемость у пациентов КРР во II стадии в зависимости от молекулярного профиля, ассоциированного с морфологическими факторами риска, мы убедились, что различия оказались также статистически значимыми.

Рисунок 10. Общая (ОВ) и безрецидивная выживаемость (ВБПБ) во II стадии КРР в зависимости от экспрессионного профиля, связанного с наличием морфологических факторов риска



Примечание: различия статистически значимы. $p < 0.05$ (log-rank test)

Возможности прогнозирования развития прогрессирования при колоректальном раке

В настоящее время регулярно предлагаются разнообразные модели прогнозирования, основанные на использовании современных математических методов в сочетании с расширенным набором объясняющих переменных (характер точечных мутаций, микросателлитной нестабильности, изучение микроопухолевого окружения и др.). В работе мы поставили перед собой задачу разработки такой прогностической модели, которая обладала бы высокими показателями качества в отношении прогнозирования 3-хлетней безрецидивной выживаемости (ВБПБ) у

пациентов КРР. Для ее решения нами был сформирован перечень объясняющих переменных, основанный как на традиционных патоморфологических предикторах прогноза: критериях Т и N, степени дифференцировки, лимфоваскулярной и ангиолимфатической инвазии и прочих (первая группа), так и на показателях экспрессии мРНК в образцах колоректальной аденокарциномы имеющейся панели генов-участников сигнальных путей канцерогенеза (вторая группа). Это позволило использовать в общей сложности 134 показателя в качестве объясняющих переменных для построения предиктивных моделей.

Первой нами была создана математическая модель прогнозирования прогрессирования КРР в течение 36-ти месяцев после установки его диагноза на основании лишь данных первой группы массива (она включает клинко-морфологические критерии риска прогрессирования КРР). В нее вошли следующие переменные: **Дифференцировка** опухоли (G) (принимает значение «0», если степень дифференцировки G1 или G2, и «1», если G3); **Факторы риска** - наличие факторов риска по критериям NCCN (принимает значение «0», если ни одного из таковых нет, и «1» - если хоть один есть); **Лимфоузлы** (Kn) - соотношение числа метастатических лимфоузлов к общему числу удаленных; **Возраст** - возраст пациента, равный полному числу лет; **Локализация** – локализация опухоли: принимает значение «1» при правосторонней локализации опухоли (слепая, восходящая, поперечноободочная кишка) и «0» - при левосторонней (нисходящая ободочная, сигмовидная, прямая кишка);

Полученное регрессионное уравнение данной логит-модели получило следующий вид:

$$X_2 (\text{прогрессирование}_{36 \text{ мес.}}) = -0.83 * \text{дифференцировка} - 2.44 * \text{факторы риска} - 1.51 * \text{лимфоузлы} + 0.0516 * \text{возраст} + 0.72 * \text{локализация} + 0.332$$

0,332 - постоянный коэффициент в модели.

Коэффициент R^2 в этой модели составил 0,29. Отметим, что в итоговое уравнение вошли такие показатели, как степень дифференцировки (G), локализация опухоли и классические факторы высокого риска, что еще раз указывает на их значимость в отношении влияния на прогноз. Общая точность этой модели, составляющая 56,62%, оказалась невысока, а точность прогноза у пациентов без развившегося прогрессирования на изучаемом периоде наблюдения, равную 37%, мы расценили как неудовлетворительную, а при следующем шаге работы дополнительно использовали в качестве объясняющих переменных имеющиеся данные о значениях экспрессии мРНК нашей панели генов из образцов колоректальной аденокарциномы.

В результате для создания прогностической логистической модели был использован для анализа весь массив имеющихся у нас данных: 78 показателей как из первой группы (клинко-морфологические данные), так и второй (значения экспрессии мРНК панели 62 генов - цитокинов и факторов иммунного ответа, межклеточного взаимодействия, транскрипции, апоптоза,

пролиферации, факторов роста и дифференцировки из образцов колоректальной аденокарциномы).

