

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

На правах рукописи

Гончаров Сергей Владимирович

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

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

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

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

Москва- 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. Колоректальный рак: современное состояние проблемы диагностики и лечения (Обзор литературы).....	24
ГЛАВА 2. Материал и методы лечения.....	67
ГЛАВА 3. Клинико-морфологическая характеристика обследованных пациентов.....	88
3.1. Клиническая характеристика пациентов КРР	88
3.2. Лечение пациентов в локализованных стадиях КРР (T1-4b, N0-2, M0).....	95
3.2.1. Неoadьювантное лечение пациентов в локализованных стадиях КРР (T1-4b, N0-2, M0).....	97
3.2.2. Хирургическое лечение пациентов в локализованных стадиях КРР (T1-4b, N0-2, M0).....	101
3.2.3. Результаты патоморфологического исследования операционных препаратов	108
3.2.4. Адьювантное лечение пациентов в локализованных стадиях КРР (T1-4b, N0-2, M0).....	117
ГЛАВА 4. Молекулярно-генетическая характеристика слизистой толстой кишки в норме и патологии.....	121
4.1. Оценка экспрессии генов неизменной слизистой оболочки толстой кишки в норме и при КРР.....	121
4.1.1. Оценка экспрессии генов в образцах слизистой оболочки толстой кишки у здоровых людей в зависимости от эмбрионально-анатомического отдела	121
4.1.2. Оценка экспрессии генов в образцах слизистой оболочки толстой кишки у здоровых людей в зависимости от возраста.....	125
4.1.3. Оценка экспрессии генов в образцах неизменной слизистой оболочки толстой кишки при наличии в ней гиперпролиферативных и воспалительных процессов	129
4.1.3.1. Оценка экспрессии генов в образцах неизменной слизистой толстой кишки при наличии гиперпролиферативных процессов в ней в зависимости от анатомического отдела.	129
4.1.3.2. Оценка экспрессии генов в образцах из неизменной слизистой толстой кишки при наличии гиперпролиферативных	

процессов в зависимости от морфологических характеристик аденомы	131
4.1.3.3. Оценка экспрессии генов в образцах из неизменной слизистой толстой кишки при наличии аденом и гиперпластических полипов.....	132
4.1.4. Оценка уровня экспрессии генов в образцах неизменной слизистой оболочки толстой кишки при колоректальном раке локальных стадий различных локализаций	133
4.2. Оценка возможности использования образцов щеточной биопсии прямой кишки для молекулярной диагностики патологических изменений слизистой толстой кишки.....	135
4.2.1. Оценка результатов анализа профиля экспрессии генов в образцах щеточной биопсии прямой кишки для выявления патологии в ней.....	137
4.2.2. Оценка профилей экспрессии генов в образцах щеточной биопсии слизистой прямой кишки в норме и при колоректальном раке различных локализаций.....	140
4.2.2.1. Оценка экспрессии генов в образцах щеточной биопсии неизменной слизистой прямой кишки при наличии аденом в ободочной кишке.....	142
4.2.2.2. Оценка экспрессии генов в образцах щеточной биопсии неизменной слизистой прямой кишки у пациентов с неспецифическим язвенным колитом.....	144
4.2.3. Определение оптимальной панели генов исследования образцов щеточной биопсии прямой кишки для диагностики заболеваний толстой кишки. Алгоритм ее применения	145
4.3. Оценка экспрессии генов в образцах колоректального рака	148
4.3.1. Оценка уровня экспрессии в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости от степени ее дифференцировки.....	148
4.3.2. Оценка уровня экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости от глубины инвазии опухоли (показатель Т по классификации TNM).....	149
4.3.3. Оценка уровня экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости от характера изменений регионарных лимфоузлов (показатель N по классификации TNM)	150
4.3.4. Оценка уровня экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости от локализации в эмбрионально-анатомических отделах толстой кишки.....	153
4.3.5. Оценка уровня экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости от характера мутаций в генах RAS..	156
4.3.6. Сравнительная оценка уровня экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы, неизменной слизистой при КРР и в	

норме в зависимости от эмбрионально-анатомического отдела прямой кишки.....	159
4.4. Оценка риска прогрессирования колоректального рака с использованием молекулярно-генетических технологий	161
4.4.1. Связь риска прогрессирования КРР с уровнем экспрессии генов в образцах аденокарциномы и неизменной слизистой	161
4.4.2. Модель фенотипирования колоректального рака на основе кластеризации профилей экспрессии генов и ее связь с прогрессированием заболевания	164
4.4.3. Результаты мультифакторного регрессионного анализа (РМА) в оценке срока безрецидивной выживаемости (ВБПБ) у пациентов с КРР	170
4.4.4. Оценка возможности использования дифференцированной лечебной тактики во II стадии КРР в зависимости от профиля экспрессии генов	176
4.5. Возможности прогнозирования развития прогрессирования при колоректальном раке	180
4.5.1. Логистическая регрессия в прогнозировании безрецидивной выживаемости (ВБПБ).....	182
4.5.2. Подготовка к построению модели: импутация и очистка данных	183
4.5.3. Анализ подготовленных данных. Создание прогностических математических моделей.....	186
4.5.4. Определение критических значений показателей экспрессии мРНК генов, формирующих прогностическую модель течения КРР .	197
4.5.5. Проверка качества прогностической математической модели прогрессирования КРР в локальных стадиях	201
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	203
ВЫВОДЫ	237
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	240
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	241
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	243

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

КРР – колоректальный рак

АХТ – адьювантная химиотерапия

НАТ – неoadьювантная терапия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография

ЛУ – лимфатические узлы

ПЦР-ОТ – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

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

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

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

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

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

TNM (от tumor, nodus и metastasis) – международная классификация стадирования злокачественных новообразований

STAGE HAZARD («ФАКТОРЫ РИСКА») – комплексный показатель, включающий стадию и риск прогрессирования: II или III стадия КРР согласно критериям NCCN (High-risk factors for recurrence)

RHE/ExRHE – правосторонняя/расширенная правосторонняя гемиколэктомия

TCR – резекция поперечноободочной кишки

LHE/ExLHE – левосторонняя/расширенная левосторонняя гемиколэктомия

AR – передняя резекция прямой кишки

LAR – низкая передняя резекция прямой кишки

ParISR – парциальная интрасфинктерная резекция прямой кишки

TotISR – тотальная интрасфинктерная резекция прямой кишки

ARE – брюшно-промежностная экстирпация прямой кишки

RS (right side) – правая половина ободочной кишки

LS (left side) – левая половина ободочной кишки

R (rectum) – прямая кишка

MHC – морфологически неизменная слизистая толстой кишки (при колоректальном раке)

MYC – регуляторный ген, участвует в процессе транскрипции

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

BIRC5 – ингибитор ответа апоптозных повторов 5/ Сурвивин

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-Мус 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

HER2/neu (Human Growth Factor Receptor 2) – Рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2

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

CCNB1 (Cyclin B1) – циклин B1

CCND1 (Cyclin D1) – циклин D1

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Колоректальный рак (КРР) занимает одну из ведущих позиций в структуре онкологической заболеваемости как в России, так и во всем мире. Распространенность 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. [9]. Удельный вес КРР, диагностированного в I-II стадии в нашей стране в 2011-2021 гг., повысился для ободочной кишки с 40,0% до 50,4%, а для прямой кишки с 48,2% до 49,5%. При этом колоректальный рак, выявленный в III стадии за этот же период (2011-2021 гг.), имеет разнонаправленную динамику: снижение числа пациентов раком ободочной кишки с 28,4% до 22,1% и одновременное увеличение числа больных раком прямой кишки с 25,2% до 27,4% в этой подгруппе [9]. Также можно констатировать, что, несмотря на очевидные успехи в диагностике КРР в условиях растущей заболеваемости, число пациентов с локальными стадиями, перспективными в отношении благоприятного прогноза, остается, по сути, прежним [9].

Причины такой ситуации крайне разнообразны. С одной стороны, имеется ряд объективных обстоятельств, по-прежнему связанных как с несвоевременной диагностикой КРР, так и с увеличением и сохранением в популяции факторов риска его развития: ожирения, курения табака, характера питания с преобладанием в диете переработанного красного мяса, общим старением населения. А с другой – сам факт установления диагноза колоректального рака предполагает использование большого количества современных эффективных лечебных методик – хирургических, лучевых и лекарственных. Каждая из этих методик непрерывно совершенствуется, пополняя и изменяя уже существующий опыт лечения КРР.

С точки зрения совершенствования вторичной профилактики, рак толстой кишки представляется весьма привлекательной мишенью для

улучшения результатов его своевременной диагностики. Это обусловлено как постоянно растущей заболеваемостью, что оправдывает массовое регулярное обследование бессимптомной группы условно здоровых людей, так и, как правило, четким, растянутым во времени процессом злокачественной трансформации слизистой толстой кишки. Выявление предраковых изменений в ней, а также рака в начальных стадиях характеризуется прекрасным прогнозом. Но, к сожалению, ни один из существующих на сегодня в России и мире методов диагностики патологических изменений слизистой оболочки толстой кишки не может считаться во всех отношениях идеальным. Фиброколоноскопия является самым надежным методом оценки состояния кишки и, соответственно, «золотым стандартом» диагностики КРР, но широкое ее использование в профилактических целях затруднено вследствие агрессивного характера процедуры, определенного риска осложнений при выполнении, а также высокой себестоимости и необходимости предварительной подготовки кишечника к обследованию в течение нескольких дней. Не следует забывать про зависимость результатов колоноскопии от человеческого фактора и качества подготовки толстой кишки. Технологии искусственного интеллекта в составе оптических приборов позволяют частично компенсировать эти проблемы, но трудности массового охвата они не решают. Ранее мы указывали, что колоноскопия является «золотым» (но не идеальным!) методом выявления изменений слизистой толстой кишки. Чтобы преодолеть ее недостатки, разработаны методы молекулярной диагностики. Их чувствительность и специфичность вплотную приближается к фиброэндоскопии [138].

Широкое распространение в качестве методов молекулярной диагностики получили биохимические и иммуногистохимические тесты, принцип работы которых базируется на обнаружении скрытой крови в кале обследуемого. Не всегда опухоль проявляет себя обязательным

кровотечением, но оно может сопровождать многие неонкологические заболевания; и, более того, нарушение подготовительной диеты со стороны пациента, а именно употребление в пищу кровь содержащих пищевых продуктов (мяса), также может приводить к ложноположительным результатам [97]. Остальные диагностические методы, такие как капсульная эндоскопия и виртуальная колоноскопия, пока не могут считаться широко распространенными. Капсульная колоноскопия чаще обсуждается в литературе как метод выявления именно предраковых изменений слизистой, и, в частности, полипов низкого риска малигнизации. Чувствительность и специфичность исследования зависят от размеров полипов. И колеблются на уровне 84-88%. Считается, что в такой ситуации капсульная эндоскопия имеет преимущества по сравнению с анализом на скрытую кровь. Ввиду отсутствия инсуффляции имеется мало сведений о точности выявления неполипозидных поражений: латерально стелющихся полипов, ангиодисплазий [165]. К сожалению, мы не обнаружили результатов диагностики КРР на большом материале в отечественной литературе с использованием виртуальной колоноскопии, и можем констатировать, что в нашей стране ее использование ограничивается крупными центрами. Иностранные метаанализы определяют чувствительность этого метода в 96,1% по данным 25 исследований (398 из 414; 95% ДИ 93,8%, 97,7%) [225]. Также обратим внимание на зависимость результатов от качества подготовки кишечника. Только при надлежащей подготовке не было пропущено ни одного случая рака. При изучении результатов выявления полипов в метаанализе на 33 исследованиях чувствительность была переменной, но улучшалась по мере увеличения размера полипа (48% для полипов <6 мм; 61% для полипов 6-9 мм, чувствительность 70% для полипов >9 мм) [166]. Еще раз подчеркнем экономические, технические, организационные и социальные трудности этого метода, затрудняющие его активное практическое применение, особенно в условиях нашей страны.

К настоящему времени большие надежды возлагаются на использование достижений молекулярной медицины для своевременного выявления патологических изменений слизистой оболочки толстой кишки. Обсуждая системы молекулярной диагностики КРР, отметим, что, несмотря на многочисленные исследования, в настоящее время существуют только две одобренные диагностические скрининговые системы колоректального рака на основе метилирования: Epi proColon и Cologuard [231]. Также на основе метилированной ДНК разрабатываются тесты по выявлению колоректального рака, использующие образцы плазмы крови тестируемого [337].

Прогнозированию прогрессирования колоректального рака как одной из основных задач его третичной профилактики посвящено множество публикаций. Оно традиционно основывается на международной классификации стадий в системе TNM. Однако очевидно, что имеются различия в разрабатываемых моделях выживаемости независимо от стадии, что позволяет предположить сложное взаимодействие стадии, биологии опухоли, особенностей организма и массы других факторов, играющих роль в формировании прогноза, стратификации риска и определении показаний к проведению неoadъювантной и адъювантной терапии.

В современной онкологии существует устойчивая тенденция поиска клиничко-молекулярных фенотипов колоректального рака, которые решили бы основные проблемы третичной профилактики: это дифференцированный подход к лечению, создание рациональных мониторинговых схем и, самое главное, мы хотим это подчеркнуть, оценки эффективности существующих и перспективных схем лечения. Такой подход предполагает оценку эффективности третичной профилактики КРР с учетом информации не только о патоморфологической стадии, а через призму понимания биологии опухоли. Продолжающаяся разработка молекулярных фенотипов служит именно этой цели.

При обсуждении роли молекулярно-генетических исследований в задачах третичной профилактики колоректального рака – а, собственно, именно с этой целью они и созданы, – в последние годы благодаря усилиям медицинских сообществ стали доступны клиничко-геномные базы данных. Анализируя их, можно лучше понять геномный ландшафт колоректального рака и попытаться приблизиться к их решению, оценив эффективность и безопасность лечения в подгруппах пациентов с различными геномными профилями. Но насколько репрезентативны популяции пациентов с колоректальным раком в различных клиничко-геномных базах данных? В проведенных работах [313] был сделан важный вывод о том, что различия между базами данных по демографическим, клиническим характеристикам, схемам лечения и общей выживаемости должны учитываться при разработке исследований и интерпретации результатов, полученных в клиничко-геномных базах данных. Также уже опубликовано большое количество работ, посвященных ассоциациям между прогнозом прогрессирования КРР и молекулярными характеристиками опухоли. Можно считать, что история изучения прогнозирования течения колоректального рака началась в 1965 г. с открытия онкомаркера РЭА – ракового эмбрионального антигена [130]. В современных клинических рекомендациях определение его уровня и сейчас рекомендуется для мониторинга эффективности терапии пациентов с КРР и в качестве предиктора прогрессирования с рекомендациями оценки его уровня каждые 3 месяца на протяжении 3 лет. Более 20 лет назад определение его инициальной концентрации в США предполагалось даже включить в базовую классификацию по системе TNM. Чувствительность других онкомаркеров, в частности, СА 19-9, значительно уступает РЭА, однако его повышенные уровни также могут служить фактором неблагоприятного прогноза. Эволюция знаний о молекулярных механизмах канцерогенеза привела к открытию многих биологических предикторов для прогнозирования: микросателлитной нестабильности (MSI), потере

гетерозиготности хромосомы 18q (18qLOH), мутации в генах *p53*, *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA*, нарушения экспрессии *PTEN* и цитовиллина, полиморфизм *UGT1A1*. В последние годы изучалась также экспрессия микроРНК – коротких некодирующих молекул РНК из 18-22 нуклеотидов. Huang et al. [150] обнаружили, что уровни miR29a и miR92a в плазме крови больных КРР коррелировали с возможностью его прогрессирования с высокой точностью и специфичностью. Само понятие «высокого риска прогрессирования» при колоректальном раке также внесено в международные протоколы лечения как с позиций клинико-морфологических представлений о факторах риска: степени дифференцировки опухоли, лимфоваскулярной инвазии, кишечной непроходимости, наличии перфорации или положительного края резекции и т.д., так и с позиций формирования на этапе первичной диагностики клинических групп с дифференцированным подходом к лечению и третичной профилактике в каждой из них в силу выявленных различных молекулярно-генетических характеристик КРР [21]. Особое внимание при этом придается выбору терапевтических решений при II стадии колоректального рака. Однако выявление того или иного прогностического маркера далеко не всегда позволяет предсказывать ответ опухоли на лечение [134], а значит, объективно оценить его эффективность.

Если резюмировать сказанное выше, становится очевидным, что улучшение результатов лечения колоректального рака может быть реализовано повышением эффективности мер вторичной и третичной его профилактики: улучшением возможностей своевременной диагностики предраковых изменений и непосредственно самого КРР за счет их совершенствования и увеличением охвата фокусных групп риска уже имеющимися методами выявления патологии и внедрением новых диагностических методик, основанных на современных достижениях молекулярной биологии. Разработка дифференцированной стратегии

лечения КРР в локальных стадиях и объективная оценка риска его прогрессирования будет базироваться не только на интерпретации традиционных клинико-морфологических показателей аденокарциномы и состоянии регионарных лимфоузлов, но и на всестороннем анализе массива данных вне формальной патогистологической стадии – молекулярно-генетической характеристике как опухолевого узла, так и всей слизистой толстой кишки, рассматривая ее как единый орган, вовлеченный в системный процесс канцерогенеза. Все вышесказанное и предопределило выполнение данной работы.

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 клиничко-молекулярных фенотипов и математических моделей оценки риска его прогрессирования.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное молекулярно-генетическое исследование у пациентов с КРР, включившее в себя анализ относительных значений экспрессии мРНК 62 генов, потенциальных участников различных путей канцерогенеза и регулирующих базовые внутриклеточные процессы пролиферации, апоптоза, ангиогенеза, и т.д. в образцах из колоректальной аденокарциномы с определением точечных мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, оценкой микросателлитной нестабильности (MSI) в них, со сравнением профилей экспрессии этой же панели генов в образцах неизменной слизистой толстой кишки при колоректальном раке в 0-III стадиях и у здоровых людей, а также в материале щеточной биопсии слизистой прямой кишки при колоректальном раке, расположенном в различных эмбрионально-анатомических отделах толстой кишки, гиперпролиферативных процессах в ней, неспецифическом язвенном колите,

а также при отсутствии органической патологии со стороны слизистой оболочки толстой кишки.

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 нижеампулярного 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 адьювантной 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, PAPPА, 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

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 клиничко-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 значительно 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 значительно 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 значительно 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 перинеуральная 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 рентгенорадиологии» МЗ РФ. Материалы диссертации используются в лекциях и практических занятиях со студентами кафедры онкологии и рентгенорадиологии Российского университета дружбы народов (РУДН).

Апробация работы

Результаты исследования обсуждены на форумах, съездах и конференциях:

- Съезд хирургов юга России: «Симультанные операции при синхронном метастатическом поражении печени колоректальным раком» г. Пятигорск, 21-22 октября 2021 г.;
- V Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии, Москва, 18 декабря 2019 г.;
- Международный онкологический форум «Белые ночи 2019», Санкт-Петербург, 20-23 июня 2019 г.;
- Общероссийская конференция «Современная онкология из центра в регионы- II», Курск, 26 мая 2022 г.;
- ASCO Annual Meeting June 3-7, 2022, McCormick Place, Chicago, IL;

- V Международный Форум Онкологии и Радиотерапии, Москва, 19-23 сентября 2022: Возможности прогнозирования результатов лечения колоректального рака на основании молекулярных особенностей опухоли и опухолевого микроокружения;
- VI Международный Форум Онкологии и Радиотерапии, Москва, 11-14 сентября 2023: Вторичная и третичная профилактика колоректального рака: роль молекулярных технологий, актуальные проблемы и пути решения.

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

Личный вклад соискателя

Соискатель разработал цель и задачи исследования, методологические подходы, его дизайн, создал электронную базу данных результатов и осуществил ее статистическую обработку. Автор отбирал пациентов для включения в исследование, являлся участником онкологических консилиумов и клинических разборов, принимал непосредственное участие в хирургическом этапе лечения, оценивал отдаленные результаты. Им лично выполнено 385 операций у 560 пациентов исследованной выборки пациентов с КРР. Все публикации также написаны соискателем. Научный консультант и соавторы публикаций оказали автору неоценимую методическую и консультативную помощь, содействовали в оформлении работы. Анализ и обобщение полученных результатов, а также написание всех разделов работы выполнены лично соискателем. Выносимые на защиту научные положения, выводы диссертации и практические рекомендации являются результатом самостоятельной работы автора.

Публикации

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

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материал и методы исследования, клинико-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.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Отраженные в диссертации Гончарова С.В. научные положения соответствуют области исследования специальности 3.1.6. «Онкология, лучевая терапия»: ранняя диагностика колоректального рака и его исследование на молекулярном и клеточном уровне, основанное на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии) с учетом оценки эффективности противоопухолевого лечения на основе анализа отдаленных результатов. Полученные соискателем научные результаты соответствуют пунктам 2,3,10 паспорта специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (медицинские науки).

ГЛАВА 1. Колоректальный рак: современное состояние проблемы диагностики и лечения (Обзор литературы)

1.1. Эпидемиология и факторы риска колоректального рака

Колоректальный рак (КРР) продолжает занимать одну из лидирующих позиций в структуре онкологической заболеваемости и смертности в России и во всем мире [103, 9, 12].

Среди онкологических заболеваний сегодня КРР находится на третьем месте по распространенности после рака легких и молочной железы, причем две трети всех случаев колоректального рака возникает в развитых регионах мира [114]. Повсеместно он занимает третье место в структуре ЗНО у мужчин и второе у женщин, составляя около 10% всех случаев рака с более чем 1,2 млн. новых случаев во всем мире [71]. КРР поражает мужчин и женщин всех расовых и этнических групп и чаще всего встречается у лиц в возрасте старше 50 лет [77]. По литературным данным, 90% заболевших – это население в возрасте старше 55 лет, более чем в 80% случаев заболевание выявляется у пациентов старше 60 лет, и заболеваемость заметно возрастает после 70-75 лет.

Проведенные исследования показали, что у 30% пациентов прослеживается семейная история заболевания, при этом лишь у 5% из них КРР развивается на фоне хорошо известных наследственных синдромов. А именно: Линча (СЛ), семейный аденоматозный полипоз (САП), MUTYH-ассоциированный полипоз (МАП), ювенильный полипоз, наследственный синдром смешанного полипоза, синдром Пейтца-Егерса, а также зубчатый полипоз [64, 215, 12, 11]. При этом зубчатый полипоз характеризуется множественными зубчатыми полипами в толстой кишке с высоким риском развития КРР, однако генетическая основа этого синдрома не выявлена [161]. Отмечено, что большинство семейных случаев КРР (20-30%) не входят в состав какого-либо синдрома и, возможно, имеют мультигенную этиологию [161, 215].

В настоящее время в литературе определены следующие факторы риска КРР: возраст старше 50-60 лет, особенности питания (избыточное употребление красного мяса, жиров, недостаток в рационе пищевых волокон). Различные генетические синдромы: диффузный семейный полипоз, наследственный семейный неполипозный КРР, ювенильный полипоз, синдром Пейтса-Егерса, индивидуальный анамнез КРР или аденоматозных полипов ободочной кишки, воспалительные заболевания кишечника (болезнь Крона, язвенный колит), наличие в анамнезе КРР у родственников, курение, злоупотребление алкоголем; ожирение; низкая физическая активность. У женщин дополнительным фактором риска является ранее перенесенный рак молочной железы и/или женских половых органов [80, 226, 24]. Большинство исследователей считают, что 52-57% случаев КРР связаны с образом жизни и факторами окружающей среды [258]. Представленные в литературе результаты нескольких исследований свидетельствуют о положительном влиянии программы скрининга КРР на факторы образа жизни, участвующие в патогенезе колоректального рака [185]. Например, если пациенты в течение 3-х лет участвуют в программе, то и при нормальных результатах скрининг-теста начинают изменяться такие привычки, как курение (уменьшение количества выкуриваемых сигарет или отказ от курения), особенности питания (исключение из рациона «вредных» продуктов) и физическая нагрузка (повышение физической активности) [258]. Эти факторы могут быть дополнительно использованы в стратификации риска для выявления фокусной группы пациентов в рамках скрининговых программ или отдельных диагностических методов в составе программы [286].

В России в структуре смертности населения от ЗНО КРР занимает второе место после рака легкого. В структуре онкологической заболеваемости за последние 20 лет КРР у мужчин переместился на 3-е место, а у женщин мигрировал с 6-го на 4-е место, уступая лишь раку легкого,

желудка и молочной железы. Заболевание редко встречается у людей до 40 лет, около 90% случаев КРР приходится на возрастной период старше 50 лет [245]. В Европе в 2011 году рак стал одной из глобальных проблем для общества, обусловив 29% всех смертей у мужчин и 23% – у женщин. В том же году ЗНО стало причиной 7,6 млн смертей во всем мире. В этой связи Американское общество клинической онкологии (ASCO) разработало план действий в целях улучшения результатов его лечения [31]. Этот план требует разработки новых подходов к терапии КРР, использованию молекулярно-генетических методов для улучшения результатов лечения. Хотя многие из предложений, изложенных ASCO, могут использоваться в других странах, каждая страна сталкивается с рядом уникальных проблем, характерных для колоректального рака, требующих индивидуального подхода [305].

Риск возникновения колоректального рака у людей, не имеющих предрасполагающих факторов, составляет лишь 1-3%. Если у родственников первой степени родства ранее выявлялся КРР, то риск повышается до 5%. Среди больных язвенным колитом риск развития КРР равен 15-30%, среди пациентов с болезнью Крона - 15%, с неполипозным наследственным КРР - 15-20%, наследственным семейным полипозом - 30-100%. Данные группы риска необходимо подвергать обязательным профилактическим осмотрам, что в ряде случаев способствует раннему выявлению рака [59]. Поскольку КРР часто возникает метакронно, пациентов, ранее уже получавших лечение по поводу КРР, также необходимо рассматривать как группу риска возникновения второй опухоли в кишечнике. У 50% таких больных могут возникнуть новые полипы, и в 5% случаев они малигнизируются [107].

Сахарный диабет связан с повышенным риском КРР [149, 156, 162]. Одним из возможных объяснений, связывающих диабет с КРР, является гиперинсулинемия. Поскольку инсулин является важным фактором роста эпителия толстой кишки - он и может стимулировать стартовавшие процессы злокачественной трансформации слизистой оболочки толстой кишки [128,

176, 319]. Помимо увеличения риска заболевания КРР, установлено, что диабет также может ухудшать прогноз у пациентов с КРР [106].

Росту заболеваемости КРР в развитых странах способствует увеличение в пищевом рационе содержания красного, промышленно переработанного мяса. Уменьшение потребления клетчатки наряду с излишним поступлением животного жира ускоряет рост кишечных бактерий, вырабатывающих канцерогены. Этот процесс способны также стимулировать соли желчных кислот. Долгосрочное потребление красного мяса или мясных продуктов, по-видимому, также связано с повышенным риском КРР, особенно это касается опухолей левосторонней локализации [80, 91].

Высока также частота КРР среди работников асбестовых производств, лесопилок [126].

Природные витамины А, С и Е инактивируют канцерогены, а турнепс и цветная капуста индуцируют экспрессию бензпиренгидроксилазы, способной инактивировать поглощенные канцерогены. Отмечено резкое снижение заболеваемости среди вегетарианцев.

Прочие факторы риска: язвенный колит, болезнь Крона, аденома толстой кишки в анамнезе, диффузный семейный полипоз, одиночные и множественные полипы, ворсинчатые опухоли; злокачественные опухоли репродуктивной системы или молочной железы, синдромы семейного рака, иммунодефицитные состояния [46, 55]. Опубликованы сведения, что курение табака увеличивает частоту малигнизации при хронических воспалительных процессах в слизистой толстой кишки [128].

Хотя исследования и обнаружили связь между КРР и повышенным потреблением алкоголя [120, 318], нет прямых доказательств того, что снижение потребления алкоголя также снижает и риск возникновения КРР, аденоматозных полипов или зубчатых аденом. Однако в этом случае повышенный риск может быть связан с нарушением абсорбции фолиевой

кислоты алкоголем и снижением потребления фолиевой кислоты у злоупотребляющих спиртным [127, 143].

Давно установлено, что курение табака связано с повышенным риском КРР и аденоматозных полипов. Метаанализ 2008 года показал, что у курильщиков более чем в два раза выше вероятность развития аденоматозных полипов высокого риска или КРР [59]. Однако нет убедительных доказательств того, что отказ от курения может снизить риск КРР, аденоматозных или зубчатых полипов.

Ожирение является существенным фактором риска КРР. Этот риск увеличивается вместе с повышением индекса массы тела. Ожирение также увеличивает вероятность смерти от КРР [168, 187].

Установлено, что снижение индекса массы тела может снизить риск КРР. Метаанализ 2007 года обнаружил связь между увеличением индекса массы тела и КРР [94], а метаанализ 2014 года показал, что выполнение бариатрической операции ассоциировано со снижением риска КРР на 27% по сравнению с лицами, страдающими ожирением, которым хирургическое лечение ожирения не проводилось [27, 277].

Повышенная физическая активность также связана со снижением риска КРР. Метаанализ от 2017 года показал, что повышенная физическая активность была связана со снижением риска КРР [205].

Хотя и установлена связь между повышенным потреблением жиров и риском образования зубчатых аденом, нет никаких доказательств того, что диета с низким содержанием жиров снижает риск КРР. Рандомизированное клиническое исследование с участием 48835 женщин в постменопаузе в возрасте от 50 до 75 лет показало, что у женщин, которым была назначена диета с низким содержанием жиров, риск развития КРР не отличался от тех, кто придерживался обычной диеты после восьмилетнего наблюдения [270].

Смертность от КРР на 1/4 выше у мужчин, чем у женщин, и аденомы толстой кишки и КРР, по-видимому, имеют более широкое распространение у женщин [270], особенно у женщин в постменопаузе.

Некоторые исследования показывают, что длительное сидение, независимо от отсутствия физической активности и ожирения, увеличивает риск КРР, особенно КРР у относительно молодых людей [224, 252].

1.2. Патогенетические механизмы развития колоректального рака

Колоректальный рак давно отнесен к группе генетически гетерогенных заболеваний. В основе его патогенеза лежит ряд последовательных генетических и эпигенетических изменений, приводящих в течение довольно длительного времени к развитию злокачественной опухоли. Центральным фактором канцерогенеза признана геномная нестабильность. Геномная нестабильность определяется высокой частотой мутаций. Эти мутации могут включать в себя изменения в последовательности нуклеиновых кислот, хромосомные перестройки или анеуплоидию.

При КРР часто встречаются несколько форм геномной нестабильности: микросателлитная нестабильность (microsatellite instability MSI), хромосомная нестабильность (chromosomal instability CIN) и транслокации хромосом. MSI встречается примерно в 15% случаев рака толстой кишки и является результатом инактивации системы репарации неспаренных оснований (mismatch repair system, репарация несоответствия - MMR), вторичной по отношению к мутациям гена *MMR*.

Потеря стабильности генома способствует приобретению множественных мутаций, которые приводят к развитию КРР.

Геномная нестабильность может принимать различные формы, включая хромосомную нестабильность (CIN), микросателлитную нестабильность и дефекты репарации ДНК [245]. Полногеномный анализ

мутаций генов в КРР выявил приобретенные соматические мутации более чем в 100 генах и в среднем 80 мутаций в КРР, что подчеркивает гетерогенность заболевания [76].

Микросателлиты — это мононуклеотидные или динуклеотидные повторы, обнаруженные по всему геному, что делает их уязвимыми для ошибок транскрипции во время репликации. Нестабильные микросателлитные опухоли отличаются от опухолей с геномной нестабильностью, демонстрируя нормальный кариотип [76].

Механизмы канцерогенеза при микросателлитной нестабильности включают инактивацию генов, ответственных за репарацию несоответствия ДНК (mismatch repair - MMR) посредством соматической мутации [245].

Эта потеря функции гена MMR и неспособность восстановить проскальзывание цепи в нуклеотидных повторах изменяет размер микросателлитов. Если микросателлит находится в кодирующей области гена — это приводит к изменению его функции гена или экспрессии. Соматическая инактивация генов MMR выявляется в 15% случаев спорадического КРР. Выявлены ассоциации MMR с пожилым возрастом, женским полом и локализацией рака в проксимальных отделах толстой кишки. Мутации в линии генов MMR ответственны за синдром Линча или наследственный неполипозный колоректальный рак, при котором пожизненный риск КРР составляет примерно 80% [324]. Мутации, приводящие к развитию КРР, идентифицированы в четырех генах MMR: *MLH1*, *MSH2* (чаще всего), *MSH6* и *PMS2* [172, 324].

Работа систем репарации ДНК происходит в фазу G1 клеточного цикла. Она обеспечивается генами-супрессорами опухолевого роста, среди которых ген *TP53* является одним из наиболее важных, за что и получил название «хранитель генома» [256]. Онкогенез требует длительного воздействия канцерогенов и накопления нескольких мутаций в ключевых

онкогенах и генах-супрессорах опухолевого роста, что порой занимает десятилетия [163].

Среди генетических альтераций выделяют два взаимоисключающих пути нестабильности, ведущих к КРР. Первая из них - хромосомная нестабильность, развивается предположительно вследствие инактивирующей мутации гена-супрессора опухоли *APC* (adenomatous polyposis coli), которая приводит к крупным хромосомным aberrациям, таким как анеуплоидия и дупликация, потеря гетерозиготности, активации онкогенов *KRAS*, *BRAF*, либо инактивация генов онкосупрессоров (в частности, *TP53*), контролирующих клеточный цикл, межклеточную связь и апоптоз [237]. С учетом данных событий, фенотип опухоли классифицируется как CIN-положительный (chromosomal instability) или отрицательный (стабильный). У 65-85% пациентов с колоректальным раком встречается хромосомная нестабильность, которая обуславливает каноническое или классическое развитие аденокарциномы по модели, описанной в 1990 г. Vogelstein В. и др. [33, 118].

APC-ген связан с возникновением таких заболеваний, как семейный аденоматозный полипоз, синдромы Гарднера и Туркота, и вовлечен в регуляцию белка β -катенина, организацию цитоскелета, апоптоза, контроля клеточного цикла и адгезию, его также называют «геном-привратником», потому что данная мутация считается воротами для злокачественной трансформации [281]. Мутация *APC*-гена выявляется более чем в 80% аденом и аденокарцином толстой кишки [241]. *APC*-белок – участник канонического WNT-сигнального пути и опосредованно через β -катенин вызывает транскрипцию ряда генов, важнейшими из которых являются *c-Myc*, циклин D, сурвивин, *MMP7*, *MDR1*, *AXIN-2*, *CD44* [153]. В толстой кишке он обеспечивает функцию важных цитоплазматических связей между колоноцитами, образуемых кадгеринами, через которые происходит большая часть межклеточной коммуникации. Для поддержания надлежащей функции

кадгеринов белок APC должен связываться с цитоплазматическим доменом молекулы кадгерина вместе с β -катенином и *GSK3- β* (glycogen synthase kinase-3 β). Связывание этих трех белков с кадгериновым доменом формирует межклеточную адгезию и обеспечивает нормальную архитектуру эпителиальных клеток и тканей [295]. Активирующая мутация APC-гена, учитывая его физиологическую роль в регуляции уровня β -катенина, способствует метастазированию опухоли, усиливая способность клеток к миграции и инвазии. В частности, данный белок регулирует экспрессию генов матриксных металлопротеиназ (*MMP2*, *MMP7*, *MMP9*, *MMP26*), продукты которых играют роль в ремоделировании тканевого матрикса, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференцировке клеток, а также апоптозе. Современные данные указывают на повышение интенсивности экспрессии β -катенина не только в опухолевых клетках толстой кишки, но и в инфильтрирующей ткань T-регуляторных клетках, при этом активация β -катенина нарушает их нормальное развитие и функцию. Помимо этого, путем изменения экспрессии регулируемых данным белком генов в опухолевом микроокружении – макрофагах, фибробластах, эндотелиальных клетках, мезенхимальных стволовых клетках – оказывает влияние на активность опухолевого роста [263]. Для KPP характерны соматические мутации и в самом гене β -катенина-*CTNB1*, инактивирующие мутации *TCF4* транскрипционного фактора, генов *AXIN1* или *AXIN2* [323].

Активирующие мутации в гене β -катенина (*CTNB1*) наблюдаются при колоректальном раке, хотя намного чаще встречаются в аденомах (12.5%), чем в инвазивных опухолях (1.4%). Предполагается, что доброкачественные опухоли с мутантным типом *CTNB1* нечасто прогрессируют в карциномы [265]. Помимо вышперечисленного, мутация APC увеличивает активность *COX2* (циклооксигеназа-2), что происходит при одновременном повышении активности эпидермального фактора роста. Повышенный уровень провоспалительных цитокинов способствует стимуляции пролиферации и

угнетает функцию *GSK3 β* [174]. Данный фермент играет важную роль в процессах инвазии, метастазирования и ангиогенеза, обладает провоспалительным действием. Экспрессия *COX2* представлена в 70% случаев КРР, и ее количество пропорционально увеличивалось со стадией заболевания, что определяет важную роль фермента как прогностического маркера при КРР [311].

Еще один ключевой элемент канцерогенеза при КРР – рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), трансмембранный белок с тирозинкиназной активностью, осуществляющий передачу сигналов от рецептора к ядру в момент связывания рецепторных лигандов рецептором. Основными лигандами являются эпидермальный фактор роста (EGF) и TGF-альфа (трансформирующий фактор роста альфа) [66]. Сигналы EGFR обеспечивают уход клетки от апоптоза, способствуют инвазии и ангиогенезу. Хотя EGFR не считается прогностическим фактором у пациентов с колоректальным раком, он играет основную роль в пролиферации опухолевых клеток [85]. Исследования показали, что белок EGFR сверхэкспрессируется при КРР от 20% до 80% случаев за счет амплификации гена и редко за счет мутации (менее 5% случаев КРР) [146]. Также стоит обратить внимание на рецептор эндотелиального фактора роста VEGFR (vascular endothelial growth factor), обладающий также тирозинкиназной активностью, экспрессия которого выявлена в 50% колоректальных карцином [86]. В нормальной ткани слизистой кишки процессы ангиогенеза регулируются ангиогенными и антиангиогенными факторами, однако в условиях гипоксии, что характерно для опухолевой ткани, в работу включаются транскрипционный фактор HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), стимулирующий VEGF и обеспечивающий таким образом рост новых сосудов [75].

Белки семейства *RAS* участвуют в работе сигнального пути EGFR (семейства тирозинкиназ), и при нарушении выполняемых ими функций

активизируются процессы пролиферации, дедифференцировки, ангиогенеза и способности к метастазированию. Они представляют собой семейство низкомолекулярных ГТФ-связывающих белков (ГТФ-аз), включающее *H-RAS*, *K-RAS* и *N-RAS* [80].

KRAS — это небольшой G-белок, который действует как преобразователь в пути EGFR. *KRAS* представляет собой закрепленный на мембране гуанозинтрифосфат/гуанозиндифосфат (GTP/GDP) — связывающий белок, который широко экспрессируется в большинстве клеток человека. Как малая ГТФаза (фермент, расщепляющий ГТФ), *KRAS* участвует во внутриклеточной передаче сигнала и в основном отвечает за активацию передачи сигналов EGFR [160]. EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) активируется при колоректальном канцерогенезе путем связывания лиганда на его внеклеточной части [191].

Обмен активного GTP-связанного состояния и неактивного GDP-связанного состояния строго контролируется белками, активирующими GTPase (GAP), и факторами обмена гуаниновых нуклеотидов [308]. В нормальных физиологических условиях восходящие сигналы активируют *KRAS* дикого типа, способствуя обмену связанного GDP на GTP. Этот процесс является временным из-за GAP-опосредованного гидролиза GTP. Однако этот процесс изменяется при мутации гена *KRAS*. Когда происходит точечная мутация в кодоне 12, белок блокируется в активном состоянии и постоянно передает ядру митогенные сигналы [285].

Мутантный *KRAS* обнаруживается примерно в 35-45% КРР [29, 170, 304]. Мутации *KRAS*, как сообщается, представляют собой почти однонуклеотидные точечные мутации, и наиболее распространенными паттернами являются G12D, G12A, G12R, G12C, G12S, G12V и G13D. В кодоне 12 мутация pG12D, pG12V является наиболее частой, а в кодоне 13 наиболее частой является замена глицина на аспарат (pG13D) [222].

Эти мутации нарушают внутреннюю активность GTPase *KRAS* и не позволяют GAP стимулировать гидролиз GTP путем *KRAS* заставляя, таким образом, белки *KRAS* накапливаться в GTP-связанной активной форме. Таким образом, мутантный *KRAS* приводит к активному GTP-связанному состоянию и активации последующих пролиферативных сигнальных путей [56, 273]. Следовательно, мутации *KRAS* играют важную роль в онкогенезе и являются наиболее распространенными при колоректальном раке. Поскольку *KRAS* является наиболее часто мутируемым фактором ниже сигнального пути EGFR, он считался маркером терапии против EGFR [292]. В то же время связь между статусом мутации *KRAS* и клиническими, морфологическими и биологическими характеристиками КРР, а также гендерными различиями неясна [310].

Как ранее упоминалось, *KRAS* является эффектором сигнальной трансдукции от рецептора EGFR, передающим сигналы через BRAF и активирующим сигнальный путь MAPK. Активирующая мутация *K-RAS* гена была выявлена в большом количестве опухолей человека, она приводит к стимуляции клеточной пролиферации, трансформации и дифференцировке клеток [236]. При колоректальном раке данная мутация встречается примерно в 30-60% случаев, в подавляющем числе случаев определяются в экзоне 2, кодонах 12 и 13. Однако описаны мутации в экзоне 3, кодоне 61, и в экзоне 4, кодонах 117 и 146. Мутации в гене *NRAS* (в идентичных экзонах и кодонах) при КРР встречаются в 5% случаев. Мутации *KRAS* часто наблюдаются в очагах аберрантных крипт (aberrant crypt foci, ACF), представленные неполиповидными малыми неопластическими образованиями толстой кишки с измененным железистым строением, но в которых дисплазия обычно отсутствует, а также характерны для значительной части гиперпластических полипов, которые с минимальной вероятностью прогрессируют в карциному [111]. Точечные мутации *K-RAS* выявляются в аденомах и аденокарциномах у одних и тех же пациентов, что

объясняет участие мутации *K-RAS* в трансформации аденомы по зубчатому (альтернативному) пути в карциному. Однако данное событие является продолжением инициальной фазы канцерогенеза и не является достаточным для злокачественной трансформации, которая нуждается в дополнительных «драйверах». В их роли выступает мутация гена *APC* на инициальном этапе [243].

Ген *BRAF* имеет мутации в 5-10 % случаев КРР. Стоит отметить, что точечная мутация (V600E) в онкогене *BRAF* является взаимоисключающей с мутацией в гене *KRAS* и кодирует RAS-регулируемую серин/треонинкиназу, которая является последующей эффекторной молекулой, расположенной после белка *KRAS*, участвуя в сигнальных путях MAPK (митоген-активируемый протеинкиназный каскад -mitogen-activated protein kinase) и PI3K (фосфоинозитид-3-киназа), эффекторами которых являются MEK 1/2 –тирозинкиназы. Также подвергаются фосфорилированию белки ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase). Указанные киназы контролируют клеточный цикл посредством регуляции ферментов, таких как Cyclin D1 [131]. По данным различных исследований, мутантный ген *BRAF* связан со старением, женским полом, расположением опухоли в проксимальном отделе толстой кишки, низким уровнем дифференцировки, муцинозной гистологией, наличием лимфоцитарной инфильтрации и поздней стадией заболевания [248]. Пациенты с опухолями, несущими мутации *BRAF* V600E, демонстрируют плохой прогноз в условиях метастазирования [54]. Опухоли с диким типом *BRAF* обычно MSS (микросателлитно стабильные) и демонстрируют хромосомную нестабильность. Различные исследования показывают, что мутантный *BRAF*, по-видимому, является достоверным индикатором плохого прогноза при CIS/MSS и, в противоположность, при сочетании с MSI при колоректальном раке характеризуется лучшим прогнозом [210].

Выживаемость пациентов с КРР при наличии мутации *BRAF* составляет на 10-16 месяцев меньше, следовательно, мутация *BRAF* является негативным прогностическим фактором. Кроме того, наличие мутации в гене *BRAF* у пациентов с КРР является противопоказанием к применению анти-EGFR-терапии [274].

Несмотря на то, что наиболее распространенная мутация в *BRAF* - p.V600E, существуют также редкие мутации, которые могут иметь лучший прогноз, такие как p.D594G или p.G596N [73]. По сравнению с p.V600E, эти мутации чаще выявляются при раке прямой кишки. Редкие мутации в гене *BRAF*, обнаруженные в кодонах 597/601, сходны по прогнозу с p.V600E [274]. В связи с этим была предложена следующая классификация мутаций в гене *BRAF*: класс 1 – p. V600E, 2 – кодоны 597/601 с аналогичным прогнозом и 3 – кодоны класса 581/594/596 со значительно лучшим прогнозом [327].

В настоящее время не существует четко определенных стандартов лечения пациентов с мутациями в гене *BRAF*, и добиться увеличения их выживаемости до сих пор не представляется возможным [50]. Стоит отметить, что частота мутаций в гене *BRAF* различна у пациентов из разных популяций. Например, в США мутации были обнаружены в 28,4% случаев, в то время как в Иране только в 7% [116, 328].

Решающим моментом является тот факт, что опухоли у пациентов с синдромом Линча не имеют мутаций в гене *BRAF*, таким образом, выявление его у пациента позволяет исключить этот синдром [301].

Таким образом, характеристики пациентов с опухолями, мутировавшими в *BRAF*, сильно различаются в разных популяциях [116].

Сигнальный путь Рi3К/АКТ/PTEN часто не функционален как при спорадических, так и при наследственных формах КРР, активирует рост клеток и ингибирует клеточный апоптоз в ответ на внеклеточную стимуляцию факторами роста, цитокинами, гормонами, тепловым и окислительным стрессом, гипоксией и гипогликемией.

Фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3) является ключевым вторичным эффектором, влияющим на рост и пролиферацию клеток, выживание и другие процессы. На клеточной мембране образование PIP3 из фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата (PIP2) зависит от активности PI3K (фосфоинозитид-3-киназа) класса I, которая физиологически активируется вышестоящими рецепторами тирозинкиназ. Далее происходит связывание PIP3 с АКТ (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase- семейство протеинкиназ B), прикрепление к клеточной мембране и активация с участием фосфоинозитол-зависимой киназы-1 (PDK1). [54]. АКТ участвует в таких клеточных процессах, как метаболизм, трансляция, апоптоз и непосредственно клеточный цикл, путем фосфорилирования белков-мишеней, таких как BAD (антагонист гибели клеток bcl-2), каспаза-9, mTOR (mammalian target of rapamycin- мишень рапамицина млекопитающих), GSK3 и β -катенин [278].

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), отрицательный регулятор пути PI3K/АКТ, является геном-супрессором опухолевого роста и осуществляет свое управление путем дефосфорилирования и подавления количества PIP3; мутантная форма встречается в 30% опухолей с MSI и в 9% опухолей с CIN [239]. Было выявлено, что небольшие количественные изменения его экспрессии связаны с различными типами рака, а врожденная мутация характерна для пациентов с синдромом Коудена, при котором повышен риск образования доброкачественных опухолей ЖКТ, но не колоректального рака. Помимо вышеперечисленного, ген *PTEN* контролирует архитектуру эпителиальных клеток и тканей, участвует в формировании межклеточных контактов, обуславливает способность к миграции, инвазивности и метастазированию [95].