Итоговое регрессионное уравнение этой модели получило следующий вид:

$$X2 (\text{прогрессирование}_{36 \text{ мес.}}) = 0.54 * CCNB1 - 0.51 * Ki67 - 0.46 * GRB7 - 2.63 * \text{факторы_риска} - 2.1 * \text{лимфоузлы} + 0.05 * \text{возраст} - 0.2 * IGF1 - 1.03 * \text{дифференцировка} - 0.25 * IL2 + 0.2 * IL6 - 0.24 * IL8 + 0.33 * GATA3 + 11.05$$

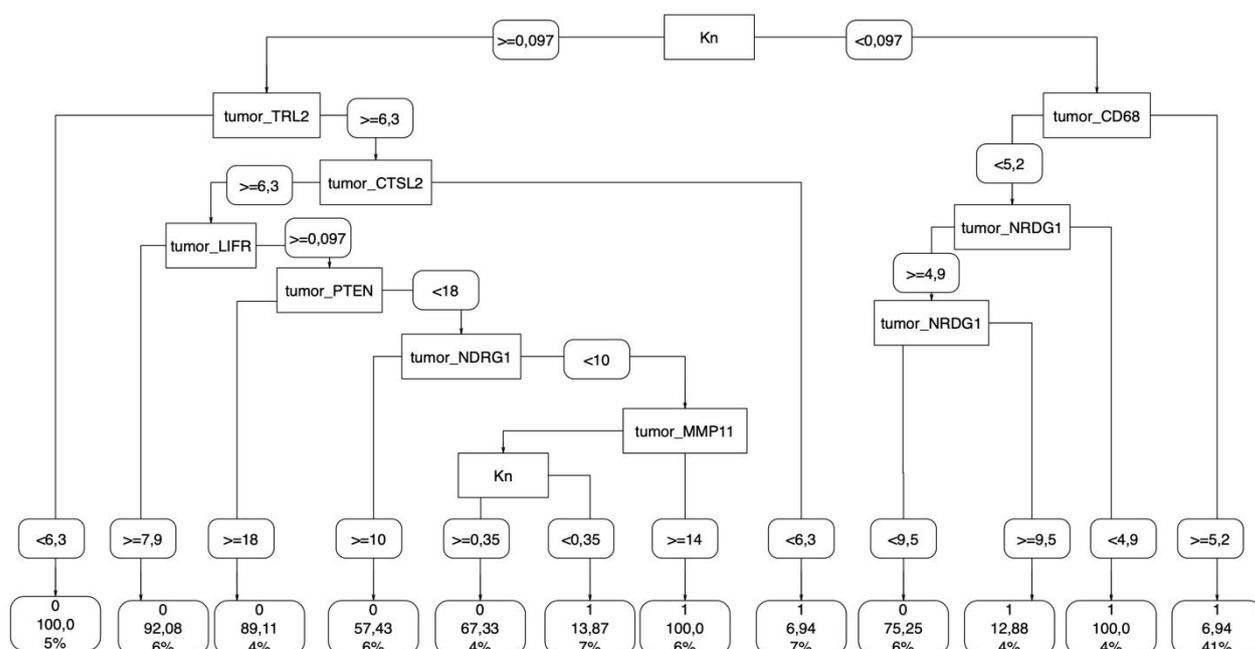
В него вошли следующие показатели в качестве предикторов (объясняющих переменных): дифференцировка опухоли (G), наличие факторов риска по критериям NCCN, соотношение числа метастатических лимфоузлов к общему числу удаленных; возраст пациента, равный полному числу лет, относительные уровни экспрессии мРНК *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* в аденокарциноме. Коэффициент R^2 в этой модели составил уже 0,4. Существенное повышение точности разработанной модели достигнуто включением в регрессионное уравнение значений экспрессии генов *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3*. Общая точность классификации по представленной модели составила 80,6%. При этом особо отметим, что точность прогнозирования у пациентов без прогрессирования существенно повысилась с 37% до 70,5%.

Следующим этапом работы явилось определение критических значений переменных, вошедших в итоговую прогностическую модель прогрессирования КРР, а также, что, по сути, и является самым важным – проверка на значимость выявленных критических значений изучаемых переменных, которыми явились важнейшие клинико-морфологические характеристики аденокарциномы, а также значения экспрессии мРНК ряда генов использованной панели генов-участников сигнальных путей канцерогенеза.