«Страж генома» или P53 представляет собой белок, кодируемый геном *TP53*. Опухолевый супрессор выполняет роль ключевого регулятора

транскрипции генов, которые кодируют белки с функциями в контрольных точках клеточного цикла [183]. P53 увеличивает время перехода клетки из G1 в S-фазу цикла, позволяя таким образом системам репарации ДНК исправить ошибки или мутации репликации, либо при невозможности этого индуцирует апоптоз через каспазный путь, выключающий функцию митохондрий [289]. Мутация в гене супрессора опухоли *TP53* имеет решающее значение для канцерогенеза и перехода от неинвазивного к инвазивному заболеванию и обнаруживаются в аденомах в 5% случаев, злокачественных полипах 50% и карциномах 75% с возрастающей частотой, коррелирующей со степенью злокачественности [30].

Мутация в гене *TP53* способствует приобретению инвазивности опухолевой клетки во время трансформации в пути аденома-карцинома. *TP53* активируется многими факторами помимо повреждения ДНК, среди которых: ультрафиолетовое излучение, окислительный и осмотический стресс, химические вещества и вирусы [39]. Некоторые типы вирусов папилломы человека (ВПЧ) способны отключить функцию *TP53* и, таким образом, увеличить риск развития рака.

Потеря гетерозиготности в 18-q регионе хромосомы встречается в порядке 70% случаев КРР, примерно в 50% – на поздних стадиях и менее 10% – на ранних [135]. Данные локусы хромосом 18q21.1 являются носителями генов *SMAD2*, *SMAD3* и *SMAD4*, кодирующими пострецепторные структуры в сигнальном пути супрессора опухоли *TGFβ* и участвующими в формировании хромосомной нестабильности [291].

Сигнальный путь *TGFβ* вносит важный вклад в канцерогенез при КРР путем инактивирующих мутаций генов рецепторов *TGFβIIIR* и *TGFβIR*, суперсемейства ACVR2 (характерных для MSI опухолей), благодаря его роли в индукции генов *snail*, *slug*, *twist* и *zeb*, участвующих в эпителиально-мезенхимальном переходе [242].

Эпителиально-мезенхимальный переход заключается в существенном фенотипическом превращении эпителиальных клеток в клетки с мезенхимальным фенотипом. Это обратимый процесс, который часто происходит во время эмбрионального развития и ремоделирования тканей, а также играет важную роль в ранних событиях, возникающих при инвазии и метастазировании многих видов рака, включая КРР [181]. В процессе данного перехода активируется группа транскрипционных факторов, в результате чего гиперэкспрессируются мезенхимальные маркеры: *SNAIL1/2*, *TWIST*, *ZEB1/2*, *VIM* [198]. Во время ЭМП эпителиальные клетки перестают экспрессировать е-кадгерин, который обладает свойством поддерживать эпителиальный фенотип, в результате нарушается механизм межклеточной адгезии, клетки приобретают мезенхимальные характеристики, в том числе способность к миграции и инвазии [98].

Второй генетический путь при КРР – микросателлитная нестабильность (MSI), ставшая результатом неспособности системы MMR исправлять базовые ошибки и поддерживать геномную стабильность. Таким образом, клетки с аномально функционирующим MMR накапливают ошибки, а не исправляют их [72, 322].

Гипотеза «мутаторного фенотипа» возникновения рака, выдвинутая L. Loeb et al. (1974), согласно которой клетка должна пережить цепь мутаций, чтобы стать злокачественной, но для этого у нее исходно должна быть способность мутировать чаще, чем в норме, что может быть связано с инактивацией механизмов, отвечающих за сохранность структуры ДНК [199], получила подтверждение в 1993 г., когда у близких родственников больных наследственным раком толстой кишки была выявлена микросателлитная нестабильность (MSI-H) [25].

На сегодняшний день известно пять генов, вовлеченных в процессы онкогенеза при КРР: *MLH1* (49%), *MSH2* (38%), *MSH6* (9%), *PSM2* (2%) и *PMS1* (0,3%) [74]. Мы уже упоминали, что дефекты в генах *MMR MSH2* и

MSH6, *MLH1* и *PMS2* у людей были связаны с синдромом Линча (ранее известным как наследственный неполипозный колоректальный рак), аутомно-доминантным заболеванием, при котором один из генов ДНК MMR мутирует в клетках зародышевой линии. Однако, в отличие от герминальных мутаций MMR, 15–20% спорадических опухолей с MSI инактивируют систему MMR соматическим эпигенетическим механизмом: гиперметилирование инактивирует транскрипцию генов *MLH1*, таким образом, нарушая работу системы репарации ДНК и формируя фенотип с микросателлитной нестабильностью высокого уровня [209].

Спорадические опухоли с MSI в 50% случаев имеют мутации в гене *BRAF* и в 99% метилированный *MLH1*, в отличие от синдрома Линча, где наблюдается дикий тип гена *BRAF* и очень редко метилированный ген *MLH1* [112]. Анализ повторяющихся последовательностей в опухоли привел к идентификации инактивированных генов. К примеру, мутации сдвига рамки считывания (при которых происходит вставка или делеция нуклеотидов, в количестве не кратном трем) гена *TGFβIIIR* встречаются в 90 % случаев КРР с MSI-H [208]. Интересно, что оба аллеля гена *ACVR2* (activin type II receptor), кодирующие рецептор активина II типа, соматически мутированы приблизительно в 85% случаев КРР с MSI-H. Как и нормально функционирующий *TGFβIIIR*, *ACVR2* подавляет пролиферацию клеток под воздействием трансформирующего фактора роста (*TGFβ1*) [164].

Гены *BAX* и *BCL2* кодируют гомологичные белки, которые оказывают противоположные эффекты на жизнедеятельность клетки: если *BCL2* пролонгирует жизнедеятельность клетки, то *BAX* ускоряет апоптоз. *BAX* образует гетеродимеры с *BCL2* внутри клетки, и соотношение белков в данном соединении может быть главной детерминантой клеточной способности к апоптозу. *TP53* при воздействии ДНК-повреждающими или другими агентами может влиять на экспрессию генов *BAX* и *BCL2*, меняя соотношение данных белков друг к другу, тем самым переводя клетку в

состояние повышенной чувствительности к апоптозу. Мутация гена *BAX* в данном случае иммортализирует опухолевую клетку и встречается в 50% случаев КРР с микросателлитной нестабильностью [251].

Примерно в одной трети случаев КРР с MSI-H наблюдались мутации гена *TCF7L2*, кодирующего белок TCF4, и, учитывая роль исходного белка в репрессии генов-эффекторов пути WNT в отсутствие стабилизированного β -катенина, данная мутация может представлять собой альтернативный механизм дерегуляции Wnt/ β -катенин -сигнального пути. Мутация *TGF β RII* и *BAX*, по-видимому, характерны для поздних периодов прогрессии аденомы к карциноме и часто встречаются при дисплазии высокой степени на границе определения типа злокачественности [132].

Аберрантное метилирование ДНК является наиболее широко изученным эпигенетическим событием онкогенеза. Метилирование ДНК является одной из важных эпигенетических модификаций, способных регулировать экспрессию генов. У людей метилирование ДНК происходит путем присоединения метильной группы к цитозину в паре с гуанином (CpG-динуклеотиды) [41]. Становится все более очевидным, что эпигенетические события могут играть центральную роль в возникновении и прогрессировании рака. Механизм одновременного метилирования многих CpG-островков в промоторах, так называемых CpG-islands, которые особенно богаты динуклеотидами цитозин-гуанин, а также тотальное гипометилирование экзонных и интронных участков генов определяют метиляторный фенотип CIMP (CpG island methylator phenotype), который классифицируется как высокий (CIMP-H), низкий (CIMP-L) или отсутствующий (CIMP-S). Высокая степень гиперметиляции аберрантного промотора выключает функцию генов, в т.ч. генов системы репарации ДНК (6-0-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы).

Аберрантное гиперметиличование подавляет функцию различных генов-супрессоров опухолей при колоректальном раке, включая *CDKN2A* /

p16, *MGMT*, *p14*, *ARF* и *HLTF*. Обнаружены гиперметилированные гены *HLTF*, *SLC5A8*, *MGMT*, *MINT1* и *MINT31* в очагах аберрантных крипт, являющиеся субстратом для процесса перехода аденома-карцинома. Таким образом, CIMP можно обозначить инициальным событием онкогенеза при КРР [79]. Weisenberger и соавторы указали на роль CIMP в КРР, основываясь на статусе метилирования пяти генов (*CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* и *SOCS1*) [321]. CIMP-позитивные опухоли обладают уникальными клинико-патологическими и молекулярными особенностями, включая расположение в проксимальных отделах толстой кишки, муцинозное и низкодифференцированное гистологическое строение, а также наличие частых мутаций *KRAS* или *BRAF*. Приблизительно 80% спорадических карцином с *MSI-H* содержат гиперметилированный по двум аллелям ген *MLH1* [300].

Принято считать, что микросателлитная или хромосомная нестабильность, мутаторный фенотип инициируют процесс канцерогена при КРР и создают основу для последующих мутационных изменений в генах контроля роста клетки. К слову, опухоли «CIN-H» обладает прогнозом хуже, чем, к примеру, «MSI-H». Объяснить это можно тем, что мутаторный фенотип, характерный для микросателлитной нестабильности, чаще связан с низкой жизнеспособностью клетки ввиду наличия большего числа критических мутаций для цикла клетки, что также ограничивает прогрессирование. Известно, что корреляция между соматическими мутациями и фенотипом экспрессии генов при колоректальном раке слабо выражена, однако экспрессия генов и белков показывает значительные различия при сравнении опухолевых фенотипов с CIN и MSI [125].

Существует теория развития рака из стволовых клеток, заключенная в идее, что только небольшая часть опухоли состоит из клеток, способных генерировать весь объем опухоли [184]. Такого рода клетки, инициирующие рак или мультипотентные раковые стволовые клетки, были обнаружены при

КРР [58]. Наличие нескольких линий стволовых клеток в рамках отдельно взятой карциномы доказано анализом метилирования ДНК. Это имеет принципиальное значение в рамках терапевтического лечения, так как уничтожение большей части опухолевых клеток может быть совершенно неэффективным, если опухолевые стволовые клетки выживут и продолжат свою жизнедеятельность [282]. Предполагается, что драйверные события в виде MSI и CIN, а также последующие мутации будут происходить в стволовых клетках и распространяться посреди общего объема опухоли [190].

Несколько авторов пытались определить путь КРР в соответствии с оригинальной концепцией многоэтапного канцерогенеза. Если в упрощенной форме объединить все вышеописанное, то классический путь заключается в мутации гена *APC*, событие характерное для ранней аденомы, за которой следуют мутации *KRAS*, *PIK3CA*, *SMAD4* и *TP53* и потеря гетерозиготности хромосом 18q и 17p, которые ведут к развитию промежуточной и поздней аденомы. Этот путь ведет к образованию хромосомно-нестабильной карциномы. Зубчатый путь развития КРР берет свое начало с мутации *BRAF* в гиперпластическом полипе, модулируя формирование CIMP-II фенотипа опухоли в зубчатых образованиях на широком основании (sessile serrated lesions – SSL), что в дальнейшем провоцирует развитие дисплазии путем метилирования *MLH1* и, наконец, формированию карциномы с фенотипом MSI-II [40].

Еще одним шагом в направлении персонализации лечения является выделение групп пациентов в зависимости от молекулярных изменений, происходящих в опухоли. На данный момент на основе молекулярно-генетических исследований КРР усилиями научного консорциума (Colorectal Cancer Subtyping Consortium) сформирован/создан консенсус по молекулярным подтипам КРР. Так, в настоящее время выделено 4 молекулярных фенотипа колоректального рака, различающихся по

генетическим, эпигенетическим характеристикам, экспрессии сигнальных путей, клинической картине и обладающих значительным потенциалом для формирования дизайна будущих клинических исследований и целенаправленного создания лекарственных препаратов [137].

Молекулярный фенотип 1 или иммунный (CMS1- consensus molecular subtype) встречается в 14 % случаев и наиболее распространен среди зубчатых полипов, трансформирующихся в аденокарциному [255].

Для 1 фенотипа характерны, как и для зубчатого пути злокачественной трансформации, расположение опухоли в проксимальном отделе толстой кишки, высокая частота мутации *BRAF* V600E, гипермутированность, CIMP-H, нарушение функционирования системы репарации неспаренных нуклеотидов, инфильтрация иммунными лимфоцитами в микроокружение опухоли. В 15% случаев КРР, выявленный на ранних стадиях, характеризуется микросателлитной нестабильностью и гипермутированностью [70]. Ранняя стадия заболевания в сочетании с микросателлитной нестабильностью (большинство случаев опухолей 1 фенотипа) обеспечивают лучший прогноз для жизни пациента, нежели чем при микросателлитно-стабильных опухолях [283].

При II стадии КРР с MSI наблюдается меньшее число рецидивов и, как правило, пациентам данной группы не проводят адьювантную химиотерапию. При III стадии опухоли чувствительны к комбинации фторурацила, оксалиплатина и лейковорина (FOLFOX) [32]. Прогноз заболевания для данного молекулярного фенотипа достоверно лучше до момента диссеминации. Это может быть связано с выраженной инфильтрацией микроокружения опухоли иммунными клетками, в частности вовлеченностью Т-клеток: CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты, активированные CD4+ Т-хелперные клетки 1 типа (Th1) и натуральные киллеры. Тем не менее, 1 молекулярный фенотип характеризуется худшей выживаемостью и агрессивностью в случае рецидива, так как в данном

случае MSI сочетается с мутацией *BRAF* V600E. Во всех гипермутированных и микросателлитно-нестабильных опухолях повышены уровни PD-1 (белок запрограммированной клеточной гибели-1), PD1 лиганд 1 (PD-L1). Повышенная экспрессия множественных иммунных контрольных точек обуславливает положительный ответ на терапию ингибиторами контрольных точек [197].

Особенностью II-IV молекулярных фенотипов является хромосомная нестабильность высокой степени, которая, как было указано выше, проявляется потерей гетерозиготности, анеуплоидией, транслокациями и делециями [109].

Молекулярный фенотип II связан с каноническим путем трансформации аденомы в карциному и встречается в 37% случаев КРР. Данный профиль экспрессии генов способствует развитию дифференцированного фенотипа эпителиальных клеток, инициируется потерей гена-супрессора опухоли *APC*, за которым следует активирующая мутация в *KRAS* и потеря функций *TP53*. Молекулярный механизм 2 и 4 фенотипов схож по количеству копий соматических альтераций (SCNA), обе группы MSS и CIMP-L. Однако 2 фенотип обладает активированными WNT/ β -catenin и MYC сигнальными путями, которые способствуют выраженной экспрессии онкогенов *EGFR*, *ERBB2* (*HER2*), инсулиноподобного фактора роста 2 (*IGF2*), субстрата инсулинового рецептора 1 (*IRS-1*), фактора транскрипции гепатоцитарного ядерного фактора 4 α (*HNF4A*) и циклинов. Опухоль локализована в 59% случаев в левых отделах кишки, медиана выживаемости после рецидива составляет 35 месяцев, что значительно отличается с 1 типом, где локализация, как правило, справа и медиана выживаемости после рецидива – 11 месяцев [137].

Молекулярный подтип III, иначе называемый метаболическим, характерен для 13% опухолей. Данный подтип, несмотря на CIN+, характеризуется меньшим количеством копий соматических альтераций

(SCNA), по сравнению со 2 и 4 подтипами, большим уровнем MSI (CIMP-фенотип низкий, со средним уровнем гиперметилирования). В 30% случаев опухоли данного фенотипа гипермутированы, что меньше чем в 1 типе, но больше, чем во 2 и 4. В 68% встречаются *KRAS*-мутации, больше, чем в остальных фенотипах. Метаболическая дисрегуляция обусловлена активацией глутаминолиза, липидогенеза, а также обогащенность *KRAS*-мутациями связана с выраженной метаболической адаптацией при КРР [333]. Среди всех субтипов мезенхимальный наиболее близок по профилю генной экспрессии к нормальной ткани кишки. Есть предположение, что предшественником в данном подтипе могут быть тубулярно-ворсинчатые аденомы с зубчатыми чертами, характерные для КРР с *KRAS*-мутацией [26]. Подгруппа пациентов данного фенотипа с III стадией заболевания, получавшая лечение в объеме FOLFOX, обогащенная *KRAS* мутацией, с дистальной локализацией опухоли связана с коротким промежутком времени до рецидива и худшим прогнозом [52]. При метастатическом КРР достаточно ограничено применение моноклональных антител (например, цетуксимаб) в связи с превалированием *KRAS*-мутантного фенотипа, являющегося предиктором неэффективности анти-EGFR терапии [101].

В плане перспективности новых методов лечения стоит упомянуть, что 3 и 4 молекулярные подтипы связаны с гиперэкспрессией *HER-2*, и в случае опухолей, резистентных к анти-EGFR терапии, возможной эффективностью может обладать комбинация рап-EGFR ингибиторов тирозинкиназ [173]. Также учитывая тот факт, что нарушение клеточного метаболизма является установленным фактом канцерогенеза, возможно станет перспективным применение ингибиторов, влияющих на метаболические процессы транспорта глюкозы, гликолитические ферменты и синтазы жирных кислот [142]. В лабораторных исследованиях цистатион- β -синтаза находится в более активном состоянии при колоректальном раке, чем в нормальной слизистой толстой кишки, что способствует пролиферации

опухолей, ангиогенезу, а также провоцирует метаболическую перестройку и способность к инвазии [334].

Ингибирование цистатион- β -синтазы приводит к нарушению анаболического метаболизма раковых клеток и может стать перспективным способом лечения при *KRAS*-мутантном фенотипе [82]. CMS4 - мезенхимальный, характерен для 23 % опухолей при КРР, характеризуется активацией *TGF β* , стромальной инвазией и усиленным ангиогенезом. Фенотип связан с эпителиально-мезенхимальным переходом, который приводит к формированию большого числа эмбриональных опухолевых клеток, обуславливающих инвазию и метастазирование. Высокий уровень стромальной инфильтрации связан с неблагоприятным прогнозом [169]. В экспериментальных исследованиях показано, что из зубчатых аденом при наличии *BRAF* V600 мутации был получен 4 мезенхимальный или 1 иммунный фенотип в зависимости от высокого или низкого уровня трансформирующего фактора роста (*TGF β*) в микроокружении [121].

Хотя предраковые образования, предшествующие 4 фенотипу, и развиваются генетически в соответствии с зубчатым путем, они характеризуются низким уровнем гипермутации, MSS и высоким уровнем копий соматических альтераций (SCNA) [157].

Опухоли с 4 молекулярным фенотипом диагностируют на поздних стадиях, они характеризуются неблагоприятным прогнозом с худшей 5-летней (62%) и безрецидивной (60%) выживаемостью по сравнению с остальными фенотипами. При диссеминации вне зависимости от *KRAS*-статуса опухоль с 4 фенотипом резистентна к анти-EGFR терапии. [137, 20]

В рамках персонализированной медицины молекулярные подтипы CMS КРР можно и стоит рассматривать как молекулярные биомаркеры для предполагаемой стратификации пациентов в клинических исследованиях. На сегодняшний день проводится достаточно много различных исследований о

применении тех или иных таргетных препаратов в зависимости от молекулярных субтипов опухолей.

Несмотря на все имеющиеся достижения молекулярной биологии колоректального рака, основной вопрос, который остается у клиницистов, занимающихся данной патологией, заключается в определении рисков и сроках рецидивирования, равно как и в определении той единственной правильной тактики лечения у данного конкретного пациента.

В заключение следует отметить, что многолетние исследования привели к получению данных, подтверждающих высокий уровень гетерогенности и вариабельности колоректального рака. А это, в свою очередь, привело к пониманию необходимости перехода от протокольных вариантов лечения к индивидуализации терапии КРР. И в ближайшей перспективе ожидается создание современных лекарственных препаратов, назначение которых будет происходить с учетом молекулярно-генетического фенотипа опухоли. Такое направление, скорее всего, и станет фундаментом дифференцированного подхода к лечению колоректального рака.

1.3. Диагностика колоректального рака. Проблемы и возможности его выявления.

Вторичная профилактика колоректального рака включает в себя как своевременную диагностику уже развившейся аденокарциномы в толстой кишке, так и, что предпочтительно, выявление предраковых (гиперпролиферативных) заболеваний толстой кишки, особенностью которых является длительное бессимптомное течение и высокий риск последующей малигнизации [20].

Эффективность диагностики КРР, к сожалению, и сегодня нельзя считать удовлетворительной. У каждого третьего больного на момент постановки диагноза выявляется III или IV стадия заболевания. Главная причина такой ситуации – низкая выявляемость ранних стадий [7] и предраковых заболеваний.

Ситуация с ранней диагностикой КРР существенно улучшилась, когда в 1964 г. Н. Watanabe и соавторы в сотрудничестве с фирмой «Machida» (Япония) на основании уже существующих фиброгастроскопов разработали первую модель фиброколоноскопа (ФКС), с помощью которого стало можно проводить визуальную оценку толстой кишки [19]. Но только осмотр слизистой оболочки толстой кишки не в полной мере устраивал врачей, и двумя годами позже, в 1966 г., Н. Niwa с соавторами сообщили о первых результатах использования нового ФКС. Данная модель обеспечивала хороший обзор, позволяла брать материал для гистологического и цитологического исследования, фотографировать результаты [99, 320]. ФКС аналогична ректороманоскопии (сигмоидоскопии) - разница связана с тем, какие части толстой кишки можно исследовать. Колоноскопия позволяет исследовать всю толстую кишку (длиной 1200–1500 мм). Сигмоидоскопия позволяет исследовать дистальную часть (около 600 мм) толстой кишки, что может быть достаточно, поскольку преимущества колоноскопии для выживания рака ограничиваются обнаружением поражений в дистальной части толстой кишки. Сигмоидоскопия часто используется в качестве процедуры скрининга в сочетании с анализом кала на скрытую кровь (FOBT) вместо тотальной колоноскопии. Около 5% прошедших скрининг лиц направляются на колоноскопию.

Активный поиск предраковых заболеваний толстой кишки у лиц безотягощенного семейного онкологического анамнеза требует больших затрат ввиду необходимости широкого охвата населения. Несмотря на широкое внедрение эндоскопического исследования органов желудочно-кишечного тракта с лечебно-диагностической целью, кратная пяти или десяти годам массовая колоноскопия, начиная с возраста 45 – 50 лет, остается непосильным скрининговым мероприятием даже для стран с высоким уровнем экономического развития. Таким образом, несмотря на самую высокую точность и специфичность данного метода в выявлении

предраковых заболеваний толстой кишки, а также КРР на ранних стадиях, колоноскопия в большинстве стран рекомендуется к применению как метод утоняющей диагностики или в скрининговых программах не чаще чем 1 раз в пять или 10 лет [10].

Тотальная колоноскопия является важнейшим методом оценки состояния слизистой толстой кишки. Сегодня она предполагает дополнительное использование сложных технологий визуализации, позволяющих выявлять изменения в просвете кишки небольших размеров: хромоскопии, узкоспектральной эндоскопии, аутофлюоресцентной эндоскопии [306]. И широко используется в группах высокого риска в качестве скрининговой методики [115]. С ее помощью удастся выявить до 55% аденом и до 80% аденокарцином ободочной и прямой кишки в начальных стадиях [117].

В качестве альтернативы рассматривается виртуальная колоноскопия, при которой используются 2D и 3D изображения толстой кишки, восстановленные на основе компьютерной томографии или магнитно-резонансной.

Сообщается, что виртуальная колоноскопия обладает высокой диагностической ценностью в обнаружении полипов и КРР и по точности сравнима с традиционной оптической колоноскопией в обнаружении полипов больше 6 мм в диаметре. Чувствительность метода – 93,8%, специфичность – 96%. Прерогативой виртуальной колоноскопии являются изучение толщины стенки кишки, протяженности ее поражения, оценка паракишечных изменений, состояния лимфатического аппарата, брыжейки, а также паренхиматозных органов.

К сожалению, виртуальная колоноскопия не позволяет проводить лечебные манипуляции, такие как удаление полипов и опухолей или биопсия, а также визуализацию поражений размером менее 5 миллиметров. При

обнаружении изменений со стороны толстой кишки потребуется выполнение лечебно-диагностической стандартной колоноскопии.

В России сегодня наиболее распространенный лабораторный тест для выявления КРР – анализ кала на скрытую кровь, который широко и достаточно давно используется в европейских странах. По данным литературы, ежегодный FOBТ-анализ позволяет снизить риск смертности от КРР на 15–30% [117].

Положительные результаты теста стимулируют немедленное выполнение колоноскопии, удаление аденом и выявление предраковых поражений толстой кишки, в результате чего риск заболеваемости КРР снижается до 20%. Иммунохимическое исследование кала на скрытую кровь (FIT) более специфично и чувствительно, чем FOBТ, и сегодня используется чаще, хотя нередко встречаются ложноположительные и ложноотрицательные результаты данных тестов. Преимуществом FIT перед FOBТ является отсутствие реакции с животным гемоглобином, находящимся в кишке при употреблении мяса перед проведением анализа [20].

С целью преодоления этих недостатков прилагаются значительные усилия для выявления специфических ДНК-маркеров КРР в кале. Считается, что наиболее перспективно в этом отношении определение мутаций генов *KRAS*, *BRAF*, а также *CNRIP1*, *FBN1*, *INA* и *SNCA*, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью в обнаружении как КРР, так и аденом. Данные клинических исследований по определению ДНК-маркеров в образцах кала и крови указывают на возможность их использования с ранней диагностики КРР [19].

Хороших результатов достигли корейские исследователи [331]. Доступны неинвазивные фекальные иммунохимические тесты (FIT) на гемоглобин в кале, их чувствительность относительно низкая при обнаружении КРР I стадии (53%) и крупных аденом ($\geq 1,0$ см) (27%) со специфичностью 94,6% [217]. И хотя колоноскопия и анализ кала на скрытую

кровь FOBТ – (фекальный иммунохимический тест) или FIT, являются наиболее широко используемыми инструментами скрининга КРР, эти методы по-прежнему ограничены в использовании [240, 294, 302].

Канцерогенез при КРР протекает в результате накопления генетических и эпигенетических аномалий генома [48]. Абберрантное метилирование ДНК в сайтах CpG генов - одно из наиболее распространенных молекулярных изменений во время канцерогенеза [45, 167, 336].

Обнаружение метилированной ДНК определенного гена в неинвазивных образцах стула является многообещающим вариантом для обнаружения КРР [307]. Таким образом, неинвазивное тестирование ДНК на основе стула стало новой стратегией выявления пациентов как с КРР, так и с предраковыми изменениями. Анализы метилирования ДНК на основе стула с использованием нескольких эпигенетических биомаркеров, таких как *BMP3*, *NDRG4*, *SDC2*, *SFRP2*, *TFPI2* и *VIM*, были описаны в литературе как потенциальные неинвазивные инструменты для раннего обнаружения колоректального рака [28, 84, 129, 155, 227, 303, 314], с чувствительностью тестов от 46 до 90% и специфичностью от 76,8 до 93%.

В 2019 году в Южной Корее разработали высокочувствительный и точный анализ ДНК метилирования. Метод, состоящий из количественной специфичной для метилирования ПЦР в реальном времени (qMSP), после линейного обогащения мишеней (LTE) названного *meSDC2* LTE-qMSP для метилирования *SDC2*, продемонстрировал, что метилирование *SDC2* ДНК стула имеет высокий потенциал как диагностический метод раннего выявления КРР [331]. В других исследованиях также установлено, что метилирование *SDC2* может быть использовано в качестве диагностического теста при изучении образцов крови и кала у пациентов с КРР. [42, 43, 212, 213, 253].

Между тем, Yoon Dae Han et al. [331] недавно опубликовали результаты теста на метилирование *SDC2* фекальной ДНК в китайской популяции. Его общая точность выявления КРР была сопоставима с корейской.

Можно отметить, что это исследование продемонстрировало, что тест *meSDC2* LTE-qMSP на основе ДНК стула имеет высокую диагностическую ценность для раннего выявления КРР. *MeSDC2* LTE-qMSP на основе ДНК стула продемонстрировал общую чувствительность 90,2% с AUC 0,902 при обнаружении КРР, не связанного со стадией, локализацией, полом или возрастом ($P > 0,05$), со специфичностью теста 90,2%. Чувствительность для выявления ранних стадий (0-II) составила 89,1%. Этот тест также обнаружил 66,7% и 24,4% аденом с высокой и низкой дисплазией, соответственно [331].

Корейские исследователи считают, что тест на метилирование *SDC2* в образцах кала является новым потенциальным диагностическим генетическим тестом для выявления КРР.

Для скрининга пациентов на рак могут использоваться *microRNA*, поскольку они стабильны и обнаруживаются в крови и стуле, а их профили экспрессии отражают их экспрессию в опухолях от пациентов с КРР [113, 254]. *MicroRNA* представляют собой небольшие одноцепочечные РНК длиной 21-23 нуклеотида (нт), которые подавляют трансляцию мРНК и запускают деградацию мРНК [193, 299]. Их функции могут посттранскрипционно модулироваться посредством взаимодействия с мишенями, деградации и секвестрации других мРНК [152].

В идеале скрининговые тесты должны обнаруживать присутствие *microRNA*, обнаруживаемых исключительно у людей с аденомами кишечника или КРР. Хотя использование *microRNA* для скрининга колоректального рака не может превзойти результаты рутинной колоноскопии, их использование может предложить менее инвазивные и

более экономичные альтернативы в дополнение к существующим подходам к скринингу.

Новые усовершенствования технологий обнаружения miRNA, такие как цифровая ПЦР (полимеразная цепная реакция - усовершенствованный метод, позволяющий осуществлять прямой подсчет числа мишеней - нуклеиновых кислот), могут позволить использовать более чувствительные методы для абсолютного количественного определения microRNA.

Сигнатуры экспрессии множественных microRNA и мРНК также могут обеспечивать эффективные диагностические и прогностические анализы КРР [90, 189]. Уровень Mir-21 повышен в колоректальном раке, при этом в нескольких исследованиях сообщается о ступенчатом увеличении его экспрессии по мере того, как опухоль переходит на более поздние стадии [175, 268, 298]. MiR-21 также может относительно точно предсказать локальную глубину инвазии опухоли (T), поражение лимфатических узлов (N) и наличие отдаленных метастазов (M) – определив таким образом общепринятую стадию рака по системе TNM [44, 148, 179, 195, 280]. Кроме того, высокие уровни miR-21 в колоректальной аденокарциноме и образцах сыворотки связаны с большим размером опухоли и с отдаленными метастазами [338]. Высокая экспрессия miR-21 в опухолях также связана с плохим ответом на химиотерапию и снижением безрецидивной выживаемости [179, 232, 269, 279]. Уровни циркулирующего miR-21 тем не менее снижаются после хирургического лечения. Эти исследования демонстрируют, что уровни miR-21 в сыворотке и кале отражают его уровни в аденокарциноме. Таким образом, он может служить как диагностическим, так и прогностическим биомаркером, прогнозируя стадию TNM, потенциальные метастазы и чувствительность к химиотерапии.

MiR-29a также активируется в опухолях [65] и в крови пациентов с КРР, что может использоваться для дифференциальной диагностики пациентов с ранним КРР и ворсинчатыми аденомами [150, 202, 317]. В

образцах кала при колоректальном раке уровень miR-29a был значимо выше при локализации опухоли в прямой кишке [338]. MiR-29a также был предложен в качестве маркера для раннего обнаружения метастазов КРР в печени, поскольку его уровни в сыворотке были значительно выше при их появлении [317].

Использование miR-29a в качестве прогностического биомаркера КРР менее очевидно, но повышение его уровней может указывать на раннее метастазирование [317, 297]. Подавление miR-200c приводит к апоптозу и снижению инвазии в клеточных линиях КРР [83, 291]. По данным исследований, microRNA ассоциирован со снижением выживаемости пациентов, но не связан со стадией по системе TNM [83, 325, 335]. Уровни MiR-200c также повышены в плазме пациентов с КРР и снижаются после хирургического лечения [335]. В другом исследовании выявлено, что сывороточные уровни miR-200c были значимо повышены в IV стадии по сравнению с локальными и в норме, а также были увеличены в лимфатических узлах, печени и других отдаленных метастазах [297]. Уровни miR-200c в метастазах печени коррелируют с уровнями в первичных опухолях КРР, а уровни miR-200c значительно увеличиваются как в метастазах, так и в первичной опухоли по сравнению с морфологически неизменной слизистой толстой кишки [297, 291]. Вместе эти исследования демонстрируют потенциал miR-200c в качестве маркера отдаленных метастазов при КРР. Повышенные уровни miR-200c в сыворотке у пациентов с КРР указывают на снижение выживаемости пациентов [297]. Многие исследования демонстрируют, что оценка microRNA в качестве биомаркера у пациентов с КРР при определении его уровня в крови и кале является многообещающей. Определение microRNA в сыворотке крови или кале может не только дополнить существующие методы скрининга КРР, но и дать новое понимание механизмов канцерогенеза и метастазирования.

Кроме того, образцы FOBТ, уже собранные для скрининга пациентов с подозрением на КРР, могут быть использованы для анализа microRNA [195]. Более того, microRNA в кале могут служить идеальным тестом для ранней диагностики КРР, если измененные уровни microRNA могут быть обнаружены в нем раньше, чем в сыворотке крови. Анализ, который исследует экспрессию как онкогенов, так и microRNA-супрессоров опухолей, может обеспечить наиболее полную оценку для диагностических и прогностических целей [36].

Давно доказано, что ранняя диагностика и своевременное удаление аденоматозных полипов приводит к снижению заболеваемости КРР почти на 80 % [255].

Также выявлено, что при проведении скрининга пожизненный риск КРР для населения в целом снижается до 4,4 %. Важность и эффективность этой стратегии была признана Европейской Комиссией, призывающей к осуществлению скрининговых программ по всей Европе [117].

К сожалению, обычно в России колоноскопия назначается людям с типичными жалобами и явными клиническими симптомами поражения толстой кишки, а профилактические исследования проводятся достаточно редко. Часто и у врачей первичного звена, и у населения в целом отмечается низкая онкологическая настороженность в отношении КРР. В связи с этим полипы прямой и ободочной кишки очень часто оказываются просто случайной находкой при обследовании по поводу других заболеваний.

Разработка и применение единых стандартов ранней диагностики повысит своевременную выявляемость патологии толстой кишки и позволит выбирать оптимальную тактику лечения КРР, что в конечном итоге будет способствовать улучшению результатов борьбы с ним [255].

1.4. Проблемы лечения колоректального рака в локализованных стадиях

Успех лечения колоректального рака, как и любого другого онкологического заболевания, во многом определяется оптимальной стратегией: последовательностью применения имеющихся в арсенале современной онкологии методов лечения – хирургических, лекарственных, лучевых. Это утверждение никоим образом не уменьшает эффективность каждого из методов самого по себе, однако зачастую именно их оптимальная комбинация и этапность способствуют желаемому результату: длительной ремиссии или полному выздоровлению. И отправной точкой в этом вопросе является стадия колоректального рака. Общепринятая в мире и нашей стране система классификации TNM начала разрабатываться с 1943 года Пьером Денуа (*Pierre Denoix*, Франция) и с тех пор претерпела множество изменений, которые вносятся и по настоящее время. Стадия определяет и прогноз КРР. Очевидно, что локализованные стадии имеют лучший прогноз, но развитие прогрессирования возможно в любой стадии. Понимание этого факта привело к появлению в международных руководствах понятия «факторов риска прогрессирования», к которым для колоректального рака относят лимфоваскулярную и периневральную инвазию, наличие опухолевых депозитов, перфорации и некоторые другие. По сути, произошло дополнительное разделение стадий, в первую очередь II и III, по формуле «стадия+риск». Некоторые исследователи разделяют также I стадию по степени риска прогрессирования [192]. Такая тенденция привела к появлению дифференцированных стратегий лечения в зависимости не только от стадии, но и от факторов риска прогрессирования. Так, уже в упомянутой выше работе предложено применять адьювантную химиотерапию FOLFOX даже в I стадии КРР при наличии факторов риска [192]. С другой стороны, предпринимаются попытки выделить группы пациентов с наличием одного фактора риска прогрессирования, у которых возможно отказаться от

проведения адьювантной химиотерапии при II стадии КРР при выявлении микросателлитной нестабильности.

Еще одна нерешенная проблема в лечении КРР — это роль неоадьювантной химиотерапии в улучшении результатов лечения. В настоящий момент максимально широко обсуждается роль тотальной неоадьювантной терапии в лечении местнораспространенного рака прямой кишки. В 2021 году опубликован обширный метаанализ [196], посвященный результатам проведенных исследований. Основные тезисы этого обзора: частота полных патоморфологических ответов выше при применении тотальной неоадьювантной терапии, включая консолидирующую химиотерапию. Частота полных патоморфологических ответов выше при применении коротких курсов в ее составе. Улучшается безрецидивная выживаемость, но, что особенно важно, не улучшается общая выживаемость при использовании тотальной неоадьювантной терапии в схемах лечения пациентов с КРР.

Неоадьювантная химиотерапия доказала положительный эффект и в настоящее время представляет собой стандарт лечения местнораспространенного рака прямой кишки, а также метастазов колоректального рака в печень [92], но она не была широко исследована при не метастатическом КРР. На сегодняшний день опубликовано четыре проспективных исследования и одно ретроспективное когортное исследование по неоадьювантной химиотерапии в этих условиях [35, 105, 123, 159, 171]. Все они сообщили о значительном уменьшении стадии опухоли с приемлемой токсичностью и отсутствии неблагоприятного влияния на послеоперационную заболеваемость, когда пациенты с местнораспространенным раком получали неоадьювантную химиотерапию [35, 123, 159, 171]. Среди этих исследований три анализировали отдаленные онкологические исходы [105, 159, 275]. Прежде всего, в исследовании фазы II в Дании, в котором 77 пациентов были рандомизированы между двумя

группами неoadьювантного лечения (XELOX или XELOX + панитумумаб) в соответствии с мутационным статусом *KRAS*, *BRAF* или *PIK3CA*, авторы наблюдали, что 42% пациентов с WT, получавших XELOX + панитумумаб и 51% мутировавших пациентов, получавших XELOX, могли избежать адьювантной химиотерапии (показатель конверсии) с кумулятивной 3-летней частотой рецидивов 6% и 3-летней безрецидивной выживаемостью 94%. Затем ретроспективный анализ данных по 27 575 пациентам с pT3 и pT4 M0 показал, что среди 921 (3%) пациента, получавших неoadьювантную химиотерапию, показатель 3-летней выживаемости значительно улучшился только у пациентов с первичной опухолью pT4b по сравнению с их коллегами, получавшими предварительную операцию и адьювантную химиотерапию (74% против 66%, $p = 0,002$) [105]. После сопоставления показателей предрасположенности улучшение общей выживаемости у пациентов с заболеванием pT4b, получавших неoadьювантную химиотерапию, оставалось статистически значимым и может быть связано со снижением частоты положительного края резекции [105]. Наконец, в исследовании 3 фазы FOxTROT в Великобритании оценивали периоперационный фторурацил (5FU) и оксалиплатин с панитумумабом или без него у 1052 пациентов с резектабельными T3 и T4 карциномами высокого риска [123]. Окончательный анализ был представлен на конференции ASCO в 2019 г. и подтвердил, что адьювантная химиотерапия не увеличивала число послеоперационных осложнений, вызывала значительное снижение стадии опухоли и снижала риск положительного края резекции [275]. Тем не менее, исследование FOxTROT не достигло целевого статистического значения для своей первичной конечной точки (частота рецидивов КРР заболевания за 2 года) [275].

Несколько факторов могут объяснить отсутствие продемонстрированного положительного влияния неoadьювантной химиотерапии на онкологические исходы в этих рандомизированных

контролируемых исследованиях [123, 159, 171, 275]. Во-первых, стадирование с помощью КТ перед лечением для выбора местнораспространенных опухолей, подходящих для неoadьювантной химиотерапии, может привести к завышению стадии и, следовательно, к избыточному лечению. Действительно, в различные опубликованные исследования были включены пациенты со стадией II низкого риска и даже некоторые пациенты со стадией I, и они составляют от 24% до 33% всей исследуемой популяции с предварительным хирургическим вмешательством [171, 275]. Таким образом, необходимы более точные критерии стадирования КТ прежде чем рассматривать неoadьювантное лечение у пациентов с КРР [104]. Другие методы визуализации, такие как МРТ, также могут помочь улучшить отбор пациентов с высоким риском II и III стадии, подходящих для предоперационного лечения в будущем [151].

Во-вторых, пациенты, получавшие неoadьювантную химиотерапию в этих исследованиях, не были отобраны по локализации опухоли, статусу MMR или мутационному статусу, и эти молекулярные подгруппы могут быть не эквивалентны с точки зрения ответа на предоперационную химиотерапию [123, 159, 171, 275]. Мутационный паттерн, наблюдаемый в исследовании PRODIGE 22, включал 13,5% опухолей dMMR, 4% и 51% опухолей с мутациями *BRAF* и *RAS* соответственно. В датском исследовании фазы II высокая частота мутаций *BRAF* (22%) могла повлиять на ответ на химиотерапию и вызвать предвзятость при интерпретации анализа выживаемости. [159]. В исследовании FOxTROT секвенирование следующего поколения показало расширенные мутации *RAS* или *BRAF* более чем у 35% пациентов [275]. Полный анализ биомаркеров продолжается в рамках исследования FOxTROT, и результаты ожидаются. Статус MMR в датском исследовании II фазы не определялся до начала лечения, хотя опухоли правосторонней локализации представляли 56% исследуемой популяции [123]. В исследовании III фазы FOxTROT, несмотря на то, что

анализ подгрупп не был предварительно определен в дизайне исследования, у пациентов с dMMR не было пользы от периоперационной химиотерапии по частоте гистологической регрессии и общей выживаемости в отличие от пациентов с pMMR [275]. В совокупности с многообещающими результатами пилотного исследования NICHE, вселяющего большие надежды на неоадьювантную иммунотерапию для пациентов с dMMR, определение статуса MMR при местно-распространенном КРР теперь является обязательным при обсуждении неоадьювантного лечения [78] и включено в нашей стране в рекомендации RUSSCO.

В-третьих, неоадьювантная химиотерапия в опубликованных исследованиях фазы II-III могла быть субоптимальной с точки зрения режимов (5-фторурацил и оксалиплатин) и количества циклов (ограничено тремя или четырьмя циклами) [123, 159, 171, 275]. Ни в одном из опубликованных испытаний не было продемонстрировано каких-либо признаков пользы от добавления моноклонального антитела, нацеленного на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) в отношении гистологического ответа или выживаемости. Анти EGFR терапия может плохо сочетаться с оксалиплатином, как было предложено в исследовании New EPOC при резектабельных метастазах колоректального рака в печень и в исследовании PETACC-8 при адьювантной терапии [244]. Учитывая недавние сообщения о целесообразности и эффективности неоадьювантной химиотерапии FOLFIRINOX в исследованиях рака прямой кишки (GRECCAR 4, FFCD1102, PRODIGE 23) [37, 89, 260], можно предположить, что такой режим, как неоадьювантная терапия в периоперационных условиях, улучшит онкологические результаты. По сравнению с монотерапией 5FU-оксалиплатином при местнораспространенном КРР. Исследование PRODIGE 54-IROCAS, в котором оценивается схема FOLFIRINOX в качестве адьювантной терапии при pT4 или N2,

продолжается во Франции [47], а испытания схемы FOLFIRINOX в неоадьювантном режиме планируются в других странах.

Для оценки эффективности и безопасности периоперационной химиотерапии FOLFOX проводится рандомизированное многоцентровое исследование II фазы (PRODIGE 22) у пациентов со II–III стадией КРР [171]. Эффективность (первичная конечная точка) оценивалась по гистологическому ответу первичной опухоли, определяемому степенью терапевтического патоморфоза опухоли, и не достигала статистической значимости. Опубликованы трехлетние его результаты: было показано, что периоперационная химиотерапия с помощью FOLFOX безопасна и осуществима и приводит к лучшему патоморфологическому ответу, чем послеоперационная FOLFOX. Хотя исследование фазы II PRODIGE 22 было недостаточно мощным для выявления преимуществ в выживаемости, не было продемонстрировано положительного влияния неоадьювантной химиотерапии на общую выживаемость у пациентов с местнораспространенным нематастатическим КРР.

Необходимы дальнейшие исследования в этой области для выявления подгруппы пациентов, которым может быть полезна неоадьювантная химиотерапия в периоперационной стратегии, и использование для этого молекулярных фенотипов и стратифицированного риска представляется многообещающим.

1.5. Перспективы использования молекулярно-генетических исследований в диагностике и лечении колоректального рака

Определение экспрессии генов является одним из методов исследования молекулярного фенотипа. Метод позволяет количественно оценить в цитоплазме клетки транскрипты матричной РНК (мРНК). Активность генов на молекуле ДНК отражается количеством мРНК молекул в клетке и коррелирует с количеством кодируемого этим геном белка,

повышение или снижение концентрации которого способно приводить к изменению функционального состояния клетки [67]. Технологии с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией позволяют определить количество транскриптов мРНК в материале и широко описаны в литературе [204]. Изменение уровня экспрессии гена расценивается как показатель его активности [309].

В основе канцерогенеза при КРР лежит нарушение механизмов взаимодействия генов. Более 50 лет широко изучаются различные предикторы, которые могли бы прогнозировать течение заболевания. Предполагается, что изучение внутриклеточного гомеостаза в норме и при КРР позволит обнаружить молекулярные механизмы, влияющие на канцерогенез, и выявить новые терапевтические мишени. В основе такого изучения лежит формирование субтипов опухолей по уровню наиболее высоко экспрессируемых генов, которые тем самым формируют ее специфические характеристики [329].

В настоящее время создано несколько тест-систем для определения прогноза заболевания и эффективности терапии. Такие системы, как Oncotype DX, Coloprint, ColDx, определяют вероятность прогрессирования рака на основе оценки уровня экспрессии ряда генов в опухоли [61, 177].

Модель для прогноза прогрессирования OncotypeDX® Colon Cancer Assay представляет собой 12-генную панель с использованием метода ОТ-ПЦР. Тест-система дает индивидуальную количественную оценку риска прогрессирования КРР у пациентов II и III стадии и применяется в комплексе со стандартными методами для индивидуального планирования лечения рака толстой кишки. Основной задачей данной системы является определение уровней экспрессии 7 функциональных и 5 контрольных генов в образцах из опухоли. Выбор генов, используемых в OncotypeDX®, был основан на результатах четырех клинических исследований с участием 1851 пациентов и выборкой 761 генов, проведенных NSABP и Cleveland Clinic Foundation

(CCF) в сотрудничестве с Genomic Health, Inc. Были выявлены ассоциации между уровнями экспрессии ряда генов (*Ki-67*, *MYBL2*, *C-MYC*, *FAP*, *INHBA*, *BGN*) и прогрессированием при КРР. OncotypeDX использовался в ряде клинических исследований, таких как QUASAR, CALGB 9581 и NSABPC-07 [332].

ColoPrint разработан с использованием данных об экспрессии всего генома и проверен у пациентов с II стадией КРР. Он включает оценку экспрессии 18 генов и расчет корреляции профиля экспрессии в образце со стандартом (среднее значение для профиля экспрессии ткани опухолей с известным клиническим исходом) (индекс ColoPrint). По экспрессионному профилю в опухолевом образце был определен низкий или высокий риск прогрессирования заболевания, который определялся как возникновение рецидива или смерти от рака толстой кишки. В литературе указано, что расчет индекса ColoPrint обеспечивает воспроизводимую, клинически значимую оценку риска прогрессирования [203].

В некоторых работах прогностическая эффективность этих коммерческих систем подвергается критике. Так, в своей работе Lin et al. [192] утверждают, что им удалось создать более эффективную систему прогнозирования прогрессирования КРР и ответа на лечение в I-II стадиях, чем OncotypeDX® и ColoPrint. Таким образом, авторы формируют индивидуальный план лечения в начальных стадиях КРР, предлагая включать в схему адъювантную химиотерапию, чего обычно не происходит.

Продолжаются и исследования, связанные с поисками других, более эффективных молекулярных маркеров прогрессирования КРР. Так, например, опубликована работа, в которой показана ассоциация снижения уровня экспрессии *RARβ* с отдаленными метастазами, дифференцировкой и стадией у пациентов с КРР [315].

Также предложены прогностические модели прогрессирования КРР на основе экспрессии *ESM1*, *CTHRC1*, *AZGP1*, которые определялись не только в ткани опухоли, но и в крови, моче и слюне [110].

Известны также специфические биомаркеры для прогнозирования возможности метастазирования КРР в лимфатические узлы – белок теплового шока 47 (HSP47) [216]. Как утверждают авторы, его обнаружение также будет индивидуализировать подход к лечению у пациентов с высоким риском метастазирования в лимфатические узлы.

Подводя итоги, можно констатировать, что разработка эффективных, практически применимых методов прогноза и разделения КРР на молекулярные фенотипы является актуальной задачей. Анализ литературы показывает, что существующие в настоящее время принципы фенотипирования и прогноза хотя и имеют реальное практическое применение, не окончательные и продолжение исследований в этом направлении будет способствовать улучшению результатов лечения КРР за счет дифференцированного подхода к нему.

ГЛАВА 2. Материал и методы лечения

Данное исследование является фрагментом научно-исследовательской деятельности ФГБУ «РНЦРР» по разработке новых методов комбинированного и комплексного лечения опухолевых заболеваний на основе комплексной морфологической и биомолекулярной диагностики. Исследование одобрено независимым этическим комитетом ФГБУ «РНЦРР» МЗ России.

Сбор клинического материала проводился на базе научно-исследовательского отдела хирургии и хирургических технологий в онкологии. Обследование и лечение пациентов осуществлялось в профильных клинических подразделениях ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ согласно утвержденным Ученым Советом клиническим протоколам.

Патоморфологические исследования выполнялись в патологоанатомическом отделении ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ под руководством заведующего отделением д.м.н. Ближнюкова Олега Петровича.

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

Объект исследования. Критерии включения и исключения из исследования

В работе изучены результаты молекулярно-генетических исследований 1286 биологических образцов, полученных из различных источников (групп пациентов и здоровых людей): образцы от 590 человек, проходивших в ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ с 2011 по 2021 год лечение колоректального рака 0-III стадии различных локализаций. Из них 225 пациентам определены уровни экспрессии мРНК на панели, включавшей 62 гена-участника сигнальных путей канцерогенеза в образцах, полученных из опухоли, а также у 119

человек из них дополнительно аналогичным образом исследованы уровни экспрессии генов этой панели в образцах из слизистой толстой кишки, взятых из максимально удаленного от опухоли края резекции препарата (всего 344 образца). Анализ точечных мутаций проведен у 399 пациентов с КРР. Он включал в себя исследование мутаций в генах *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* и определение микросателлитной нестабильности MSI. Еще у 44 пациентов с КРР различных локализаций выполнена щеточная биопсия (соскоб при помощи урогенитального зонда) слизистой из нижеампулярного отдела прямой кишки (всего 44 образца – по одному от каждого пациента). В этих образцах также исследованы уровни экспрессии имевшейся панели из 62 генов. Эти 787 образцов составили группу «Колоректальный рак». Обратим внимание, что образцы, которые подвергались молекулярно-генетическому исследованию по определению показателей экспрессии мРНК, отбирались до проведения неоадьювантного лечения.

Также обследованы 29 пациентов (у них отобрано 73 образца с использованием щипцовой биопсии и 23 образца щеточной биопсии из нижеампулярного отдела прямой кишки) с полипами ободочной кишки и 55 пациентов с верифицированным диагнозом неспецифический язвенный колит (по 1 образцу щеточной биопсии слизистой прямой кишки от каждого пациента – 55 образцов). Эти пациенты условно составили группу «Доброкачественная патология». Она состояла из 151 образца.

Группа «Норма» включала 348 образцов. Они получены от 95 условно здоровых людей, 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 нижеампулярного отдела прямой кишки и 63 дополнительных образца щеточной биопсии из нижеампулярного отдела прямой кишки).

Отсутствие органической патологии со стороны толстой кишки верифицировалось обязательным проведением колоноскопии.

Дополнительно (ЭГДС, КТ органов грудной клетки, брюшной полости, малого таза, анализ уровня онкомаркеров РЭА, СА 19-9, СА 72-4, ПСА/СА 125) исключались опухоли другой локализации. Из исследования исключались лица, имевшие злокачественные новообразования в анамнезе и у ближайших родственников.

В **таблице 1** представлены методы исследования в зависимости от типа полученных образцов.

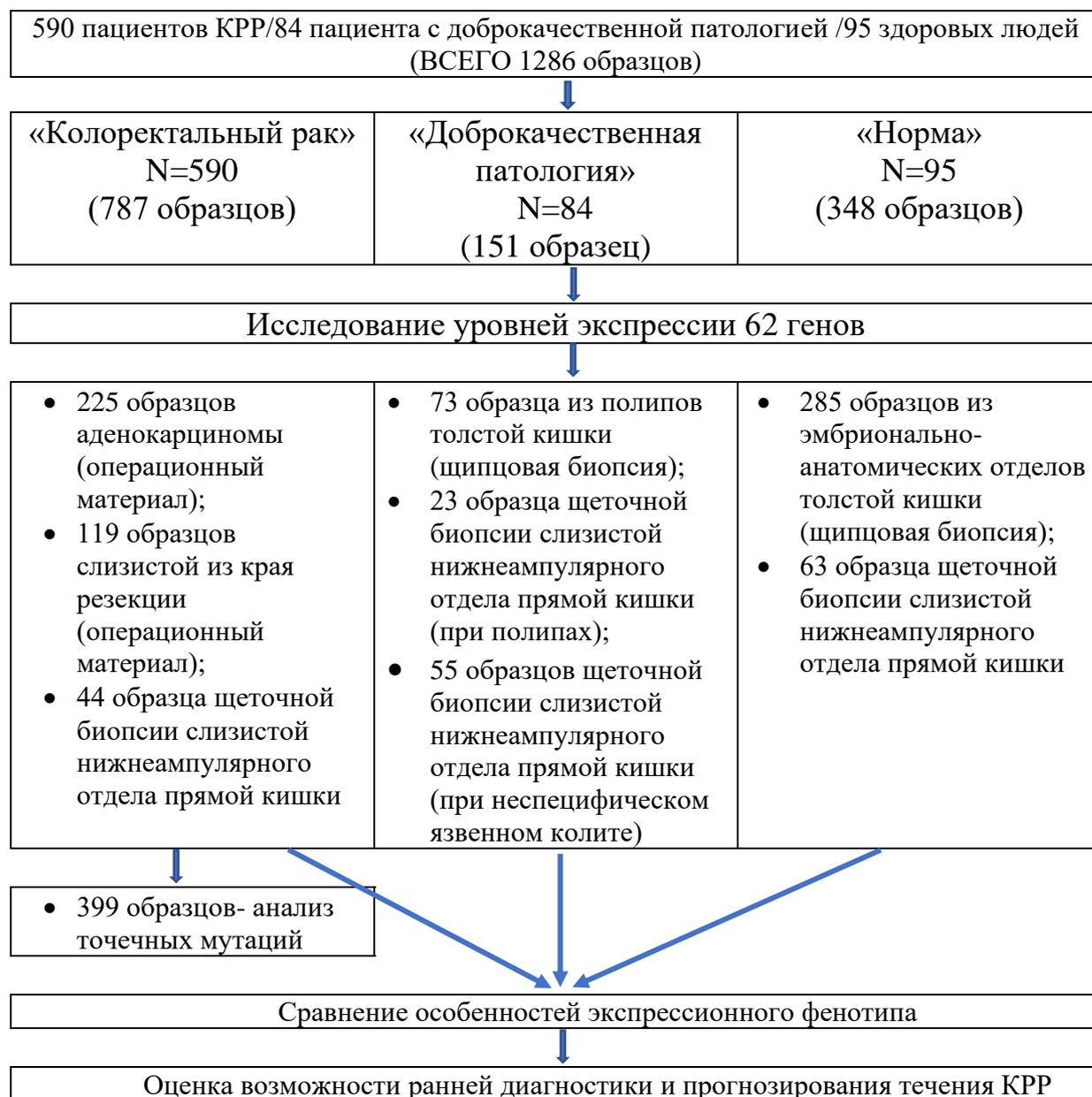
Таблица 1. Методы исследования и типы образцов

Тип образца	Методы исследования
Образец из аденокарциномы, полученный при исследовании операционного препарата	<ul style="list-style-type: none"> • Исследование экспрессии мРНК на панели 65 генов (62 функциональных и 3 референсных) • Исследование мутаций в генах <i>KRAS</i>, <i>NRAS</i>, <i>BRAF</i>, определение MSI
Образец морфологически неизменной слизистой (МНС) у пациентов с КРР, полученный при исследовании операционного препарата	<ul style="list-style-type: none"> • Исследование экспрессии мРНК на панели 65 генов (62 функциональных и 3 референсных)
Биопсийный образец неизменной слизистой от здоровых людей, полученный в ходе колоноскопии	
Щеточная биопсия слизистой нижнеампулярного отдела прямой кишки у пациентов с КРР, полипами, неспецифическим язвенным колитом и в норме	

Анализ проводился с учетом эмбрионально-анатомического отдела толстой кишки, из которого образец отбирался. В первую очередь нас интересовали образцы из условно «правой» эмбриональной кишки, включающую в себя слепую, восходящую и поперечно ободочную кишку, и «левую», в которую входили нисходящая ободочная, сигмовидная и прямая кишка. Границей эмбриональных отделов считали селезеночный угол ободочной кишки.

Как уже указывалось, всего нами был изучен молекулярный профиль в 1286 образцах. Из них уровень экспрессии панели 62 генов-участников сигнальных путей канцерогенеза был определен в 388 различных образцах, полученных от пациентов в локальных стадиях колоректального рака различной локализации, 151 образце при неопухоловой (доброкачественной) патологии в толстой кишке и 348 образцах в норме. Дизайн исследования представлен на **рисунке 1**.

Рисунок 1. Дизайн исследования



Критериями исключения пациентов из исследования явились: отказ пациента

от включения в исследование, наличие опухолевого роста по проксимальному или дистальному краю резекции.

С учетом поставленных задач и необходимости оценки отдаленных результатов во всех анализируемых наблюдениях, из исследования выбывали пациенты, имевшие фатальные послеоперационные осложнения (V степени по классификации Clavien-Dindo), а также пациенты, имевшие срок наблюдения менее 24 месяцев.

Группу «Доброкачественная патология» (151 образец) составили 29 пациентов с полипами ободочной и прямой кишки: тубулярные аденомы были выявлены у 23, гиперпластические полипы – у 6 пациентов. Всего получено 73 образца при биопсии и 23 образца щеточной биопсии нижнеампулярного отдела прямой кишки. В этой группе также анализировались 55 образцов щеточной биопсии слизистой нижнеампулярного отдела прямой кишки пациентов, страдавших неспецифическим язвенным колитом. Все участники дали письменное информированное добровольное согласие на включение в исследование, согласие на проведение полной санации толстой кишки при колоноскопии (удалялись все полипы с обязательным последующим гистологическим исследованием). Нами также исключались пациенты, у которых, по данным гистологического исследования, в аденоме определялась тяжелая дисплазия.

Пациенты группы «Норма» давали письменное информированное добровольное согласие на включение в исследование, согласие на биопсию слизистой при проведении плановой колоноскопии. У них (инструментально) и у родственников первой линии (анамнестически) исключались другие онкологические заболевания.

Основным этапом работы явилось создание базы данных пациентов, включенных в исследование. Она вместила в себя всю полученную информацию: результаты клинических, инструментальных, макро- и микроскопических патоморфологических исследований, молекулярных и

генетических исследований всех образцов. Информация из базы данных позволила изучить отдаленные результаты лечения. Медиана наблюдения составила 42,7 мес.

Краткая характеристика исследованных генов

В каждом образце, подвергнувшись молекулярно-генетическому исследованию, анализировался уровень экспрессии 62 функциональных генов и 3 референсных. В панель вошли различные гены, активность которых может изменяться в процессе канцерогенеза. Нами они были объединены в несколько функциональных групп: гены пролиферации, апоптоза, транскрипции, межклеточных взаимодействий, гены клеточной дифференцировки, иммунного ответа, роста и мембранные рецепторы. В **таблице 2** указаны гены, отобранные для анализа в исследовании.

Таблица 2. Исследуемая панель генов

Функциональная группа	Гены
Гены пролиферации	<i>KI67, CCND1, CCNB1, PTEN, STK-15 (AURKA), P16INK4A, P14ARF</i>
Гены транскрипции	<i>MYC, MYBL2, GATA3</i>
Гены апоптоза	<i>BCL2, BAX, BAG1, NDRG1, BIRC5, TERT</i>
Гены факторов роста	<i>VEGFα 121, VEGFα 165, VEGFα 189, SCUBE2, IGF-1, IGF-2, TGFβ</i>
Гены дифференцировки	<i>HER2 (ERB-B2), ESR, PGR CYP19A1 C-ERB2, GRB7, CD 45, CD 56, CD 68 LIF, LIFR</i>
Гены межклеточного взаимодействия	<i>MMP11, MMP2, MMP7, MMP8, MMP9, CTSL2, PAPP A</i>
Гены факторов иммунного ответа	<i>IL-1β, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12α, IL-15, IL-28, IL-29; COX-2, TNFα, TLR-2, TLR-4, TLR-7, IFNγ, GNLY, GREM, HLA-G1, HLA-G5, LIF, LIFR, GATA3</i>
Многофункциональные гены	<i>CD-56, LGALS1</i>
Контрольные гены	<i>GUSB, B2M, HPRT.</i>

Методы обследования пациентов

Все пациенты с КРР, участвовавшие в исследовании, имели локальные стадии рака прямой или ободочной кишки, подтвержденные данными комплексного предоперационного обследования, интраоперационной

ревизии и результатами патоморфологического исследования операционного препарата, подтвердившими гистологическую верификацию аденокарциномы различной степени дифференцировки. Патоморфологическое заключение формировалось согласно Практическим рекомендациям по лечению злокачественных опухолей Российского общества клинической онкологии (RUSSCO). Оно включало следующие параметры (здесь нами они цитируются в точном соответствии с Рекомендациями <https://www.rosoncoweb.ru/standarts/RUSSCO/2022/2022-22.pdf>): 1. Описание макропрепарата: расстояние до проксимального и дистального краев резекции; размеры опухоли; наличие или отсутствие перфорации опухоли, наличие иных новообразований; гистологический тип опухоли (согласно Классификации ВОЗ редакции 2019 года); степень злокачественности опухоли (низкая, высокая); pT; pN (с указанием общего числа исследованных и пораженных лимфатических узлов); наличие в периколярной жировой ткани изолированных опухолевых депозитов без предсуществующих структур лимфатического узла (иначе следует относить к метастазу), сосудистых структур (иначе следует относить к сосудистой инвазии) или нервов (иначе следует относить к периневральной инвазии); наличие поражения проксимального края резекции (отрицательный результат также должен быть констатирован); наличие поражения дистального края резекции (отрицательный результат также должен быть констатирован); наличие поражения циркулярного края резекции (отрицательный результат также должен быть констатирован) для рака прямой кишки — макроскопически оценить объем выполненной хирургом диссекции регионарной клетчатки в пределах мезоректальной фасции (согласно методике Р. Quirke [247]): TME-G1/G2/G3; при микроскопическом исследовании указать расстояние в миллиметрах от ближайшего фокуса опухоли (первичный очаг или депозит или метастаз) до маркированного красителем циркулярного края резекции (согласно методике Р. Quirke);

наличие интрамуральной и экстрамуральной сосудистой инвазии (отрицательный результат также должен быть констатирован); наличие перинеуральной инвазии (отрицательный результат также должен быть констатирован); гистологическая градация инвазивного фронта опухоли (tumor budding) по 3-ступенчатой схеме, в соответствии с градацией International Tumor Budding Consensus Conference (2016); гистологические признаки, значимо ассоциированные с MSI (зубчатая, перстневидноклеточная, муцинозная и медуллярная аденокарцинома, интра- и перитуморальная лимфоидная инфильтрация, правосторонняя локализация опухоли); степень регрессии опухоли (TRG1–TRG5) по шкале Mandard (при проведении неoadьювантного лечения). На этапе начала набора пациентов использовалась шкала Г.А. Лавниковой [16]. В соответствующей главе мы представили результаты оценки по обеим шкалам.

Молекулярно-генетические исследования включали в себя определение соматических мутаций в генах *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* и определение микросателлитной нестабильности MSI и определение уровня экспрессии панели из 62 генов (таблица 2) в образцах из опухоли и края резекции.

По окончании лечения за пациентами проводилось контрольное наблюдение, включавшее осмотр врача, определение уровня онкомаркера РЭА и УЗИ органов брюшной полости каждые 3 месяца в течение первых 2 лет от момента установки диагноза. Компьютерную томографию органов грудной клетки и органов брюшной полости с контрастным усилением выполняли также каждые 6 месяцев, если не имелось показаний к сокращению сроков ввиду появлений подозрений на развитие прогрессирования КРР. Контрольную колоноскопию выполняли ежегодно, если толстая кишка перед началом лечения была осмотрена полностью. В противном случае тотальную колоноскопию рекомендовали выполнить

после 3 месяцев от момента хирургического лечения. Пациенты, имевшие срок наблюдения менее 24 месяцев, из исследования выбывали.

У пациентов с гиперпролиферативными заболеваниями толстой кишки и неспецифическим язвенным колитом образцы для исследования отбирались во время колоноскопии. В образцах исследовался уровень экспрессии изучаемой панели генов (**таблица 2**). Толстая кишка санировалась полностью у пациентов с полипами. Отсутствие злокачественного перерождения полипов верифицировалось данными гистологического исследования. При выявлении в полипе тяжелой дисплазии пациент из исследования исключался. Отдаленные результаты у этих пациентов не отслеживались и контрольные исследования не выполнялись.

У здоровых людей образцы, полученные в результате щипцовой и щеточной биопсии слизистой оболочки, также исследовались методом полимеразной цепной реакции с определением значений экспрессии мРНК той же самой панели генов.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

В исследовании была использована методика ПЦР в реальном времени, которая позволяет определить количество транскриптов в тестируемом образце. В конце реакции информация о количестве молекул мРНК определенных генов в тестируемом образце представляется графически и в цифровом виде, что позволяет косвенно судить об уровне экспрессии этих генов.

Подготовка образца для исследования заключалась в выделении молекул мРНК и синтезе комплементарной ДНК на их матрице. Для выделения мРНК использовался набор колонок RNeasy Mini kit (Qiagen, ФРГ). Процесс выделения и очистки РНК проводится следующим образом: гомогенизация образца в растворе гуанидинсульфата с фильтрацией на сорбирующих колонках в буферах и последующим осаждением молекул РНК

в растворе. Важной особенностью мРНК из нативной ткани является достаточно высокая сохранность фрагментов молекул, длина которых может достигать 20 000 п.н. Это позволяет создавать уникальные наборы праймеров, исключая фоновую амплификацию геномной ДНК, что, в свою очередь, исключает стадию обработки раствора основаниями ДНК.

Необходимость синтеза кДНК на матрице РНК связана с отсутствием сродства ДНК-полимераз Taq или MMLV (транскриптаза вируса лейкоза мышей Молони), часто используемых в ПЦР, к мРНК. Процесс обратной транскрипции *in vitro* воспроизводит действие фермента ревертазы, впервые описанного для ретровирусов. Однако в искусственных условиях исследователь способен контролировать реакцию путем целенаправленной селективной транскрипции исследуемых генов путем отбора олигонуклеотидных последовательностей праймеров, которые играют роль затравки для синтеза транскрибируемого фрагмента нуклеиновой кислоты. Именно достаточная длина мРНК из нативных образцов позволяет отбирать праймеры, комплементарная последовательность которых лежит на границе экзонов РНК-матрицы, что исключает случайную транскрипцию ДНК из-за наличия в ней интронов.

Для проведения реакции ОТ-ПЦР необходимы три ключевых компонента.

- молекула кДНК, которая играет роль матрицы, содержащей исследуемый фрагмент.

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

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

Если необходимая кДНК присутствует в анализируемом образце, то в ходе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, обеспечиваемых определенными циклами изменения температурного режима. Каждый цикл усиления состоит из трех этапов, описанных ниже:

1. Денатурация: реакцию смесь нагревают до 92-95°C, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК, целостность которых обеспечивается термолабильными водородными связями, разматываются с образованием двух одноцепочечных молекул

2. Отжиг на матрице: на втором этапе праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени.

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

Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа.

После отжига праймеров Таq-полимераза приступает к завершению второй цепочки ДНК, начиная с 3'-конца праймера.

3. Удлинение (синтез): температуру в реакционной смеси доводят до оптимальной для Таq-полимеразы, и синтез второй цепи продолжается с максимальной эффективностью.

В дальнейшей стадии денатурации, отжига и удлинения повторяются многократно (30 и более раз). В каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается.

Для количественной оценки содержания мРНК в образце была использована ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), основной особенностью которой является способность обнаруживать накопление продуктов амплификации непосредственно во время амплификации. Данная технология использует интеркалирующие красители либо флуорофоры в составе

олигонуклеотидных гибридационных зондов. Существует несколько вариантов таких зондов. В основе технологии лежит резонансный перенос энергии флуоресценции, который базируется на обмене энергией между двумя фотоактивными молекулами, одна из которых является донором (первый флуоресцентный краситель), а другая – акцептором («темновой» гаситель) энергии. Эффективность переноса энергии зависит от взаимного расположения донора и акцептора. Состав набора использованных нами реагентов включал гибридационный зонд TagMan, который представляет собой линейный олигонуклеотид, меченный по 5'-концу флуорофором, а по 3'-гасителем флуоресценции. Место отжига зонда располагают между участками отжига прямого и обратного праймеров, что исключает детекцию нецелевых продуктов, которые теоретически могут образоваться в результате неспецифического отжига.

В современных системах усиление излучения в соответствующей области спектра используется для возбуждения флуоресценции с последующим обнаружением изменений длины волны. Как только уровень сигнала превысит определенный пороговый уровень шума, его изменение будет графически отображено в режиме реального времени в виде экспоненциальной кривой, поднимающейся выше уровня изолинии. Точкой пересечения кривой с осью ОН является так называемый пороговый цикл, относительное значение, отражающее концентрацию транскрипта в растворе.

С целью стандартизации методики и для получения воспроизводимого алгоритма расчета результатов необходимо введение внешних стандартов, относительно которых будет производиться количественная оценка реакции. Одним из возможных вариантов является одновременное определение экспрессии т.н. «референсных» генов, экспрессия которых не зависит от различных специфических условий.

После статистической обработки результатов ПЦР появляются значения относительного уровня экспрессии изучаемых генов, выраженных десятичными числами.

Методика пробоподготовки и ОТ-ПЦР в исследовании

Процедура от момента получения образца до получения результатов ОТ-ПЦР состояла из трех этапов: выделение мРНК из него, проведение обратной транскрипции и собственно ПЦР.

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

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

Контроль отсутствия реакции на геномной ДНК ставили с образцами, не прошедшими реакцию обратной транскрипции, которые разводили в ТЕ-буфере в конечной концентрации, эквивалентной таковой кДНК. ДНК-зонды, использовавшиеся для детекции продуктов амплификации исследуемых и нормировочных генов, были помечены FAM. Реакции амплификации генов ставили в разных пробирках в двух повторах. Оптимальную температуру отжига праймеров и зондов подбирали экспериментально с использованием режима «градиент температур», для всех тест-систем температура была унифицирована и составила 64°C. Амплификацию осуществляли в режиме «реального времени» в объеме 12

мкл по следующей программе: 15 циклов - 80°C 5 сек, 94°C 5 сек; 1 цикл - 94°C 5 мин; 50 циклов - 94°C 10 сек, 64°C 10 сек, использовали приборы «ДТ-322» и «ДТ-prime 5» производства фирмы ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64°C.

Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, методом сравнения индикаторных циклов (C_p) с использованием нормализации по контрольным генам (House Keeping Gene). В качестве контрольных генов использовали *GUSB* (бета-глюкуронидаза), *B2M* (бета-2-микроглобулин) и *HPRT1* (гипоксантин-гуанин фосфорибосилтрансфераза 1), как наиболее стабильно экспрессируемых в различных тканях [194]. Они были подобраны экспериментально таким образом, чтобы диапазон экспрессии контрольных генов перекрывал диапазон экспрессии всех исследуемых генов. По контрольным генам нормировали количество мРНК для каждого образца. Реакцию амплификации проводили в дублях, из которых в расчет брали среднее значение точки пересечения C_p (crossing point).

Формулы расчета:

Уровень экспрессии гена без учета количества материала, $[C_i]$, определяли как $[C_i] = 2^{C_{pi} - C_{pi\ min}}$, где C_{pi} – значение индикаторного цикла в исследуемом образце, а $C_{pi\ min}$ – минимальное значение индикаторного цикла (соответствует максимальному значению экспрессии) во всей выборке для данного гена, 2 – эффективность амплификации. Сначала вычислялись нормировочные факторы для каждого из нормировочных генов по формуле:

$$NF = 2^{C_p - C_{pi\ min}},$$

где C_p – значение индикаторного цикла в исследуемом образце, а $C_{pi\ min}$ – минимальное значение индикаторного цикла (соответствует максимальному значению экспрессии) во всей выборке для нормировочного

гена. Нормировочный фактор NF с учётом всех нормировочных генов рассчитывается как среднее геометрическое:

$$NF = \sqrt[3]{NF_{b2m} \times NF_{gusb} \times NF_{hpvt1}}$$

Уровень экспрессии генов с учетом нормировочного фактора рассчитывали как $[C_{NF}] = [C_i] / NF$ и использовали для определения относительного уровня экспрессии по формуле $[C_{NF}] / [C_{NF \min}]$, где $C_{NF \min}$ – значение C_{NF} в образце с минимальным уровнем экспрессии.

В результате расчета в исследуемой выборке по каждому из 62 генов определяется образец с самым низким уровнем экспрессии. Этот образец (всего 62 образца, соответствующих числу исследованных генов) приобретает значение «1». В остальных образцах с более высоким уровнем экспрессии (больше, чем «1») значения показывают, во сколько раз экспрессия гена выше по отношению к образцу со значением «1». Полученные результаты были логарифмированы по основанию «2».

Методы лечения

Лечение пациентов с КРР проводилось согласно утвержденным клиническим протоколам РНЦРР, клиническим рекомендациям МЗ РФ, актуальным в соответствующие временные периоды. В зависимости от стадии и локализации опухоли оно предполагало проведение хирургического лечения открытым или лапароскопическим доступом, а также адъювантную и неoadъювантную лекарственную и лучевую терапии в различных режимах, которые подробно описаны в соответствующих разделах работы.

Методы статистического анализа данных

Статистическая обработка результатов 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 данных 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. 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 имеет преимущества по сравнению с обычными видами регрессии, поскольку при проектировании модели строится определенная схема отношений между параметрами, разбивая переменные на группы, называемые латентными

переменными. Это позволяет избежать негативного влияния включения в модель сильно коррелирующихся параметров. Hanafi et al. [141] описывает решение данным методом проблем эндогенности и мультиколлинеарности. Утверждается также [38], что данная модель не чувствительна к характеристикам распределения переменных. Перечисленные особенности метода позволяют лучше анализировать мягкие системы, которые включают в себя множества взаимосвязанных факторов за счет выделения их в группы и настройки путей взаимодействия.

Модель моделирования PLS-SEM, также иногда называемая PLS-PM (partial least squares structural equation modeling), часто применяется при исследовании систем, которые могут быть классифицированы как «мягкие». Их отличие от «жестких» в том, что они ни имеют полностью определенного состава элементов, а их законы поведения слишком сложны, чтобы описать их полностью (зачастую говорят, что заданных законов поведения просто нет), из-за чего их очень сложно моделировать. Описанные ранее преимущества метода, которые демонстрируются в литературе [186, 235, 249], послужили основанием для выбора PLS-PM для этой задачи. Идея данного метода состоит в том, что такие системы удобнее оценивать с помощью наблюдаемых переменных-индикаторов, для этого методология SEM предполагает, что матрицу $n \times p$ (где n – число наблюдений, p – число параметров) т.е. обычную базу данных, применяемую в моделировании, можно разбить на J независимых блоков X_j , каждый из которых является неявной (латентной) переменной $LV_j, j = 1, \dots, J$, каждый блок содержит K переменных X_{j1}, \dots, X_{jk} (блок может состоять из одной латентной переменной, если она логически не может быть объединена с другими в массиве). В результате каждая из реальных (наблюдаемых) переменных из изначального массива становится частью какой-либо латентной переменной (это также называются рефлексивным способом). Основная идея модели может быть записана в следующем виде:

$$X_{jk} = \alpha_{0jk} + \alpha_{jk}LV_j + \varepsilon_{jk}, k = 1, \dots, K \quad (1)$$

где коэффициент α_{0jk} называется нагрузкой (в оригинальном описании loading) факторов, а ε_{jk} – ошибкой.

С помощью данного метода решается несколько видов задач, основной из них является построение модели структурной регрессии, проверяющей отношения между латентными переменными. Эти зависимости могут быть представлены в следующем виде:

$$LV_j = W_{0j} + \sum_{i \rightarrow j} \beta_{ji}LV_i + \varepsilon_j \quad (2)$$

где ε_j – ошибка, β_{ji} – коэффициент пути, по которому можно судить о силе связи между латентными переменными, $i \rightarrow j$ означает, что суммируются по всем значениям i за исключением $i = j$.

Необходимо отметить, что, помимо упомянутого ранее рефлексивного способа, существует и формативный, в этом случае предполагается, что рассматриваемый фактор можно получить из индикаторов:

$$LV_j = W_{0j} + \sum_k W_{jk}X_{jk} + \varepsilon_j \quad (3)$$

Уравнения (1) – (3) формируют полную модель структурной регрессии. Для работы с данной моделью необходимо выдвинуть гипотезы о наличии латентных переменных и их связях. Получаемую структуру обычно называют внутренней моделью. После чего из собранных и обработанных данных отбираются переменные для каждой латентной переменной. После этого становится возможным запустить моделирование и оценить качество модели и, если оно неудовлетворительно, внести правки в набор наблюдаемых переменных в рамках латентных переменных.

Для решения описанных систем уравнений применяется метод частных наименьших квадратов (PLS - Partial Least Squares), который широко используется для эмпирической проверки теорий в различных сферах,

предметом которых являются «мягкие» системы, например, медицина, экономика, менеджмент, социология, психология [51, 312]. И хотя более распространено экономическое приложение этих моделей [68, 262, 276], есть примеры ее применения и в других областях [207, 315], в том числе и в медицине [330].

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.

Поскольку в данном случае мы изучали влияние данных факторов на срок безрецидивной выживаемости, и изучаемые переменные не предполагают влияния по цепочке друг на друга, мы связываем все латентные переменные напрямую с зависимой переменной: безрецидивной выживаемостью. Базовая модель изображена на **рисунке 2** в Приложении.

Данный рисунок сформирован на основе имеющихся гипотез (направлений влияния) относительно латентных переменных, представляющих собой определенные группы показателей (функциональные группы генов, морфологические показатели, точечные мутации), а также на основе предположения, что, поскольку мы изучаем их влияние на срок безрецидивной выживаемости («ВБПБ» на схеме в центре), мы их связываем напрямую с исследуемой переменной.

Чтобы расширить полученные результаты, применялся анализ IMPA (Importance-Performance Map Analysis) [257], дающий дополнительную информацию. Такой метод обычно используется в качестве финальной части анализа [88], поскольку позволяет строить точечные графики, одна ось которых представляет производительность (performance) или же реальное влияние переменных, а вторая – их значимость в целом. Следуя Hair et al. [139] на точечном графике, можно выделить 4 области, которые не имеют четких границ и обычно определяются, исходя из относительных значений производительности и значимости переменных:

- Область высокой значимости и производительности (обычно называют maintain) – для наиболее важных переменных
- Высокая значимость при низкой производительности (обычно обозначают development area) – для значимых переменных, которые существенно повлияют на результат.
- Низкая значимость и производительность (обычно обозначают low priority) – влияние таких переменных на результат минимально
- Низкая значимость при высокой производительности (обычно обозначают possible overkill) – для малозначимых переменных, значению которых уделяется определенное внимание.

Нужно отметить, что большой отрицательный коэффициент, как и большой положительный, говорит о высокой значимости, тогда как низкой значимостью является область около нуля. При этом в любом случае граница областей является достаточно условной.

Таким образом, данный подход позволяет получить более надежные выводы, нежели простой анализ коэффициентов путей латентных переменных.

Проверка качества модели осуществляется с помощью заданных разработчиками метода PLS-SEM индикаторов [250]. Необходимость получения достаточно высоких показателей этих индикаторов связана с тем,

что нужна определенная согласованность блоков наблюдаемых переменных для каждой латентной переменной, которая позволяет оценить силу связи между наблюдаемыми переменными. В частности, индикаторы должны иметь сильную корреляцию между собой, но слабую с другими латентными переменными. Этими индикаторами согласованности являются:

- коэффициент α Кронбаха (зависит от средних значений коэффициентов парной корреляции между всеми индикаторами в блоке), он должен быть больше 0.7;
- коэффициент ρ Диллона-Голдштейна (связан с вариацией суммы индикаторов), также должен быть больше 0.7;
- собственные значения матрицы корреляции индикаторов, это показатель AVE (average Variance extracted), который должен быть больше 0.5.

Анализируя другие работы, использующие данную модель, можно последовать примеру статьи Hair et al. [140] которая говорит, что действительность модели основана на показателе AVE. В нашей работе все переменные после оптимизации наборов наблюдаемых переменных вполне удовлетворяют этим требованиям (некоторые индикаторы стоят на границе указанных уровней, что, учитывая относительно небольшой набор выборки, можно считать приемлемым), **таблица 3** индикаторов качества модели представлена в Приложении.

ГЛАВА 3. Клинико-морфологическая характеристика обследованных пациентов

3.1. Клиническая характеристика пациентов КРР

В исследовании изучались биологические образцы 590 пациентов с КРР локальных стадий различных локализаций (290 мужчин [49,2%] и 300 женщин [50,8%] в возрасте от 23 до 93 лет). Средний возраст пациентов составил $64,6 \pm 10,9$ лет.

Распределение пациентов по возрастным группам представлено в **таблице 5**. Значимых гендерных отличий при анализе по возрастным подгруппам не получено. Средний возраст пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом рак ободочной/прямой кишки составил $64,6 \pm 10,9$ лет, доля мужчин – 49,2%; средний возраст пациентов в контрольной группе «Норма» составил $60,1 \pm 7,25$ года, доля мужчин 55,7% (53 человека)

Таблица 4. Возрастные группы в исследовании

Возрастная группа	«Колоректальный рак», N=590 абс.кол-во/доля в группе (%)	«Доброкачественная патология», N=84, абс.кол-во/доля в группе (%)	«Норма», N=95, абс.кол-во/доля в группе (%)	p
Моложе 45 лет	72 (12,2%)	11 (13,1%)	12 (12,6%)	0,8939
45-60 лет	137 (23,2%)	21 (25%)	34 (35,8%)	0,0862
Старше 60 лет	381 (64,6%)	52 (61,9%)	49 (51,6%)	0,0763

Средний срок наблюдения составил $42,29 \pm 28,38$ месяца, что мы сочли достаточным для решения поставленных в работе задач.

Структура КРР по локальным стадиям представлена на **диаграмме 1**: 0 и I стадия у 125 (21,2%) пациентов; II стадия - у 213 (36,1%); III стадия - у 252 (42,7%). Отметим, что II и III стадия диагностированы почти у 80% наших пациентов, что потребовало, с одной стороны, проведения адъювантного лекарственного лечения, а, с другой, свидетельствует о неэффективности

ранней диагностики у этой группы по сравнению с рядом развитых стран, где выявляемость КРР на поздних стадиях не превышает 15%. [36, 62, 63].

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



Опухоли правого эмбрионально-анатомического отдела толстой кишки (слепая кишка, восходящая ободочная кишка, печеночный угол, поперечная ободочная кишка до селезеночного угла) выявлены у 126 пациентов (21,4%); опухоли левого отдела (селезеночный угол, нисходящая ободочная кишка, сигмовидная кишка, ректосигмоидное соединение) у 187 пациентов (31,7%). Опухоль прямой кишки выявлена в 46,9% (277 пациентов) случаев. Локализация опухоли по отделам толстой кишки представлена на **диаграмме 2**. Собственные данные согласуются с данными ВОЗ [287]. Нами не была обнаружена зависимость локализации опухоли в определенном отделе толстой кишки от возраста. Средний возраст пациентов с правосторонней локализацией опухоли в работе составил $65,1 \pm 11,9$ лет, левосторонней $64,3 \pm 10,9$ лет, прямой $63,2 \pm 10,9$ лет. Группы не имели достоверных различий по возрастной структуре. Характер распределения пациентов по возрастным группам соответствовал нормальному ($W=0,95$, тест Шапиро-Уилкса). Распределение пациентов по возрасту в зависимости от локализации опухоли отражено на **диаграмме 3**.

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

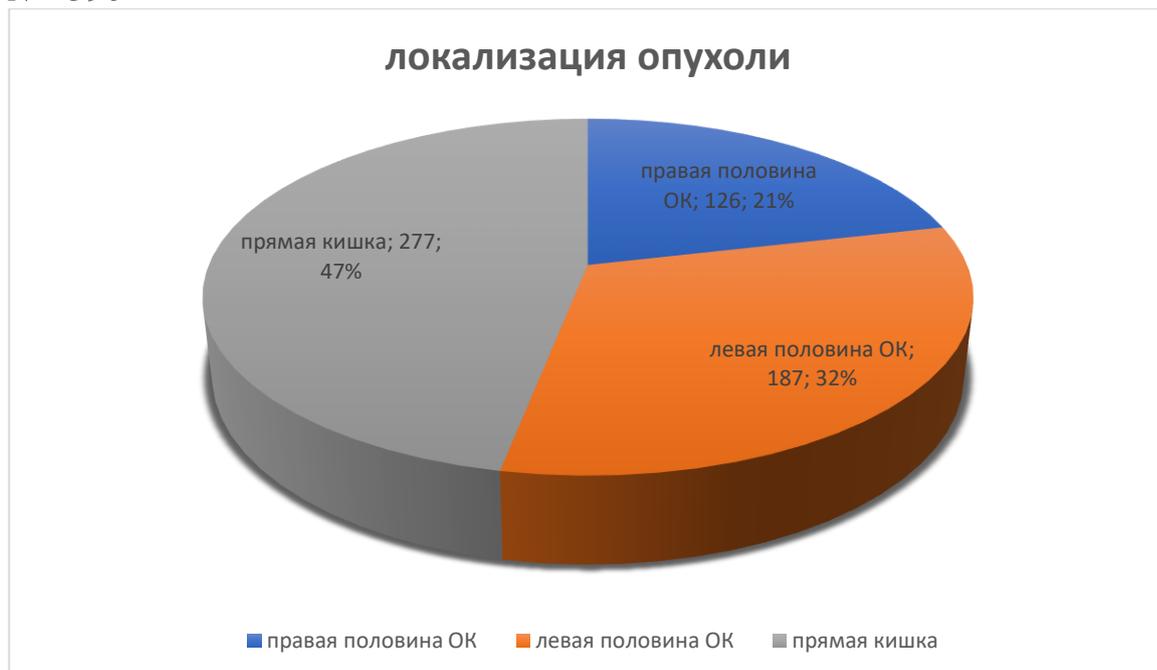
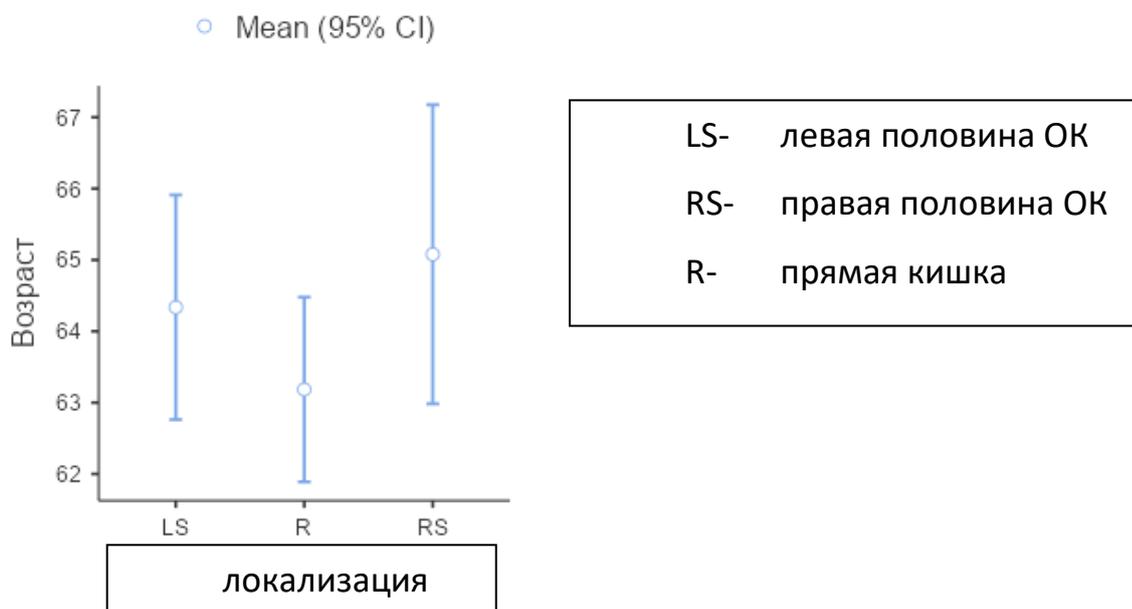


Диаграмма 3. Распределение пациентов по возрасту в зависимости от локализации опухоли, N=590

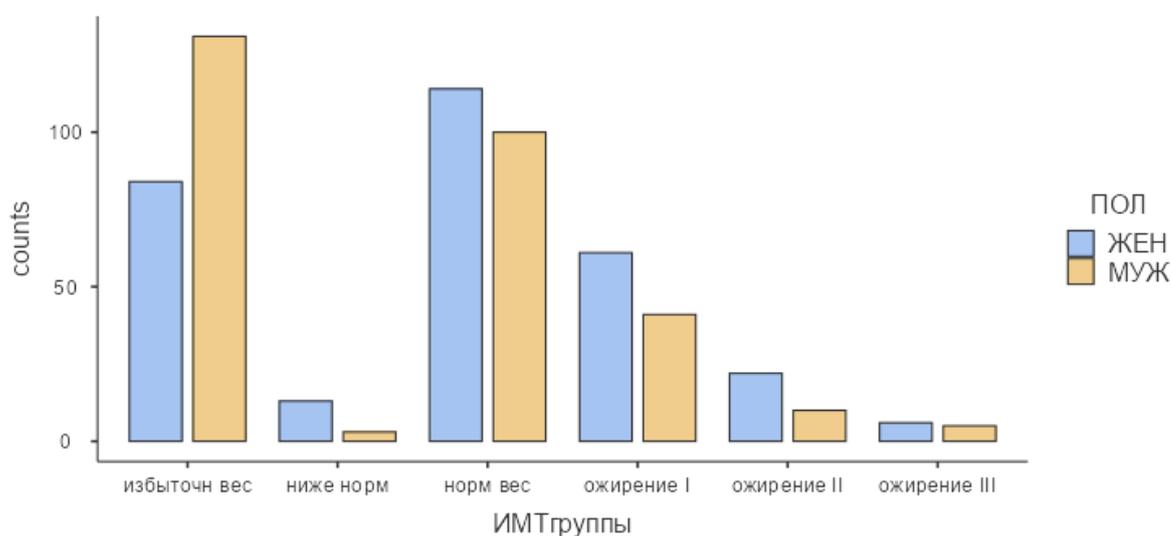


Была также изучена и частота сочетания полипов и колоректального рака. При локализации аденокарциномы в левых отделах толстой кишки (нисходящая ободочная, сигмовидная и прямая кишка) доброкачественные полипы в кишке выявлены у 69 (11,7%) пациентов, а при локализации рака в правой половине – у 24 (4,1%) человек. Отметим, что у 41 (6,9%) пациента с

локализацией опухоли в левых отделах ободочной кишки полипы были выявлены при колоноскопии через 3-4 месяца после хирургического лечения ввиду того, что стенозирующий характер аденокарциномы в левых отделах толстой кишки на момент ее выявления не позволил провести тотальную колоноскопию. 96 (16,3%) пациентам ранее до выявления КРР выполнялась колоноскопия, а полипэктомия в анамнезе производилась только у 11 человек. Средний срок между колоноскопией, на которой был выявлен КРР, и предшествующей без патологии, составил $7,3 \pm 6,1$ лет. На проведение FOBТ-теста на скрытую кровь как элемент диспансеризации в течение жизни указали только 13 пациентов нашей выборки, что составило всего 2,2%. Можно констатировать, что пациенты, выявленные активно при диспансеризации в нашей выборке, практически отсутствовали.

На диаграмме 4 представлены антропометрические данные пациентов в зависимости от пола.

Диаграмма 4. Антропометрические показатели пациентов с КРР, N=590



Обнаружен разброс антропометрических характеристик у пациентов с КРР. ИМТ ниже нормы ($<18,5$) определялся у 16 (2,7%) пациентов. Нормальный вес ($ИМТ \geq 18,5$ и <25) определялся у 214 больных (36,3%). Дефицит массы тела у 16 (1,7%) пациентов. Ожирение I степени у 102 человек (17,3%), II степени у 32 (5,4%), а III степени у 11 человек (1,9%).

Нарушение антропометрических характеристик встретилось у 376 (63,7%) пациентов.

В нашем исследовании преобладали мужчины с избыточным весом. Женщины преобладали в группах с нормальным весом и ожирением. Значимых различий по антропометрии в гендерной структуре нами выявлено не было.

У 203 пациентов с КРР был измерен объем талии и бедер (вычислен коэффициент ОТ/ОБ). Так нами был оценен характер распределения жировой ткани. Результаты (97 мужчин и 106 женщин) отражены в **таблице 5**.

Таблица 5. Соотношение объема талии/объема бедер у пациентов КРР, N=203

Пол	ОТ/ОБ	Дефицит и нормальный ИМТ	Избыточная масса тела	Ожирение	всего N=203
Мужчины N=97	<1	15	14	3	32
	>1	27	24	15	66
Женщины N=106	<0,85	24	21	8	53
	>0,85	17	21	14	52

Сахарный диабет II типа отмечен у 96 (16,2%) пациентов. Им проводилась гипогликемическая терапия. При этом 7 (1,1%) пациентов нуждались в использовании инъекционного инсулина в различных формах.

Особое внимание у пациентов с КРР мы обращали на наличие рака иной локализации. Таковых нами было выявлено 17,4% (103 человека: 56 мужчин и 47 женщин). У 5 человек выявлено две злокачественные опухоли, а у двух – три, помимо КРР. Чаще всего в нашем исследовании выявлялось множественное поражение аденокарциномой толстой кишки, простаты и молочной железы. В 5 случаях выявлено две и более син- и метакронных аденокарциномы. Эти данные указаны в **таблице 6**.

Некоторые отечественные исследователи отнесли КРР к гормонозависимым опухолям, аналогично опухолям женской половой системы [4, 6].