Для оценки предсказательных возможностей нелинейных моделей использовались «случайные леса». «Леса» деревьев решений (по 1000 деревьев в каждом) строились по 5 раз с выбором модели, показавшей лучшие метрики. Рейтинг моделей был построен по показателю «каппа Коэна», учитывающего превышение предсказательных возможностей моделей по сравнению с константной моделью. В результате мы отобрали две модели «случайный лес».

Первая модель (**рисунок 11**) оценила влияние соотношение числа метастатических лимфатических узлов в операционном препарате к общему числу удаленных и определила критическое значение этого коэффициента. Традиционно считается, что наличие даже одного метастатически измененного лимфоузла по данным патоморфологического исследования значительно утяжеляет прогноз, сразу переводя КРР в III стадию (N+) вне зависимости от критерия T по системе TNM.

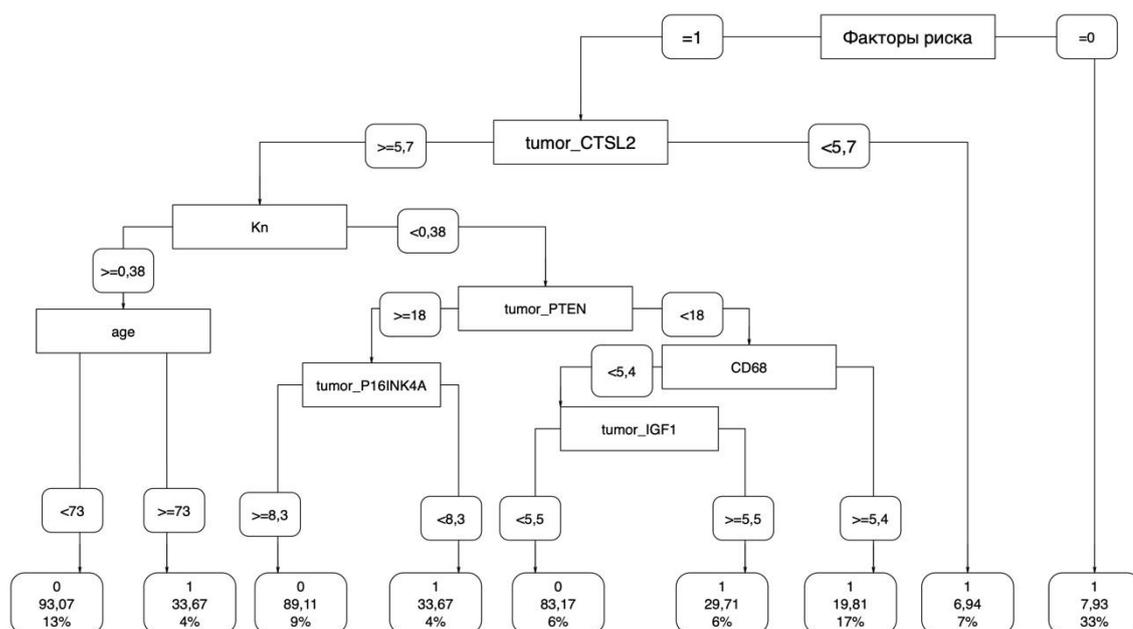
Рисунок 11. Модель 1 («случайный лес»). Метод работы с пропусками: импутация kNN. Число образцов: 216



Однако, наряду с количеством и характером пораженных лимфоузлов, можно предположить важное влияние на прогноз опухолевой стромы и ее микроокружения, что демонстрирует повышение экспрессии *CD68* выше порогового значения 5,2. *CD68* играет роль в фагоцитарной активности тканевых макрофагов как во внутриклеточном лизосомальном метаболизме, так и во внеклеточных взаимодействиях. Опухоль-ассоциированные макрофаги (tumor associated macrophages, TAM) – преобладающий подкласс лейкоцитов в солидных опухолях, к которым относится КРР. TAM с противовоспалительной активностью модулируют микроокружение, способствуют росту опухоли, ее инвазии и метастазированию, стимулируют ангиогенез, резистентность опухоли к химио- и радиотерапии и создают условия избегания опухолью иммунного надзора. Данные клинических и экспериментальных исследований свидетельствуют о связи высокой плотности TAM в опухоли с неблагоприятным прогнозом для пациентов [Богданова И.М. и соавт., 2019].