Таблица 6. Частота рака других локализаций у пациентов КРР,
N=110

Первично-множественная опухоль	Абсолютное количество	Частота, %
Первично-множественный КРР	31	28,2%
Рак простаты	17	15,5%
Рак молочной железы	15	13,6%
Рак почки	7	6,4%
Рак эндометрия	9	8,2%
Рак желудка	7	6,4%
Рак мочевого пузыря	3	2,7%
Рак яичников	9	8,2%
Рак легкого	3	2,7%
Рак кожи	4	3,6%
ЗНО крови (лейкоз, лимфома)	2	1,8%
Рак щитовидной железы	1	0,9%
Рак большого сосочка 12 п.кишки	1	0,9%
Рак поджелудочной железы	1	0,9%

План лечения каждого пациента утверждался онкологическим консилиумом в соответствии с собственными, утвержденными Ученым Советом РНЦРР протоколами лечения рака ободочной и прямой кишки, которые соответствуют Клиническим Рекомендациям Минздрава РФ и Практическим рекомендациям Российского общества клинической онкологии, актуальными на момент его проведения [221]. За 10-летний период лечения этих пациентов с 2011 по 2021 гг., безусловно, произошла как актуализация соответствующих протоколов лечения, так и изменение хирургических принципов мобилизации кишки и доступа к ней. В частности, операции, выполненные лапароскопическим доступом, в 2021 г. составляли уже 86,3% по сравнению с 2011 г., когда лапароскопически выполнялось лишь 7,2% операций.

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).

Подводя итог в этом разделе работы, отметим:

1. 521 пациент (88,3%) был старше 50 лет. Это подтверждает эпидемиологический возраст возникновения КРР как закономерного итога стартовавших путей канцерогенеза. Практически всем пациентам диагноз установлен при наличии симптоматики или как случайная находка, в том числе при обследовании по поводу ранее пролеченного рака другой локализации. Эффективность вторичной профилактики на пациентах нашей выборки расцениваем как крайне низкую: в 43% наблюдений (252 пациента) опухоль диагностирована на III стадии по нашим данным;

2. Требование к полному обследованию толстой кишки должно непременно соблюдаться. При невозможности выполнения тотальной колоноскопии при стенозировании просвета необходимо выполнить повторное исследование через 3-4 месяца после хирургического лечения. Либо, если клиническая ситуация диктовала необходимость формирования разгрузочной стомы и проведения неоадьювантного лечения, до такового. Это позволит выявить аденоматозные полипы, частота которых различна в правых и левых отделах кишки и варьируется от 4,1% до 11,7%. Эти данные могут указывать на различные механизмы канцерогенеза в зависимости от эмбрионально-анатомического отдела;

3. Абдоминальный тип ожирения при КРР характерен как для мужчин, так и для женщин;

4. Вторая злокачественная опухоль при наличии КРР – это чаще всего другой отдел толстой кишки, предстательная железа, молочные железы.

Учитывая большое многообразие вариантов неоадьювантной химио- и лучевой терапии как в монорежиме, так и в комбинации, хирургического

лечения, а также адъювантной терапии у наблюдаемых пациентов в различных клинических стадиях, программы их лечения решено изложить в отдельных разделах.

3.2. Лечение пациентов в локализованных стадиях КРР (Т1-4b, N0-2, M0)

Группу пациентов изучаемых стадий КРР (0-III) составили 590 человек (290 мужчин и 300 женщин). Распределение по возрасту и гендерное распределение пациентов по возрастным подгруппам представлено на диаграмме 5 и в таблице 7.

Диаграмма 5. Распределение пациентов по возрасту в локальных стадиях КРР. N=590

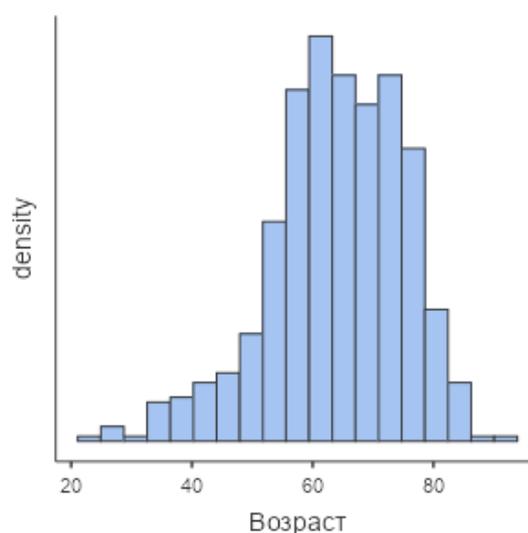


Таблица 7. Распределение пациентов по возрасту при локализованных стадиях КРР, N=590

	До 45 лет	45-60	Старше 61 года
Мужчины, N=290	9 1,5%	87 14,7%	194 32,9%
Женщины N=300	13 2,2%	96 16,3%	191 32,4%

Гистограмма возрастных интервалов для всех пациентов имела нормальное распределение (тест Шапиро-Уилкса $W=0,974$, $p<0.05$). Средний возраст составил $64,0 \pm 11,1$ лет.

На диаграмме 6 и в таблице 8 отражено распределение пациентов КРР в нашем исследовании по полу и отделам толстой кишки.

Диаграмма 6. Распределение пациентов с КРР по полу и отделам толстой кишки, N=590

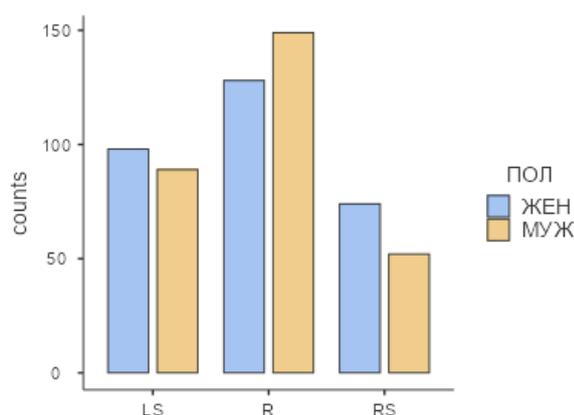


Таблица 8. Распределение пациентов с КРР по полу и отделам толстой кишки, N=590

	Правая половина (RS)	Левая половина (LS)	Прямая кишка (R)
Мужчины, N=290	52 (8,9%)	89 (14,9%)	149 (25,3%)
Женщины, N=300	74 (12,5%)	98 (16,7%)	128 (21,7%)
Всего, N=590	126 (21,4%)	187 (31,6%)	277 (47%)

Обсуждая стадии КРР у пациентов, представленных в выборке, следует отметить, что в **таблице 9** указана именно клиническая стадия (сTNM) на момент установки диагноза.

Таблица 9. Клинические стадии КРР сTNM, N=590

		Правая половина (RS)	Левая половина (LS)	Прямая кишка (R)	Всего	Всего, %
0-I ст.		20	33	73	126	126 21,4%
II ст.	IIA	38	53	45	136	215 36,4%
	IIB	21	16	19	56	
	IIC	3	10	10	23	
III ст.	IIIA	6	7	36	49	249 42,2%
	IIIB	22	50	71	143	
	IIIC	16	18	23	57	

Несмотря на достаточно высокий удельный вес пациентов с 0 и I стадиями КРР, которые составили в нашей выборке 21,4% (126 человек), пациенты с III стадией, тем не менее, составили 42,2% наблюдений. Причем в самой структуре пациентов, имевших III стадию, подавляющее

большинство (200 больных из 249) имели IIВ и IIIС стадии КРР. В целом, характеризуя стадийную структуру нашей выборки, можно отметить, что в ней широко представлены все имеющиеся локальные стадии КРР, что позволило проводить сопоставимые сравнения.

Подробная гистологическая оценка выявленных вариантов КРР будет дана в разделе, посвященном патоморфологическому исследованию.

3.2.1. Неoadьювантное лечение пациентов в локализованных стадиях КРР (Т1-4b, N0-2, M0)

У 166 пациентов нашей выборки было проведено неoadьювантное лечение (неoadьювантная химиотерапия - НАТ), что составило 28,1% от числа всех пролеченных пациентов. В **таблице 10** представлено распределение пациентов в зависимости от локализации опухоли в различных отделах толстой кишки и проведенного неoadьювантного лечения.

Таблица 10. Распределение КРР по отделам толстой кишки в зависимости от НАТ, N=590

	Правая половина (RS)	Левая половина (LS)	Прямая кишка (R)
проведена НАТ	4	6	156
Без НАТ	122	181	121
Всего	126	187	277

Очевидно, что при локализации опухоли в прямой кишке неoadьювантная терапия проводилась более чем в половине случаев: 156 пациентов из 277 или 56,3%, тогда как на наблюдения с проведенной НАТ при локализации опухоли в правой и левой половине ободочной кишки приходились лишь одиночные случаи такого варианта лечения, 4% и 6% пациентов соответственно. Отечественные и международные клинические рекомендации предполагают лечение рака ободочной кишки с хирургического этапа. Проведение неoadьювантной химиотерапии при этой локализации служит предметом проводящихся до настоящего времени

клинических исследований, однако показания к ней постоянно расширяются [123, 171].

Варианты проведения НАТ в нашем исследовании представлены следующими сочетаниями:

1. Только неоадьювантная химиотерапия. Использовались схемы FOLFOX, XELOX, Мейо или капецитабин в монорежиме;
2. Конформная дистанционная лучевая терапия как единственный вариант неоадьювантного лечения;
3. Индукционная неоадьювантная химиотерапия (схемы FOLFOX, XELOX или капецитабин в монорежиме) с последующей неоадьювантной конформной лучевой терапией;
4. Неоадьювантная лучевая терапия с последующей консолидирующей неоадьювантной химиотерапией (схема XELOX или капецитабин в монорежиме);
5. Индукционная неоадьювантная химиотерапия (схемы FOLFOX, XELOX или капецитабин в монорежиме) с последующей неоадьювантной конформной лучевой терапией и дальнейшей консолидирующей неоадьювантной химиотерапией (теми же схемами).

Таким образом, всего имелось 5 вышеуказанных вариантов неоадьювантного лечения.

Первый вариант лечения - неоадьювантная химиотерапия в монорежиме была проведена у 66 пациентов (11,2%). Варианты ее проведения представлены в **таблице 11**.

Таблица 11. Неоадьювантная химиотерапия в монорежиме при КРР, n=66

Схема	Число курсов	Число пациентов; %
XELOX	4	59; 89,4%;
FOLFOX	6	4; 6,1%
Капецитабин	4	2; 3%
Мейо	4	1; 1,5%
Всего		66;100%

У 62 пациентов с первым вариантом лечения опухоль локализовалась в прямой кишке. У 3 отмечено расположение аденокарциномы в левой половине ободочной кишки и только у 1 пациента – в правой. Хотелось бы отметить, что в литературе обнаружены данные о том, что терапевтический эффект предоперационной химиотерапии на основе оксалиплатина сопоставим с предоперационной химиолучевой терапией. Авторы работы утверждают, что применение предоперационной химиотерапии является возможным и перспективным вариантом для лечения пациентов местнораспространенным раком прямой кишки [230].

Второй вариант – конформная дистанционная лучевая терапия как единственный вариант неоадьювантного лечения – проведена у 50 (8,5%) пациентов в нашем исследовании. Суммарные дозы указаны в **таблице 12**.

Таблица 12. Суммарные дозы облучения при проведении неоадьювантной ЛТ, N=50

СОД	Число пациентов	%
25 Гр	3	6.0 %
44 Гр	8	16.0 %
46 Гр	6	12.0 %
50 Гр	10	20.0 %
52 Гр	23	46.0 %

В режиме крупного фракционирования РОД 5 Гр коротким курсом ДЛТ получили 3 (6%) пациента с диагнозом рака прямой кишки. Остальным 47 пациентам проводилось лечение расщепленным курсом РОД 1,8-2 Гр до СОД 44-52 Гр на опухоль и тазовые лимфоузлы. Лечение в этом варианте было проведено у 46 пациентов с локализацией опухоли в прямой кишке: у 3 в ректосигмоидном отделе толстой кишки и у 1 пациента в ободочной кишке.

Третий вариант лечения – индукционная неоадьювантная химиотерапия с последующей неоадьювантной конформной лучевой терапией – использовался у 13 пациентов (2,2%). 2 курса XELOX использовано у 4 пациентов, 4 курса XELOX – у 5 больных, 3 курса капецитабина – у 3 пациентов, и у одного больного было использовано 8

курсов неoadьювантной химиотерапии по схеме FOLFOX. Дистанционная конформная лучевая терапия крупными фракциями РОД 5 Гр до СОД 25 Гр в этой подгруппе проведена у 3 пациентов, остальным 10 больным лечение проводилось по расщепленному курсу фракциями 1,8-2 Гр до СОД 44-50 Гр.

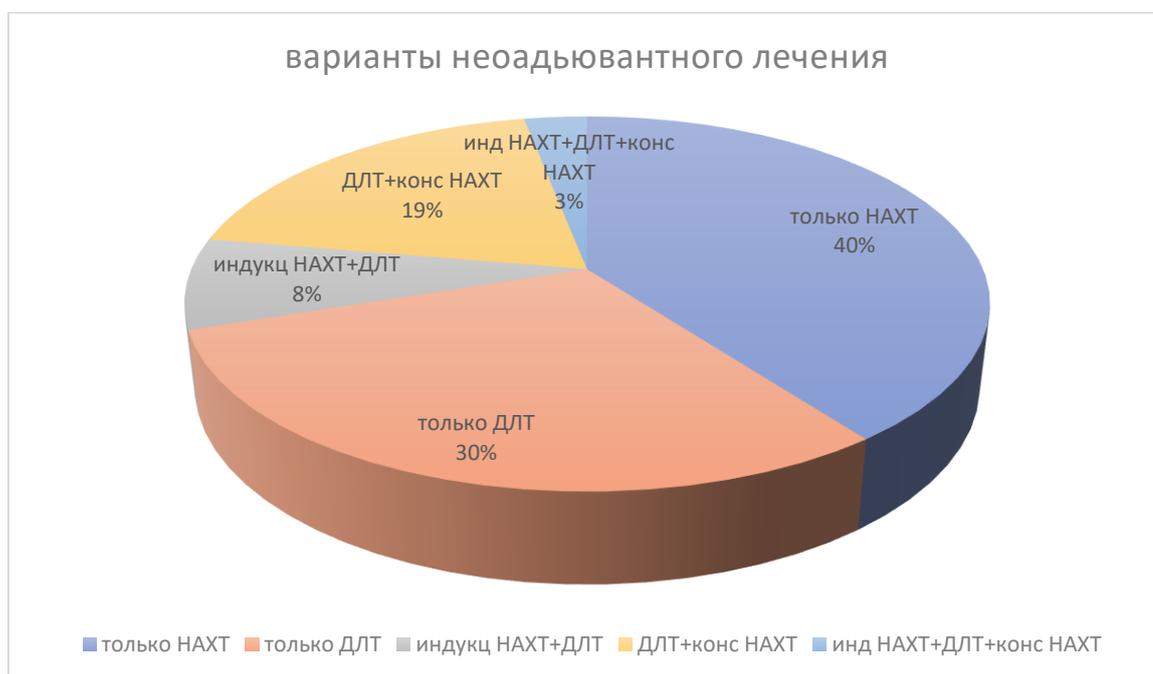
Четвертый вариант неoadьювантного лечения – неoadьювантная конформная дистанционная лучевая терапия с последующей консолидирующей неoadьювантной химиотерапией (схема XELOX или капецитабин в монорежиме) – проведена у 32 больных (5,4%). Только у 1 пациента с этим вариантом был использован режим крупного фракционирования РОД 5 Гр. В остальных наблюдениях (31 больной) ДЛТ проводилась по расщепленному курсу до СОД 44-54 Гр. 25 пациентов в этой подгруппе в качестве консолидирующей химиотерапии получили 2 курса монокимиотерапии капецитабином в дозе 2000 мг/м², у 5 использовано 2 курса XELOX, а 1 пациент получил 4 курса лечения по той же схеме.

Пятый вариант – индукционная неoadьювантная химиотерапия с последующей неoadьювантной конформной лучевой терапией и дальнейшей консолидирующей неoadьювантной химиотерапией (теми же схемами) – использован у 5 пациентов (0,8%). Индукционная химиотерапия осуществлялась проведением 2 курсов по схеме XELOX. Конформная ДЛТ проводилась у 2 больных крупными фракциями РОД 5 Гр и у 3 пациентов – расщепленным курсом СОД 46-52 Гр на первичную опухоль и регионарные лимфоузлы. Консолидирующая химиотерапия реализована проведением 4 курсов также по схеме XELOX.

Таким образом, капецитабин являлся основным препаратом схемы лекарственного лечения и использовался в 53 случаях НАТ, в том числе при 25 наблюдениях он использовался в комбинации с оксалиплатином. Доза капецитабина составляла 2000 мг/м², оксалиплатина 130 мг/м².

На диаграмме 7 представлены все проведенные варианты неоадьювантного лечения.

Диаграмма 7. Варианты неоадьювантного лечения, N=166



Использование неоадьювантного лечения привело к лечебному патоморфозу в опухоли и редукции патоморфологической стадии в ряде наблюдений. Эти данные будут представлены в главе, посвященной морфологической характеристике операционного материала.

3.2.2. Хирургическое лечение пациентов в локализованных стадиях КРР (T1-4b, N0-2, M0)

Хирургический этап лечения выполнен всем 590 пациентам, включенным в исследование. В зависимости от локализации и распространенности опухоли выполнялись следующие операции, которые здесь и далее будут указываться в соответствующей сокращенной международной терминологии.

При раке *ободочной* кишки:

- RHE/ExRHE – правосторонняя/расширенная правосторонняя гемиколэктомия;
- TCR – резекция поперечноободочной кишки;

- LHE/ExLHE – левосторонняя/расширенная левосторонняя гемиколэктомия;
- SE – резекция сигмовидной кишки.

При раке *прямой* кишки:

- AR – передняя резекция прямой кишки;
- LAR – низкая передняя резекция прямой кишки;
- ParISR – парциальная интрасфинктерная резекция прямой кишки;
- TotISR – тотальная интрасфинктерная резекция прямой кишки;
- ARE – экстирпация прямой кишки.

Отдельно нами была выделена ТЕО (transanal endoscopic operation) – трансанальная эндоскопическая полностенная резекция прямой кишки.

При хирургическом лечении опухолей правой половины ободочной кишки (эта группа включала в себя 126 [21,4%] пациентов) у 5 (0,84%) пациентов выполнена резекция поперечной ободочной кишки (TCR). Основной операцией в этой группе являлась правосторонняя гемиколэктомия (RHE) – 102 (17,3%) пациента, а еще у 19 (3,2%) пациентов выполнена расширенная правосторонняя гемиколэктомия (ExRHE).

Хирургическое лечение 187 (31,7%) пациентов с локализацией КРР в левой половине ободочной кишке в основном представлено выполнением резекции сигмовидной кишки (SE) – у 81 (13,7%) пациента, левосторонней гемиколэктомии – у 47 (LHE) (8%) больных, расширенной левосторонней гемиколэктомии (ExLHE) – у 11 (1,7%) больных. Кроме того, у 7 (1,2%) пациентов при локализации опухоли в селезеночном углу ободочной кишки была выполнена расширенная правосторонняя гемиколэктомия (ExRHE). Передняя резекция прямой кишки (AR) выполнена у 41 (6,9%) больного при расположении опухоли в ректосигмоидном отделе толстой кишки.

У 277 (46,9%) пациентов хирургическое лечение рака прямой кишки проведено в следующих вариантах: основной операцией являлась низкая передняя резекция прямой кишки (LAR) – 151 (25,6%) наблюдение. В этой

группе также мы отметили достаточно большое число брюшно-промежностных экстирпаций прямой кишки (ARE) – 68 (11,5%) наблюдений. Кроме того, у 33 (5,6%) пациентов удалось выполнить трансанальное эндоскопическое полностенное иссечение опухоли после комбинированной неоадьювантной терапии. Самыми редкими были операции в объеме парциальной интрасфинктерной резекции (ParISR) – у 16 (2,7%) пациентов и тотальной интрасфинктерной резекции (TotISR) – еще у 9 (1,5%) человек.

Таблица 13. Объем хирургического лечения (с учетом доступа) в локализованных стадиях КРР, N=590

Объем операции	Всего	Из них лапароскопическим доступом (из них в%)
правосторонняя гемиколэктомия (RHE)	102	88 (86,3%)
расширенная правосторонняя гемиколэктомия (ExRHE)	19/7	15/7 (78,9%/100%)
резекция поперечноободочной кишки (TCR)	5	-
левосторонняя гемиколэктомия (LHE)	47	39 (82,9%)
расширенная левосторонняя гемиколэктомия (ExLHE)	11	8 (72,7%)
резекция сигмовидной кишки (SE)	81	71 (87,6%)
передняя резекция прямой кишки (AR)	41	34 (82,9%)
низкая передняя резекция прямой кишки (LAR)	151	107 (70,9%)
парциальная интрасфинктерная резекция (ParISR)	16	11 (68,7%)
тотальная интрасфинктерная резекция (TotISR)	9	5 (55,5%)
экстирпация прямой кишки (ARE)	68	55 (80,9%)
трансанальная эндоскопическая операция (ТЕО)	33	-

У 57 (9,7%) пациентов в связи с местным распространением рака операция выполнялась с удалением или резекцией соседних органов. Основными операциями при этом являлись следующие комбинации с основным объемом операции: резекция мочевого пузыря (19 наблюдений), резекция мочеточника (3 больных) (с пластикой последнего – 1 или выведением кутанеостомы – 2), экстирпация матки с придатками – 23

пациентки, овариоэктомия – 9, резекция влагалища – 5, резекция передней брюшной стенки – 11, цистпростатвезикулэктомия – 3. Еще у 45 пациентов (7,5%) объем операции расширялся за счет выполнения симультантных вмешательств, представленных холецистэктомией – 34 пациента и грыжесечением с герниопластикой – 11 больных. Герниопластика выполнялась только местными тканями ввиду работы на «открытой» кишке по основному заболеванию, даже с учетом широкого использования лапароскопического доступа, который активно применялся нами при хирургическом лечении пациентов КРР любой локализации, особенно в последние годы исследования. В **таблице 13** и на **диаграмме 8** представлены обобщенные данные по объему проведенного хирургического лечения с учетом используемого доступа.

Диаграмма 8. Объем хирургического лечения. N=590



С учетом поставленных задач и критериев исключения, принятых в нашей работе, пациенты, имевшие послеоперационные осложнения, приведшие к летальному исходу в ближайшем послеоперационном периоде, из исследования выбывали. Кроме того, в исследование не включались пациенты, имевшие срок наблюдения менее 24 месяцев. Таким образом, обсуждая здесь результаты хирургического лечения, мы ограничились

комплексным представлением осложнений, классифицируя их по общепринятой шкале Clavien-Dindo с I по IV классы.

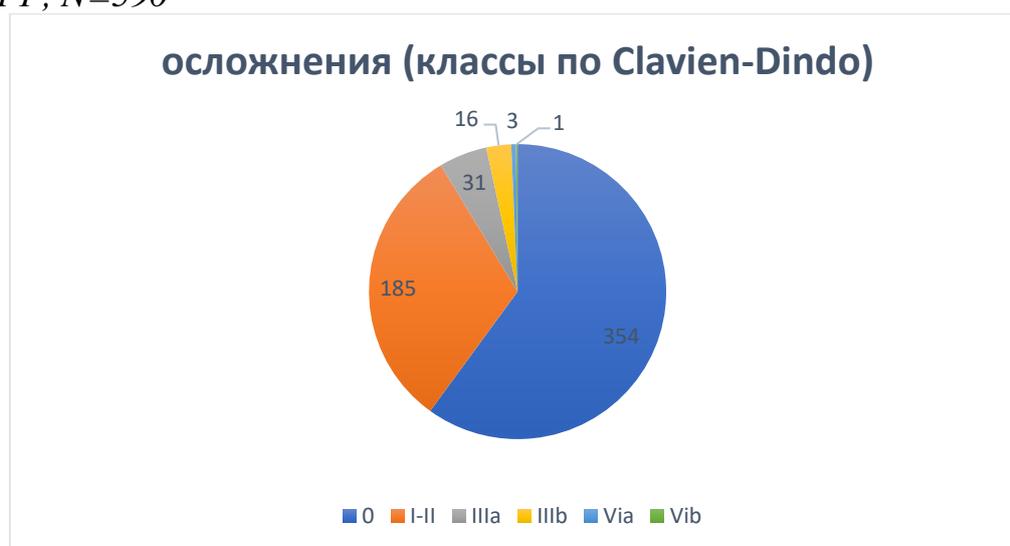
Наблюдаемое число послеоперационных осложнений не противоречит данным, опубликованным другими исследователями [211].

Результаты представлены в **таблице 14** и на **диаграмме 9**.

Таблица 14. Классы n/o осложнений по Cl-D, N=590

Класс осложнения по CL-D	Число пациентов
0	354 (60%)
I-II	185 (31,4%)
IIIa	31 (5,2%)
IIIb	16 (2,7%)
IVa	3 (0,5%)
IVb	1 (0,17%)

Диаграмма 9. Характер n/o осложнений по Cl-D при локализованном КРР, N=590



Отметим, что 60% наших пациентов не имели послеоперационных осложнений, а еще у 31,4% пациентов отклонения в течение послеоперационного периода нами расценивались как незначительные. При этом у 9,6% (51 пациент) развились уже серьезные осложнения, потребовавшие коррекции повторными вмешательствами под местной анестезией у 31 больного и под общей еще у 16 пациентов. Серьезные нарушения витальных функций развились у 4 человек. III класс осложнений

включил в себя 17 пациентов с несостоятельностью межкишечного анастомоза (13 десцендоректальных, 2 сигморекто- и 2 илеотрансверзоанастомоза), которые потребовали повторных вмешательств для их коррекции. У 9 пациентов развились некрозы стомы или парастомические абсцессы. Ранняя спаечная тонкокишечная непроходимость отмечена у 3 больных. В IV класс осложнений вошли 3 пациента с ТЭЛА и последующей пневмонией и 1 пациент с острым трансмуральным инфарктом миокарда, которые возникли в ближайшем послеоперационном периоде.

У всех 590 пациентов с локализованным КРР нами были прослежены отдаленные результаты в сроках от 24 до 321 месяца ($36 \pm 31,2$) согласно дизайну исследования.

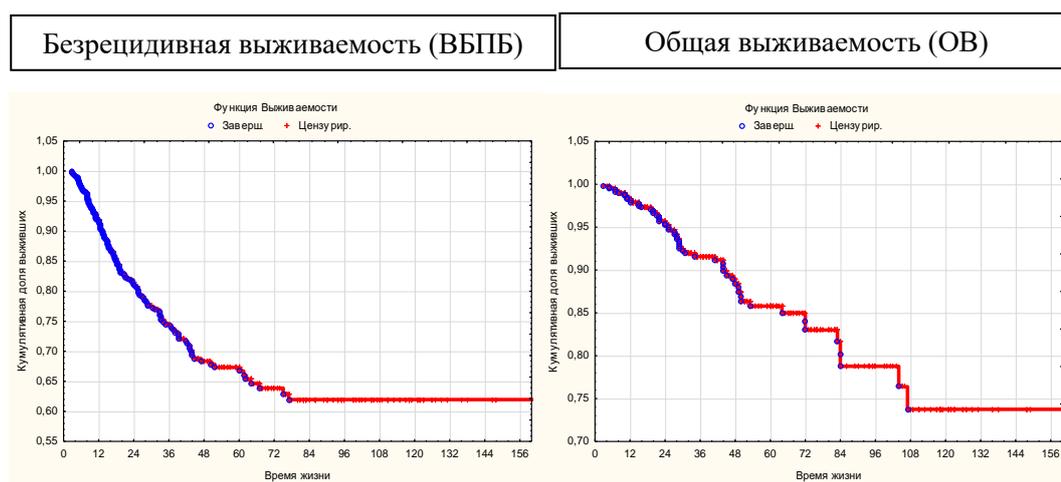
В течение периода наблюдения метастазы в печени выявлены у 54 (9,2%) пациентов. При этом лишь у 21 (3,5%) больного из них метастазы в печени были изолированными, у 5 (0,8%) пациентов они сочетались с местным рецидивом. Метастазы в легких отмечены у 41 (6,9%) больного (изолированные метастазы в легких у 17 [2,9%], а сочетание с местным рецидивом у 2 [0,3%] пациентов). Поражение брюшины отмечено у 24 (4,1%) человек. В 6 (1,01%) случаях оно сочеталось с местным рецидивом рака. Всего местный рецидив отмечен у 34 (5,8%) больных, но как единственный вариант прогрессирования местный рецидив без генерализации КРР в 15 (2,5%) наблюдениях. Поражение костей как один из вариантов генерализации отмечено у 7 (1,2%) больных.

Подводя некоторые итоги в этом разделе работы, можно отметить следующее. 78,6% пациентов нашей выборки перенесли хирургическое лечение КРР левосторонней локализации, из которых 46,9% (277 пациентов) пришлось на опухоль с локализацией в прямой кишке. Основными операциями явились передняя и низкая передняя резекция прямой кишки – всего 192 пациента, а также правосторонняя и расширенная правосторонняя

гемиколэктомии – 128 операций. На эти операции суммарно пришлось более половины (54,2%) от всех выполненных. Брюшно-промежностная экстирпация прямой кишки при раке нижнеампулярного его отдела существенно (68 наблюдений против 25) доминирует над сфинктер сохраняющими операциями. Отмечается устойчивая тенденция к выполнению хирургического лечения в любом объеме лапароскопическим доступом. Только у 60% пациентов послеоперационный период можно расценить как полностью благоприятный, несмотря на то, что число серьезных осложнений (Шв-IVb классов) относительно невелико и составляет лишь 3,4% (20 пациентов). Среди вариантов прогрессирования преобладает диссеминация рака. Изолированные метастазы печени выявлены у 21 (3,5%) больного, легких у 17 (2,9%) пациентов, а в 15 (2,5%) наблюдениях местный рецидив как единственное проявление прогрессирования КРР.

На **рисунке 3** представлена общая и безрецидивная выживаемости пациентов, включенных в исследование.

Рисунок 3. Общая (ОВ) и безрецидивная выживаемость (ВБПБ) в исследовании



3.2.3. Результаты патоморфологического исследования операционных препаратов

Патоморфологическому исследованию подверглись все удаленные макропрепараты оперированных пациентов.

Гистологическое заключение формировалось на основании рекомендаций Клинических рекомендаций Министерства Здравоохранения России и Практических Рекомендаций Российского общества клинической онкологии RUSSCO, в котором отражались следующие параметры:

- расстояние до проксимального и дистального краев резекции;
- размеры опухоли;
- гистологическое строение опухоли;
- G;
- pT;
- pN (с указанием общего числа исследованных и пораженных лимфоузлов), необходимо исследование не менее 12 удаленных лимфоузлов;
- состояние проксимального края резекции (отрицательный результат также констатировался);
- состояние дистального края резекции (отрицательный результат также констатировался);
- наличие лимфоваскулярной и/или периневральной инвазии (отрицательный результат также констатировался);
- степень регрессии опухоли по шкале Лавниковой или Mandard (при наличии предшествующего лечения);
- поражение апикального лимфатического узла (отрицательный результат также констатировался);
- для удаленных малигнизированных полипов — наличие инвазии опухоли в ножку полипа;

- при операциях на прямой кишке оценивалось качество выполненной тотальной мезоректумэктомии по Quirke [247].

В 27 (4,6%) наблюдениях выявлена диморфная дифференцировка опухоли: умеренно-высокодифференцированную и умеренно-низкодифференцированную, в 19 и 8 случаях соответственно.

Согласно критериям включения в исследование, ни один край резекции операционного препарата не имел макро- и микроскопических признаков опухолевого роста. Образец слизистой оболочки толстой кишки, отобранный на максимальном расстоянии от края резекции, нами расценивался как «нормальный». Это определение, как мы ранее указывали, игнорирует данные о существовании ряда важных молекулярных изменений в окружении опухоли [21]. Мы разделяем мнение ученых [223, 18], считающих, что во всей слизистой оболочке толстой кишки при КРР продолжают происходить неспецифические процессы, синхронные с опухолью.

Фиброзная реакция стромы в краях резекции при прорастании опухоли всей толщи кишки подразумевает высокую экспрессию $TGF-\beta$ и приводит к развитию бессосудистого склероза в ответ на существующую ишемию [188, 145, 238, 280], что может являться индуктором эпителиально-мезенхимального перехода – одного из важнейших условий развития отдаленного метастазирования.

При гистологическом исследовании опухоли описана аденокарцинома различной степени дифференцировки. Внутриклеточное слизееобразование наблюдалось в 87 (14,7%) случаях. Высокодифференцированные аденокарциномы (G1) выявлены у 261 (44,2%), умереннодифференцированные (G2) - у 279 (47,3%), низкодифференцированные (G3) - у 23 (3,8%) пациентов. Диморфные дифференцировки встречались: G1+G2 – у 19 (3,2%) пациентов, а G2+G3 – у 8 (1,4%) пациентов. Мы не обнаружили зависимости между степенью

дифференцировки опухоли и ее локализацией. Характеристика КРР по степени дифференцировки представлена на **диаграмме 10**.

Диаграмма 10. Степень дифференцировки КРР, N=590



Нами неоднократно подчеркивалось, что КРР представляет собой гетерогенную группу опухолей с неопределенным прогнозом. Оценка «почкования опухоли» (tumor budding) предлагается как один из признаков такой гетерогенности. Впервые этот феномен в виде «прорастания на границе опухоли» был описан в 1954 г. Т. Imai [154], а сам термин «tumor budding» предложили Т. Morodomi et al. [218] в 1989 году. В некоторых работах указывается, что «tumor budding» является независимым фактором прогноза КРР. Иногда считается, что с его помощью разделение на группы риска более объективно, чем по классификации TNM, а также потенциальным предиктором эффективности лечения этого заболевания, особенно на II стадии заболевания [122].

Оценка «tumor budding» появилась в 8-й редакции классификации TNM (2017) и была рекомендована для включения в патогистологическое заключение [293, 296]. Проблемой является отсутствие стандартизированного метода оценки «tumor budding». В обзоре В. Mitrovic et al. [214] описано 12 способов анализа опухолевого почкования,

отличающихся друг от друга. В 2016 г. на международной конференции ITBCC (International Tumor Budding Consensus Conference) принято соглашение о стандартизированной оценке опухолевого почкования при КРР [201]. По этому соглашению опухолевые почки определяются как единичные раковые клетки или их кластеры (не более чем из четырех единиц) на границе инвазии. Было подтверждено, что опухолевое почкование – это независимый предиктор лимфогенного метастазирования и выживания пациентов при КРР во II стадии. В рекомендациях по стандартам и протоколам исследования при злокачественных новообразованиях Королевской коллегии патологов (Royal College of Pathologists) Великобритании от 2017 г. отмечено, что феномен почкования еще недостаточно изучен, чтобы рекомендовать его в качестве одного из основных диагностических компонентов патолого-анатомического заключения при КРР [200].

Феномен почкования опухоли изучен нами у всех 490 (83,05%) пациентов в локализованных стадиях КРР, а также изучена его зависимость от степени дифференцировки опухоли. Распределение пациентов в **таблице 15**.

Таблица 15. Почкование опухоли (tumor budding) и степень дифференцировки, N=490

Tumor budding	дифференцировка			всего
	G1	G2	G3	
Tb0	137	187	11	335 (68,4%)
Tb1	51	47	3	101 (20,6%)
Tb2	17	21	1	39 (7,9%)
Tb3	5	9	1	15 (3,1%)
всего	210	264	16	490 (100%)

Особый интерес изучение феномена почкования опухоли представляет во II стадии КРР, поскольку у пациентов с колоректальной карциномой II стадии исходы сильно различаются. Определение tumor budding может быть информативным для выделения подгруппы высокого риска у этой категории пациентов. В исследовании Hase et al. [144]

продемонстрировано, что показатели 5-летней выживаемости у пациентов с T_b high grade (стадия II, T₃₋₄ N₀) значительно хуже, чем у пациентов по шкале Dukes C (N+) без почкования (29 % против 66 %; $P < 0,001$). В ряде более поздних исследований было подтверждено, что прогноз у пациентов с колоректальной карциномой II стадии значительно ухудшается, когда присутствует почкование высокой степени [219, 230, 315]. Эти исследования выявили, что показатели выживаемости пациентов с КРР стадии II с высокой степенью почкования эквивалентны показателям выживаемости пациентов с колоректальной карциномой стадии III [230]. В своих исследованиях опухолей pT₃ стадии II и III Okuyama et al [230] обнаружили, что почкование опухоли было единственным фактором при многомерном анализе, который был связан со снижением выживаемости и был более прогностически значимым, чем метастазы в лимфатические узлы.

В настоящее время показания к химиотерапии при КРР II стадии по-прежнему неясны, и адъювантная терапия рассматривается только в подгруппах с классическими неблагоприятными прогностическими признаками, например, низкой дифференцировкой, pT₄, а также перинеуральной и лимфоваскулярной инвазией. Исследование QUASAR продемонстрировало, что химиотерапия действительно приводит к увеличению выживаемости у пациентов со II стадией, но улучшение было небольшим и может не оправдывать затраты и побочные эффекты химиотерапии у всех пациентов [133]. Значительно худший прогноз у пациентов со стадией II КРР с T_b high grade побудил некоторых авторов предложить адъювантную химиотерапию у этих пациентов [158], однако отсутствуют опубликованные данные, оценивающие эффективность химиотерапии при колоректальной карциноме II стадии с почкованием опухоли.

В наше исследование включено 215 пациентов (36,4%) со второй стадией КРР. У 173 из них удалось изучить опухолевое почкование. Полученные данные представлены на **диаграмме 11**.

Диаграмма 11. Tumor budding при II стадии КРР, N=173



Таким образом, лишь у 13 % пациентов выявлен Tb high grade (20 случаев Tb2 и 3 случая Tb3 соответственно; всего 23 наблюдения). Однако практически все они (21 пациент из 23) имели высокий риск прогрессирования, согласно классическим критериям: степени дифференцировки и ангиолимфатической инвазии. А признаков tumor budding не обнаруживалось у 93,3% подгруппы низкого риска во II стадии КРР.

В целом значимой корреляции между степенью зрелости опухоли и почкованием не наблюдалось. Также не обнаружено значимых различий в частоте почкования ($p=0,497$) при различной глубине инвазии колоректальных карцином, что совпадает с данными других авторов [13].

После проведения неoadьювантного лечения у всех 166 пациентов (28,1%) нашего исследования, которым она проводилась в том или ином варианте, описанном в соответствующих разделах, была определена степень регрессии опухоли по Г.А. Лавниковой [15, 16, 17] и шкале Mandard

(Mandard Tumor Regression Grading System) [206]. Эти данные представлены в **таблице 16** и на **диаграмме 12**.

Диаграмма 12. Степень регрессии опухоли по шкале Г.А. Лавниковой после НАТ, N=166

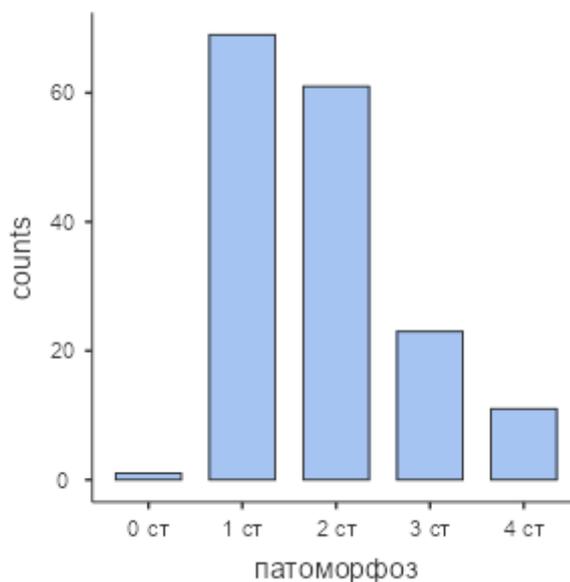


Таблица 16. Степень регрессии опухоли по шкале Mandard после НАТ, N=166

Степень патоморфоза	Число пациентов	%
TRG5	2	0.8 %
TRG4	69	41.7 %
TRG3	61	37.0 %
TRG2	23	13.8 %
TRG1	11	6.7 %

Следует заметить, что почти 20% пациентов имели выраженный терапевтический патоморфоз (3-4 степени по Лавниковой, TRG1-2), однако при анализе оказалось, что степень лечебного патоморфоза не оказывает статистически значимого влияния на показатели безрецидивной выживаемости ($p=0,17$).

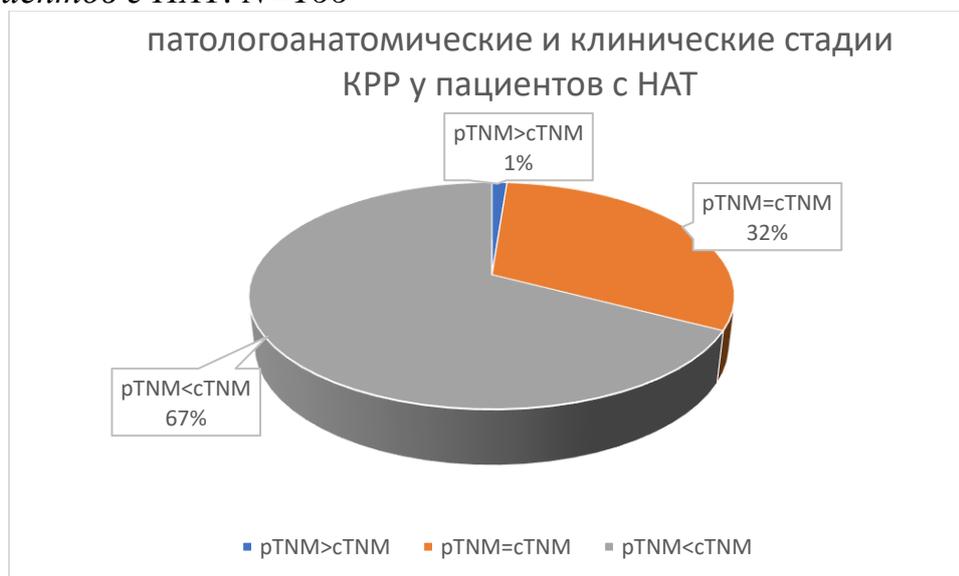
Сосудистая и периневральная инвазия опухоли наблюдалась у 21 пациента (12,6%) с включением НАТ в схему лечения.

Необходимо отметить, что стадия заболевания на клиническом этапе (сTNM) в 24,9% случаев (у 147 пациентов) отличалась от патоморфологической (pTNM). Среди этих 147 пациентов подавляющее большинство (113 больных) получали неoadьювантное лечение. Эта

ситуация как подчеркивает трудности первичного клинико-инструментального стадирования КРР, так и, что вероятнее всего, может свидетельствовать об эффективности предоперационной терапии.

Стадия КРР была основой для формирования групп сравнения с учетом риска прогрессирования у пациентов, которым не проводилось неоадьювантное лечение. В случае его проведения группы риска формировались на основании первичной клинической стадии КРР. Заметим, что среди пациентов, получивших неоадьювантное лечение в различных вариантах, несовпадение клинической и патоморфологической стадии составило 68,1% (113 пациентов), в первую очередь за счет миграции стадии в меньшую сторону у 111 пациентов за счет не выявления метастазов в регионарных лимфоузлах, заподозренных при инструментальном исследовании, а также редукции местного распространения опухоли. Повышение стадии отмечено лишь у 2 человек. В 53 наблюдениях клиническая и патоморфологическая стадия при проведении предоперационного лечения совпали **диаграмма 13**.

Диаграмма 13. Клинические и патоморфологические стадии у пациентов с НАТ. N=166

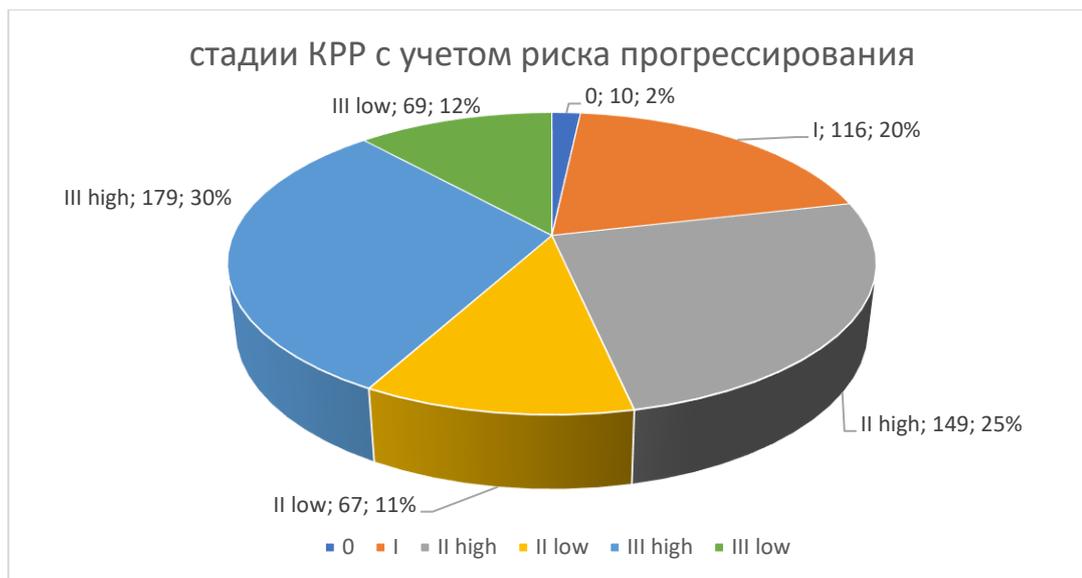


Где: pTNM- патоморфологическая стадия, cTNM-клиническая стадия

Для проведения статистических сравнений на основании анализов результатов морфологического исследования в работе также использовалось

разделение КРР по стадиям с учетом риска согласно критериям NCCN (High-risk factors for recurrence) [221]: наличия кишечной непроходимости, перфорации, ангиолимфатической (IMV) или периневральной инвазии (LMV), низкая дифференцировка опухоли, менее 12 лимфоузлов в препарате (далее по тексту *факторы риска NCCN*). На **диаграмме 14** распределение пациентов по стадиям с учетом риска прогрессирования КРР.

Диаграмма 14. Распределение по стадиям с учетом риска, N=590



Где: 0- пациенты с нулевой стадией КРР; I - пациенты с первой стадией; II high/II low - пациенты со второй стадией КРР с наличием/отсутствием *факторов риска NCCN* соответственно; III high/III low- пациенты с третьей стадией КРР с наличием/отсутствием *факторов риска NCCN* соответственно.

Таким образом, пациенты со второй и третьей стадиями и наличием факторов риска в нашей выборке составили 55% (149 и 179 пациентов соответственно; всего 328 человек).

У 95 здоровых людей гистологическое исследование выявило неизменную слизистую оболочку соответствующего отдела толстой кишки.

Подводя промежуточные итоги, отметим:

1. К 78% больных со стадиями II и III применяется понятие «риска прогрессирования», определяемое отечественными и международными клиническими рекомендациями. При этом риск прогрессирования расценивался как «высокий» у 25% (179 пациентов со II стадией КРР) и 30% (179 больных с III стадией) соответственно. Эти пациенты составляют более половины всей выборки (55%) и представляют собой фокусную группу с максимально неопределенным прогнозом и необходимостью дифференцированного лечения КРР;

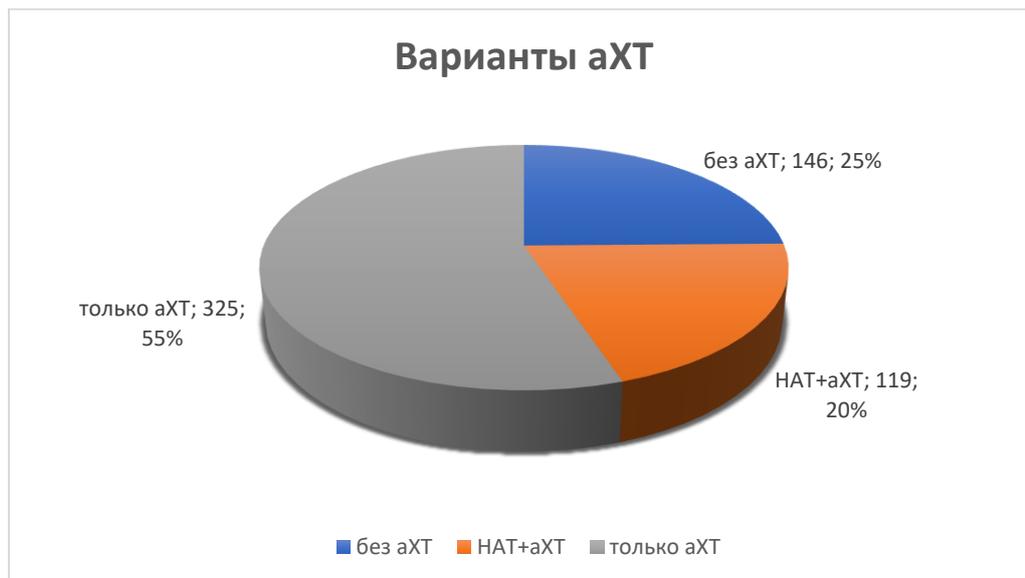
2. Всестороннее изучение образцов неизмененной слизистой при КРР может дать дополнительную информацию, выявив новые характеристики заболевания, важные в отношении прогнозирования. Эти результаты могут быть получены только посредством молекулярно-генетического исследования ввиду достижения «диагностического потолка» при рутинной световой микроскопии;

3. Значимой связи между степенью дифференцировки опухоли и опухолевым почкованием не выявлено. Также не обнаружено статистически значимых различий в частоте обнаружения почкования ($p=0,497$) при различной глубине инвазии. Феномен «tumor budding» требует оценки, прежде всего, во II и III стадиях КРР также с точки зрения молекулярных изменений.

3.2.4. Адьювантное лечение пациентов в локализованных стадиях КРР (T1-4b, N0-2, M0)

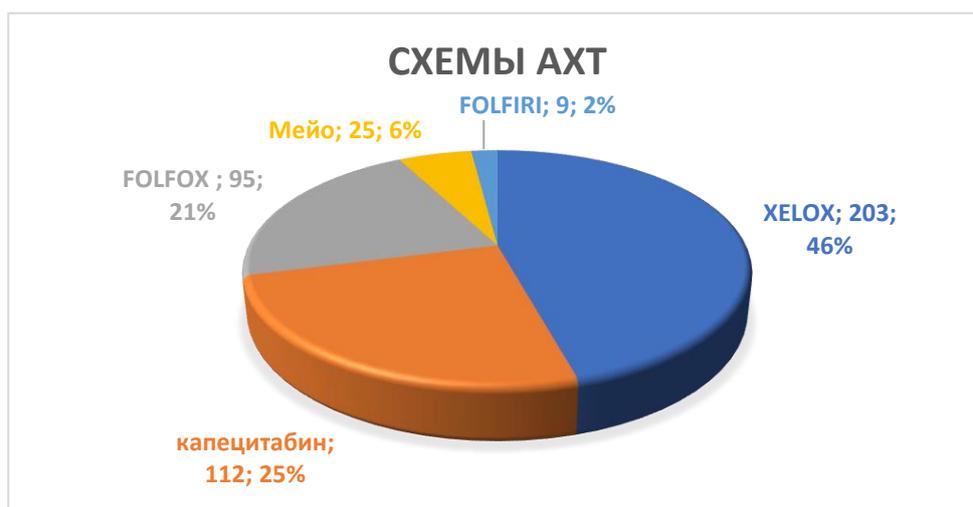
Адьювантное лечение в нашем исследовании было представлено различными вариантами лекарственной цитостатической терапии (аХТ) после хирургического этапа, которая была проведена 444 из 590 пациентов, что составило 75,3%. При этом у 20,2% (119 из 444 получавших аХТ) она проводилась после ранее проведенного неoadьювантного химиолучевого лечения в различных режимах. На **диаграмме 15** представлено соотношение различных вариантов лечения пациентов с КРР в нашей выборке.

Диаграмма 15 Варианты аХТ, N=590



Основными схемами использованной химиотерапии в адьювантном режиме у 444 (100%) пациентов явились: XELOX - 203 пациента (45,7%): 4-12 курсов; капецитабин в монорежиме - у 112 больных (25,3%): 6-8 курсов; FOLFOX - 95 пациентов (21,4%): 4-12 курсов; схема Мейо - у 25 пациентов (5,6%): 4-8 курсов, и FOLFIRI - 9 больных (2%): 6-8 курсов. Ниже полученные данные представлены в виде **диаграммы 16**.

Диаграмма 16. Схемы химиотерапии в адьювантном режиме, N=444



Особый интерес с точки зрения использования различных схем аХТ представляла «фокусная группа», включавшая 465 пациентов, имевших в нашем исследовании II (213 пациентов) и III (252 пациента) стадию КРР,

соответственно. Именно в ней, согласно классическим критериям, были сформированы подгруппы риска прогрессирования. При анализе различий в частоте назначения основных типичных схем в послеоперационном периоде нами выявлено не было. Эти данные представлены в **таблице 17**.

Схемы аХТ, включающие капецитабин, применялись у 67,8% пациентов (315 человек), а препарат платины - оксалиплатин, у 54,1% (298 больных). 5-фторурацил был включен в схему у 129 (29%) пациентов. Таким образом, капецитабин оказался самым используемым препаратом в схемах проведенной аХТ, а с учетом его использования в качестве радиомодификатора при проведении неoadьювантной дистанционной лучевой терапии и препарата при проведении индукционной и консолидирующей неoadьювантной химиотерапии его эффективность в первой линии напрямую влияет на успех лечения. В целом это соответствует имеющимся современным клиническим рекомендациям.

Таблица 17. Схемы химиотерапии с учетом риска прогрессирования, N=465

	II ст. низкий риск	II ст. высокий риск	III ст. низкий риск	III ст. высокий риск	всего
XELOX	27	47	29	100	203 (43,7%)
капецитабин	13	54	20	25	112 (24,1%)
FOLFOX	10	23	11	51	95 (20,4%)
Мейо	-	14	8	3	25 (5,4%)
FOLFIRI	-	3	2	4	9 (1,9%)
Без АХТ	3	9	6	3	21 (4,5%)
Всего	53 (11,4%)	150 (32,3%)	76 (16,3%)	186 (40%)	465 (100%)

Подводя итоги, можно считать, что лишь 4,5% пациентов (21 наблюдение) не получили адьювантной терапии во II и III стадиях КРР в нашем исследовании, при этом связи с установленными группами риска мы

не выявили. Можно предположить, что имеющиеся в настоящий момент тенденции к усилению неоадьювантного лечения и снижению числа курсов и случаев использования аХТ могут быть реализованы ее дальнейшим ограничением в подгруппах низкого риска при II и III стадии КРР.

К недостаткам адьювантного режима ХТ относится и тот факт, что по данным различных исследований от 17% до 28% пациентов, которым было показано лечение, не начинают либо получают его со значительной задержкой или не в полном объеме. Данное обстоятельство вызвано наличием временной сформированной кишечной стомой, частотой послеоперационных осложнений, высокой токсичностью и плохой толерантностью [57, 124, 182].

ГЛАВА 4. Молекулярно-генетическая характеристика слизистой толстой кишки в норме и патологии

4.1. Оценка экспрессии генов неизменной слизистой оболочки толстой кишки в норме и при КРР

4.1.1. Оценка экспрессии генов в образцах слизистой оболочки толстой кишки у здоровых людей в зависимости от эмбрионально-анатомического отдела

В группе «Норма» у 95 человек (мужчины 53 [55,7%], женщины 42 [44,3%]) в возрасте от 39 до 75 лет, средний возраст составил 60,1±7,25 года. Согласно дизайну нашего исследования, у всех участников группы была выполнена биопсия из трех отделов толстой кишки: «правого» – восходящая ободочная кишка, «левого» – сигмовидная кишка и из прямой кишки. Всего было получено 285 образцов, в которых были определены показатели экспрессии мРНК 62 генов. В **таблице 18** представлены результаты логистической регрессии при выявлении различий «правых» и «левых» эмбрионально-анатомических отделов.

Таблица 18. Результаты логистической регрессии. Различия «правых» и «левых» эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки

Ген	Коэффициент	Станд ошибка	z-статистика	вероятность
<i>MGB1</i>	-0.415697	0.139578	-2.978232	0.0029
<i>HER2</i>	2.868913	0.674484	4.253496	0.0000
<i>BAG1</i>	-1.442097	0.519684	-2.774948	0.0055
<i>PGR</i>	-0.975406	0.368753	-2.645144	0.0082
<i>SCUBE2</i>	0.765776	0.298858	2.562340	0.0104
<i>MMP2</i>	-2.776164	0.541059	-5.130985	0.0000
<i>PAPPA</i>	1.073780	0.299550	3.584648	0.0003
<i>IL12a</i>	1.419003	0.383627	3.698913	0.0002
<i>IL7</i>	-1.348287	0.565962	-2.382293	0.0172
<i>IL15</i>	1.288322	0.381199	3.379656	0.0007
<i>IL8</i>	0.566181	0.196423	2.882449	0.0039
<i>IL1b</i>	-0.804836	0.266682	-3.017963	0.0025
<i>CD45</i>	1.827264	0.617905	2.957194	0.0031
<i>VEGFA189</i>	1.972815	0.532223	3.706749	0.0002
<i>TLR7</i>	-0.866158	0.410313	-2.110968	0.0348
<i>GATA3</i>	-1.401728	0.578565	-2.422767	0.0154
C	-13.02992	5.381571	-2.421211	0.0155
		R ²		0.787608

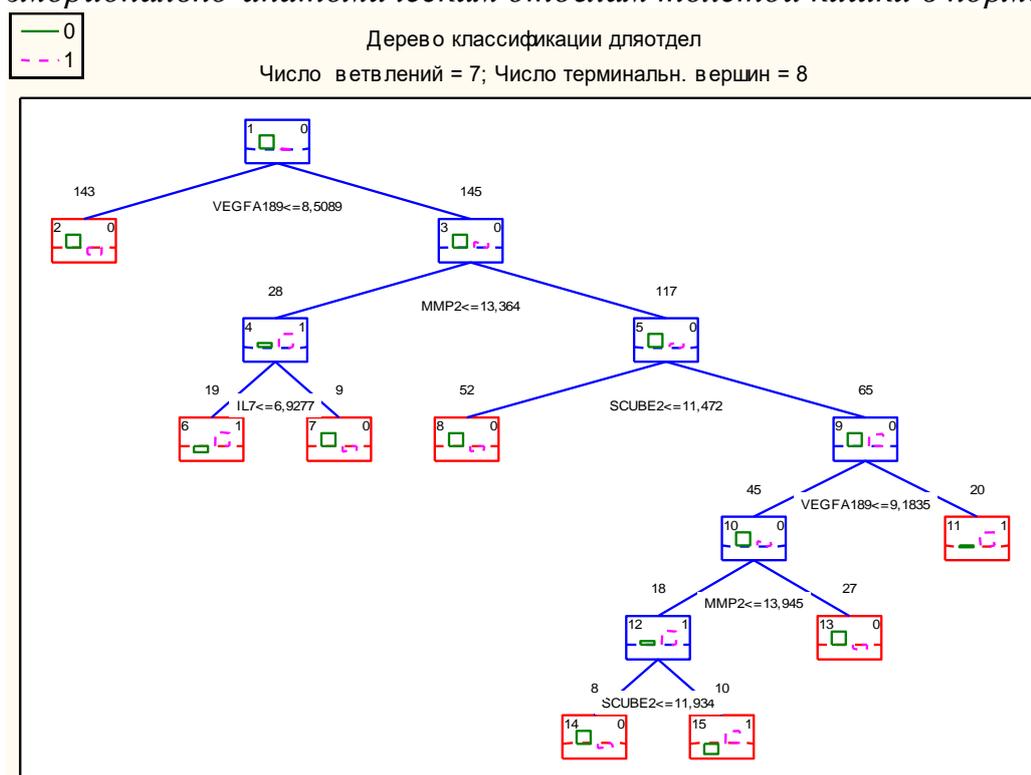
Нами была использована регрессионная модель бинарного выбора (логит-регрессия) для описания нелинейной зависимости распределения

образцов по эмбрионально-анатомическим отделам. Для решения задачи отнесения образца к тому или иному отделу было построено дерево бинарной классификации.

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, мы построили бинарное дерево классификации (**рисунок 4**), чтобы выявить пороговые значения экспрессии генов, уровень экспрессии которых статистически значимо отличается в зависимости от эмбрионально-анатомического отдела толстой кишки в норме.

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



Оказалось, что первый «узел» деления на отделы связан со снижением экспрессии *VEGFA189* ниже порогового значения 8,508. Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) является высокоспецифичным фактором для эндотелиальных клеток сосудов в эмбриогенезе и опухолевой строме и участвует в росте опухоли и метастазировании [220]. Кроме того, на

этапе формирования толстой кишки у зародыша *VEGFA189* влияет на эпителиально-мезенхимальные взаимодействия слоев первичной кишечной трубки, чем, по-видимому, и можно объяснить различные уровни его экспрессии в зависимости от эмбрионально анатомического отдела.

Второй выявленный по различию ген *MMP2*. Снижение его экспрессии ниже 13,364 классифицирует образец к «левым» отделам кишки.

Также мы провели анализ значений медианы (*Me*) экспрессии 62 генов в каждом из 3 эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки. Были определены гены с высокой и низкой экспрессией в каждом из них. (**Таблица 19**). Отметим, что высокий уровень экспрессии *TERT* ассоциирован с низким уровнем экспрессии *CCND1* в «левых» отделах ободочной кишки.

Таблица 19. Высокий/низкий уровень медианы экспрессии генов в эмбрионально-анатомических отделах толстой кишки в норме. (*U-критерий Манна-Уитни*).

Отделы толстой кишки	Высокий уровень экспрессии относительно других отделов	Низкий уровень экспрессии относительно других отделов
ПРАВЫЕ (RS) (слепая, восход ободочная, поперечноободочная)	<i>CCNB1, IL2Ra, IFNg, TGFb, CD68, NDRG1, MMP11, CD56, SCUBE2.</i>	<i>BAG1, P16INK4A, MMP2 IL 2, STK15, MYBL2.</i>
ЛЕВЫЕ (LS) (нисходящая ободочная, сигмовидная, ректосигмоидный отдел)	<i>PAPPA, VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, TERT.</i>	<i>CCND1, P14ARF, CYP19A, MMP7, MMP9, CD45, TGFb, LGALS, IL6, IL8, IL1b, COX-2, IGF2, BAX, HLA-G1, GATA3, PGR, ESR1, IL6, IL12a, IL10, LIFR, CCNB1, IL2Ra, TNFa, CD69, CD68, CTSL2</i>
Прямая кишка (R)	<i>CCND1, P14ARF, ESR1, MMP7, HLA-G5, GREM1, IL6, IL8, IL12a, IL10, IGF2, P16INK4A, MYC, CTSL2, BAG1, BAX, PGR, CYP19A, MMP11, MMP9, CD45, TNFa, LGALS1, GNLY, IL2, IL10, COX-2.</i>	<i>NDRG1, TERT, MMP2, IFNg, PAPPA, VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, TLR4.</i>

Уровень экспрессии 29 генов в образцах из прямой кишке был выше в сравнении с образцами из правой и левой половины в ободочной кишки (**таблица 20**). Данные гены обеспечивают регуляцию в слизистой оболочке

процессов пролиферации, апоптоза, межклеточных взаимодействий, иммунного ответа.

Дискриминантный анализ показал высокие показатели точности распределения образцов слизистой по отделам толстой кишки. В **таблице 20** показано, что они с высокой точностью классифицируются в каждом эмбрионально-анатомическом отделе кишки. Общая точность классификации составила 92%. Дискриминантный анализ также подтвердил отличия экспрессии генов в образцах из прямой кишки от двух других отделов с точностью дифференцировки 100%.

***Таблица 20.** Результаты дискриминантного анализа по классификации образцов в толстой кишке согласно дискриминантной модели*

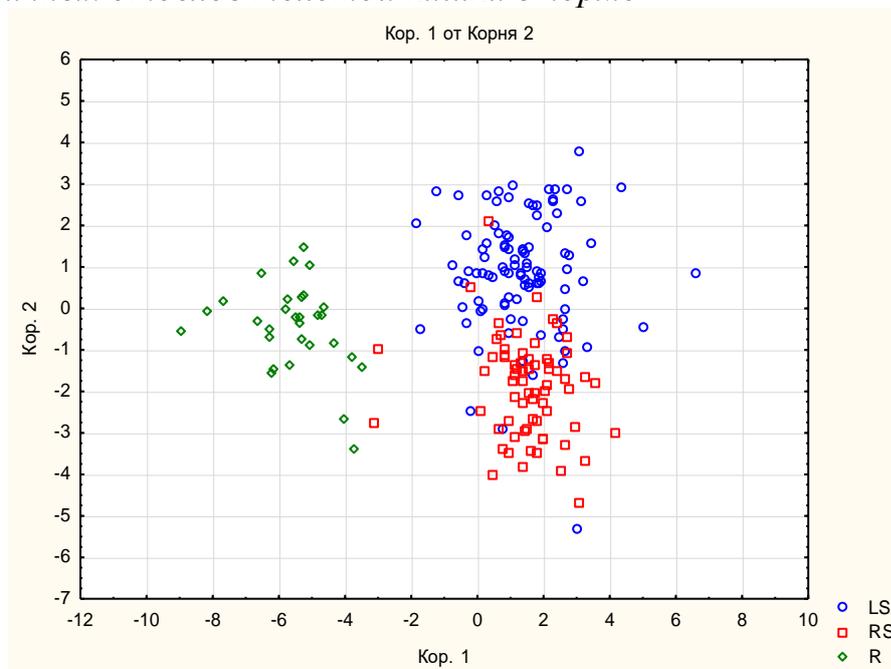
Отдел кишки	Частота совпадения классификации (%)	Распределение образцов по отделам кишки согласно дискриминантной модели (n)		
		правая ободочная кишка	Левая ободочная кишка	Прямая кишка
правая ободочная кишка	85,26%	81	14	0
левая ободочная кишка	90,52%	9	86	0
прямая кишка	100%	0	0	95
общая точность классификации %	91,9%	90	100	95

Предполагаем, что ошибки классификации возникают ввиду отсутствия четких анатомических границ при вариабельной длине толстой кишки, затрудняющих эндоскопическую навигацию и определение границ отделов при колоноскопии и, соответственно, заборе образцов слизистой оболочки.

На **рисунке 5** показан результат канонического анализа для образцов, сформированных по эмбрионально-анатомическим отделам толстой кишки. Решение дискриминантной функции 1 по оси X показывает отсутствие пересекающихся значений для группы «прямая кишка» и объединением

групп правая и левая ободочная кишка относительно центральной линии. По вертикальной оси Y (решение дискриминантной функции 2) заметно небольшое объединение образцов из правой и левой ободочной кишки относительно центральной линии.

Рисунок 5. 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

Оценивая вышеописанные результаты, отметим, что в образцах слизистой толстой кишки у здоровых людей в норме обнаружены отличия профилей экспрессии мРНК использованной панели правых и левых отделов ободочной кишки между собой и особый молекулярный профиль, характерный для прямой кишки, определяющийся с точностью до 100%.

4.1.2. Оценка экспрессии генов в образцах слизистой оболочки толстой кишки у здоровых людей в зависимости от возраста

Очевидно, что сам по себе возраст не является главным фактором развития КРР, но в тоже время заболеваемость им у пациентов в возрасте до 40 лет и старше 60 очень существенно различается и составляет 8 и 150 случаев на 100 тыс. населения соответственно, причем это относится и к мужчинам, и к женщинам [9].

Представляет интерес оценка экспрессии генов слизистой толстой кишки у здоровых людей в зависимости от возраста. Ориентируясь на уже имеющиеся эпидемиологические данные о значительном повышении риска развития КРР после 60 лет, мы решили выяснить, как различаются профили экспрессии генов, имеющих в нашей панели до и после достижения этого возраста, который расценили как пороговый.

С этой целью нами была сформирована регрессионная модель бинарного выбора, где целевой переменной служил пороговый возраст пациента, определенный нами в 60 лет. Построенная модель представлена в **таблице 21**.

Таблица 21. Результаты логистической регрессии. Целевая переменная «возраст 60 лет»

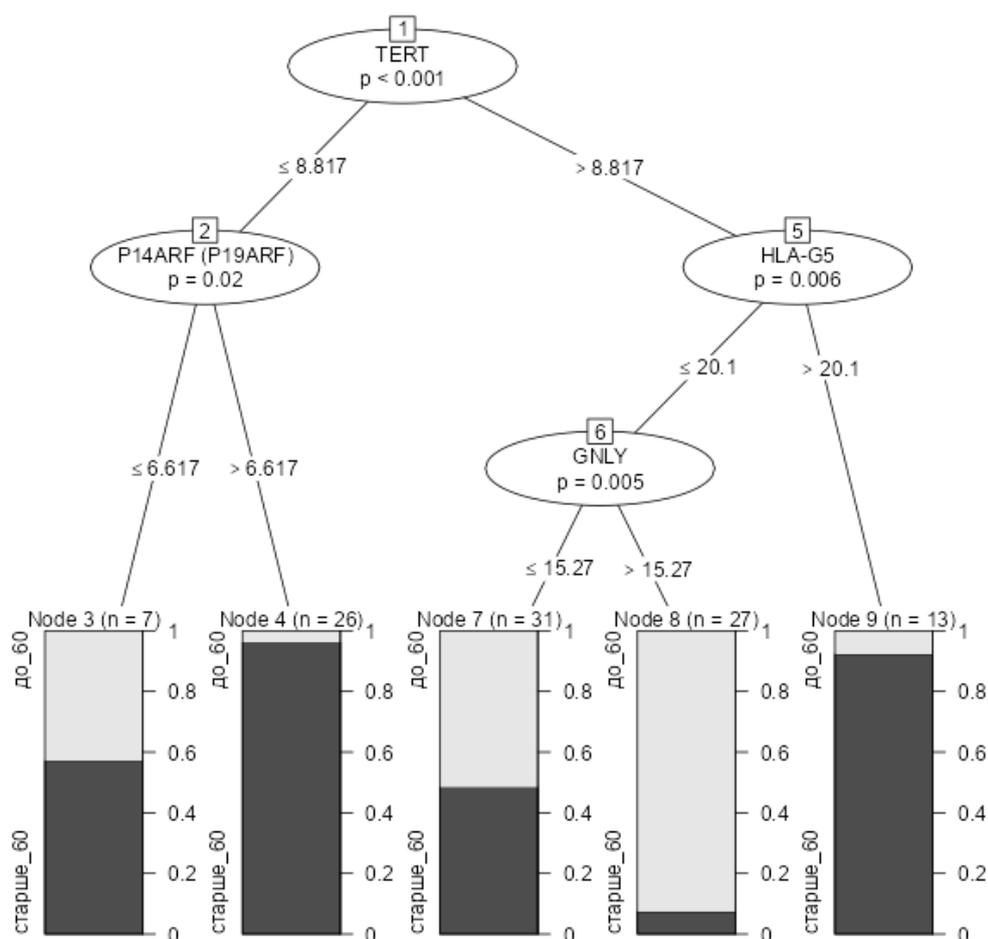
Ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статист	вероятность.
<i>TERT</i>	-1.831321	0.629827	-2.907656	0.0036
<i>HER2</i>	-1.619942	0.876028	-1.849190	0.0644
<i>GNLY</i>	-1.344840	0.361266	-3.722579	0.0002
<i>P14ARF (P19ARF)</i>	0.671623	0.377895	1.777272	0.0755
<i>PAPPA</i>	2.621241	0.808448	3.242312	0.0012
<i>IL1b</i>	1.517233	0.448955	3.379478	0.0007
<i>TNFa</i>	-4.845008	1.243051	-3.897675	0.0001
<i>VEGFA121</i>	-4.177860	1.500274	-2.784731	0.0054
<i>VEGFA189</i>	4.301784	1.243552	3.459272	0.0005
<i>HLA-G5</i>	0.368893	0.113792	3.241810	0.0012
<i>GATA3</i>	2.586712	0.956463	2.704457	0.0068
<i>LGALS1</i>	-2.786845	0.791670	-3.520209	0.0004
С	26.83255	10.75002	2.496047	0.0126
		R^2		0.877868

Эту модель в качестве объясняющих переменных сформировали показатели экспрессии 12 генов: *TERT*, *HER2*, *GNLY*, *P14ARF (P19ARF)*, *PAPPA*, *IL1b*, *TNFa*, *VEGFA121*, *VEGFA189*, *HLA-G5*, *GATA3*, *LGALS1*

GATA3 кодирует белок семейства транскрипционных факторов GATA. Они специфически экспрессируются в предшественниках белых

адипоцитов и непосредственно участвуют в процессе дифференцировки Т-хелперов при иммунных и воспалительных реакциях, а также являются участниками эстроген-зависимого сигнального пути регуляции экспрессии генов. Наши данные косвенно 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. Для решения задачи возможности разделения пациентов на возрастные подгруппы до и после 60 лет мы построили дерево бинарной классификации (рисунок 6).

Рисунок 6. Дерево бинарной классификации по пороговому возрасту «60 лет»



Выявлено, что первичный узел классификации включает ген *TERT*. Для старшей возрастной группы характерна гиперэкспрессия *P14ARF* и *HLA-*

G5. Можно предположить, что это отражает стимуляцию онкосупрессоров и угнетение иммунитета у людей старше 60 лет.

Также обращает на себя внимание гиперэкспрессия *GNLY* с критическим значением более 15,27 (рисунок 6) в группе здоровых людей моложе 60 лет. Кодированный им белок является членом семейства сапозиноподобных белков (SAPLIP), находится в цитотоксических гранулах Т-клеток, которые высвобождаются при стимуляции антигеном, а также обладает антимикробной активностью, что может объяснить более частые нарушения микробиоты в старшей возрастной группе.

В работе также нами был проанализированы уровни экспрессии изучаемых генов в образцах слизистой возрастных групп с использованием Т-критерия Стьюдента. Были выделены 3 подгруппы здоровых людей: группа 1 – моложе 45 лет, 2 – от 45 до 60 лет, 3 – старше 60 лет (таблица 22).

Таблица 22. Матрица классификации: соответствие распределения образцов из слизистой у здоровых людей по возрастным группам

Возрастные группы	точность классификации %	Распределение образцов согласно дискриминантной модели (n)		
		Менее 45 лет	45-60 лет	Старше 65 лет
Менее 45 лет	70,0%	7	1	2
45-60 лет	96,0%	1	44	0
Старше 60 лет	91,8%	1	2	34
Общая точность классификации	92,4%	9	47	36

Примечание. В таблице представлено число корректно классифицированных образцов исследуемой возрастной группы (на диагонали матрицы) и тех, которые попали не в свои группы. Строки обозначают истинное количество образцов в группе

Сравнение возрастных групп «моложе 45 лет» и «от 45 до 60 лет» показало значимые отличия по уровням экспрессии 10 генов: *KI67*, *CCNB1*, *GRB7*, *STK15*, *MYBL2*, *COX-2*, *IL7*, *IL8*, *IL10*, *VEGFA121*. Сравнение возрастных групп «от 45 до 60 лет» и «старше 60 лет» показало достоверные отличия экспрессии 17 генов: *CD68*, *TERT*, *STK15*, *P14ARF* (*P19ARF*), *COX-2*, *CYP19A*, *GREM1*, *IL12a*, *IL7*, *IL15*, *IL8*, *IFNg*, *VEGFA121*, *BAX*, *HLA-G5*, *GATA3*, *LGALS1*. Сравнение групп «моложе 45 лет» и «старше 60 лет» показало достоверные отличия экспрессии 8 генов: *CTSL2*, *TERT*, *TNFa*, *IL6*,

IL12a, IL15, PAPP, LIFR. Проведенный дискриминантный анализ показал отличия профилей экспрессии для образцов из всех изучаемых возрастных групп. Наиболее высокие показатели точности распределения (более 93%) отмечены для групп «45-60 лет» и группы «старше 60 лет»

4.1.3. Оценка экспрессии генов в образцах неизменной слизистой оболочки толстой кишки при наличии в ней гиперпролиферативных и воспалительных процессов

Около 75% случаев КРР связано с его развитием из предшествующей аденомы [118]. Их малигнизация имеет важное клиническое значение, как результат реализации канонического пути канцерогенеза. Такие опухоли обычно имеют микросателлитно-стабильный генотип и часто содержат мутации гена *KRAS*. Каноническая форма КРР чаще встречается в левых отделах толстой кишки. Около 25% карцином возникают по альтернативному пути из предшественника, известного как плоская зубчатая аденома. Зубчатые аденомы чаще расположены в правой ободочной кишке, часто приобретают мутацию *BRAF* на ранних стадиях развития [96]. Эти мутации происходят на ранней и поздней стадиях цепи «полип-карцинома». И хотя наличие гиперпластических полипов в толстой кишке не является предиктором начала канцерогенеза, сам факт их возникновения является результатом процессов в слизистой оболочке, которые нельзя назвать нормой. Анализируя образцы из неизменной слизистой толстой кишки при полипах, мы исходили из предположения, что они могут иметь молекулярные отличия как от нормы, так и от уже развившегося КРР.

4.1.3.1. Оценка экспрессии генов в образцах неизменной слизистой толстой кишки при наличии гиперпролиферативных процессов в ней в зависимости от анатомического отдела.

Мы провели исследование экспрессионного профиля образцов, отобранных из неизменной слизистой толстой кишки при наличии аденом и полипов в ней в зависимости от правого или левого эмбрионально-

анатомического отдела толстой кишки, сформировав регрессионную логистическую модель, чтобы выяснить, как изменится точность молекулярной классификации отделов при наличии гиперпролиферативных изменений слизистой кишки (**таблица 23**).

Таблица 23. Результаты логистической регрессии. Целевая переменная «локализация полипа»

Ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность.
Константа	8.70	9.979	0.872	0.383
<i>CCND1</i>	-2.64	1.000	-2.636	0.008
<i>IL12a</i>	2.12	0.748	2.828	0.005
<i>IL15</i>	1.95	0.733	2.663	0.008
<i>IL1b</i>	-1.25	0.383	-3.257	0.001
<i>TNFa</i>	1.43	0.809	1.768	0.077
<i>TGFb</i>	-2.36	1.076	-2.197	0.028

Примечание. Веса представляют собой логарифмические шансы "локализация = правая половина" по сравнению с "локализация = левая половина"

Таблица 24. Матрица классификации образцов неизменной слизистой при наличии полипов и аденом в зависимости от отдела толстой кишки

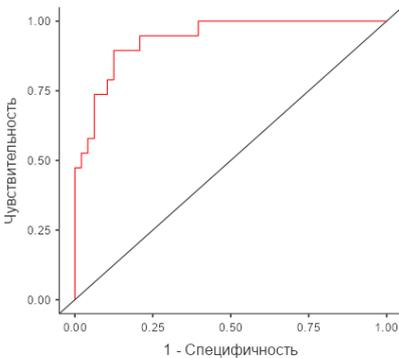
наблюдаемый	Предсказанный		% правильных
	Левая ободочная кишка	Правая ободочная кишка	
Левая ободочная кишка	44	4	91,7%
Правая ободочная кишка	5	14	73,7%

Матрица классификации модели представлена в **таблице 24**. Точность классификации «левых» отделов толстой кишки составила 91,7%, по сравнению с «правыми», где таковая составила лишь 73,7%. Ошибки классификации возникают вследствие сложностей эндоскопической навигации при колоноскопии, и, что более важно, как мы считаем, различных молекулярных процессов в слизистой с наличием гипертрофических полипов и аденом, формирующих неоднородный ее «экспрессионный пейзаж».

Значения точности, специфичности, чувствительности и ROC-кривая полученной модели зависимости образцов из неизменной слизистой толстой кишки от анатомических отделов толстой кишки представлены в **таблице 25**.

Таблица 25. Прогностические меры модели

Точность	Специфичность	Чувствительность	AUC
0.866	0.917	0.737	0.936



4.1.3.2. Оценка экспрессии генов в образцах из неизменной слизистой толстой кишки при наличии гиперпролиферативных процессов в зависимости от морфологических характеристик аденомы

Ранее проведенные исследования свидетельствуют, что с увеличением размеров и степени дисплазии полипов возрастает пролиферативная активность в них. В предсуществующих аденомах размером менее 10 мм фокусы аденокарциномы обнаруживаются редко, в 0,5-1% случаев, с увеличением размера полипа до 20 мм возрастает и риск малигнизации до 5-10 %. Большие полипы малигнизируются уже в 20-30 % случаев [1].

Образцы неизменной слизистой, отобранные от пациентов с аденомами, были разделены на 2 подгруппы. В группу со слабой дисплазией вошел 31 образец, в группу с умеренной дисплазией вошло 27 образцов. В **таблице 26** показана взаимосвязь уровня экспрессии со степенью дисплазии. Определены 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*). Все выявленные отличия статистически значимы ($p < 0,05$).

Таблица 26. 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

В литературе имеются сведения, что апоптотическая активность в аденоме изменяется со степенью дисплазии [261]. В нашем исследовании в образцах из неизменной слизистой оболочки, отобранных вне аденом с умеренной дисплазией, отмечен более высокий уровень экспрессии 22 генов, в том числе митохондриального апоптоза, чем в неизменной слизистой, взятой при аденомах со слабой дисплазией.

4.1.3.3. Оценка экспрессии генов в образцах из неизменной слизистой толстой кишки при наличии аденом и гиперпластических полипов

На следующем этапе работы мы проанализировали уровень экспрессии образцов неизменной слизистой при наличии аденомы (n=58) и гиперпластических полипов (n=15).

Нами установлены статистически значимые отличия показателей экспрессии 6 генов: *BAG1*, *MYBL2*, *MMP9*, *MMP7*, *IL8*, *HLA-G5* в зависимости от гистологического варианта (таблица 27). В группе «аденома» нами

отмечен более высокий уровень экспрессии цитокина *IL8* и генов межклеточной адгезии *MMP7* и *MMP9*.

Таблица 27 – Сравнение значений экспрессии в образцах неизменной слизистой при гиперпролиферативных процессах в зависимости от гистологического типа. T- 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

4.1.4. Оценка уровня экспрессии генов в образцах неизменной слизистой оболочки толстой кишки при колоректальном раке локальных стадий различных локализаций

В этой части исследования была проведена оценка уровней экспрессии мРНК генов имеющейся панели в образцах, отобранных из слизистой оболочки проксимального края резекции операционного препарата в случае локализации опухоли в прямой кишке или в левой половине ободочной. При локализации опухоли в правой половине ободочной кишки в макропрепарате после правосторонней гемиколэктомии выбирался максимально удаленный от опухоли край препарата. В работе оценивались образцы, отобранные у пациентов, имевших локальные стадии КРР. Эти образцы, после гистологической верификации отсутствия опухолевого роста в них, в нашей работе мы условно считали морфологически неизменной слизистой оболочкой у пациентов с КРР. Всего было исследовано 119 (n=119) таких образцов согласно дизайну исследования. В зависимости от расположения опухоли образцы распределились следующим образом: опухоли правой половины - 21 образец (17,6%), левой половины - 70 образцов (58,8%), прямая кишка - 28 образцов (23,6%). Проведенный анализ показал, что образцы неизменной слизистой края резекции при КРР в разных эмбрионально-анатомических отделах кишки по уровню экспрессии мРНК ряда генов

имеют статистически значимые отличия. Образцы, отобранные из прямой кишки, отличаются от образцов из левой ободочной по уровню экспрессии 31 разного гена (таблица 28).

Таблица 28. Отличия уровней экспрессии при парном сравнении образцов неизменной слизистой края резекции при КРР в 3 отделах толстой кишки (правая половина ободочной кишки (RS), Левая половина ободочной кишки (LS), Прямая кишка(R))

ген	R/LS			LS/RS			R/RS		
	Сум.ран Г	Сум.ран Г	р-уров.	Сум.ран Г	Сум.ран Г	р-уров.	Сум.ран Г	Сум.ран Г	р-уров.
BCL2	21874,5	8015,50	0,52528	21874,5	8015,50	0,52528	20908,5	4067,50	0,00233
BIRC5	18625,5	9340,50	0,00695	18625,5	9340,50	0,00695	17993,0	5012,00	0,85812
NDRG1	21853,0	8282,00	0,93471	21853,0	8282,00	0,93471	21140,5	4059,50	0,00443
KI67	19950,0	9696,00	0,00444	19950,0	9696,00	0,00444	18956,0	5797,0	0,15494
PTEN	23751,0	7624,00	0,07384	23751,0	7624,00	0,07384	22474,0	3861,00	0,00013
BAG1	22902,5	7973,50	0,32893	22902,5	7973,50	0,32897	21700,0	4178,00	0,00322
CCNB1	21462,5	10163,5	0,00180	21462,5	10163,5	0,00180	20919,5	5645,50	0,59468
MMP11	20580,5	7860,50	0,84504	20580,5	7860,50	0,84503	17519,5	6570,5	0,00007
MYBL2	20947,0	9681,0	0,01280	20947,0	9681,00	0,01281	20947,0	9681,00	0,01281
P16INK 4A	23489,0	7387,00	0,03235	23489,0	7387,00	0,03235	23489,0	7387,00	0,03235
MMP9	20741,0	6287,0	0,00105	20741,00	6287,0	0,00105	20741,0	6287,00	0,00101
P14ARF	19925,5	5952,50	0,00047	19925,5	5952,5	0,00047	19925,5	5952,50	0,0004
COX-2	20682,5	6345,50	0,01512	20682,5	6345,5	0,01512	20682,5	6345,5	0,01516
CYP19A	13468,0	4677,0	0,01359	13468,0	4677,0	0,01359	13468,0	4677,0	0,01359
GREM1	19966,5	6368,50	0,00716	19966,5	6368,5	0,00719	19966,5	6368,5	0,00716
MMP7	18162,5	6147,50	0,01632	18162,5	6147,50	0,01632	18162,5	6147,50	0,01632
IL2	8473,00	3308,0	0,99194	8473,00	3308,0	0,99194	8473,00	3308,0	0,99194
MMP8	13723,0	3855,00	0,00441	13723,0	3855,00	0,00441	13723,0	3855,00	0,0044
IL6	14200,0	4136,00	0,00094	14200,0	4136,00	0,00094	14200,0	4136,00	0,00094
IL12a	19074,0	6804,0	0,06477	19074,0	6804,0	0,06477	19074,0	6804,0	0,06477
IL7	17051,5	7701,5	0,2977	17051,5	7701,5	0,2977	17051,5	7701,5	0,2977
IL15	18231,0	7875,0	0,48212	4162,5	2165,5	0,0104	18231,0	7875,0	0,48215
IL8	22422,5	6497,50	0,00109	3422,50	3132,5	0,01342	22422,5	6497,5	0,00109
IL1b	21535,5	6430,50	0,00142	3475,5	3079,5	0,0302	21535,5	6430,5	0,00142
IL10	20279,0	6286,00	0,00341	3556,00	2772,00	0,30763	20279,0	6286,00	0,00341
TLR2	20247,5	6087,50	0,00975	3208,50	2462,50	0,29874	20247,5	6087,50	0,00975
TLR7	17850,0	7801,00	0,22573	3778,00	2000,00	0,04106	17850,0	7801,00	0,22573
HLA-G5	14339,5	4381,50	0,05450	2315,00	1871,00	0,53953	14339,5	4381,50	0,05450
LGALS1	21819,0	6861,00	0,04846	3202,50	2683,50	0,03311	21819,0	6861,00	0,04846
LIF	14686,0	4229,0	0,01524	2075,00	1841,00	0,0429	14686,0	4229,00	0,01524
LIFR	17230,5	7300,5	0,47435	3819,00	2176,00	0,03009	17230,5	7300,50	0,47435

Примечание: Указаны значения $p < 0,05$, полученные с помощью критерия Манна-Уитни (U-тест). «*» отличия достоверны ($p < 0,05$). «-» отличия не достоверны.

При колоректальном раке образцы неизменной слизистой из прямой кишки отличались от образцов из левой ободочной по уровню экспрессии следующих 19 генов: *P14ARF (P19ARF)*, *IL6*, *MMP9*, *IL8*, *IL1b*, *CCNB1*, *IL10*, *MMP8*, *KI67*, *BIRC5*, *GREM1*, *TLR2*, *MYBL2*, *CYP19A*, *COX-2*, *LIF*, *MMP7*, *P16INK4A*, *LGALS1*. Образцы, отобранные 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 из 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 в образцах неизменной слизистой оболочки: *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 было установлено, что уровень экспрессии гена *CCND1* в образцах из слизистой в норме был самым высоким в прямой кишке. Для образцов неизменной слизистой при наличии в кишке аденокарциномы эта закономерность сохраняется.

4.2. Оценка возможности использования образцов щеточной биопсии прямой кишки для молекулярной диагностики патологических изменений слизистой толстой кишки

Проблемы своевременной диагностики КРР с точки зрения технических и организационных аспектов в работе нами уже обсуждались.

Как было отмечено, массовое эндоскопическое обследование затратно и ресурсоемко. Призванные решить этот вопрос различные фекальные тесты отличаются доступностью и дешевизной, но, тем не менее, имеют один существенный, на наш взгляд, недостаток. Он связан с невозможностью взятия объекта исследования (кала) в момент осмотра самим врачом на амбулаторном приеме. А значит, требует высокой самодисциплины пациента для отбора образца каловых масс и его последующей транспортировки, что, по сути, подразумевает необходимость повторного визита в медицинское учреждение.

В попытке предложить решение этой проблемы нами было решено проверить, информативен ли материал щеточной биопсии слизистой оболочки прямой кишки, подвергнутый молекулярно-генетическому исследованию с целью выявления различных органических изменений слизистой толстой кишки (в первую очередь КРР) на всем ее протяжении. В этом разделе работы были исследованы диагностические панели (методы молекулярной диагностики), позволяющие проводить дифференциальную диагностику различных заболеваний толстой кишки. Данные панели сформированы методом бинарной логистической регрессии. В ряде случаев был также использован дискриминантный анализ с модулем пошагового включения переменных.

С практической точки зрения очевидно, что наиболее удобно отбирать образцы неизменной слизистой методом щеточной биопсии с помощью урогенитального зонда «цитощетка» из нижеампулярного отдела прямой кишки, т.к. эта процедура не требует ни подготовки, ни специального оснащения и может быть реализована прямо во время первого обращения пациента.

Для оценки практической реализации такой возможности нами были изучены профили экспрессии имевшейся панели в образцах соскоба слизистой у здоровых людей, пациентов с колоректальным раком, с

неспецифическим язвенным колитом, наличием аденом и гиперпластических полипов в толстой кишке. Для всех образцов было выполнено цитологическое исследование, подтвердившее отсутствие свободных опухолевых клеток в них. Полученные образцы были сгруппированы следующим образом: группа «КРР», включала пациентов с локализацией во всех трех отделах (пациенты с локализацией опухоли в нижеампулярном отделе исключались: мы рассматривали возможности обязательного пальцевого исследования при осмотре и заборе материала как достаточные в этом случае) (44 образца), группа «Норма», полученная у здоровых людей (n=63): «Аденома» - 23 образца при наличии аденомы, а также 55 пациентов с неспецифическим язвенным колитом: группа «НЯК» (55 образцов).

4.2.1. Оценка результатов анализа профиля экспрессии генов в образцах щеточной биопсии прямой кишки для выявления патологии в ней

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 29).

Таблица 29. 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

Примечание: число корректно классифицированных образцов выделено жирным шрифтом

Общая точность классификации составила 88,09%. Наибольшую ошибку в классификацию внесла группа «аденома» с точностью лишь 56,52%.

Таблица 30. Результаты логистической регрессии. Целевая переменная «наличие патологии слизистой толстой кишки»

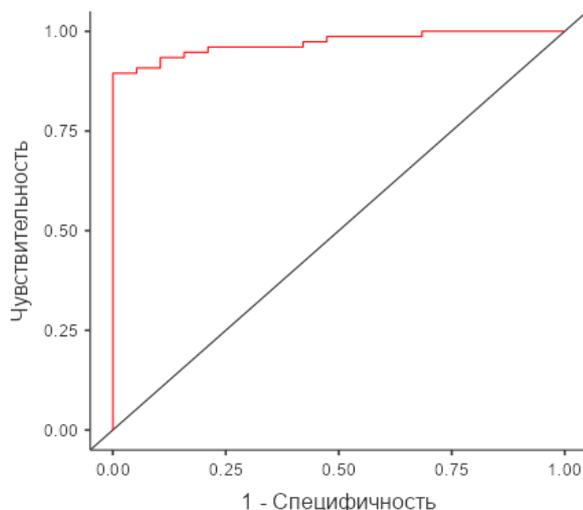
ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность.
Константа	6.101	6.897	0.885	0.376
<i>ESR1</i>	1.558	0.669	2.329	0.020
<i>P16INK4A</i>	-3.612	1.473	-2.452	0.014
<i>GNLV</i>	2.074	0.846	2.451	0.014
<i>IL12a</i>	2.925	1.209	2.418	0.016
<i>IL7</i>	-2.666	1.109	-2.405	0.016
<i>IL8</i>	2.488	1.011	2.462	0.014
<i>IL1b</i>	-1.268	0.597	-2.123	0.034
<i>TNFa</i>	-2.474	0.981	-2.522	0.012
<i>CD69</i>	2.149	0.915	2.348	0.019
<i>TLR2</i>	-2.368	1.172	-2.020	0.043
<i>HLA-G5</i>	0.521	0.238	2.188	0.029

Можно предположить, что именно в этой группе наблюдается самая значительная молекулярная гетерогенность: сочетание молекулярных признаков как нормы, так колоректального рака. Анализ верно распределившихся образцов показал, что практически все они (12 образцов из 13) имели умеренную степень дисплазии. Для групп образцов «НЯК», «Норма» и «КРР» точность классификации составила выше 90%, что свидетельствует о наличии особых молекулярных изменений (специфического профиля экспрессии) характерных для каждого из них. Убедившись в принципиальной возможности выявлять патологию толстой кишки, мы создали методом логистической регрессии прогностическую математическую модель, позволяющую выявлять изменения в толстой кишке, приняв в ней значение «1» как наличие патологии: неспецифического язвенного колита, аденом, колоректального рака, а значение «0» как отсутствие патологии в толстой кишке. В **таблице 30** представлены гены, формирующие данную модель, а в **таблице 31** матрица классификации полученной модели и ROC-кривая на **рисунке 7**.

Таблица 31. Матрица классификации модели, выявляющей патологические изменения в толстой кишке

наблюдаемый	Предсказанный		% правильных
	Патологии нет	Патология есть	
Патологии нет	17	2	89,5%
Патология есть	5	71	93,4%

Рисунок 7. ROC-кривая модели, выявляющей изменения в толстой кишке



Прогностическая модель определения каких-либо патологических изменений в толстой кишке включила в себя показатели экспрессии 11 генов образцов щеточной биопсии слизистой прямой кишки: *ESR1*, *P16INK4A*, *GNLY*, *IL12a*, *IL7*, *IL8*, *IL1b*, *TNFa*, *CD69*, *TLR2* и *HLA-G5*. Точность разработанной модели составила 93,4%. Как и при использовании модуля дискриминантного анализа, ошибки классификации связаны с ложноположительным определением аденом и относительно небольшим объемом выборки группы «Норма» (63 образца), по сравнению объединенной группой патологических изменений, включавшей образцы из групп «аденома», «НЯК», «КРР».

Можно предположить, что изменения профилей экспрессии в образцах щеточной биопсии прямой кишки в норме и при патологии могут быть связаны с миграцией в нее иммунокомпетентных клеток – нейтрофилов и лимфоцитов [87, 259, 290].