Вторая отобранная нами предиктивная модель (рисунок 12) выявила неоднородность влияния на прогрессирование КРР патоморфологических факторов риска, оцениваемых при исследовании операционного препарата (целевая переменная «факторы риска»). Эта модель определяет, что даже при наличии факторов риска снижение уровня экспрессии гена *CTSL2* в аденокарциноме способствует улучшению прогноза КРР, что может в ряде случаев объяснить лучшие отдаленные результаты лечения IIIa стадии в сравнении с IIIb и IIIc. А далее, слабое влияние на прогноз будет оказывать увеличение экспрессии генов *PTEN* и *CD68*, что может свидетельствовать о стимуляции апоптоза и активности тканевых макрофагов.

Рисунок 12. Предиктивная модель 2 («случайный лес»). Метод работы с пропусками: импутация медианой. Число образцов: 216



Для решения задачи определения критических значений показателей экспрессии мРНК генов, формирующих разработанную нами прогностическую модель прогрессирования КРР, с помощью техники «бинарного дерева классификации» были построены отдельные деревья решений, анализ которых позволяет определить критические значения влияющих переменных: клинико-патоморфологических предикторов прогноза и показателей экспрессии мРНК ряда отобранных генов нашей панели. Для этого был использован внутренний инструмент «случайных лесов»: значимость переменной определяется показателем, насколько уменьшается доля верно распознанных значений при случайных перестановках значений данной переменной.

Адекватность окончательной модели проверена нами с помощью построения рейтинга переменных. Результаты, полученные таким способом, могут быть использованы для прогнозирования течения колоректального рака. Что касается определения пороговых значений экспрессии генов, использованных в прогностической модели, то по технике «бинарного дерева классификации» были получены новые значения, которые нужно учитывать дополнительно при определении вероятности развития прогрессирования у пациентов с КРР. Для проверки значимости выявленных нами на предыдущих этапах работы критических значений влияющих переменных была использована проверочная логистическая модель. Все ее переменные имеют вероятность $p > 0,1$, что подтверждает правильность выявленных критических значений экспрессии генов панели, включенных в разработанную нами прогностическую модель.

Таблица 9. Критические значения переменных прогностической модели

Переменная в модели	Критическое значение
Лимфоузлы (Kn)	0.097
<i>GRB7</i>	17
<i>Ki67</i>	8,6
<i>IGF1</i>	7,6
<i>IL2</i>	4,6
<i>IL6</i>	14
<i>IL8</i>	4.8
<i>GATA3</i>	5,1
<i>CCNB1</i>	10

Где: Лимфоузлы (Kn) - соотношение числа метастатических лимфоузлов к числу удаленных; *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* – уровни экспрессии соответствующего гена в опухоли.

Подводя итоги, можно утверждать, что эффективная реализация возможностей дифференцированного подхода к лечению и профилактике прогрессирования колоректального рака сегодня должна быть основана на всесторонней оценке молекулярно-генетических показателей аденокарциномы и ее окружения с учетом эмбрионально-анатомического отдела толстой кишки, в котором опухоль возникла.

Мультидисциплинарная команда является основой для разработки современных стратегий лечения колоректального рака. Во время онкологического консилиума концепция такого подхода требует увеличения числа точек пересечения профессиональных знаний большого числа «узких» специалистов: лучевых диагностов, эндоскопистов, хирургов, онкологов, радиологов, генетиков, клинических фармакологов и многих других. И здесь особую ценность приобретают характеристики заболевания, которые могут персонифицировать вариант его течения среди биологического разнообразия КРР. Именно к таким характеристикам, на наш взгляд, и относятся представления о риске прогрессирования и прогнозе течения заболевания, которые мы разработали в процессе работы, сформировав молекулярные фенотипы и предиктивные модели, используя морфологические и молекулярно-генетические показатели колоректальной аденокарциномы и ее окружения. Их оценка позволит дифференцированно оценивать эффективность различных методов лечения и их комбинаций в локальных стадиях колоректального рака, а также сформировать эффективную систему мониторинга за пациентами после лечения, ориентируясь на выявленные критические значения показателей экспрессии мРНК ряда генов, участвующих в молекулярных сигнальных путях канцерогенеза.