4.2.2. Оценка профилей экспрессии генов в образцах щеточной биопсии слизистой прямой кишки в норме и при колоректальном раке различных локализаций

Продолжая решать задачу разработки метода дифференциальной диагностики патологии толстой кишки, мы проанализировали способность математических моделей, использующих показатели экспрессии мРНК как объясняющие переменные, разделять образцы щеточной биопсии неизменной слизистой из прямой кишки, полученные от пациентов с уже развившимся КРР от образцов слизистой здоровых людей. При классификации двух групп методом дискриминантного анализа образцы нормальной слизистой здоровых распределились с точностью 100%, т.е. с отсутствием ложноположительных результатов, что важно с точки зрения применения метода в качестве диагностического для КРР (таблица 32). Образцы у пациентов с КРР были правильно распределены в свою группу в 88,63%. Общая точность модели составила 94,39%.

Для выявления генов-участников мы создали прогностическую логит-модель, позволяющую выявлять наличие колоректального рака, приняв в ней значение «1» как наличие КРР, а значение «0» как норму.

Таблица 32. Классификационная матрица соскобов из прямой кишки для групп «норма» и «КРР»

Группа	Частота совпадения классификации %	Распределение по дискриминантной модели (n=107)	
		«КРР»	«Норма»
«КРР»	88,63%	39	5
«Норма»	100,00%	0	63
Точность модели	94,39%	38	67

Примечание: В таблице представлено число корректно классифицированных образцов исследуемой группы (на диагонали матрицы) и тех, которые попали не в свои группы

В модель вошли показатели экспрессии в образце 6 генов: *CTSL2*, *ESR1*, *GRB7*, *GPLY*, *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). Об имеющейся зависимости экспрессии генов от возраста в нашей работе мы уже неоднократно подчеркивали и опубликовали работу в печати [5].

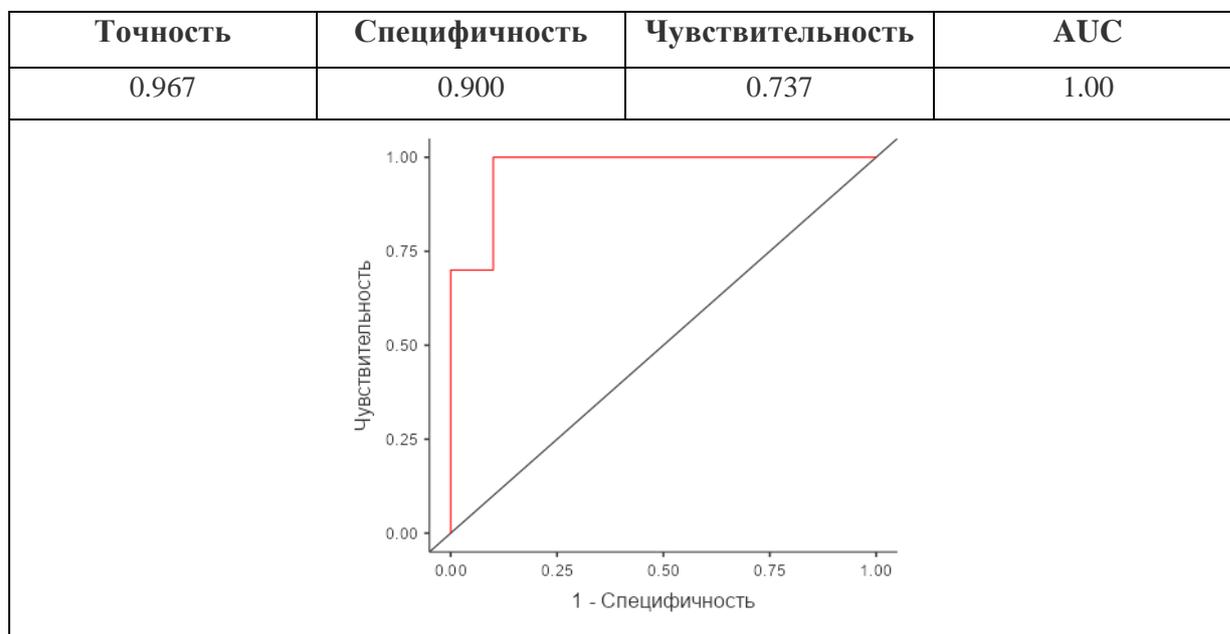
Таблица 33. Результаты логистической регрессии. Целевая переменная «наличие КРР»

Предиктор\ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность.
Константа	-1.100	28.047	-0.0392	0.969
Возраст	0.245	0.147	1.6685	0.095
CTSL2	3.238	2.015	1.6066	0.108
ESR1	1.540	0.857	1.7969	0.072
GRB7	-5.797	3.275	-1.7702	0.077
GNLY	4.216	2.432	1.7338	0.083
MMP2	-1.403	0.892	-1.5735	0.116
TERT	-0.779	0.580	-1.3442	0.179

Таблица 34. Матрица классификации логит-модели, выявляющей КРР

наблюдаемый	Предсказанный		% правильных
	КРР нет	КРР есть	
КРР нет	9	1	90,0%
КРР есть	1	201	100%

Рисунок 8. Прогностические меры модели, выявляющей КРР



Анализ точности классификации образцов показал, что в группу «норма» распределились те же 5 образцов группы «КРР». На основании

полученных данных уровни экспрессии генов *CTSL2*, *ESR1*, *GRB7*, *GPLY*, *MMP2*, *TERT* можно рассматривать в качестве диагностических для выявления КРР молекулярным методом. Точность модели составила 96,7%. В **таблице 33** представлены гены, формирующие данную модель, а в **таблице 34** матрица классификации полученной модели и ROC-кривая на **рисунке 8**.

4.2.2.1. Оценка экспрессии генов в образцах щеточной биопсии неизменной слизистой прямой кишки при наличии аденом в ободочной кишке

Выявление аденом, как предраковых заболеваний, представляет большой практический интерес. Очевидно, что их своевременное эндоскопическое удаление снизит частоту развития КРР и будет иметь значительный экономический эффект ввиду отсутствия необходимости дорогостоящего лечения развившейся аденокарциномы.

Таблица 35. Результаты логистической регрессии. Целевая переменная «наличие аденомы»

Ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность.
Константа	22.23	10.44	2.13	0.033
<i>BCL2</i>	2.67	1.34	1.99	0.047
<i>MYC</i>	-3.07	1.25	-2.47	0.014
<i>CD68</i>	-3.30	1.53	-2.16	0.031
<i>TERT</i>	-2.58	1.12	-2.29	0.022
<i>STK15</i>	3.03	1.56	1.94	0.053

Для выявления генов-участников метода молекулярной диагностики аденом в толстой кишке мы вновь использовали регрессионный анализ и создали логит-модель, позволяющую выявлять наличие аденом, приняв в ней значение «1» как наличие аденомы, а значение «0» как норму. В **таблице 35** представлены гены, формирующие данную модель, а в **таблице 36** матрица классификации полученной модели, ROC-кривая и прогностические меры модели на **рисунке 9**.

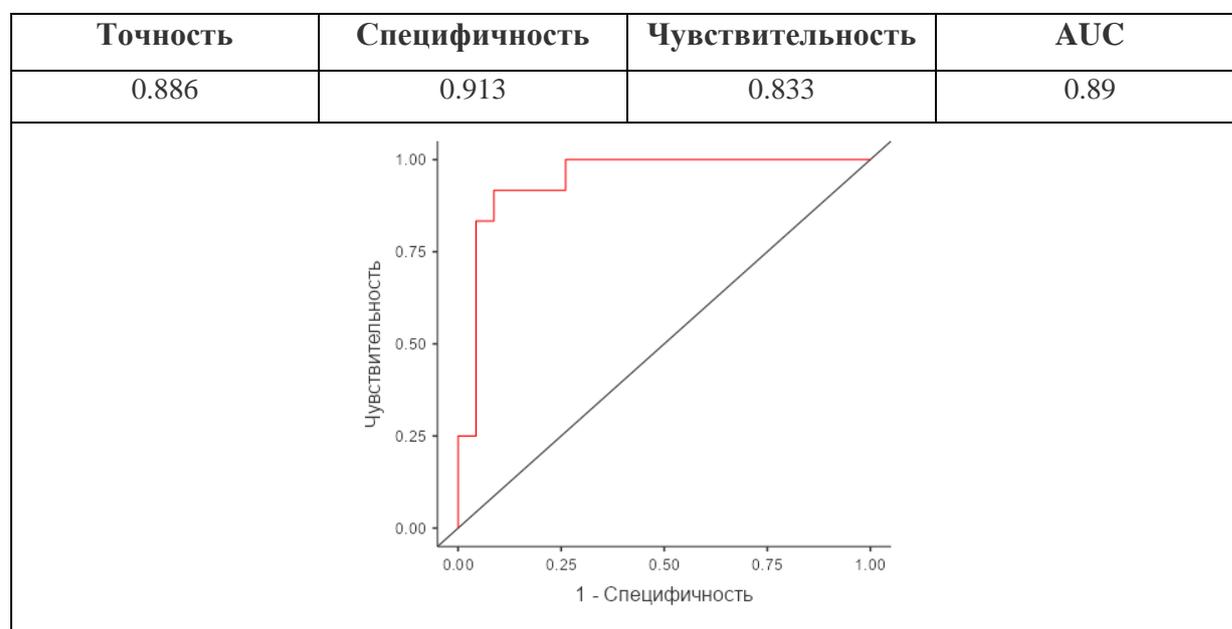
Таблица 36. Матрица классификации модели, выявляющей аденомы

наблюдаемый	Предсказанный		% правильных
	аденомы нет	аденома есть	
аденомы нет	21	2	91,3%
аденома есть	2	10	83,3%

Точность полученной модели оказалась на уровне 88,6%. Модель в качестве объясняющих переменных включила уровни экспрессии в соскобе прямой кишки 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. Так, в частности, обращает на себя внимание наличие в качестве объясняющей переменной показателей экспрессии *STK15* в модели диагностики аденом. Он является членом семейства киназ, которые действуют как ключевые регуляторы сегрегации хромосом и цитокинеза. Обычно уровень его экспрессии контролируется онкосупрессором p53.

Рисунок 9. Прогностические меры и ROC-кривая модели, выявляющей аденомы



4.2.2.2. Оценка экспрессии генов в образцах щеточной биопсии неизменной слизистой прямой кишки у пациентов с неспецифическим язвенным колитом

Сравнение профилей экспрессии образцов неизменной слизистой прямой кишки при анализе групп «Норма» и «НЯК» показал, что с точностью 92,7% можно выделить группу пациентов с колитами. Группа здоровых классифицируется с точностью 100%. Общая точность модели классификации составила 95,76% (таблица 37).

Таблица 37. Классификационная матрица образцов прямой кишки для групп «норма» и «НЯК»

Группа	точность классификации %	Распределение по группам по дискриминантной модели (n=118)	
		«НЯК»	«Норма»
«НЯК»	92,7%	51	4
«Норма»	98,4%	1	62
Точность модели	95,8%	52	66

Для выявления генов-участников метода диагностики неспецифического язвенного колита в толстой кишке мы вновь использовали регрессионный анализ и создали логит-модель, позволяющую выявлять наличие неспецифического язвенного колита, приняв в ней значение «1» как его наличие, а значение «0» как норму.

Таблица 38. Результаты логистической регрессии. Целевая переменная «наличие неспецифического язвенного колита»

Предиктор\ген	Коэффициент	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность.
Константа	-7.44	8.70	-0.855	0.392
<i>CTSL2</i>	5.18	2.13	2.435	0.015
<i>BCL2</i>	-3.64	1.48	-2.456	0.014
<i>MYC</i>	-2.91	1.41	-2.062	0.039
<i>BIRC5</i>	2.41	1.12	2.156	0.031
<i>CD68</i>	-3.15	1.67	-1.883	0.060

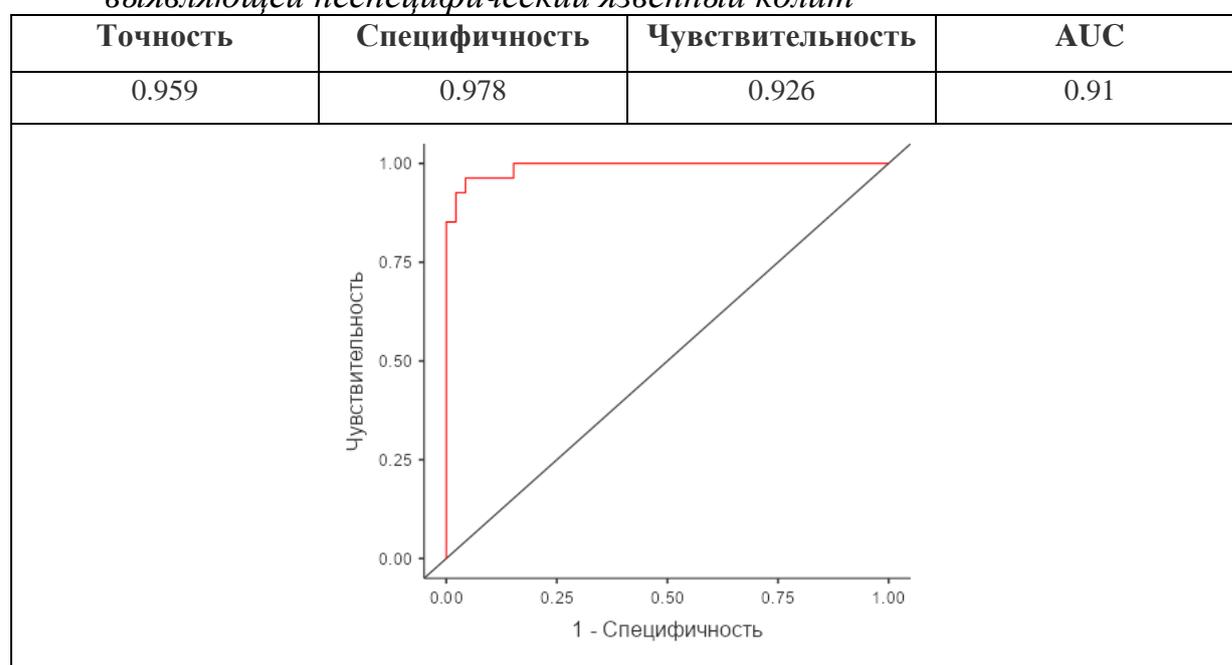
В таблице 38 представлены гены, формирующие данную модель, а в таблице 39 матрица классификации полученной модели, прогностические меры и ROC-кривая на рисунке 10. Дискриминантный и регрессионный анализы показали очень схожие результаты. Точность молекулярной

диагностики с использованием математической модели составила 96%. В панель вошли показатели экспрессии 5 генов: *CTSL2*, *BCL2*, *MYC*, *BIRC5*, *CD68*.

Таблица 39. Матрица классификации и прогностические меры логит модели, выявляющей наличие НЯК

Наблюдаемый	Предсказанный		% правильных
	НЯК нет	НЯК есть	
НЯК нет	45	1	97,8%
НЯК есть	2	25	92,6%

Рисунок 10. Прогностические меры и ROC-кривая модели, выявляющей неспецифический язвенный колит



4.2.3. Определение оптимальной панели генов исследования образцов щеточной биопсии прямой кишки для диагностики заболеваний толстой кишки. Алгоритм ее применения

Ранее мы уже выявили, что профиль экспрессии генов в слизистой оболочке толстой кишки зависит как от эмбрионально-анатомического отдела, так и от характера изменений в ней. В этом разделе работы показано, как мы проводили поиск таких генов, определение уровней экспрессии которых позволило бы отличить слизистую оболочку в норме и патологии на

основе изменения экспрессии мРНК в клеточном материале соскобов из прямой кишки.

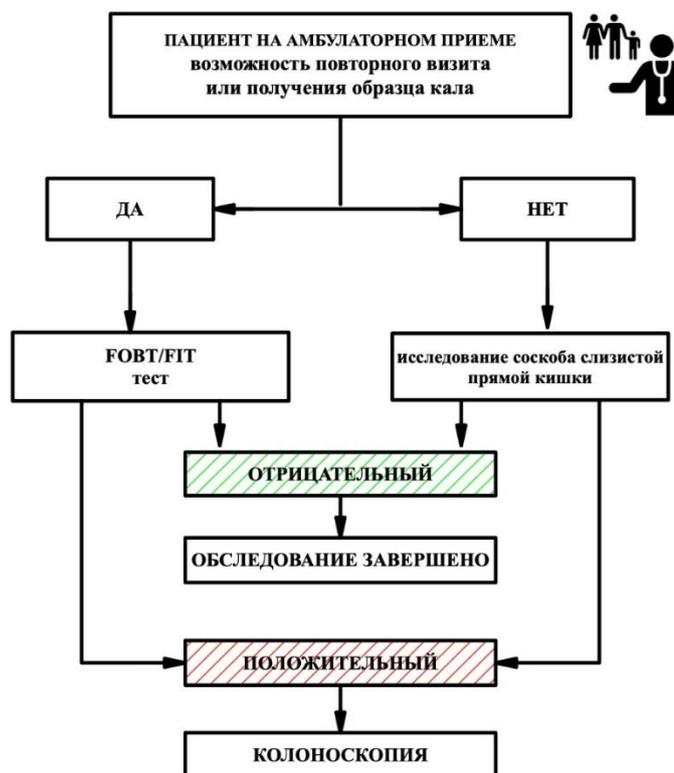
Уровень экспрессии гена является переменной в математической модели (регрессионной или дискриминантной). Используя рассчитанные коэффициенты регрессии для уровня экспрессии гена и константу в соответствующей модели, можно с высокой точностью определить вероятность принадлежности исследуемого образца к определенной группе (условно норме, патологии толстой кишки в целом или дифференцированной патологии: наличие аденом, неспецифического язвенного колита или колоректального рака).

В сводной **таблице 40** представлены общие характеристики разработанных моделей диагностики патологии толстой кишки. В зависимости от цели можно использовать разные панели оценки образцов щеточной биопсии (соскоба) нижеампулярного отдела прямой кишки. Нами предлагается алгоритм использования моделей молекулярной диагностики патологии в толстой кишке и выявления КРР на амбулаторном приеме. Возможность использования предлагаемого молекулярного исследования наряду с традиционными фекальными тестами на скрытую кровь представлена на **рисунке 11**.

Таблица 40. Модели молекулярной диагностики патологии толстой кишки

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

Рисунок 11. Алгоритм использования моделей молекулярной диагностики изменений слизистой толстой кишки



В частности, модель, включающая определение значения экспрессии 6 генов *CTSL2*, *ESR1*, *GRB7*, *GPLY*, *MMP2*, *TERT*, позволяет дифференцировать «условно норму» от колоректального рака. Чувствительность такого теста составляет 96,7% при уровне специфичности 90%. Еще раз хотим подчеркнуть, что эта диагностическая модель, помимо оценки показателей экспрессии ряда генов, включает возраст обследуемого в виде полного числа лет в качестве объясняющей переменной. При распределении в группу «КРР» пациент направляется на колоноскопию.

Для разработки надежной молекулярной диагностической модели выявления аденом требуется продолжение исследований, увеличение количества наблюдений и оценка воспроизводимости данного метода.

4.3. Оценка экспрессии генов в образцах колоректального рака

На этом этапе работы мы изучили профили экспрессии мРНК генов имеющейся в нашем распоряжении панели в образцах КРР в зависимости от ключевых клиничко-морфологических характеристик колоректальной аденокарциномы: 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 белков системы RAS.

4.3.1. Оценка уровня экспрессии в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости от степени ее дифференцировки

Сравнительный анализ экспрессии генов (ANOVA) по критерию «степень дифференцировки» выявил статистически значимые отличия уровней экспрессии 4 генов: *PTEN*, *MYBL2*, *CYP19A* и *MMP8* (таблица 41). Используя критерий Тьюки на множественность сравнений, было установлено, что по уровню экспрессии ни по одному из генов не имелось статистически значимых различий по всем трем степеням дифференцировки опухоли. Уровни экспрессии генов *PTEN*, *MYBL2* и *MMP8* различались в парах G1/G3 и G2/G3, а *CCNB1* только в паре G1/G3.

Таблица 41. Статистически значимые различия уровней экспрессии генов в зависимости от степени дифференцировки (ANOVA)

Ген	F-статистика	df1	df2	p
<i>PTEN</i>	5.1497	2	14.53	0.020
<i>MYBL2</i>	4.1241	2	12.93	0.041
<i>CCNB1</i>	5.6247	2	14.56	0.015
<i>MMP8</i>	4.2452	2	10.93	0.043

Где: df*- степень свободы, p - вероятность

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

онкосупрессоров (*PTEN*). Эти данные соответствуют современным научным представлениям о том, что наличие низкой дифференцировки (G3) по-прежнему может считаться одним из факторов негативного прогноза. Актуальные клинические рекомендации подтверждают, что степень дифференцировки опухоли не участвует в формировании стадии. Она определяется только комбинацией характеристик T, N, M, описывающих размер или глубину инвазии рака, поражение регионарных лимфатических узлов и наличия отдаленных метастазов.

4.3.2. Оценка уровня экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости от глубины инвазии опухоли (показатель T по классификации TNM)

Результаты сравнения показателей экспрессии генов в образцах колоректального рака в зависимости от его размеров и глубины инвазии представлены в **таблице 42**. В таблице указаны только статистически значимые различия в группах. Максимальное количество таковых при оценке экспрессии генов *MMP11*, *MMP2*, *MMP7* и *TPA* было обнаружено при попарном сравнении пары T1/T4 (DSCF). Уровень экспрессии *CYP19A* значимо отличался в паре T3/T4.

Таблица 42. Сравнение средних значений уровней экспрессии генов в зависимости от размеров опухоли в образцах КРР (Крускал-Уоллис)

Ген	χ^2	df	p
<i>MMP11</i>	8.42	3	0.038
<i>CYP19A</i>	8.82	3	0.032
<i>MMP2</i>	8.31	3	0.040
<i>MMP7</i>	10.11	3	0.018
<i>TPA</i>	7.94	3	0.047

Анализ результатов, приведенных в **таблице 43**, указывает на роль матричных металлопротеиназ при увеличении размера опухоли, в первую очередь *MMP7*, которая снижает адгезию раковых клеток и увеличивает вероятность метастазирования КРР. Higashi et al. [147] было установлено, что *MMP7* гиперэкспрессируется в аденоматозных полипах с тяжелой

дисплазией. Кроме того, *MMP7* участвует в трансформации ворсинчатых аденом в рак и способствует его росту [246].

4.3.3. Оценка уровня экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости от характера изменений регионарных лимфоузлов (показатель N по классификации TNM)

Гены, уровни экспрессии которых имели статистически значимые различия с учетом поправки Тьюки на множественность сравнений в зависимости от показателя N по системе TNM, представлены в **таблице 43**.

Таблица 43. Отличия экспрессии генов в образцах опухоли в зависимости от показателя N (Крускал-Уоллис)

Ген	χ^2	df (степеней свободы)	p
<i>TGFb</i>	8.40	2	0.015
<i>PTEN</i>	7.56	2	0.023
<i>BCL2</i>	6.60	2	0.037
<i>NDRG1</i>	9.88	2	0.007
<i>MMP11</i>	9.74	2	0.008
<i>IGF2</i>	6.37	2	0.041

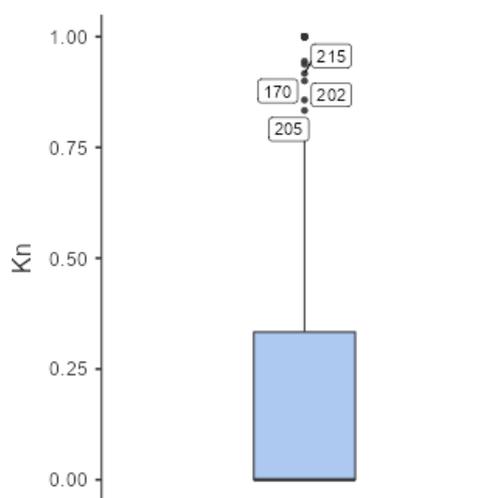
При попарном сравнении статистически значимые различия в паре N0/N2 были выявлены для показателей экспрессии 4 генов: *TGFb*, *NDRC1*, *MMP11*, *IGF2*. Пара N0/N1 отличалась по уровню экспрессии гена *PTEN*, а пара N1/N2 по экспрессии генов *BCL2*, *NDRC1*, *MMP11*. *Kovacevic Z et al.* [178] выявили, что ген *NDRG1* является супрессором опухолевого роста и метастазирования. Его гиперэкспрессия отрицательно коррелирует с развитием прогрессирования. Так, *NDRG1* ингибирует основные онкогенные пути: RAS, c-Src, PI3K, WNT, ROCK1/pMLC2.

В образцах колоректальной аденокарциномы с поражением более чем 3 регионарных лимфоузлов в препарате (N2) выявлена гиперэкспрессия *PTEN* и *MMP11* в сравнении с образцами, где поражение регионарных лимфоузлов не выявлялось (N0). Предполагаем, что резкое увеличение

экспрессии тканевой протеазы *MMP11* позволяет опухолевой клетке разрушать межклеточный матрикс и создает условия для метастазирования.

С учетом этих данных различия экспрессионных профилей в зависимости от глубины инвазии опухоли, наличия лимфогенных метастазов представляются вполне логичными.

Диаграмма 17. Характеристика отношения метастатических лимфоузлов к общему числу удалённых (диаграмма размаха)



Получив эти результаты, мы решили проверить, как регионарное метастазирование связано с изменением уровня экспрессии генов. Для этого мы провели регрессионный анализ, используя в качестве зависимой переменной отношение числа метастатических лимфоузлов к общему числу удаленных (K_n). Этот показатель в нашей выборке варьировал от 0 до 1 и имел ненормальное распределение $Me\ 0[0;0,33]$: **диаграмма 17**.

В **таблице 44** представлены гены-участники полученной регрессионной модели. Показатели соответствия этой линейной регрессионной модели нас не удовлетворили: $R^2=0.32$, тест Дурбина-Ватсона на автокорреляцию 1.21. Обратившись к уже полученным нами данным об имеющейся связи профилей экспрессии в образцах неизменной слизистой при колоректальном раке с наличием регионарных метастазов, мы дополнительно использовали их в новой модели в качестве объясняющих переменных. Полученная регрессионная модель представлена в **таблице 45**.

Таблица 44. Регрессионная модель зависимости профиля экспрессии ряда генов от отношения числа метастатических лимфоузлов к общему числу удаленных

Ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность.
Константа	-0.0191	0.21607	-0.0884	0.930
CCND1	0.0450	0.01844	2.4392	0.016
CCNB1	-0.0746	0.02176	-3.4295	< .001
Ki67	0.0501	0.02780	1.8017	0.073
PGR	-0.0305	0.00939	-3.2428	0.001
MMP11	0.0237	0.00821	2.8837	0.004
MYBL2	-0.0371	0.01899	-1.9510	0.052
P16INK4A	0.0506	0.01216	4.1601	< .001
IL1b	-0.0242	0.00699	-3.4559	< .001
CD56	-0.0214	0.00819	-2.6180	0.010
LGALS1	0.0254	0.00672	3.7860	< .001

Таблица 45. 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
tumor_CCND1	0.0656	0.02240	2.930	0.004
tumor_CCNB1	-0.0662	0.02130	-3.110	0.003
tumor_P16INK4A	0.0446	0.01239	3.599	< .001
tumor_IL1b	-0.0393	0.00730	-5.380	< .001
tumor_CD56	-0.0269	0.00996	-2.700	0.008
tumor_LGALS1	0.0297	0.00830	3.576	< .001
mnt_Ki67	0.0759	0.02154	3.523	< .001
mnt_IGF2	0.0398	0.01351	2.945	0.004
mnt_CYP19A	-0.0200	0.00857	-2.337	0.022
mnt_PAPPA	-0.0454	0.01697	-2.674	0.009
mnt_IL6	0.0174	0.00935	1.861	0.066
mnt_IL15	-0.0519	0.01451	-3.575	< .001
mnt_CD56	-0.0444	0.01080	-4.113	< .001
mnt_TGFb	0.1082	0.02607	4.152	< .001

Примечание: tumor_«ген» - образец аденокарциномы; mnt_«ген» - образец неизменной слизистой при КРР

Показатели соответствия этой модели оказались значительно лучше: $R^2=0.67$, тест Дурбина-Ватсона на автокорреляцию 1.87. Такие результаты еще раз подтверждают полученные данные о наличии связи профиля экспрессии генов в образцах двух типов: из неизменной слизистой и непосредственно самой аденокарциномы с характером лимфогенного метастазирования. Кроме того, их включение в математические регрессионные модели в качестве объясняющих переменных значительно

повышает их точность. Нельзя не отметить, что большее число переменных в регрессионной модели (8 из 14) сформировано показателями экспрессии образцов из неизменной слизистой.

Таким образом, оценка уровней экспрессии *CCND1*, *CCNB1*, *P16INK4A*, *IL1b*, *CD56*, *LGALS1* в образцах из опухоли и уровней экспрессии *Ki67*, *IGF2*, *CYP19A*, *PAPPA*, *IL6* *IL15* в образцах неизменной слизистой при КРР связана с характером регионарного метастазирования при колоректальном раке.

4.3.4. Оценка уровня экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости от локализации в эмбрионально-анатомических отделах толстой кишки

Нами были проанализированы результаты оценки показателей экспрессии всех 225 образцов аденокарциномы с локализацией во всех эмбрионально-анатомических отделах толстой кишки. Из прямой кишки исследован 101 (44,8%) образец, из левой ободочной кишки – 86 (38,3%) образцов, из правой ободочной – 38 (16,9%) образцов. Были выявлены статистически значимые отличия экспрессии 23 генов различных функциональных групп (**таблица 46**).

Аденокарциномы прямой и левой ободочной кишки отличались по уровню экспрессии 14 генов: *CTSL2*, *TERT*, *ESR1*, *STK15*, *MYBL2*, *IGF1*, *IGF2*, *PAPPA*, *IL10*, *IFNg*, *CD45*, *CD56*, *CD69*, *GATA3*.

Прямая и правая ободочная – по уровню экспрессии 4 генов: *CCND1*, *BIRC5*, *IL7*, *BAX*.

Левая и правая ободочные – по уровню 8 генов: *CD68*, *GRB7*, *IFNg*, *TNFa*, *CD69*, *VEGFA165*, *VEGFA189*, *GATA3*.

Для оценки характера отличий мы провели анализ значений медианы (*Me*) экспрессии 62 генов в каждом из трех эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки. Были определены гены с высокой и низкой экспрессией в каждом из них – **таблица 47**.

Таблица 46. Значимые различия показателей экспрессии исследованных генов в образцах КРР разных эмбрионально-анатомических отделов при парном сравнении

	среднее		Р	среднее		Р	среднее		Р
	Прямая	Левая ободочная		Прямая	Правая ободочная		Прямая	Левая ободочная	
<i>CCND1</i>	6,17820	6,30717	0,542558	6,17820	6,82138	0,019910	6,30717	6,82138	0,061872
<i>BIRC5</i>	7,90626	8,33992	0,051298	7,90626	8,46043	0,040798	8,33992	8,46043	0,568415
<i>CTSL2</i>	6,85724	7,97055	0,000082	6,85724	7,44719	0,093353	7,97055	7,44719	0,059083
<i>CD68</i>	5,86907	5,61724	0,066328	5,86907	5,94982	0,589656	5,61724	5,94982	0,032279
<i>TERT</i>	9,24834	8,64330	0,017779	9,24834	8,98152	0,430583	8,64330	8,98152	0,210802
<i>ESR1</i>	5,25657	4,34312	0,007709	5,25657	4,94322	0,449969	4,34312	4,94322	0,069969
<i>GRB7</i>	15,72495	16,15252	0,096323	15,72495	15,63879	0,791944	16,15252	15,63879	0,018004
<i>STK15</i>	4,39387	4,78101	0,025301	4,39387	4,64505	0,223839	4,78101	4,64505	0,482482
<i>MYBL2</i>	8,75335	9,25213	0,038477	8,75335	9,03875	0,307704	9,25213	9,03875	0,309260
<i>IGF1</i>	8,24354	6,80703	0,003152	8,24354	7,84456	0,554588	6,80703	7,84456	0,068262
<i>IGF2</i>	11,37424	10,09643	0,046617	11,37424	10,91400	0,540527	10,09643	10,91400	0,256150
<i>PAPPA</i>	12,97163	12,00393	0,039503	12,97163	11,99647	0,082691	12,00393	11,99647	0,988595
<i>IL7</i>	6,11552	5,77870	0,236918	6,11552	5,24511	0,020544	5,77870	5,24511	0,070562
<i>IL10</i>	7,32924	6,44395	0,020349	7,32924	6,78596	0,272310	6,44395	6,78596	0,422030
<i>IFNg</i>	10,07893	8,99116	0,003107	10,07893	9,98081	0,861562	8,99116	9,98081	0,024740
<i>CD45</i>	6,31794	5,63348	0,015125	6,31794	6,16055	0,672169	5,63348	6,16055	0,101851
<i>TNFa</i>	7,13173	6,80565	0,263671	7,13173	7,68428	0,193975	6,80565	7,68428	0,011967
<i>CD56</i>	7,10327	5,94761	0,014353	7,10327	5,95978	0,054340	5,94761	5,95978	0,980819
<i>CD69</i>	5,59412	4,80406	0,007880	5,59412	5,75933	0,668938	4,80406	5,75933	0,002409
<i>BAX</i>	9,89760	9,16333	0,096741	9,89760	8,71253	0,027212	9,16333	8,71253	0,385978
<i>VEGFA165</i>	7,42000	7,73730	0,179585	7,42000	7,14370	0,405807	7,73730	7,14370	0,041504
<i>VEGFA189</i>	8,18429	8,40528	0,319345	8,18429	7,68365	0,137184	8,40528	7,68365	0,030128
<i>GATA3</i>	5,90201	5,12805	0,013332	5,90201	5,90630	0,991096	5,12805	5,90630	0,006975

По сравнению с образцами нормальной слизистой у здоровых людей в образцах, полученных из 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.

Таблица 47. Отличия медианы экспрессии генов в эмбрионально-анатомических отделах толстой кишки при КРР. (U-критерий Манна-Уитни)

Отделы толстой кишки	Высокий уровень экспрессии относительно других отделов	Низкий уровень экспрессии относительно других отделов
ПРАВЫЕ (RS) (слепая, восходящая ободочная, поперечноободочная)	<i>CCND1 BIRC5 CD68 TNFa GATA3</i>	<i>GRB7 IL7 BAX VEGFA165 VEGFA189</i>
ЛЕВЫЕ (LS) (нисходящая ободочная, сигмовидная)	<i>CTSL2 STK15 MYBL2 VEGFA165 VEGFA189</i>	<i>CD68 TERT ESR1 GRB7 IGF1 IGF2 PAPPA IL10 IFNg CD45 TNFa CD56 CD69 GATA3</i>
Прямая кишка (R)	<i>TERT ESR1 IGF1 IGF2 PAPPA IL7 IL10 IFNg CD45 CD56 CD69 BAX</i>	<i>CCND1 BIRC5 CTSL2 STK15 MYBL2</i>

По результатам анализа уровень экспрессии 12 генов в прямой кишке был выше в сравнении с уровнем генов правой и левой половиной ободочной кишки (таблица 47). Эти гены также являются звеньями разных сигнальных

путей. Но только по уровню экспрессии 4 генов: *ESR1*, *IL10*, *IGF2*, *BAX*, *PGR* сохранилась тенденция к гиперэкспрессии в прямой кишке.

Дискриминантная математическая модель классификации образцов колоректальной аденокарциномы по эмбрионально-анатомическим отделам, в отличие от модели, построенной на результатах исследования образцов слизистой у здоровых людей, продемонстрировала меньшую точность. Суммарный процент правильности классификации составил 75,42%. Но он подтвердил уже выявленную закономерность, характерную для нормальной слизистой: молекулярный фенотип образцов колоректальной аденокарциномы из прямой кишки также отличается от двух других отделов, но с точностью дифференцировки уже 81,6% (таблица 48).

Необходимо отметить, что бóльшие, чем в норме, ошибки классификации, скорее всего, возникают как из-за сходства фенотипов соседних отделов кишки, так и тем, что при развитии злокачественного перерождения слизистой фенотипические границы сглаживаются и изменения мигрируют, условно, из фенотипа, характерного для разных отделов, в условно «опухолевый» фенотип.

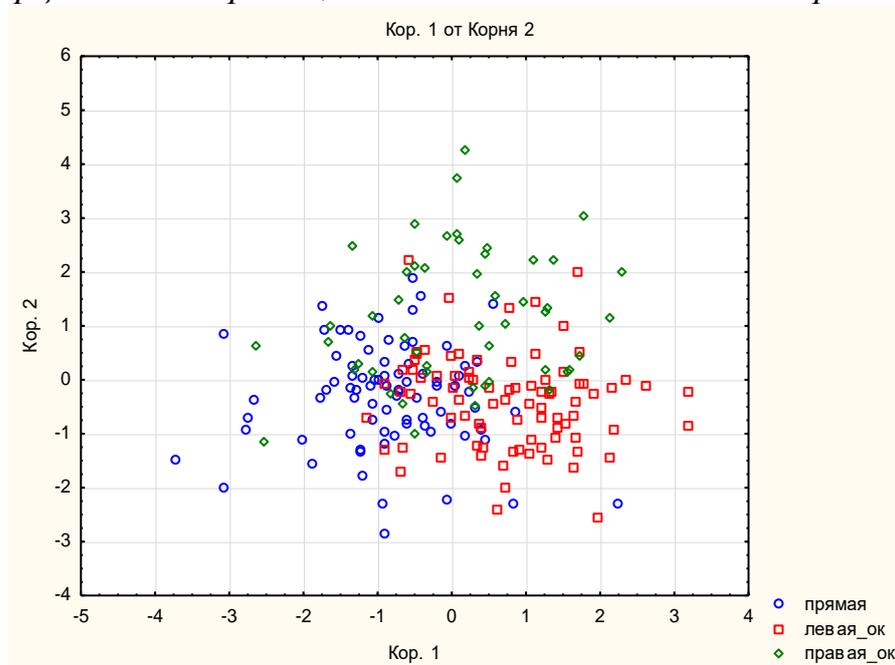
Таблица 48. Дискриминантная модель: классификация образцов аденокарциномы в эмбрионально-анатомических отделах кишки

Эмбрионально-анатомический отдел	правильная классификации (%)	Распределение образцов согласно дискриминантной модели (n)		
		правая ободочная кишка	левая ободочная кишка	Прямая кишка
правая ободочная кишка	53,8%	28	9	15
левая ободочная кишка	75%	5	66	17
прямая кишка	81,6%	5	11	71
Общая точность классификации %	75,42%	38	86	101

Классификационные возможности хорошо иллюстрируется представленными на **рисунке 12** графическими решениями дискриминантных функций для трех групп образцов, сформированных по изучаемым отделам кишки. Решение дискриминантной функции 1 по оси X

и оси Y показывает наличие пересекающихся значений для образцов из всех эмбрионально-анатомических отделов, при этом тенденция к существованию различий в них по молекулярному фенотипу сохраняется.

Рисунок 12. График канонических функций для образцов аденокарциномы из правой, левой ободочной кишки и из прямой кишки



Таким образом, в результате проведенного молекулярного исследования образцов колоректального рака обнаружено сглаживание фенотипических отличий во всех отделах толстой кишки с сохранением особого молекулярного фенотипа, характерного для прямой кишки, классифицируемого с точностью 81,6%.

4.3.5. Оценка уровня экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости от характера мутаций в генах RAS

Согласно данным литературы, до 45% спорадического КРР возникает как результат мутации протоонкогена KRAS2 [264]. Наличие мутации в гене KRAS при КРР связано с низкой выживаемостью, повышенной агрессивностью опухоли и устойчивостью к таргетной терапии, направленной против рецептора фактора роста (EGFR) [180]. Мы исследовали особенности экспрессии образцов колоректальной

аденокарциномы в зависимости от наличия мутаций *RAS*. Был использован метод логистической регрессии бинарного выбора. Значение 0 соответствовало дикому фенотипу, а 1- мутированному. В ходе исследования было установлено, что наличие мутации в генах *RAS* сильно влияет на экспрессию определенных генов и создает свой специфический экспрессионный фенотип (таблица 49).

Таблица 49. Результаты логистической регрессии. Целевая переменная «статус *RAS*»

Ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность.
Константа	-44.444	13.637	-3.26	0.001
<i>CCND1</i>	-2.275	0.677	-3.36	<.001
<i>BCL2</i>	1.236	0.505	2.45	0.014
<i>HER2</i>	2.104	0.860	2.45	0.014
<i>MYBL2</i>	2.891	0.930	3.11	0.002
<i>MMP8</i>	0.943	0.309	3.05	0.002
<i>IL6</i>	-1.043	0.370	-2.82	0.005
<i>IL8</i>	-1.193	0.544	-2.19	0.028
<i>IL1b</i>	1.352	0.476	2.84	0.005
<i>TNFa</i>	-0.701	0.346	-2.02	0.043
<i>CD69</i>	1.479	0.587	2.52	0.012

Соответствующая матрица классификации и прогностические меры представлены в таблице 50 и таблице 51.

Таблица 50. Матрица классификации модели, прогнозирующей фенотип *RAS*

наблюдаемый	Предсказанный		% правильных
	<i>RAS-mut</i>	<i>RAS-wt</i>	
<i>RAS-mut</i>	30	5	85,7%
<i>RAS-wt</i>	3	45	93,8%

При анализе молекулярных характеристик «*RAS-mut*» фенотипа выявлена высокая экспрессия *CCND1*, который кодирует белок циклин D1, образуя комплекс с циклин-зависимыми киназами CDK4 и CDK6. Мутации, амплификация и гиперэкспрессия *CCND1* в комплексе с CDK4/CDK6 регулирует 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.

Таблица 51. Прогностические меры и ROC-кривая модели, прогнозирующей фенотип RAS

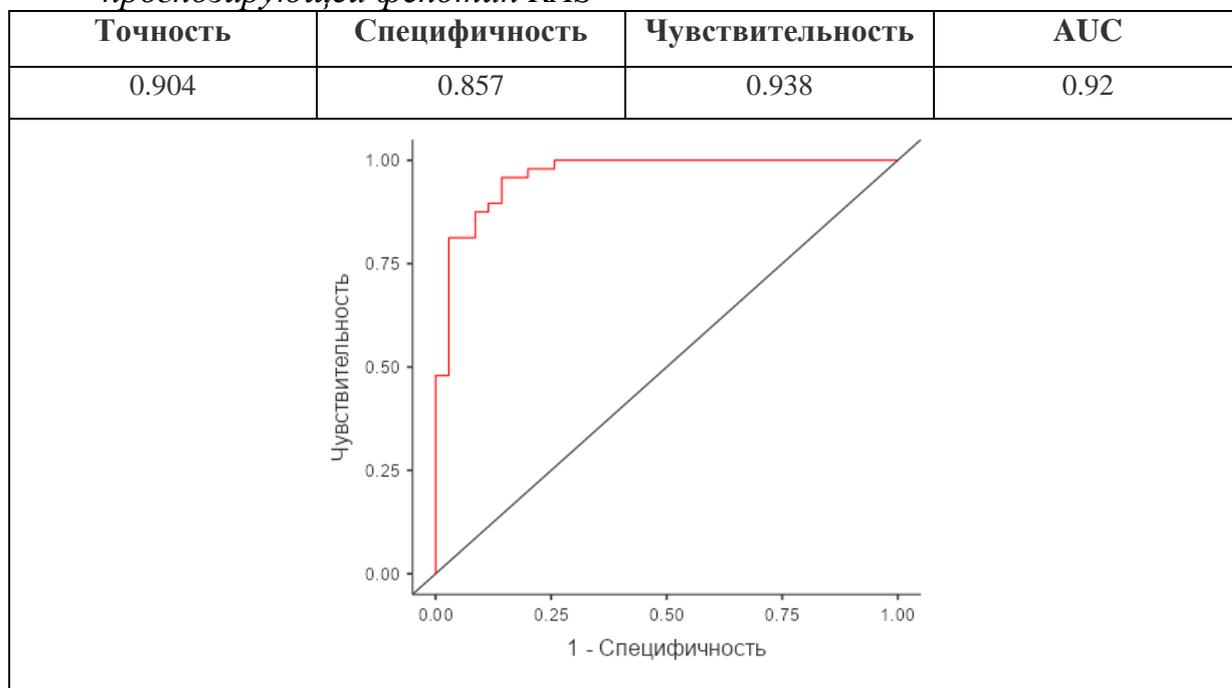
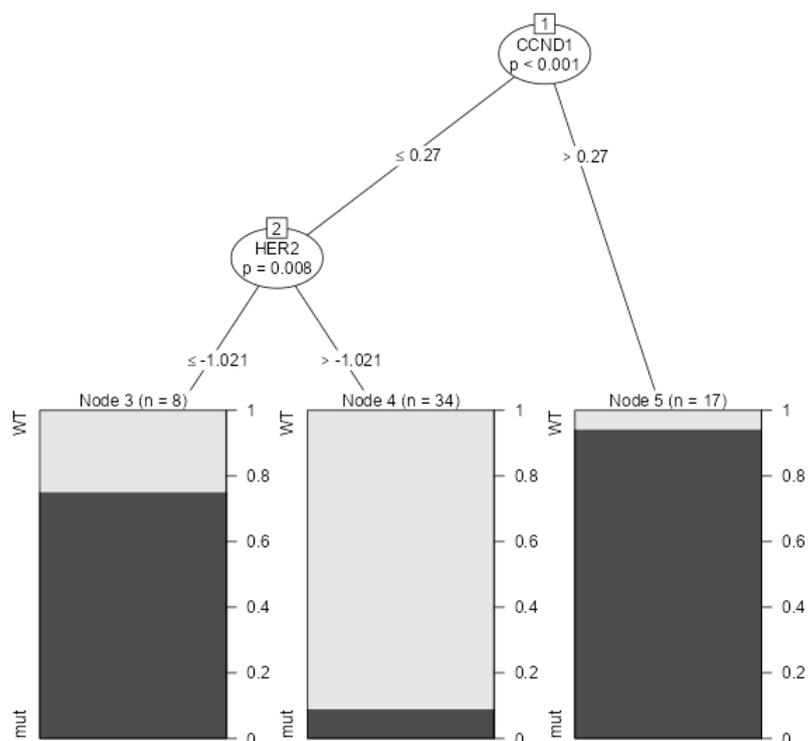


Рисунок 13. Дерево молекулярной классификации фенотипа RAS



Затем на основе выявленных отличий генов-кандидатов было сформировано «дерево классификации», которое позволило дифференцировать их для описания мутированного (*RAS-mut*) и «дикого» (*RAS-wt*) фенотипов (**рисунок 13**).

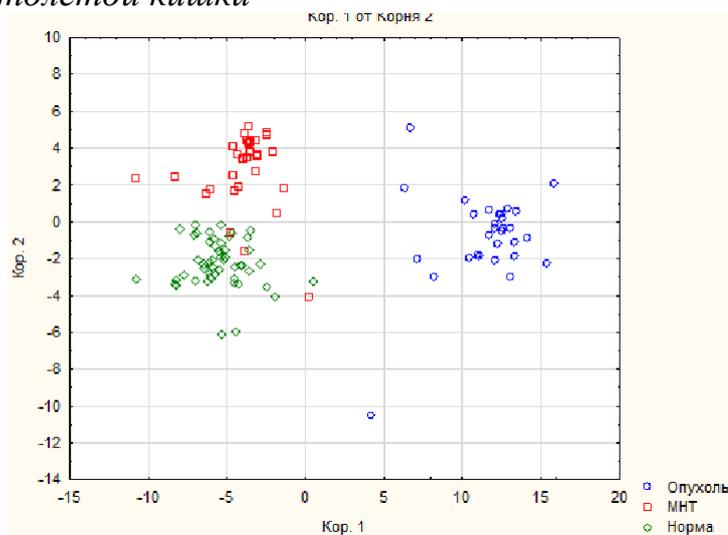
В литературе имеются сведения, что полиморфизм *CCND1* G870A может быть связан с повышенным риском развития КРР [326]. При этом анализ подгрупп по этнической принадлежности выявил значительные ассоциации между полиморфизмом *CCND1* G870A и восприимчивостью к КРР у носителей А (АА или АG или АА + АG), 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. *CCND1* непосредственно участвует в сигнальном пути Wnt, являясь ключевым регуляторным белком клеточного цикла, поэтому его сверхэкспрессия и мутация приводят к изменениям экспрессии других генов.