ВЫВОДЫ

1. Каждый эмбрионально-анатомический отдел толстой кишки в норме имеет характерный молекулярный профиль, который может быть

идентифицирован по уровню экспрессии 16 генов: *MGB, HER2, BAG1, PGR, SCUBE2, MMP2, PAPPА, IL12a, IL7, IL15, IL8, IL1b, CD45, VEGFA189, TLR7, GATA3*: правая ободочная с точностью 85,26%; левая ободочная с точностью 90,52%; прямая кишка с точностью 100%. Молекулярный профиль слизистой толстой кишки у здоровых людей достоверно изменяется при достижении возраста в 60 лет и выявляется с точностью 91,8%. При развитии патологических изменений в толстой кишке также формируются специфические молекулярные профили неизменной слизистой: характерные для колоректального рака по уровню экспрессии 14 генов: *MYBL2, P16INK4A, MMP9, P14ARF (P19ARF), COX-2, CYP19A, GREM1, MMP7, MMP8, IL6, IL8, IL1b, LGALS1, LIF*, а для гиперпролиферативных заболеваний по уровню экспрессии 22 генов: *TERT, PTEN, GATA3, BCL2, BAG1, NDRG1, IL2, IL12a, TLR2, GNLY, COX-2, IGF2, TGFb, SCUBE2, VEGFA165, PGR, CYP19A, CD56, CD69, MMP2, MMP11, LGALS1*.

2. Образцы колоректальной аденокарциномы, отобранные из прямой и левой ободочной кишки, отличаются по уровню экспрессии 14 генов: *CTSL2, TERT, ESR1, STK15, MYBL2, IGF1, IGF2, PAPPА, IL10, IFNg, CD45, CD56, CD69, GATA3*. Образцы аденокарциномы из прямой и правой ободочной кишки по уровню экспрессии 4 генов: *CCND1, BIRC5, IL7, BAX*. Образцы аденокарциномы из левой и правой ободочной кишки по уровню экспрессии 8 генов: *CD68, GRB7, IFNg, TNF α , CD69, VEGFA165, VEGFA189, GATA3*.
3. Для колоректального рака характерно снижение общей точности выявления фенотипических отличий эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки до 75,42% с сохранением особого молекулярного фенотипа прямой кишки, определяющегося с точностью 81,6%. Уровни экспрессии *PTEN, MYBL2, CYP19A* и *MMP8* в этих образцах имеют статистически значимую связь со степенью дифференцировки опухоли, а уровень экспрессии *MMP11, MMP2, MMP7* и *TPA* коррелирует с размером опухоли.
4. Одновременная оценка уровней экспрессии *CCND1, CCNB1, P16INK4A, IL1b, CD56, LGALS1* в образцах из опухоли и уровней экспрессии *Ki67, IGF2, CYP19A, PAPPА, IL6, IL15* в образцах неизменной слизистой позволяет оценить характер регионарного метастазирования при КРР;
5. Исследование экспрессионного профиля материала щеточной биопсии слизистой прямой кишки позволяет создать молекулярные диагностические панели для пары «норма – патология» на основании оценки значений экспрессии *ESR1, P16INK4A, GNLY, IL12a, IL7, IL8, IL1b, TNF α , CD69, TLR2* и *HLA-G5* с точностью 93,4%, для пары «норма – КРР» на основании оценки значений экспрессии *CTSL2, ESR1, GRB7, GNLY, MMP2, TERT* с точностью 96,7%, для пары «норма – аденома» на основании оценки значений экспрессии *BCL2, CD68, MYC, TERT, STK15*