4.3.6. Сравнительная оценка уровня экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы, неизменной слизистой при КРР и в норме в зависимости от эмбрионально-анатомического отдела прямой кишки

Ранее в работах наших коллег [21, 8] неоднократно подчеркивалось значительное различие молекулярных фенотипов опухоли и неизменной слизистой в норме и при возникновении рака. В настоящей работе мы решили уточнить, а как изменяются эти различия при исследовании образцов в зависимости от эмбрионально-анатомического отдела: правого и левого.

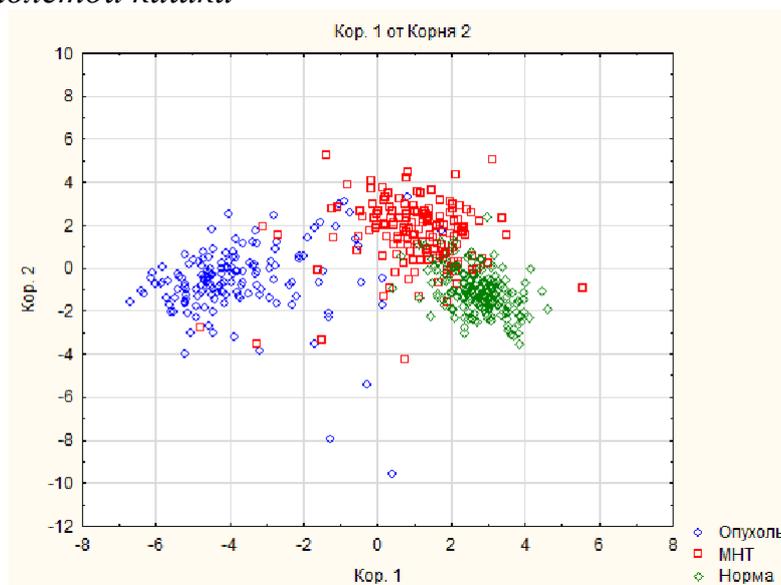
На **рисунке 14** представлены значения двух канонических функций для «правых» отделов толстой кишки, а на **рисунке 15** для «левых» отделов. Канонический анализ демонстрирует, что выявленные различия молекулярных фенотипов при возникновении колоректального рака сохраняются в каждом эмбрионально-анатомическом отделе толстой кишки.

Рисунок 14. График канонических функций для образцов из опухоли, неизменной слизистой при КРР (МНТ) и в норме в «правых» отделах толстой кишки



При этом, несмотря на кажущееся внешнее сходство, эти графики, на наш взгляд, имеют важное отличие: решение дискриминантной функции и по оси X, и по оси Y показывает большее смещение образцов из неизменной слизистой в норме при колоректальном раке в «левых» отделах толстой кишки, при этом четкое разделение образцов КРР характерно для обоих графиков.

Рисунок 15. График двух канонических функций для образцов из опухоли, неизменной слизистой при КРР (МНТ) и в норме в «левых» отделах толстой кишки



Выявленное смещение образцов из неизменной слизистой в левых эмбриональных отделах толстой кишки обусловлено характерной для них низкой геномной нестабильностью (CIMP-L), связанной с молекулярными сигнальными путями в эмбриогенезе.

4.4. Оценка риска прогрессирования колоректального рака с использованием молекулярно-генетических технологий

Развитие метастатической болезни, без сомнения, является одним из самых драматических событий в течении КРР. Зачастую ее выявление происходит после достаточно длительной ремиссии и несвоевременно, что непосредственно влияет на результаты лечения метастатической болезни. Эти обстоятельства позволяют считать оценку риска прогрессирования КРР основной задачей его третичной профилактики. Кроме того, его объективная оценка позволяет получить дополнительные аргументы «за» или «против» во время решения онкологическим консилиумом вопроса о назначении адъювантного лечения и его объема.

4.4.1. Связь риска прогрессирования КРР с уровнем экспрессии генов в образцах аденокарциномы и неизменной слизистой

В **таблице 52** представлены результаты бинарной логистической регрессии зависимости профилей экспрессии ряда генов из использованной нами панели в образцах аденокарциномы от факта прогрессирования, произошедшего в течение 36-месячного периода наблюдения. В модель вошли значения экспрессии 8 генов: *MYC*, *CCND1*, *CCNB1*, *CTSL2*, *NDRG1*, *IL1b*, *TNFa*, *VEGFA121*. Показатель R^2 модели оказался равен 0,31. Мы сочли его неудовлетворительным с точки зрения надежности прогнозирования. И сформировали новую прогностическую модель на основе логистической регрессии, дополнительно включив в нее в качестве объясняющих переменных значения экспрессии генов нашей панели в образцах

неизменной слизистой у этих же пациентов. Полученная модель представлена в **таблице 53**.

Таблица 52. Результаты логистической регрессии (образцы аденокарциномы). Целевая переменная «прогрессирование КРР»

Ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность.
Константа	1.874	1.6446	1.14	0.255
<i>MYC</i>	0.302	0.1696	1.78	0.075
<i>CCND1</i>	-0.395	0.1581	-2.50	0.012
<i>CCNB1</i>	0.234	0.1614	1.45	0.147
<i>CTSL2</i>	-0.399	0.1314	-3.03	0.002
<i>NDRG1</i>	-0.113	0.0583	-1.94	0.053
<i>IL1b</i>	0.158	0.0732	2.16	0.030
<i>TNFa</i>	0.223	0.1308	1.70	0.089
<i>VEGFA121</i>	-0.400	0.1428	-2.80	0.005

Добавление новых объясняющих переменных в модель значительно повысило ее точность. Показатель R^2 в этой модели оказался равен 0,57. Матрица классификации представлена в **таблице 54**. В прогностическую модель вошли показатели экспрессии 3 генов из опухолевых образцов: *CTSL2*, *NDRG1*, *IL1b* и 8 генов из образцов неизменной слизистой: *BIRC5*, *NDRG1*, *Ki67*, *IGF2*, *CYP19A*, *GNLY*, *MMP7*, *HLA.G5*.

В ранее проведенном исследовании Станоевичем У.С. частично были исследованы различия уровней экспрессии генов в ткани опухоли, где выявленные гены достоверно отличались в зависимости от течения процесса (без прогрессирования / с прогрессированием) [21]. Кроме того, имеются данные исследования экспрессии генов в образцах неизменной слизистой, где в группе больных с выявленным прогрессированием колоректального рака был отмечен статистически значимо более высокий уровень экспрессии *CCND1*, *BAG1*, *ESR1*, *LIFR* и ниже уровень экспрессии *IL15*, чем в группе без такового.

Таблица 53. 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

Таблица 54. Матрица классификации прогностической модели зависимости профилей экспрессии образцов аденокарциномы и неизменной слизистой от прогрессирования КРР

наблюдаемый	Предсказанный		% правильных
	Без прогрессирования	Прогрессирование	
Без прогрессирования	65	4	94,2%
Прогрессирование	6	27	81,8%

Особенности экспрессии указанных генов в образцах неизменной слизистой в первую очередь объясняются биологическими функциями *BIRC5*, *NDRG1*, *Ki67*, *IGF2*, *CYP19A*, *GNLY*, *MMP7*, *HLA.G5*. В нашей работе была зафиксирована более высокая экспрессия *GNLY* в неизменной слизистой, который является одним из маркеров цитотоксических лимфоцитов. Анализ литературных данных выявил, что при сравнении пациентов КРР с наличием регионарных или отдаленных метастазов и без таковых получены сведения о самостоятельном прогностическом значении экспрессии *GNLY* [69]. Экспрессия гена *HLA-G5* также повышается при

развитии прогрессирования, а сам ген является мишенью для таргетной терапии КРР.

Можно предположить, что отсутствие прогрессирования в период наблюдения проявляется в виде особого профиля экспрессии определенной группы генов, обеспечивающих цитотоксический иммунный механизм защиты, связанный с длительной ремиссией.

Наши исследования подтверждают, что в неизменной слизистой оболочке толстой кишки при наличии аденокарциномы происходят процессы активации врожденного и приобретенного иммунитета, которые способствуют длительной ремиссии получивших лечение пациентов.

4.4.2. Модель фенотипирования колоректального рака на основе кластеризации профилей экспрессии генов и ее связь с прогрессированием заболевания

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 и, что самое важное, по ответу на лечение [228, 272].

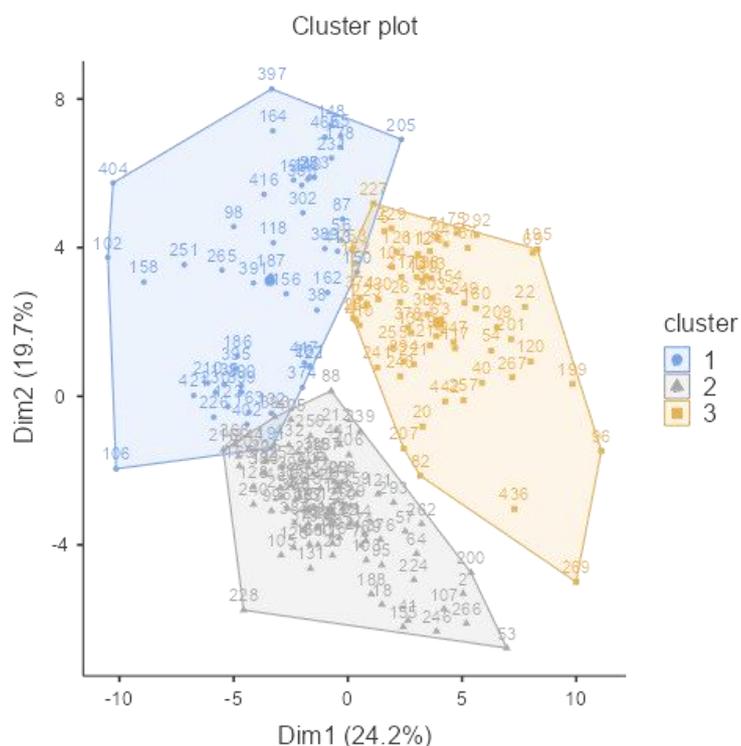
Опираясь на результаты уже проведенных собственных исследований об ассоциации профилей экспрессии генов – участников сигнальных путей канцерогенеза в образцах неизменной слизистой и образцах колоректального рака с базовыми его характеристиками: эмбрионально-анатомическим отделом, где опухоль возникла, возрастом пациента, размером аденокарциномы, степенью ее дифференцировки, характером регионарного метастазирования и прогнозом прогрессирования, мы провели кластеризацию этого массива данных. Он включил в себя 246 образцов: по

два образца - аденокарцинома и край резекции, соответственно, у 123 пациентов.

Методом k-средних, используя данные объединенного массива показателей экспрессии панели генов из образцов колоректального рака и образцов неизменной слизистой, нами были выделены три молекулярно-генетические фенотипа (кластера) (**рисунок 16** и **таблица 55**).

Мы решили оценить клиническую значимость математически выделенных молекулярных фенотипов (кластеров) с точки зрения прогнозирования развития метастатической болезни. **Таблица 55** демонстрирует распределение пациентов в выделенных кластерах с развившимся прогрессирующим и без такового на всем 36-месячном периоде наблюдения.

Рисунок 16. Результаты кластерного анализа объединенного массива показателей экспрессии панели генов в образцах колоректального рака и неизменной слизистой (метод k-средних)



Обсуждая полученные результаты с позиции оценки отдаленных результатов лечения, 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 нем 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.

Было обнаружено, что в каждом из кластеров наблюдалось равное соотношение мужчин и женщин. Кроме того, нами не выявлены статистически значимые отличия между пациентами первого, второго и третьего кластеров по возрасту ($p=0,8657$) и ИМТ ($p=0,5904$).

Таблица 55. 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

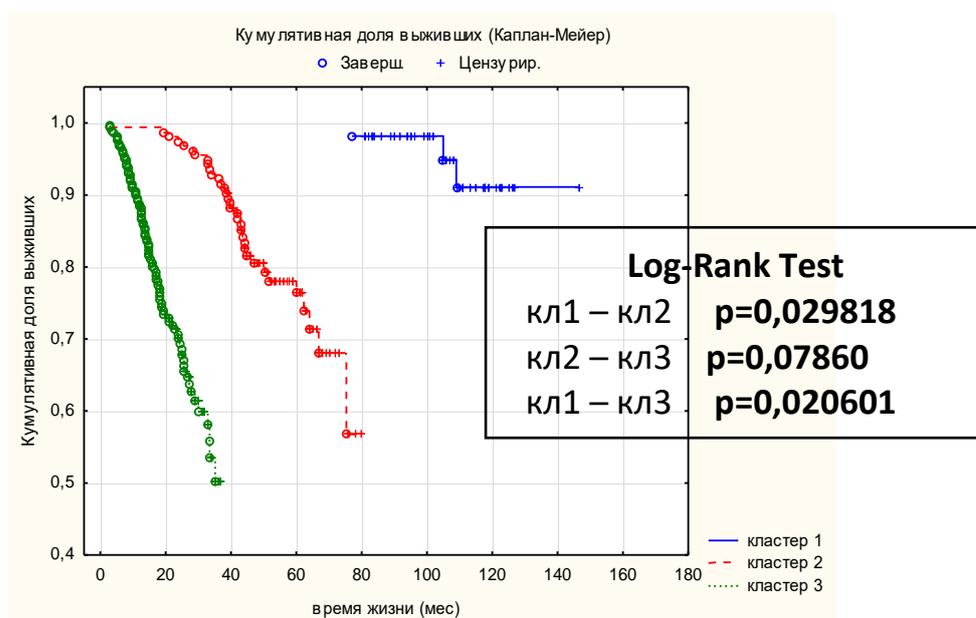
Нами был проведен сравнительный анализ локализации опухоли, консенсусного молекулярного фенотипа и точечных мутаций в выделенных кластерах и были отмечены статистически значимые различия между ними по этим признакам (**таблица 56**). Изучение информации о локализации опухоли в различных отделах ободочной и прямой кишки в зависимости от кластера показало, что в первом кластере у пациентов преобладали опухоли левой половины ободочной и прямой кишки, а в третьем кластере опухоли правой половины. Различия между кластерами были статистически значимыми ($p=0,0503$). При этом процент пациентов с локализацией опухоли в прямой кишке распределился в равной степени между первым кластером и вторым (38,5% и 36,2%, соответственно) по сравнению с третьим (27,3%). (**таблица 56**).

Таблица 56. 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%)	

Несмотря на то, 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 (38,5%), отличающийся благоприятным течением. Отсутствие статистических различий связываем с небольшим количеством пациентов в кластерах, особенно в третьем.

Рисунок 17. Безрецидивная выживаемость (ВБПБ) в кластерах



Нами была проанализирована безрецидивная выживаемость пациентов в этих кластерах, где количество рецидивов во втором кластере составило 37,5% по сравнению с первым и третьим кластерами, где

количество рецидивов было 25,7% и 85% соответственно (таблица 55, рисунок 17). Таким образом, в третий кластер вошли пациенты с самым неблагоприятным течением КРР.

Обратим внимание, что пациенты третьего кластера характеризуются наиболее плохим прогнозом КРР, так как в нем преобладают правосторонняя локализация аденокарциномы и *BRAF*-мутации в сравнении с первым кластером, где доминируют опухоли левого эмбрионально-анатомического отдела.

Считаем, однако, несмотря на представленную характеристику третьего кластера, что особого внимания также требуют пациенты, включенные во второй кластер, где прогноз в отношении метастатической болезни нами расценивается как неопределенный. Безрецидивная выживаемость (ВБПВ) в выделенных кластерах показана на рисунке 17.

Для решения задачи практического использования полученных молекулярных фенотипов мы обратились к дискриминантному анализу и разработали математический алгоритм (модель) распределения образца в определенный кластер. Он представлен в таблице 57.

Таблица 57. Модель определения молекулярного фенотипа

ген	Уилкса Лямбда	Частная Лямбда	F-исключ (2,149)	p-уров.	Толер.	1-толер. (R-кв.)
<i>MMP7_опухоль</i>	0,044754	0,844557	13,71190	0,000003	0,644817	0,355183
<i>IL8_опухоль</i>	0,040035	0,944105	4,41072	0,013772	0,339031	0,660969
<i>MMP11_опухоль</i>	0,040992	0,922057	6,29763	0,002368	0,459246	0,540754
<i>IGF2_опухоль</i>	0,041142	0,918694	6,59338	0,001804	0,299603	0,700397
<i>MYC_опухоль</i>	0,039709	0,951853	3,76838	0,025320	0,457713	0,542287
<i>CD68_опухоль</i>	0,041021	0,921398	6,35539	0,002246	0,442639	0,557361
<i>MMP2_опухоль</i>	0,039825	0,949076	3,99737	0,020367	0,337296	0,662704
<i>GREM1_MHC</i>	0,040048	0,943785	4,43748	0,013429	0,512126	0,487874
<i>MMP8_MHC</i>	0,039466	0,957709	3,28981	0,039985	0,573691	0,426309
<i>HLA-G5_MHC</i>	0,039611	0,954208	3,57519	0,030438	0,639389	0,360611
<i>LGALS1_MHC</i>	0,040850	0,925264	6,01754	0,003068	0,144639	0,855361
<i>BAX_MHC</i>	0,040715	0,928336	5,75116	0,003927	0,197142	0,802858
<i>CCND1_MHC</i>	0,039406	0,959180	3,17054	0,044828	0,391148	0,608852
<i>BAG1_MHC</i>	0,039351	0,960521	3,06206	0,049747	0,480452	0,519549
<i>TLR2_MHC</i>	0,039543	0,955839	3,44202	0,034566	0,190172	0,809828

Примечание: «_MHC» - соответствующий ген из неизменной слизистой.
«_опухоль» - соответствующий ген из опухоли

В таблице 58 представлена матрица классификации этой модели.

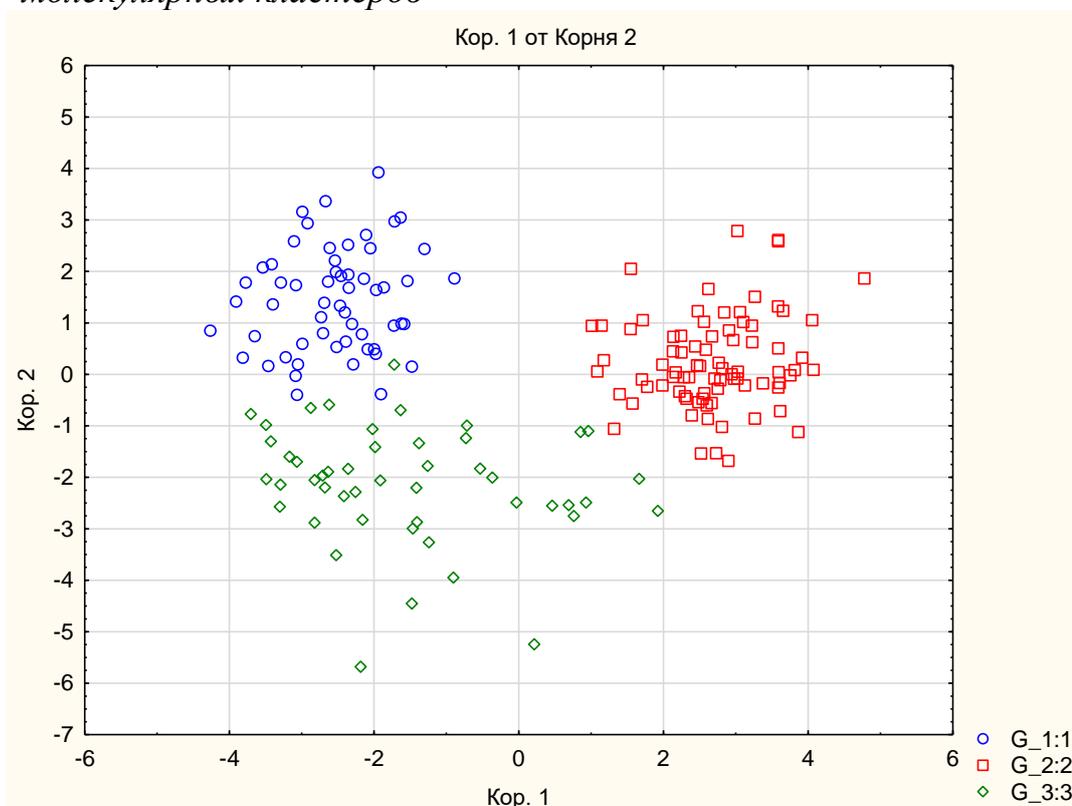
Таблица 58. Матрица классификации распределения в кластеры

кластеры	Процент правильных	G_1:1 p=,30645	G_2:2 p=,43548	G_3:3 p=,25806
G_1:1	100,0000	57	0	0
G_2:2	100,0000	0	81	0
G_3:3	93,7500	2	1	45
Всего	98,3871	59	82	45

В модели использованы показатели экспрессии 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%. Отмечаются ошибки классификации, связанные с распределением образцов в третий кластер, что представляется закономерным в связи с высокой частотой развития прогрессирования в нем.

Рисунок 18. График двух канонических функций для образцов трех молекулярных кластеров



На рисунке 18 результаты канонического анализа: показано графическое решение дискриминантных функций для трех сформированных

молекулярных фенотипов (кластеров), Решение дискриминантной функции 1 по оси X показывает отсутствие пересекающихся значений первого и второго кластера и объединением групп правая и левая ободочная кишка относительно центральной линии. По вертикальной оси Y (решение дискриминантной функции 2) заметно незначительное объединение образцов из первого и третьего кластеров относительно вертикальной линии.

4.4.3. Результаты мультифакторного регрессионного анализа (IPMA) в оценке срока безрецидивной выживаемости (ВБПБ) у пациентов с КРР

В этом разделе работы мы поставили перед собой задачу оценить влияние не каждого имеющегося показателя экспрессии определенного гена из использованной нами панели в одном из образцов слизистой или аденокарциномы, а объединить их в группы по ключевым признакам, характеристикам или функциональным свойствам. И далее включить в модель эти группы, которые, эмпирически, могут оказывать неоднородное влияние на срок безрецидивной выживаемости (ВБПБ) у пациентов с КРР. На первом этапе нами были определены следующие группы (влияющие факторы), которые в модели принимали следующие значения:

- *Пол* - пол пациента («0» - женщина; «1» - мужчина);
- *ИМТ* - индекс массы тела (выражен десятичным числом);
- *TumBudding* - tumor budding, оценка почкования опухоли (0-3);
- *Kn* - соотношение числа метастатических лимфоузлов к общему числу удаленных (выражено десятичным числом);
- *АХТ* - факт проведения адъювантной полихимиотерапии (принимает значение «0», если таковая не проводилась и «1» - если использована);
- *Мутация RAS* - наличие точечной мутации в генах системы RAS («0» – «дикий» тип, «1» – мутированный тип);

- *HEO-XT* - факт проведения неoadьювантной полихимиотерапии (принимает значение «0», если таковая не проводилась и «1» - если использована);
- *HEO-ЛТ* - факт проведения неадьювантной лучевой терапии (принимает значение «0», если таковая не проводилась и «1» - если использована)
- *Мутация* - наличие любой точечной мутации в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* («0» - мутаций нет, «1» - мутация обнаружена)

Затем, на втором этапе, к этим 9 группам добавлены показатели экспрессии генов использованной панели в составе 8 групп, объединенных функциональными свойствами (**таблица 59**).

Таким образом, нами оценивалось влияние 17 факторов (групп) на целевую переменную, которой являлся срок безрецидивной выживаемости у пациентов с КРР в нашем исследовании.

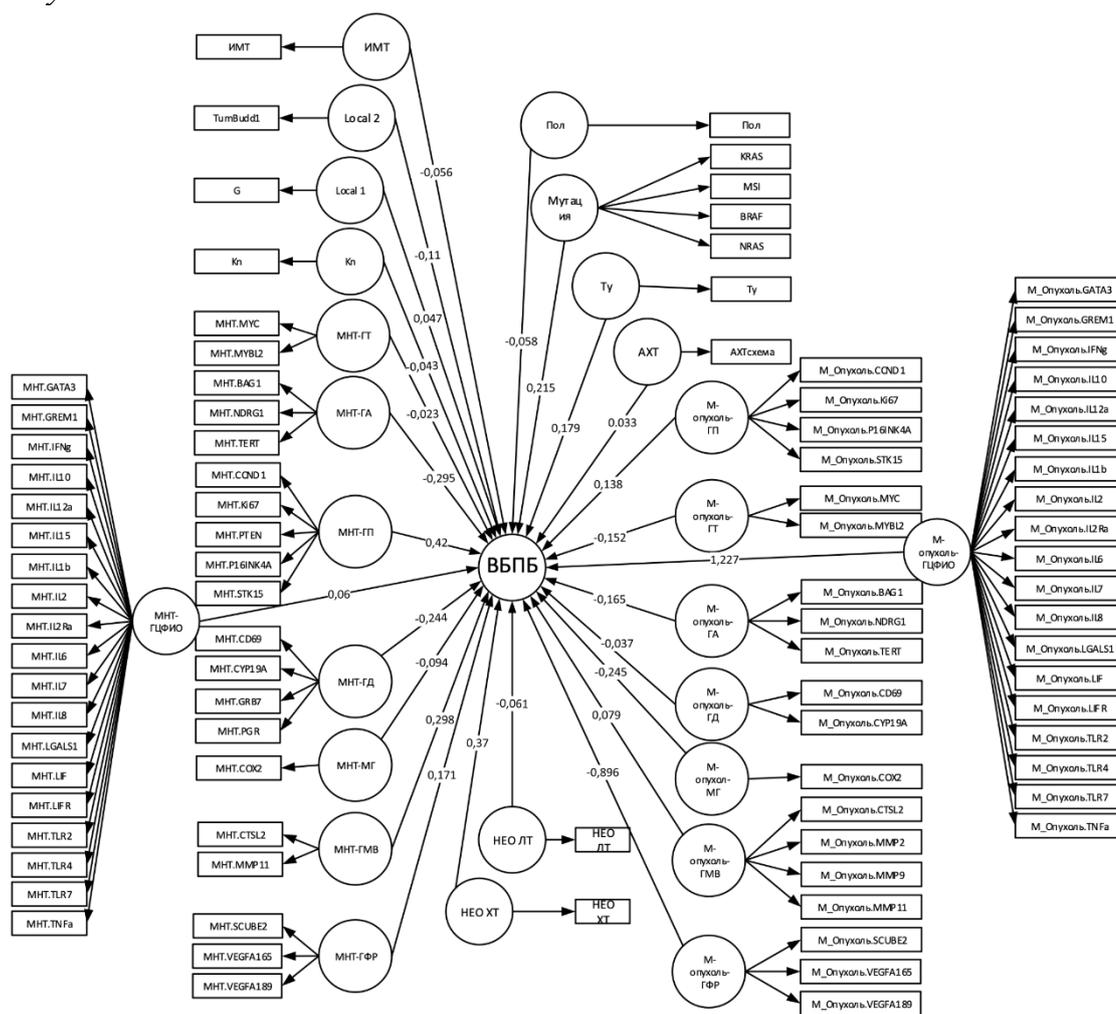
Таблица 59. Функциональные группы генов

	Наименование группы	Состав группы
1.	ГЦФИО	Гены цитокинов и факторов иммунного ответа
2.	ГМВ	Гены межклеточного взаимодействия
3.	ГТ	Гены транскрипции
4.	ГА	Гены апоптоза
5.	ГП	Гены пролиферации
6.	ГФР	Гены факторов роста
7.	МГ	Многофункциональные гены
8.	ГД	Гены дифференцировки

В этом разделе была использована регрессионная модель PLS-SEM с надстройкой IPMA, о чем уже подробно написано в разделе методов статистического исследования в Главе 2 «Материал и методы исследования». Описанная структурная модель протестирована в ряде экспериментов, в ходе которых анализировался наивысший достижимый показатель R-квадрат

зависимой переменной, которой мы считали безрецидивную выживаемость (ВБПБ) при используемых схемах связей и наборе латентных переменных: группы генов (8 групп) и дополнительные переменные (9 групп). Особое внимание было уделено составу наблюдаемых переменных, используемых в каждой латентной, что необходимо для удовлетворения требований к показателям надежности модели, которые будут описаны далее.

Рисунок 19. Структурная карта модели PLS-SEM с коэффициентами путей



Примечание: ВБПБ - безрецидивная выживаемость

Финальная модель с коэффициентами путей между латентными переменными и их веса представлены на **рисунке 19**. Латентные переменные обозначены эллипсами, в которых указаны их названия, а также R-квадрат для зависимой переменной. Наблюдаемые показатели указаны в прямоугольных блоках. На стрелках указаны коэффициенты путей β_{ji} , латентных

переменных. Направление стрелок от латентной переменной к ее индикаторам означает применение рефлексивного способа задания (применен для всех латентных переменных в модели).

Действительность модели основана на показателе AVE. В нашем случае все переменные после проведения экспериментов по оптимизации наборов наблюдаемых переменных вполне удовлетворяют этим требованиям (некоторые индикаторы стоят на границе указанных уровней, что, учитывая относительно небольшой набор выборки, можно считать приемлемым), **таблица 3** индикаторов качества модели представлена в Приложении.

В результате создания окончательной модели получены коэффициенты путей, показывающих влияние групп независимых переменных на зависимую. Они являются основным результатом моделирования и представлены для обеих исследуемых переменных в **таблице 60** в порядке убывания значимости.

Таблица 60. Значения коэффициентов путей латентных переменных для зависимой переменной «Срок безрецидивной выживаемости (ВРПБ)»

Ранг	Латентная переменная	Вес	Ранг	Латентная переменная	Вес
1	МНТ-ГП	-0.328	15	Кп	-0.070
2	опухоль-ГЦФИО	0.284	16	Мутация <i>Ras</i>	0.069
3	МНТ-ГА	-0.208	17	МНТ-ГФР	0.068
4	МНТ-ГД	0.179	18	М-опухоль-ГА	0.054
5	опухоль-ГП	0.177	19	НЕО ЛТ	0.054
6	МНТ-МГ	0.171	20	TumBudd1	0.037
7	НЕО ХТ	0.168	21	опухоль-МГ	-0.027
8	МНТ-ГЦФИО	0.166	22	Локализация КРР	0.022
9	МНТ-ГТ	0.128	23	Пол	0.020
10	опухоль-ГФР	0.110	24	МНТ-ГМВ	0.019
11	опухоль-ГТ	-0.094	25	опухоль-ГД	0.014
12	АХТ	0.091	26	G (дифференцировка)	-0.012
13	ИМТ	0.089	27	опухоль-ГМВ	0.001
14	Мутация	0.084			

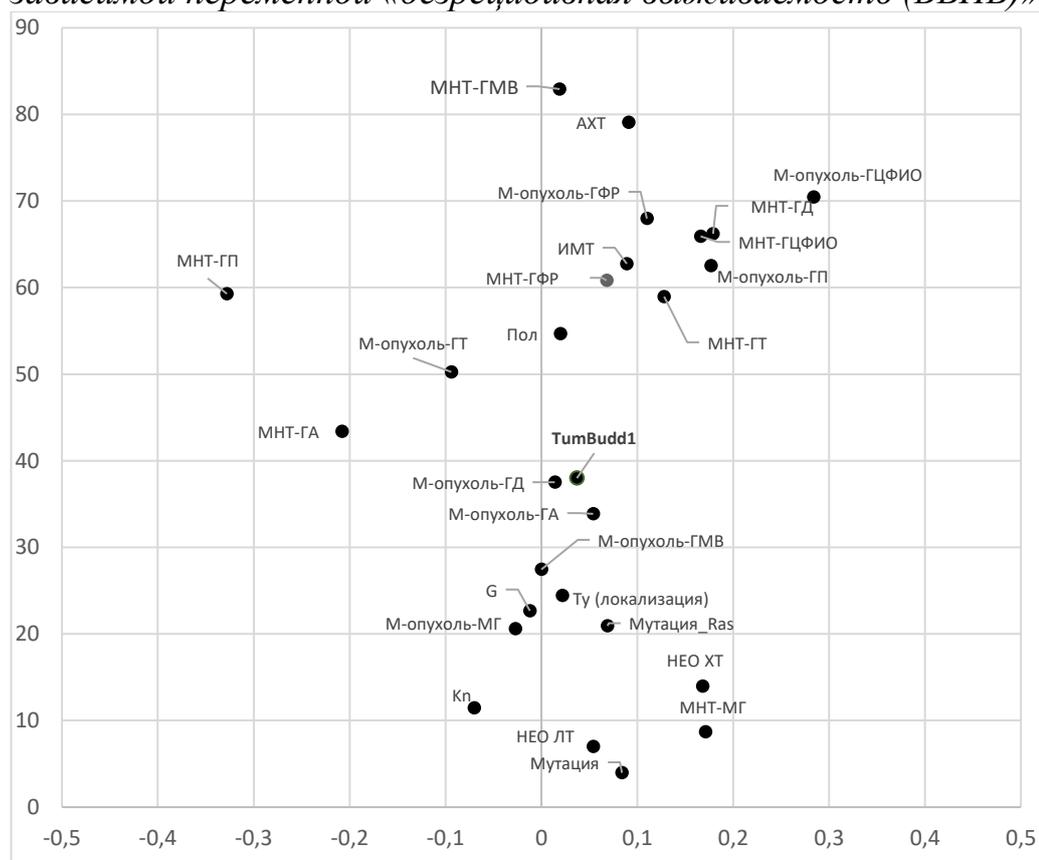
Примечание: МНТ_образцы неизменной слизистой; опухоль_образцы аденокарциномы

Применение метода IPMA позволяет более глубоко проанализировать влияние выделенных факторов (групп) на зависимую переменную. Хотя в

данном случае мы не можем говорить о потенциальных областях, на которые можно повлиять и отдать приоритеты (как, например, характер мутаций, опухолевое почкование, пол и т.д.), однако полученный результат все же позволяет несколько подробнее проанализировать значимость переменных и о том, какие именно их этих факторов (групп) оказывают больший прямой или обратный эффект на зависимую переменную.

Полученные результаты для исследуемых переменных представлены на **рисунке 20**. Из-за очень большого числа наблюдаемых переменных приведены рисунки только для латентных переменных. В любом случае, они фактически повторяют график латентных переменных. По оси x указаны значимости переменных (importance), а по оси y их производительность/влияние (performance).

Рисунок 20. Результаты IMPA для латентных переменных для зависимой переменной «безрецидивная выживаемость (ВРПБ)»



Резюмируя полученные данные, можно констатировать, что максимальное влияние на безрецидивную выживаемость 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 оболочки 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.

Нельзя исключить и влияние точечных мутаций на результаты лечения КРР в целом, однако модель демонстрирует слабый положительный коэффициент этого влияния.

Примечательно, что факт проведения неоадьювантной химиотерапии демонстрирует более высокий положительный коэффициент влияния на безрецидивную выживаемость на модели IPMA, хотя рандомизированными клиническими исследованиями не отмечено увеличение выживаемости при проведении неоадьювантной химиотерапии при опухолях ободочной кишки в II и III стадиях с факторами высокого риска, однако доказана их безопасность [171].

4.4.4. Оценка возможности использования дифференцированной лечебной тактики во II стадии КРР в зависимости от профиля экспрессии генов

В настоящий момент при выявлении II стадии КРР (pT3N0M0 и pT4N0M0) самым дискуссионным является вопрос о дифференцированной лечебной стратегии в отношении назначения адьювантной химиотерапии или отказа от нее в пользу наблюдения [119, 229]. Актуальные на момент написания работы Клинические рекомендации общества RUSSCO рекомендуют проведение АПХТ XELOX в течение 3 месяцев или FOLFOX в течение 6 месяцев у всех пациентов IIb-IIc стадии (pT4a-bN0M0), а также у пациентов IIa стадии КРР (pT3N0M0), имеющих 1 и более факторов риска (исключая G3 и/или лимфоваскулярную инвазию). У пациентов с pT3N0M0, имеющих такие факторы риска как G3 и/или лимфоваскулярная инвазия, лечебная тактика зависит от результатов определения микросателлитной нестабильности. При выявлении MSI-H пациенту рекомендуется динамическое наблюдение, как и при pT3N0M0 без факторов риска. В нашей работе мы решили проверить, существует ли различие в экспрессии панели генов в зависимости от наличия или отсутствия факторов риска. Чтобы убедиться в значимости факторов риска при II стадии КРР мы решили отдельно изучить молекулярные особенности в этой подгруппе. В нее вошло 65 пациентов нашей выборки. Распределение пациентов в зависимости от локализации опухоли по отделам кишки представлено в **таблице 61**.

Таблица 61. Распределение пациентов II стадии КРР по отделам толстой кишки

Локализация	Число пациентов	Кумул. Частота	Процент	Кумул. Процент
Правая ободочная	18	18	27,69231	27,6923
Левая ободочная	27	45	41,53846	69,2308
Прямая	20	65	30,76923	100,0000

В **таблице 62** представлена структура II стадии КРР в изучаемой подгруппе. 39 (60%) пациентов имели стадию IIa, которая и представляет максимальный интерес с точки зрения дифференцированного лечебного

подхода в отношении адъювантного лечения, а в **таблице 63** характер изучаемой подгруппы в зависимости от наличия морфологических факторов риска прогрессирования в операционном препарате и структуры II стадии.

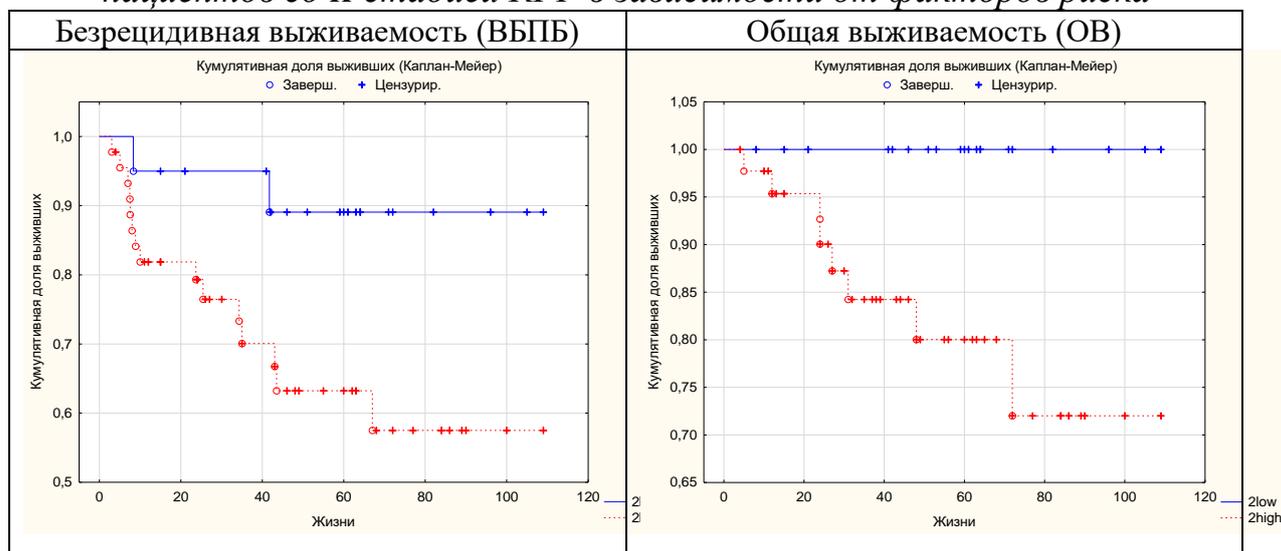
Таблица 62. Структура II стадии КРР в исследовании

стадия	Частота	Кумул. Частота	Процент	Кумул. Процент
IIA	39	54	60,00000	83,0769
IIB	15	15	23,07692	23,0769
IIC	11	65	16,92308	100,0000

Таблица 63. Структура II стадии и морфологические факторы риска прогрессирования КРР

	Стадия+риск	стадия IIB	стадия IIA	стадия IIC
Частота	Без факторов риска	3	12	5
% по строке		15,00%	60,00%	25,00%
Общий процент		4,62%	18,46%	7,69%
Частота	С наличием факторов риска	12	27	6
% по строке		26,67%	60,00%	13,33%
Общий процент		18,46%	41,54%	9,23%
Частота	Всего	15	39	11
Общий процент		23,08%	60,00%	16,92%

Рисунок 21. Общая (ОВ) и безрецидивная выживаемость (ВРПБ) пациентов со II стадией КРР в зависимости от факторов риска



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

Перед проведением исследования мы решили сравнить безрецидивную и общую выживаемость у пациентов II стадии КРР в зависимости от наличия

морфологических факторов риска (**рисунок 21**). Различия оказались статистически значимыми.

Продолжив работу, мы создали математическую модель на основе логистической регрессии, используя в качестве зависимой переменной факт наличия одного или нескольких факторов риска у пациентов II стадии КРР, а в качестве объясняющих переменных показатели экспрессии 225 образцов колоректальной аденокарциномы имеющейся панели генов канцерогенеза. Полученная математическая модель представлена в **таблице 64**.

Таблица 64. Результаты логистической регрессии. Целевая переменная «наличие факторов риска»

Ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность.
Константа	10.566	6.807	1.55	0.121
<i>MYC</i>	-6.029	2.839	-2.12	0.034
<i>BAG1</i>	-3.239	1.680	-1.93	0.054
<i>ESR1</i>	2.888	1.287	2.24	0.025
<i>STK15</i>	4.612	2.322	1.99	0.047
<i>PAPPA</i>	-1.028	0.507	-2.03	0.043
<i>IL1b</i>	-0.914	0.398	-2.29	0.022
<i>IFNg</i>	2.341	1.057	2.21	0.027
<i>CD56</i>	1.380	0.635	2.17	0.030
<i>CD69</i>	-2.866	1.343	-2.13	0.033
<i>HLA-G5</i>	0.443	0.229	1.93	0.053

В модель вошли показатели экспрессии 10 генов: *MYC*, *BAG1*, *ESR1*, *STK15*, *PAPPA*, *IL1b*, *IFNG*, *CD56*, *CD69*, *HLA-G5*. Они включают в себя все функциональные группы панели: транскрипции (*MYC*), апоптоза (*BAG1*), дифференцировки (*ESR1*, *CD56*, *CD69*), пролиферации (*STK15*), межклеточного взаимодействия (*PAPPA*), иммунного ответа (*IL1b*, *IFNG*, *HLA-G5*),

Классификационная матрица и прогностические меры модели наличия факторов риска у пациентов II стадии КРР представлены в **таблице 65**.

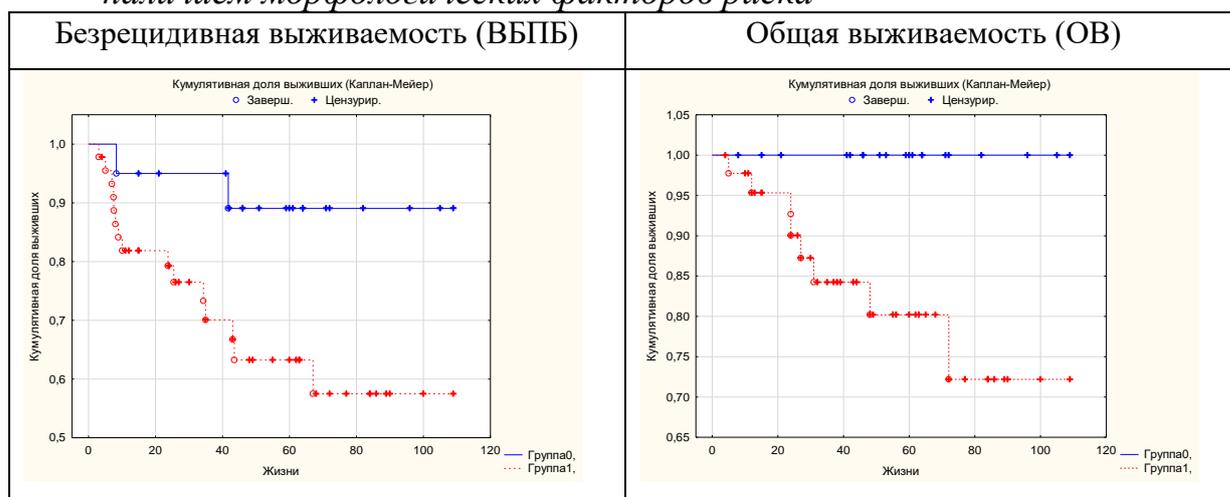
Показатели качества модели мы сочли удовлетворительными: McFadden $R^2=0.708$. Следует отметить, что точность прогнозирования наличия факторов риска оказалась выше (97,8%), чем их отсутствия (85%).

Таблица 65. Классификационная матрица. Прогностические меры ассоциации факторов риска и экспрессии ряда генов у пациентов II стадии КРР

наблюдаемый	Предсказанный		% правильных
	Факторы риска имеются	Без факторов риска	
Факторы риска имеются	44	1	97,8%
Без факторов риска	3	17	85,0%

Полученные данные требуют продолжения изучения для их валидации в проспективном исследовании. На наш взгляд, оптимизация лечебной стратегии будет реализована именно за счет разработки подобных прогностических систем, объективизирующих молекулярно-генетические предикторы риска прогрессирования.

Рисунок 22. 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)

На рисунке 22 представлена общая (ОВ) и безрецидивная выживаемость (ВБПБ) у пациентов КРР во II стадии в зависимости от экспрессионного профиля, связанного с наличием морфологических факторов риска. Различия оказались так же статистически значимыми, как и при сравнении групп риска, сформированных по результатам морфологического исследования препарата.

В заключение отметим, что обнаружение микросателлитной нестабильности является довольно редким явлением. Кроме того, для

колоректального рака также характерен четкий градиент, при котором частота MSI-H прогрессивно снижается от максимальной в слепой кишке до минимальной в опухолях прямой кишки [23], что затрудняет реализацию предложенной дифференцированной лечебной стратегии в этой подгруппе пациентов.

Считаем, что дальнейшие работы в этом направлении, в том числе создание прогностических систем, способных определять молекулярные факторы риска на основе молекулярно-генетических показателей, будут способствовать улучшению результатов лечения.

4.5. Возможности прогнозирования развития прогрессирования при колоректальном раке

Очевидно, что для обеспечения эффективного контроля за состоянием ремиссии после клинического излечения необходимо проводить профилактический мониторинг пациента, объем которого может существенно варьироваться как в сроках контрольных обследований, так и в наборе диагностических приемов. Выявление неблагоприятных предикторов течения КРР, прогнозирование его прогрессирования приобретают первостепенное значение и составляют основную задачу его третичной профилактики. В реальной практике с этой целью используется ряд прогностических моделей оценки вероятности прогрессирования КРР, построенных на различных принципах и с помощью математических методов.