- с точностью 88,6%, для пары «норма – НЯК» на основе оценки значений экспрессии *CTSL2*, *BCL2*, *MYC*, *BIRC5*, *CD68* с точностью 96%;
6. Соматические мутации генов семейства *RAS* формируют особый молекулярный фенотип, характеризующийся изменением экспрессии *CCND1*, *BCL2*, *HER2*, *MYBL2*, *MMP8*, *IL6*, *IL8*, *IL1b*, *CD69*, *TNFa*, который необходимо учитывать при оценке эффективности анти-EGFR терапии;
 7. Прогностическая математическая модель с использованием клинико-морфологических характеристик колоректальной аденокарциномы позволяет прогнозировать риск прогрессирования КРР в течение 36 месяцев от момента установки диагноза с точностью до 50,86%. Включение в модель показателей экспрессии *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* в образцах опухоли повышает точность прогноза до 80,6%;
 8. Использование комплекса многопараметрических методов (метод К-средних, бинарных «деревьев» классификации, случайных лесов, логистических моделей) позволяет с использованием экспрессионных профилей образцов аденокарциномы провести устойчивую кластеризацию пациентов на группы благоприятного, неблагоприятного и неопределенного прогнозов. Молекулярный фенотип определяется уровнем экспрессии 15 генов: 7 генов из опухолевых образцов (*MMP7*, *MMP11*, *MMP2*, *IL8*, *IGF2*, *MYC*, *CD68*) и 8 генов из образцов неизменной слизистой (*GREM1*, *MMP8*, *HLA-G5*, *LGALS1*, *BAX*, *CCND1*, *BAG1*, *TLR2*);
 9. Показатели экспрессии мРНК генов, формирующих прогностическую модель прогрессирования колоректального рака, имеют следующие критические значения: *GRB7*-17; *Ki67*-8,6; *IGF1*-7,6; *IL2*-4,6; *IL6*-14; *IL8*-4,8; *GATA3*-5,1; *CCNB1*-10;
 10. Для формирования индивидуальной программы лечения и последующего наблюдения пациентов с КРР в локализованных стадиях необходимо оценивать риск прогрессирования заболевания на основе прогностических математических моделей и кластеризации. Во II стадии КРР при pT3N0M0 с наличием морфологических предикторов высокого риска прогрессирования целесообразно исследование значений экспрессии 10 генов в образцах аденокарциномы: *MYC*, *BAG1*, *ESR1*, *STK15*, *PAPPA*, *IL1b*, *IFNG*, *CD56*, *CD69*, *HLA-G5* для построения индивидуального прогноза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

С целью повышения эффективности выявления колоректального рака предлагается несколько методов молекулярной диагностики патологии толстой кишки, основанных на оценке уровней экспрессии мРНК ряда генов методом количественной ПЦР в образцах щеточной биопсии из нижеампулярного отдела прямой кишки:

1. Панель диагностики колоректального рака, включающая 7 генов: *CTSL2*, *ESR1*, *GRB7*, *GPLY*, *MMP2*, *TERT* Точность панели 96,7% при уровне специфичности 100%;
2. Панель диагностики воспалительных изменений включает 5 генов: *CTSL2*, *BCL2*, *MYC*, *BIRC5*, *CD68*. Отсутствие патологии толстой кишки при использовании этой панели определяется со 100% точностью, неспецифический язвенный колит выявляется с точностью 96%;
3. Панель диагностики гиперпролиферативных изменений слизистой толстой кишки включает 5 генов *BCL2*, *CD68*, *MYC*, *TERT*, *STK15*. Точность обнаружения 88,6%.

Для формирования индивидуальной программы лечения и последующего наблюдения пациентов с КРР в локализованных стадиях необходимо учитывать:

1. Молекулярный фенотип, характерный для мутаций генов семейства *RAS*, характеризующийся изменением экспрессии *CCND1*, *BCL2*, *HER2*, *MYBL2*, *MMP8*, *IL6*, *IL8*, *IL1b*, *TNFa* *CD69*;
2. Во II стадии КРР при pT3N0M0 с наличием морфологических предикторов высокого риска прогрессирования целесообразно исследование значений экспрессии 10 генов в образцах аденокарциномы: *MYC*, *BAG1*, *ESR1*, *STK15*, *PAPPA*, *IL1b*, *IFNG*, *CD56*, *CD69*, *HLA-G5* для оценки целесообразности адъювантной лекарственной терапии.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Захаренко М.В., Боженко В.К., Киселева Я.Ю., Джикия Е.Л., Станоевич У.С., Кулинич Т.М., Мельникова Н.В., Сенчукова А.Л., Уракова А.Б., Грунин И.Б., Гончаров С.В., Близиюков О.П., Солодкий В.А. Исследование профилей экспрессии мРНК генов, участвующих в регуляции основных клеточных функций в неизменном эпителии толстой кишки у здоровых доноров // Биомедицинская химия. 2021. Т. 67, № 4. С.366-373.
2. Солодкий В.А., Ахаладзе Г.Г., Гребенкин Е.Н., Гончаров С.В., Станоевич У.С., Иванова О.А. Симультантные операции при синхронных метастазах колоректального рака в печени: анализ выживаемости и факторов негативного прогноза //Анналы хирургической гепатологии. 2021. Т. 26, № 1. С. 92-99.
3. Боженко В.К., Захаренко М.В., Гончаров С.В., Станоевич У., Кудинова Е.А., Солодкий В.А. Фенотипические изменения в морфологически нормальной ткани опухолевого окружения. диагностические перспективы // Клиническая лабораторная диагностика. 2021. Т. 66, № S4. С. 17-18.
4. Нуднов Н.В., Гончаров С.В., Станоевич У.С., Близиюков О.П., Конторович Д.С. Проблема своевременной диагностики первично-

- множественного синхронного рака толстой кишки // Вестник рентгенологии и радиологии. 2020. Т. 101, № 3. С. 170-174.
5. Солодкий В.А., Станоевич У., Боженко В.К., Захаренко М.В., Гончаров С.В., Крашихина Т.В., Рагимов В.А., Гребенкин Е.Н. Скрининг колоректального рака: прошлое, настоящее, будущее // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. 2020. Т. 20, № 2. С. 144-161.
 6. Боженко В.К., Захаренко М.В., Кулинич Т.М., Джикия Е.Л., Сенчукова А.Л., Станоевич У.С., Грунин И.Б., Мельникова Н.В., Крашихина Т.В., Близнюков О.П., Гончаров С.В., Кудинова Е.А. Исследование уровня экспрессии гена *tert* в слизистой оболочке толстой кишки при различной патологии // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. 2020. Т. 20, № 3. С. 15-39.
 7. Барсуков Ю.А., Ткачев С.И., Мамедли З.З., Власов О.А., Алиев В.А., Перевошиков А.Г., Гончаров С.В. Запущенный рак дистального отдела прямой кишки: возможности сфинктеросохраняющего лечения в условиях неoadьювантной терапии // Газовая хирургия и онкология. 2020. Т. 10, № 1. С. 28-36.
 8. Барсуков Ю.А., Ткачев С.И., Мамедли З.З., Перевошиков А.Г., Власов О.А., Кулушев В.М., Алиев В.А., Гончаров С.В. Комбинированное лечение больных с запущенными стадиями рака дистальных отделов прямой кишки в условиях неoadьювантной термолучевой терапии // Газовая хирургия и онкология. 2020. Т. 10, № 3-4. С. 43-53.
 9. Станоевич У.С., Боженко В.К., Захаренко М.В., Гончаров С.В., Солодкий В.А. Роль молекулярно-генетических исследований в планировании неoadьювантной химиолучевой терапии при раке прямой кишки // Злокачественные опухоли. 2016. № 4S1 (21). С. 258-259.
 10. М.В. Захаренко, В.К. Боженко, Я.Ю. Киселёва, Е.Л. Джикия, У.С. Станоевич, Т.М. Кулинич, Н.В. Мельникова, А.Л. Сенчукова, А.Б. Уракова, И.Б. Грунин, С.В. Гончаров, О.П. Близнюков, В.А. Солодкий. Исследование профилей экспрессии мРНК генов, участвующих в регуляции основных клеточных функций в неизменённом эпителии толстой кишки у здоровых доноров // Биомедицинская химия. 2021. Т. 67, № 4. С. 366-373.
 11. Кулинич Т.М., Захаренко М.В., Джикия Е.Л., Сенчукова А.Л., Станоевич У.С., Грунин И.Б., Мельникова Н.В., Гончаров С.В., Крашихина Т.В., Кудинова Е.А., Близнюков О.П., Боженко В.К. Исследование уровня экспрессии генов-маркеров пролиферативной активности в слизистой оболочке толстой кишки при различной патологии // Успехи молекулярной онкологии. 2020. Т.7, № 2. С. 39-46.
 12. Крашихина Т. В., Боженко В. К., Гончаров С.В., Станоевич У.С., Солодкий В.А. Прогностическое значение экспрессии генов при колоректальном раке // Вопросы онкологии. 2022. Т. 68, № S3. С. 113-114.

13. Гончаров С.В., Боженко В.К., Захаренко М.В., Чаптыков А.А., Кулинич Т.М., Солодкий В.А. Изменение экспрессии мРНК панели генов в слизистой оболочке толстой кишки в процессе естественного старения // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2023. – Т. 7, № 6. – С. 347-352. – DOI 10.32364/2587-6821-2023-7-6-2.
14. Боженко В.К., Гончаров С.В., Захаренко М.В., Киселева Я.Ю., Кармакова Т.А., Кулинич Т.М., Станоевич У.С., Мельникова Н.В., Сенчукова А.Л., Грунин И.Б., Близнюков О.П., Солодкий В.А. Анализ экспрессии матричной РНК панели генов морфологически неизмененного эпителия прямой кишки как метод ранней диагностики патологии толстой кишки // Успехи молекулярной онкологии. – 2023. – Т. 10, № 4. – С. 97-107.
15. Гончаров С.В., Боженко В.К., Захаренко М.В., Чаптыков А.А., Кулинич Т.М., Солодкий В.А. Возможности использования профилирования экспрессии мРНК для прогноза прогрессирования локальных стадий колоректального рака // Вестник РГМУ. 2023. № 6. С. 85–91.
16. Солодкий В. А., Гончаров С. В., Власов О. А., Барсуков Ю. А. Предварительное сравнение результатов выполнения трансанальных эндоскопических операций и стандартных хирургических вмешательств у больных раком прямой кишки // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2023. Т. 12, № 6. С. 12-18.
17. Гончаров С.В., Боженко В.К., Захаренко М.В., Киселева Я.Ю., Чаптыков А.А., Кулинич Т.М., Солодкий В.А. Анализ молекулярных фенотипов эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки в нормальной слизистой оболочке и при колоректальном раке // Альманах клинической медицины. 2023. Т. 51, № 8. С. 441-455.
18. Боженко В. К., Гончаров С. В., Кудинова Е. А. [и др.] Оценка безопасности с установлением максимально переносимой дозы ингибитора RAS-ГТ Фазы (Инг-Рас) для лечения опухолей желудочно-кишечного тракта: предварительные результаты исследования I фазы // Альманах клинической медицины. 2023. Т. 51, № 7. С. 376-396.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

КРР – колоректальный рак

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ВБПБ – выживаемость без прогрессирования болезни (безрецидивная выживаемость)

ОВ – общая выживаемость

RUSSCO – Российское общество клинической онкологии

ASCO (American Society of Clinical Oncology) – Американское общество клинической онкологии

NCCN (National Comprehensive Cancer Network) – некоммерческая организация, объединяющая комплексные онкологические центры в США

Kp – коэффициент пораженных лимфоузлов: отношение числа метастатических лимфоузлов к общему числу удаленных в операционном препарате

MYBL2 (Myeloblastosis oncogene-like 2) – онкоген миелобластома 2 типа

P16INK4A – ген-регулятор, циклин-зависимого ингибитора киназы 4A

PTEN (phosphatase and tensin homolog) – гомолог фосфатазы итензина, ген опухолевой супрессии

BCL2 (B-cell lymphoma 2) – ген В-клеточной лимфомы 2, регулятор апоптоза

BAG1 (BCL2-Associated Athanogene) – BCL2 ассоциированный ген, регулятор апоптоза

TERT (Telomerase reverse transcriptase) – ген обратной транскриптазы, препятствующей укорочению теломер в процессе деления

NDRG1 (N-Myc Downstream Regulated) – N-Мyc подавляющий ген

GRB7 (Growth factor receptor-bound protein 7) – ген рецептор связанного фактора роста 7

ESR1 – ген экспрессии рецепторов эстрогена

PGR – ген экспрессии рецепторов прогестерона

MGB1 – ген экспрессии маммаглобина

MMP11 (matrix metalloproteinase 11) – ген матричной металлопептидазы 11

CTSL2 (CathepsinL2) – ген, регулирующий активность катепсина L2

CD68 (Cluster of Differentiation 68) – кластер дифференцировки 68, макросиалин

STK-15 (Serine/threonine-protein kinase 15) – Серин/треонин-протеин киназа 15

CCNB1 (Cyclin B1) – циклин B1

CCND1 (Cyclin D1) – циклин D1