В настоящее время отечественными и зарубежными авторами регулярно предлагаются разнообразные модели прогнозирования, основанные на использовании современных математических методов (нейросетевых моделей, моделей искусственного интеллекта, построения бинарных деревьев классификации, экспертных оценок и т. д.) в сочетании с расширением набора объясняющих переменных (характер точечных мутаций, микросателлитной нестабильности, изучение микроопухолевого

окружения и др.). Тем не менее, существует не так много математических моделей, которые прогнозировали бы вероятность развития прогрессирования КРР с высокой точностью. Кроме того, прогностическая способность модели может с течением времени меняться: методики эффективно могут применяться только в клиниках, для которых они были изначально разработаны. Зарубежные модели могут не учитывать специфику российской лабораторной диагностики, схем лечения, спектра препаратов и иметь меньшую точность предсказания. Применимость модели может также меняться в зависимости от уровня и квалификации учреждения здравоохранения и т.д. Данные обстоятельства обуславливают необходимость совершенствования эффективной методики прогнозирования течения КРР в отношении развития его прогрессирования. Очевидно также, что перспектива решения этой проблемы лежит в плоскости поиска надежных и воспроизводимых предикторов прогрессирования колоректального рака вне патоморфологической стадии, которая и сейчас, по сути, главным образом и определяет дифференцированный подход к лечению, несмотря на имеющиеся достижения.

Нами была поставлена задача разработки такой 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 т.д., так и на показателях экспрессии мРНК предложенной нами панели генов. Это позволило использовать в общей сложности 134 показателя в качестве объясняющих переменных для построения моделей. С целью проверки их прогностических способностей имеющаяся выборка пациентов была разделена случайным образом на две подвыборки: рабочую (в нее вошло 90% наблюдений), на которой

проводилось построение модели, и контрольную (она включала 10% наблюдений), на ней оценивалась вероятность прогнозирования по построенной модели. Процентные доли указанных подвыборок соответствуют общей практике, принятой в современной научной литературе. Расчет выполнен в программном пакете EViews версии 7.0. По результатам оценивания и на основе сравнения конкурирующих пробит- и логит-моделей по критерию коэффициента детерминации МакФаддена, а также информационных критериев Акаике и Шварца наиболее удачной оказалась логит-спецификация моделей.

4.5.1. Логистическая регрессия в прогнозировании безрецидивной выживаемости (ВБПБ)

Данный способ в области прогнозирования вероятности выживаемости имеет однозначную интерпретацию. Стоит отметить, что модели, построенные при помощи логистической регрессии, обладают наиболее высокой эффективностью, и если их сравнивать с дискриминантным анализом, то логистическая регрессия, как правило, дает лучшие результаты в отношении воспроизводимости и надежности.

Регрессионное уравнение представлено следующим образом:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-y}} \quad (1),$$

где P — вероятность развития прогрессирования КРР (принимает значение «0» — в случае если таковое развивается, или «1» при сохранении ремиссии в течение запланированного периода наблюдения (36 месяцев), e — основание натурального логарифма, y — уравнение регрессии.

Преимуществами логистической регрессии являются:

- учет нелинейной связи между вероятностью выживаемости и ее факторами;
- «зоны неопределенности» не появляются по результатам исследования;
- жесткие ограничения не требуются, как в случае многофакторного дисперсионного анализа;
- можно сделать однозначный вывод о вероятности развития рецидива КРР.

Недостатком данного метода является его чувствительность к мультиколлинеарности факторов.

Итоговое уравнение логит-регрессии, в общем виде, может быть представлено в следующем виде

$$y(\text{вероятность наступления прогрессирования КРР}) = \alpha_0 + \sum \alpha_i \times F_{\text{морфология}_i} + \sum \beta_i \times F_{\text{опухоль}_i} + \sum \gamma_i \times E_{\text{мутации}_i} + \sum \varepsilon_i \times F_{\text{мнт}_i}, (2)$$

Расшифровка переменных уравнения логистической регрессии представлено в **таблице 66**.

Таблица 66. Расшифровка переменных уравнения регрессии

Патоморфологические критерии, определяющие прогноз при КРР	
$F_{\text{морфология}_i}$	Объем опухоли, Отношение общего числа удаленных лимфоузлов к числу метастатических, проведение неоадьювантного лечения, проведение неоадьювантного лечения и т.д.
Результаты показателей экспрессии панели 62 генов из образцов КРР	
$F_{\text{опухоль}_i}$	<i>HLA.G5, CD56, IL2, LIF, GNLY</i> и т.д
Точечные мутации и микросателлитная нестабильность	
$E_{\text{мутации}_i}$	<i>KRAS, NRAS, BRAF, MSI</i>
Результаты показателей экспрессии панели 62 генов из проксимального края резекции (образцы морфологически неизменной слизистой при КРР)	
$F_{\text{мнт}_i}$	<i>HLA.G5, CD56, IL2, LIF, GNLY</i> и т.д
Зависимая переменная	
Y	Безрецидивная выживаемость в течении 36-месяцев от момента постановки диагноза КРР

4.5.2. Подготовка к построению модели: импутация и очистка данных

На первом, подготовительном, этапе весь имеющийся массив данных был подвергнут анализу пропущенных значений. Кроме того, данные были разделены на следующие 4 группы:

1 группа переменных - традиционные клинические патоморфологические критерии, которые могут определять прогноз при КРР: пропусков данных в этой группе не отмечено.

2 группа переменных - показатели экспрессии имеющейся панели из 62 генов участников сигнальных путей канцерогенеза из образцов колоректальной аденокарциномы: пропуски до 23%, 12 строк с большими комбинациями пропусков. Импутация возможна.

3 группа переменных - результаты анализа точечных мутаций *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и микросателлитной нестабильности MSI: пропуски около 50%, есть совсем пустые строки. Понадобилось удаление строк.

4 группа переменных - показатели экспрессии панели 62 генов канцерогенеза из образцов слизистой края резекции препарата (образцы неизменной слизистой оболочки толстой кишки): пропуски в некоторых переменных более 70%, есть совсем пустые строки. Необходимо удаление строк.

После изучения характера пропущенных данных нами предпринято проведение импутации для последующего построения прогностической логит-модели безрецидивной выживаемости при КРР на 36-месячном периоде наблюдения.

В работе были использованы два разных метода импутации:

1. Импутация средними значениями. Сущность ее состоит в том, что пропуски заполняются средними значениями (средним арифметическим или медианным значением). Нами в работе была использована медиана как более робастная величина. Плюсы этого подхода: импутированные значения носят наиболее типичный характер и не приводят к сильному смещению. Минусы: все пропущенные значения одинаковы, что может привести к ложному обобщению данных.

2. Импутация на основе машинного обучения. Сущность в том, что пропущенные значения находятся исходя из непропущенных значений для данного элемента. Хорошо зарекомендовал себя алгоритм k ближайших соседей (kNN, K-nearest neighbors algorithm). Для элемента выборки, имеющего пропущенное значение, находят k элементов, наиболее похожих

на него, и пропущенное значение определяется по значениям данной переменной у его соседей: например, как среднее арифметическое, как медиана, или как случайное из значений его соседей. В данном исследовании использовалось взвешенное среднее (более близкие соседи получают большие веса). Исходя из ограниченного объема имеющейся выборки, к принято считать равным 3. Плюсы такой импутации: импутированные значения берутся от наиболее похожих соседей. Минусы: при большом числе пропущенных переменных объекты будут очень похожи на своих соседей.

Таблица 67. Результаты импутации значений экспрессии генов панели образцов колоректальной аденокарциномы

ген	Число пропущенных значений	Импутированное значение
<i>HLA.G5</i>	52	23.963134
<i>LIF</i>	51	23.502304
<i>CD56</i>	46	21.198157
<i>GPLY</i>	41	18.894009
<i>IL2</i>	41	18.894009
<i>IGF2</i>	37	17.050691
<i>IL6</i>	34	15.668203
<i>GATA3</i>	32	14.746544
<i>LIFR</i>	31	14.285714
<i>LGALS1</i>	30	13.824885

Элементы выборки, имеющие большое число пропусков, не подлежат импутации, так как они в результате будут в основном искусственными. В нашем исследовании был принят такой подход: поскольку входящие переменные разделены на группы, которые подробно были описаны выше, то решение принималось по каждой группе. Если было пропущено более 1/3 переменных группы, строки в пределах данной группы очищались (полностью заполнялись пустыми значениями). Если пропусков меньше, они импутировались. Первая группа пропусков не имела, вторая группа полностью импутирована, третья и четвертая отчасти очищены.

Результаты импутации данных второй группы: показателей экспрессии мРНК имеющейся панели из 62 генов-участников сигнальных путей канцерогенеза из образцов колоректальной аденокарциномы представлены в **таблице 67**.

4.5.3. Анализ подготовленных данных. Создание прогностических математических моделей

На начальном этапе нами была создана первая логит-модель прогнозирования развития прогрессирования КРР в течение 36-ти месяцев после установки его диагноза на основании лишь данных первой группы массива (она включает клиничко-морфологические критерии риска прогрессирования КРР) **таблица 68**.

Таблица 68. Результаты логистической регрессии. Целевая переменная «прогрессирование КРР»

Объясняющие переменные	Коэффициент	Стандартная ошибка	z-статистика	вероятность
Дифференцировка (G)	-0.834489	0.368047	-2.267346	0.0234
Факторы риска	-2.444482	0.582805	-4.194337	0.0000
Лимфоузлы (Кп)	-1.511334	0.583617	-2.589598	0.0096
Возраст	0.047712	0.017803	2.680001	0.0074
локализация	0.724943	0.454279	1.595811	0.1105
С	0.332560	1.114196	0.298475	0.7653
		R ²		0.292908

Полученное регрессионное уравнение данной логит-модели получило следующий вид:

$$X2 (\text{прогрессирование}_{36_мес.}) = -0.83 * \text{дифференцировка} - 2.44 * \text{факторы_риска} - 1.51 * \text{лимфоузлы} + 0.0516 * \text{возраст} + 0.72 * \text{локализация} + 0.332$$

Где:

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 (K_n) - 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, поперечная ободочная кишка) и «0» при левосторонней (нисходящая ободочная, сигмовидная, прямая кишка);

0,332 - постоянный коэффициент в модели.

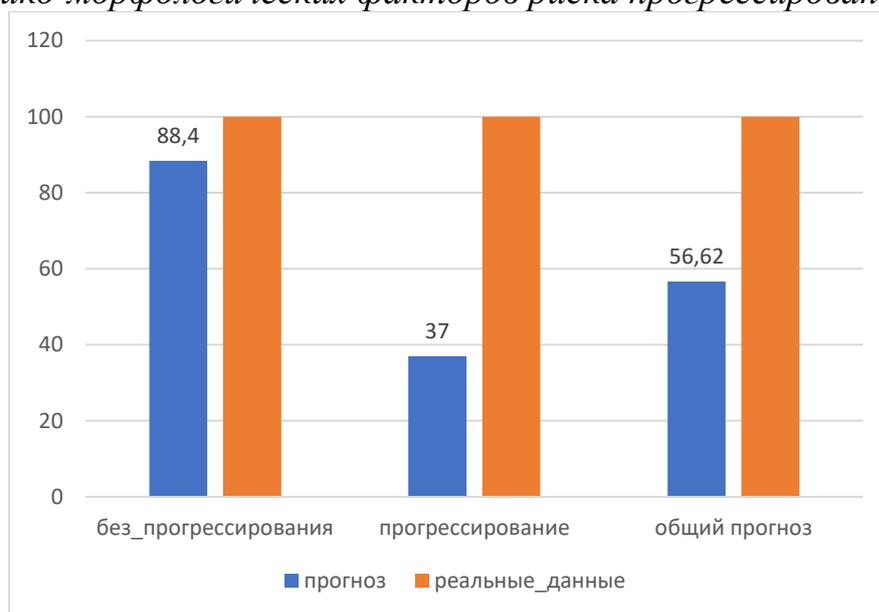
Показатель X_2 (*прогрессирование_36 мес.*) используется для нахождения вероятности возникновения прогрессирования КРР следующим образом: если $X_2 < 0$, то существует высокая вероятность возникновения рецидива заболевания в течение 36 месяцев от момента постановки диагноза. Коэффициент McFadden R-квадрат в этой модели составил 0,29. Этот показатель объясняет, что имеющиеся классические морфологические факторы риска, оцененные в результате изучения операционного препарата, такие как размер опухоли, дифференцировка, локализация по отделам толстой кишки, предсказывают вероятность прогрессирования КРР с достаточной точностью.

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. В **таблице 69** представлена матрица классификации этой прогностической модели, на **диаграмме 18** демонстрируется точность прогнозирования разработанной модели с включением патоморфологических факторов прогноза.

Таблица 69. Матрица классификации прогностической модели использованием клинико-морфологических факторов риска прогрессирувания КРР

	Фактические данные (число пациентов)	Верный прогноз (число пациентов)	Точность прогноза (%)
Без прогрессирувания	139	123	88,4 %
прогрессирувание	78	29	37%
Общая точность			56,62%

Диаграмма 18. Точность прогнозирования модели с использованием клинико-морфологических факторов риска прогрессирувания КРР



Общая точность этой модели, составляющая 56,62%, невысока, а точность прогноза у пациентов без развившегося прогрессирувания на изучаемом периоде наблюдения, равную 37%, мы расценили как неудовлетворительную и на следующем шаге работы дополнительно использовали в качестве объясняющих переменных имеющиеся данные о значениях экспрессии мРНК нашей панели генов из образцов колоректальной аденокарциномы.

В результате нами была создана прогностическая логистическая модель с использованием всех имеющихся у нас данных: 72 показателя из первой группы (клинико-морфологические данные) 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). Полученные результаты представлены в **таблице 70**.

Таблица 70. Прогностическая модель с использованием клинико-морфологических критериев риска и показателей экспрессии ряда генов панели

Предиктор\ген	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статистика	вероятность .
Факторы риска	-2.631111	0.657195	-4.003548	0.0001
Лимфоузлы (Кп)	-2.101045	0.679820	-3.090590	0.0020
возраст	0.050320	0.019404	2.593334	0.0095
Дифференцировка (G)	-1.028091	0.415533	-2.474153	0.0134
<i>CCNB1</i>	0.535019	0.207419	2.579411	0.0099
<i>Ki67</i>	-0.511469	0.276974	-1.846634	0.0648
<i>GRB7</i>	-0.456156	0.185794	-2.455168	0.0141
<i>IGF1</i>	-0.196378	0.079666	-2.465027	0.0137
<i>IL2</i>	-0.245648	0.100843	-2.435952	0.0149
<i>IL6</i>	0.202048	0.092241	2.190427	0.0285
<i>IL8</i>	-0.234825	0.094272	-2.490925	0.0127
<i>GATA3</i>	0.333421	0.174847	1.906929	0.0565
C	11.04682	3.481664	3.172857	0.0015
		R ²		0.403060

Таким образом, итоговое регрессионное уравнение получило следующий вид:

$$\begin{aligned}
 X2 \text{ (прогрессирование_36_мес.)} = & \\
 & 0.54*CCNB1 - 0.51*Ki67 - 0.46*GRB7 - 2.63*\text{факторы_риска}- \\
 & 2.1*\text{лимфоузлы} + 0.05*\text{возраст} - 0.2*IGF1- \\
 & 1.03*\text{дифференцировка} - 0.25*IL2 + 0.2*IL6 - 0.24*IL8 + \\
 & 0.33*GATA3 + 11.05
 \end{aligned}$$

Где:

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 (Кп) - соотношение числа метастатических лимфоузлов к общему числу удаленных;

Возраст - возраст пациента, равный полному числу лет;

CCNB1, Ki67, GRB7, IGF1, IL2, IL6, IL8, GATA3 – относительный уровень экспрессии мРНК соответствующего гена в опухоли;

11,05 - постоянный коэффициент в модели.

Как и в модели с использованием только клинико-морфологических характеристик аденокарциномы, показатель *X2 (прогрессирование_36_мес.)* используется для нахождения вероятности возникновения прогрессирования КРР точно таким же образом: если $X2 < 0$, то существует высокая вероятность возникновения рецидива заболевания в течение 36 месяцев от момента постановки диагноза. Коэффициент McFadden R-квадрат 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*. Матрица классификации этой прогностической модели представлена в **таблице 71**.

Таблица 71. Матрица классификации прогностической модели с использованием клинико-морфологических данных и значений экспрессии генов панели

	Фактические данные (число пациентов)	Верный прогноз (число пациентов)	Точность прогноза (%)
Без прогрессирования	139	120	86,3 %
прогрессирование	78	55	70,5%
Общая точность			80,6%

Диаграмма точности прогноза и ROC-кривая этой модели с использованием клинико-морфологических предикторов риска и значений экспрессии мРНК ряда генов панели представлены на **диаграмме 19** и **рисунке 23**. Общая точность классификации по представленной модели составила 80,6%. Особо отметим, что точность прогнозирования у пациентов без прогрессирования существенно повысилась с 37% до 70,5%.

Диаграмма 19. Точность прогнозирования модели с использованием клинико-морфологических показателей и значений экспрессии ряда генов

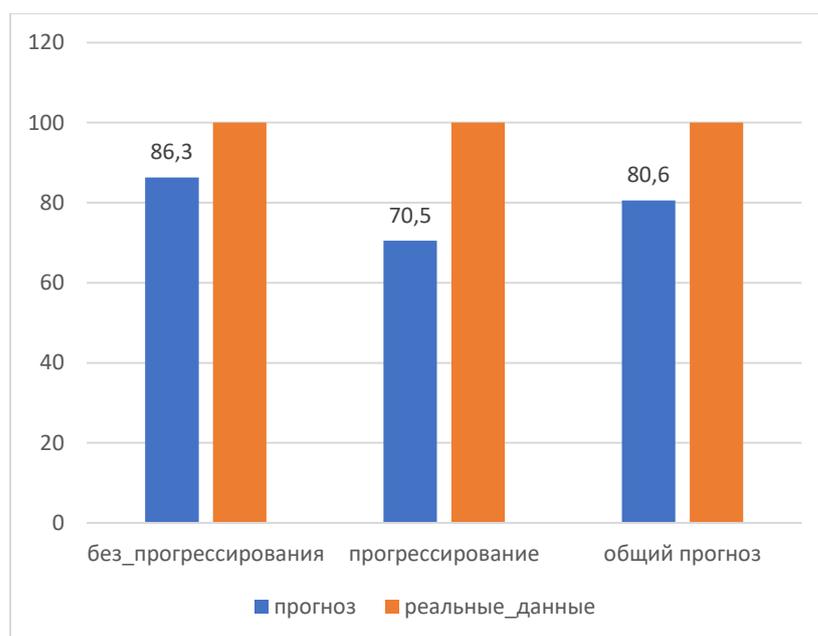
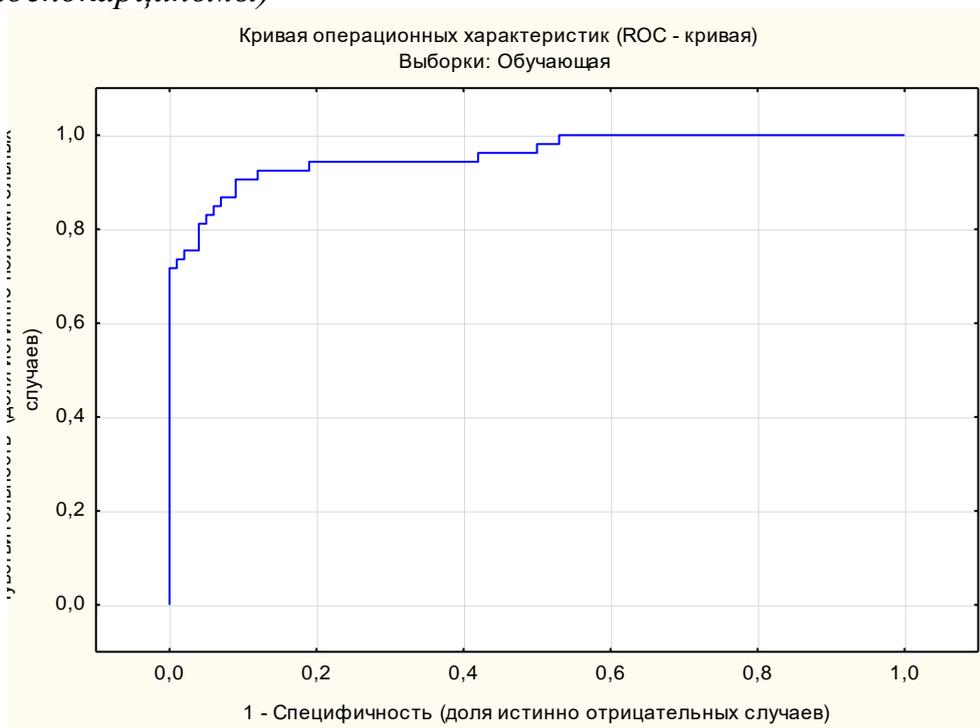


Рисунок 23. ROC-кривая прогностической модели (клинико-морфологические данные и показатели экспрессии в образцах аденокарциномы)



Следующим этапом работы явилось определение критических значений переменных, вошедших в прогностическую модель, а также, что, по сути, является самым важным в нашей работе, проверка на значимость

выявленных критических значений изучаемых переменных, которыми являются важнейшие клинико-морфологические характеристики КРР, а также значения экспрессии мРНК ряда генов использованной панели генов-участников сигнальных путей канцерогенеза.

Оценка моделей, построенных на данных 1-й (клинико-морфологические характеристики) и 2-й (значения экспрессия 62 исследованных генов канцерогенеза в образцах опухоли) групп.

Для оценки предсказательных возможностей нелинейных моделей использовались «случайные леса», особенностью которых является возможность прогнозирования «out-of-bag», при котором значение выходного показателя каждого элемента обучающей выборки предсказывается только теми из деревьев, в обучающем бутстреппе которых не было данного элемента. Это исключает элемент переобучения, при котором модель может запомнить нужное значение, и позволяет произвести оценку прогнозирования без использования тестового множества.

Леса деревьев решений по 1000 деревьев в каждом строились по 5 раз с выбором модели, показавшей лучшие метрики.

Поскольку в моделях были использованы разные объемы выборки, их рейтинг был построен по показателю «каппа Коэна», учитывающего превышение предсказательных возможностей моделей по сравнению с константной моделью.

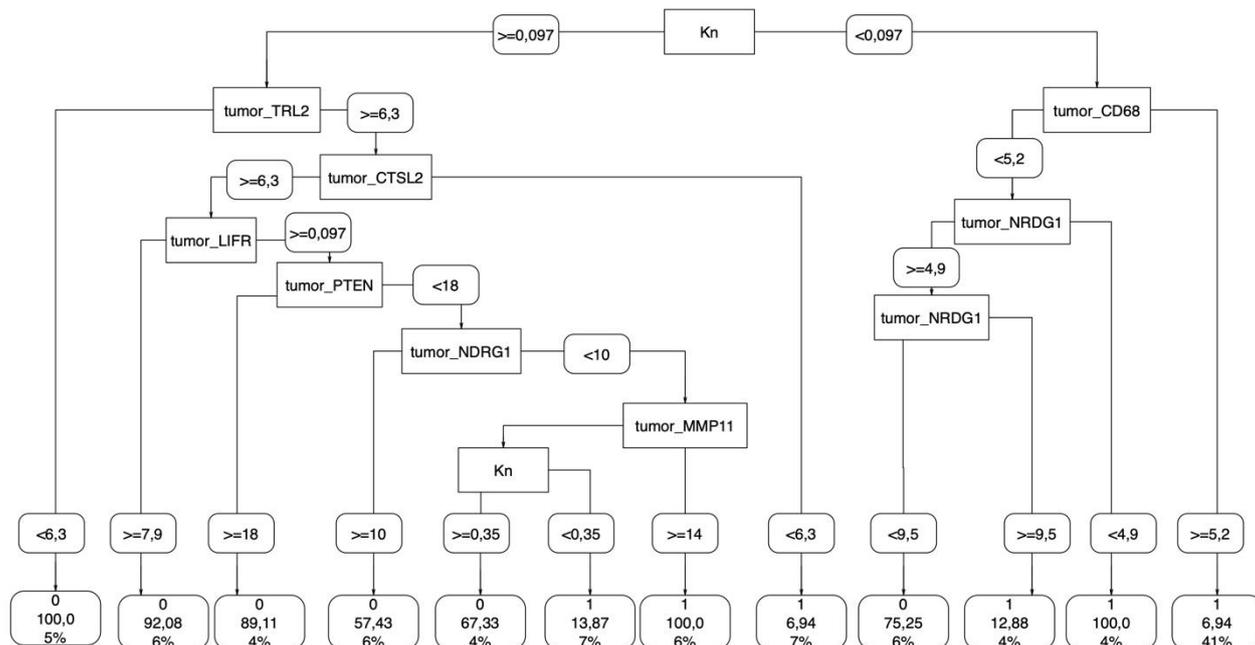
Цветом в **таблице 72** выделены лучшие модели, использующие данные обеих группы. Кроме того, нами были использованы две целевые переменные: «прогрессирование» - наличие или отсутствие прогрессирования КРР в течение всего периода наблюдения и «прогрессирование_36_мес.» - наличие или отсутствие прогрессирования КРР в течение первых 36 месяцев с момента установки диагноза, что мы сочли более важным с практической точки зрения. В **таблице 74** представлена общая характеристика построенных моделей.

Таблица 72. Общая характеристика построенных предиктивных моделей «случайных лесов»

Группа переменных	Метод работы с пропусками	Целевая переменная	Число элементов выборки	Метрики лучшей модели "случайных лесов"		
				Каппа Коэна	Accuracy	NIR
1	импутация медианой	<i>прогрессирование_36_мес.</i>	216	0,38871834	0,72685185	0,643518519
1	импутация kNN	<i>прогрессирование_36_мес.</i>	216	0,38871834	0,72685185	0,643518519
1	удаление элементов	<i>прогрессирование_36_мес.</i>	173	0,34650588	0,69942196	0,647398844
1+2	импутация kNN	<i>прогрессирование_36_мес.</i>	216	0,33225217	0,71759259	0,643518519
1+2	импутация медианой	<i>прогрессирование_36_мес.</i>	216	0,31916624	0,71296296	0,643518519
1	импутация медианой	<i>прогрессирование</i>	217	0,26448988	0,72350230	0,718894009
1	импутация kNN	<i>прогрессирование</i>	217	0,25650982	0,72350230	0,718894009
2	удаление элементов	<i>прогрессирование</i>	91	0,13937282	0,79120879	0,769230769
1	удаление элементов	<i>прогрессирование</i>	173	0,13711798	0,68208092	0,716763006
1+2	импутация kNN	<i>прогрессирование</i>	217	0,13032061	0,73271889	0,718894009
1+2	импутация медианой	<i>прогрессирование</i>	217	0,10557106	0,71428571	0,718894009
1+2	удаление элементов	<i>прогрессирование_36_мес.</i>	74	0,09545983	0,71621621	0,72972973
2	импутация kNN	<i>прогрессирование_36_мес.</i>	216	0,08455420	0,625	0,643518519
1+2	удаление элементов	<i>прогрессирование</i>	74	0,08175182	0,77027027	0,756756757
2	удаление элементов	<i>прогрессирование_36_мес.</i>	90	0,07216494	0,73333333	0,733333333
2	импутация медианой	<i>прогрессирование_36_мес.</i>	216	0,07023622	0,62037037	0,643518519
2	импутация медианой	<i>прогрессирование</i>	217	0,03637132	0,70967741	0,718894009
2	импутация kNN	<i>прогрессирование</i>	217	0,032225579	0,714285714	0,718894009

На рисунке 24 представлена первая из двух отобранных нами моделей «случайный лес». В таблице 73 приведена матрица ошибок этой модели.

Рисунок 24. модель 1 («случайный лес»). Метод работы с пропусками: импутация kNN. Число образцов: 216



Из 77 элементов со значением «0» верно предсказаны 33 значения, или 42,9% (показатель Полнота для класса 0). Из 139 элементов со значением «1» верно предсказаны 122 значения, или 73,1% (показатель Полнота для класса 1). Каппа Коэна – 0,3323.

Таблица 73. Матрица ошибок. Группы 1 и 2. Целевая переменная: «прогрессирование_36_мес.». Метод работы с пропусками: импутация kNN.

		фактические значения выходной переменной «прогрессирование_36_мес»	
		0	1
Прогнозируемые значения выходной переменной «прогрессирование_36_мес»	0	33	17
	1	44	122

Данная модель оценивает влияние соотношение числа метастатических лимфатических узлов в операционном препарате к общему числу удаленных и определяет критическое значение этого коэффициента. На рисунке 24 этот показатель обозначен как «Kn». 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 Т по системе TNM. Однако, наряду непосредственно с количеством и характером пораженных лимфоузлов, можно предположить важное влияние 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. Они характеризуются высокой степенью фенотипической и функциональной гетерогенности под влиянием локального опухолевого микроокружения. TAM с противовоспалительной активностью модулируют микроокружение, способствуют росту опухоли, ее инвазии и метастазированию. Они также стимулируют ангиогенез, резистентность опухоли к химио- и радиотерапии и создают условия избегания опухолью иммунного надзора. TAM в аденокарциноме, как правило, имеют статус альтернативно активированных макрофагов, секретирующих противовоспалительные цитокины, интерлейкин-10, простагландин E2 и экспрессирующих CD206 и CD163-рецепторы, а также CCL2-, CCL17- и CCL22-хемокины, участвующие в привлечении регуляторных Т-клеток. Данные клинических и экспериментальных исследований свидетельствуют о связи высокой плотности TAM в опухоли с неблагоприятным прогнозом для пациентов [3].

На **рисунке 25** представлена вторая отобранная нами предиктивная модель, построенная методом случайных лесов. Она выявляет неоднородность влияния на прогрессирование КРР патоморфологических

факторов риска, оцениваемых при исследовании операционного препарата (целевая переменная «факторы риска»).

Таблица 74. Матрица ошибок. Группы 1 и 2. Целевая переменная: «прогрессирование_36_мес.» Метод работы с пропусками: импутация медианой.

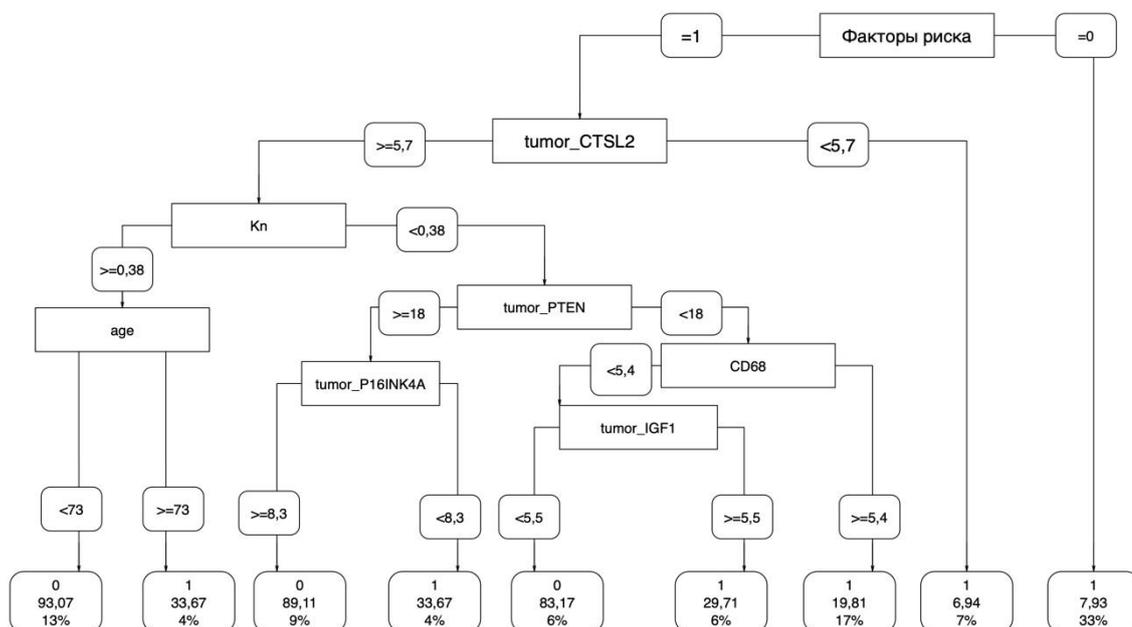
		фактические значения выходной переменной «прогрессирование_36_мес»	
		0	1
Прогнозируемые значения выходной переменной «прогрессирование_36_мес»	0	32	17
	1	45	122

В нашем исследовании мы использовали факторы риска по критериям NCCN: наличие кишечной непроходимости, перфорации, ангиолимфатической (IMV) или периневральной инвазии (LMV), низкая дифференцировка опухоли, менее 12 лимфоузлов в удаленном препарате. В **таблице 74** представлена матрица ошибок отобранной модели.

Из 77 элементов со значением «0» верно предсказаны 32 значения, или 41,6% (показатель Полнота для класса 0). Из 139 элементов со значением «1» верно предсказаны 122 значения, или 73,1% (показатель Полнота для класса 1). Каппа Коэна – 0,3192.

Модель определяет, что даже при наличии факторов риска снижение уровня экспрессии гена *CTSL2* в аденокарциноме способствует улучшению прогноза КРР, вероятно, за счет активации апоптоза. О его вовлечении в опухолевые процессы неоднократно указывалось в литературе [266]. А далее слабое влияние на прогноз, при наличии метастатических лимфоузлов, будет оказывать увеличение экспрессии генов *PTEN* и *CD68*, что может свидетельствовать о стимуляции апоптоза через работу онкосупрессора *PTEN* и стимуляции активности тканевых макрофагов через гиперэкспрессию *CD68*.

Рисунок 25. Предиктивная модель 2 («случайный лес»). Метод работы с пропусками: импутация медианой. Число образцов: 216



Мы предполагаем, что именно эти модели лучшим образом будут описывать нелинейное влияние на безрецидивную выживаемость (ВРПБ) при КРР множества клинико-морфологических и генетических характеристик аденокарциномы, формирующих ее собственную биологию и связанный с ней прогноз.

4.5.4. Определение критических значений показателей экспрессии мРНК генов, формирующих прогностическую модель течения КРР

Для решения задачи определения критических значений показателей экспрессии мРНК генов, являющихся объясняющими переменными в разработанной нами прогностической математической модели прогрессирования КРР, с помощью техники «бинарного дерева классификации» были построены отдельные деревья решений. Их анализ позволяет выявить наиболее значимые правила, обладающие высокой поддержкой и достоверностью, и таким образом определить критические

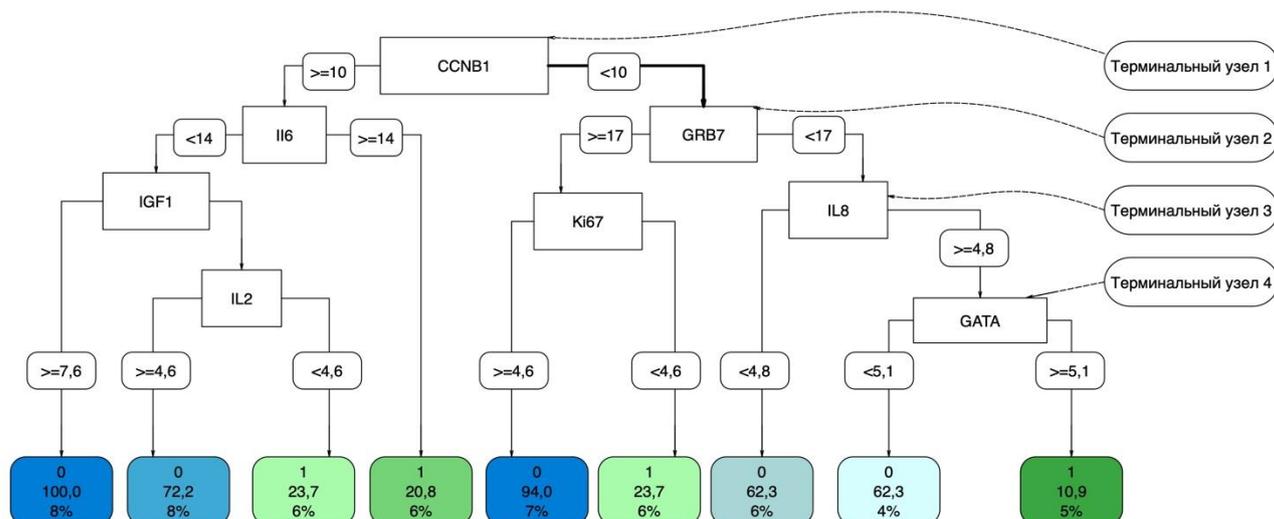
значения влияющих переменных: клинико-морфологических предикторов прогноза и показателей экспрессии мРНК генов-участников прогностической модели. Для этого использован внутренний инструмент «случайных лесов»: значимость переменной определяется по тому, насколько уменьшается доля верно распознанных значений (Accuracy) при случайных перестановках значений данной переменной. Считается, что чем более снизятся метрики модели при замене значения переменной на другие, тем большее значение она имеет для хорошего прогноза.

На **рисунке 26** представлена модель «бинарного дерева классификации» для определения критических значений показателей экспрессии ряда генов из окончательной прогностической модели.

Техника «бинарного дерева классификации» применима для анализа сложных взаимодействий между факторами. Эта модель также признает, что выбранные переменные могут оказывать нелинейное влияние на возможность развития прогрессирования КРР: любое увеличение (уменьшение) ключевого показателя необязательно увеличивает (уменьшает) вероятность возникновения прогрессирования до тех пор, пока значение индикатора не пересекает некий порог, определяемый моделью. Каждый «узел» бинарного дерева при разбиении имеет только двух потомков, называемых «дочерними узлами».

На каждом шаге построения дерева правило, формируемое в «узле», делит заданное множество примеров на две части. Правая его часть – это та часть множества, в которой правило выполняется; левая – та, для которой правило не выполняется. Для нашего случая заданное правило – отсутствие прогрессирования в течение 36 месяцев от момента установки диагноза колоректального рака в локализованной стадии. Этот процесс продолжается до тех пор, пока дальнейшее разделение станет невозможным. Базовое дерево имеет четыре терминальных «узла» (**рисунок 26**).

Рисунок 26. Модель «бинарного дерева классификации». Целевая переменная: «прогрессирование_36_мес.». Метод работы с пропусками: импутация kNN. Число образцов: 216



Терминальный узел 1 (уровень экспрессии *CCNB1* в опухоли <10) представляет состояние пациента, при котором процентное соотношение риска прогрессирования и его отсутствия составляет 27% и 73% соответственно. Фактически, если уровень экспрессии *CCNB1* в опухоли меньше 10, то условно можно считать риск возникновения прогрессирования равным 27%. Попадая в терминальный «узел» 2 (где оценивается уровень экспрессии в опухоли гена *GRB7* с пороговым значением <17) соотношение риска прогрессирования и его отсутствия составляет уже 40% и 60% соответственно.

Следует отметить, что и логистическая регрессия, и техника «бинарного дерева классификации» выделили уровень экспрессии гена *GRB7* в опухоли как значимый показатель, влияющей на возможность развития прогрессирования при КРР.

Терминальный «узел» 3 (определяемый уровнем экспрессии гена *IL8* $\geq 4,8$) определяет уже гораздо меньший риск прогрессирования, чем предыдущие узлы. Пациент с КРР при данных условиях имеет риск прогрессирования, равный 38%.

Терминальный «узел» 4 оценивает уровень экспрессии в опухоли гена *GATA3*. При этом соотношение пациентов с прогрессированием и без такового составляет 10% и 90% соответственно. Для попадания в данный «узел» уровень экспрессии в опухоли гена *GATA3* должен составлять $\geq 5,1$ (таблица 76).

Адекватность окончательной модели проверена нами с помощью построения рейтинга переменных. Результаты, полученные таким способом, могут быть использованы для прогнозирования течения колоректального рака.

Таблица 75. Критические значения переменных прогностической модели

Переменная в модели	Критическое значение
Лимфоузлы (Кп)	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 (Кп) - соотношение числа метастатических лимфоузлов к числу удаленных;

CCNB1, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* – уровни экспрессии соответствующего гена в опухоли.

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. Таким образом, разработанные модели показали довольно высокие результаты прогнозирования его течения.

4.5.5. Проверка качества прогностической математической модели прогрессирования КРР в локальных стадиях

Для проверки значимости выявленных нами на предыдущих этапах работы критических значений влияющих переменных была использована техника «Dumtuy» путем формирования в рабочем массиве данных 9 новых бинарных переменных (согласно количеству переменных модели), которые принимали значение «1», если показатель был выше критического значения, и «0», если он был ниже. С полученными таким образом dumtuy-переменными была сформирована проверочная логит-модель (таблица 76).

Таблица 76. Проверочная модель (dumtuy-переменные)

Переменная	Коэффиц	Стандартн ошибка	z-статист	вероятность
Дифференцировка (G)	-0.908411	0.388693	-2.337089	0.0194
Факторы риска	-2.652153	0.592843	-4.473619	0.0000
Лимфоузлы (Кп)	-1.356015	0.618746	-2.191552	0.0284
возраст	0.054661	0.018659	2.929468	0.0034
CCNB1	0.824629	0.432745	1.905578	0.0567
GRB7	-0.360402	0.156898	-2.297045	0.0216
IGF1	-0.876811	0.431723	-2.030959	0.0423
IL2	-0.247288	0.097625	-2.533040	0.0113
IL6	1.166503	0.708369	1.646746	0.0996
IL8	-0.168560	0.078034	-2.160095	0.0308
GATA3	1.751615	0.451944	3.875735	0.0001
C	8.209439	3.093775	2.653535	0.0080
		R-квадрат		0.344385

Где:

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 (Кп) - соотношение числа метастатических лимфоузлов к общему числу удаленных в операционном препарате;

Возраст - возраст пациента, равный полному числу лет;

CCNB1, Ki67, GRB7, IGF1, II2, II6, II8, GATA3 – значения относительного уровня экспрессии соответствующего гена в аденокарциноме;

11,05 - постоянный коэффициент в модели.

Эти результаты могут использоваться как эффективное дополнение к существующим методикам оценки риска прогрессирования у пациентов с КРР в локализованных стадиях. Данный подход позволит, с одной стороны, более эффективно реализовать на практике меры его третичной профилактики, формируя фокусную группу пациентов высокого риска прогрессирования, где возможно эффективное лечение при условии своевременной диагностики. С другой стороны, стратификация риска прогрессирования может объективизировать показания к проведению адьювантной химиотерапии при II патоморфологической стадии и поможет оценить эффективность комбинированного лечения колоректального рака в целом.

Однако, как ранее в работе нами было показано, КРР отличается значительной биологической гетерогенностью, при этом классические клиничко-морфологические факторы риска в локальных стадиях определяют его прогноз прогрессирования с точностью до 56,62%. Это обстоятельство заставляет продолжать исследования, направленные на поиск дополнительных предикторов оценки его течения за пределами патоморфологической стадии. Основным источником необходимой информации, на наш взгляд, и является молекулярно-генетический пейзаж опухоли и ее окружения, включающий собственную характеристику колоректальной аденокарциномы и оценку слизистой толстой кишки как единого органа вовлеченного в системный процесс канцерогенеза. Такие меры в составе комплексного подхода к диагностике и лечению будут способствовать улучшению результатов борьбы с колоректальным раком.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблемы диагностики и лечения колоректального рака по-прежнему актуальны ввиду 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. При этом удельный вес пациентов в локальных стадиях (0-III), биологические образцы которых и были объектом нашего исследования, не изменился [9]. Подобные эпидемиологические показатели подчеркивают, что задача своевременного выявления колоректального рака окончательно не решена.

Приступая к данной работе, мы исходили из того, что современная онкология различает три вида активной профилактики спорадического колоректального рака: первичную, вторичную и третичную. Первичная профилактика напрямую связана с увеличением и сохранением в популяции факторов риска его возникновения: ожирения, курения, характера питания с преобладанием в диете переработанного красного мяса, увеличения продолжительности жизни, наличия аденом и других. Хотя она как таковая не рассматривается в нашей работе, но нельзя не отметить, что эти факторы риска у будущего пациента полностью не исчезнут при возникновении КРР и продолжат системно влиять на заболевание.

Основными задачами вторичной и третичной профилактики при стартовавшем процессе канцерогенеза являются, соответственно, своевременное выявление предраковых заболеваний и самой колоректальной аденокарциномы, а также потенциальной метастатической болезни.

Приблизиться вплотную к решению этих задач мы можем, оценивая патологические изменения, происходящие в слизистой оболочке толстой кишки как системные. Следует учитывать, что сама по себе толстая кишка является как анатомически, так и фенотипически неоднородной. Причиной

этого является вовлечение всех трех зародышевых листков в ее эмбриогенез. Начиная с процесса гастрюляции, 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. Естественное ассиметричное строение толстой кишки в эмбриональном периоде ее развития обусловлено контролируемыми изменениями уровней экспрессии паттерна генов. Эти обстоятельства позволяют считать отделы толстой кишки не просто анатомическими, а эмбрионально-анатомическими, чему мы постоянно находили подтверждения в процессе выполнения работы. Результаты молекулярно-генетических исследований позволяют лучше понять закономерности канцерогенеза и развития прогрессирования при КРР, поскольку эмбриональные клетки человека демонстрируют фенотипическое сходство с аденокарциномой.

С течением времени накопление этих знаний привело к появлению систем молекулярной диагностики КРР. Но отметим, что, несмотря на многочисленные исследования, в настоящее время для этих целей существуют только две одобренные диагностические системы исследования образцов кала на основе метилирования: Epi proColon и Cologuard [231]. Также разрабатываются диагностические тесты на основе оценки метилированной ДНК в плазме крови [337]. Однако сегодня основными (и массовыми) методами диагностики патологии толстой кишки 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. Эти обстоятельства определяют неопределенный прогноз течения колоректального рака, а значит сложный выбор оптимальной стратегии лечения и последующего наблюдения. Такие проблемы особенно актуальны при второй стадии КРР: при $pT_3N_0M_0$ и в сочетании с «факторами риска прогрессирования». Нельзя не отметить, что система TNM имеет клинко-морфологические показатели, выделяющие группу «высокого риска прогрессирования» при колоректальном раке: дифференцировку опухоли, лимфоваскулярную инвазию, кишечную непроходимость, наличие перфорации или положительного края резекции и т.д. Кроме того, опубликованы данные, что отдаленные результаты лечения IIВ/IIС стадии часто хуже, чем IIIС [234]. В этой связи практическая необходимость оценивать риск прогрессирования КРР для сравнительного изучения эффективности стратегий лечения, дифференцированного подхода к их использованию и своевременного выявления метастатической болезни привела к поиску новых характеристик аденокарциномы вне патоморфологической стадии. И здесь основная роль принадлежит молекулярно-генетическим исследованиям, которые, бурно развиваясь, не ограничились изучением непосредственно самой опухоли, но распространились на ее окружение. Быстро выяснилось, что участки морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки при колоректальном раке имеют существенные фенотипические отличия от нормы, а значит гистологическая «нормальность» совсем не означает «нормальность» биологическую. Стало ясно, что понимание молекулярных различий между прилегающими к опухоли и здоровыми тканями может

непосредственно выявить механизмы, используемые опухолью для взаимодействия со своим окружением.

Изучение опухолевого микроокружения началось в далеком 1953 году с тех пор, как Slaughter et al. [284] впервые описали теорию «опухолевого поля», предполагающую кумулятивный процесс канцерогенеза, при котором генетические изменения приобретаются поэтапно, оставляя слизистую вне опухоли в промежуточном, предопухолевом состоянии, состоящем из морфологически нормальных, но молекулярно измененных клеток. Однако толчок к развитию это направление получило значительно позже лишь совместно с развитием молекулярно-генетических технологий. Начиная исследование, мы опирались на все вышесказанное, что и предопределило выполнение данной работы.

Целью исследования явилась реализация возможностей дифференцированного подхода к лечению и профилактике прогрессирования колоректального рака на основе определения молекулярно-генетических показателей различных эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки

Для достижения поставленной цели в работе были решены следующие задачи: изучен экспрессионный статус морфологически неизменной слизистой эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки в норме, при возникновении гиперпролиферативных изменений в ней и при развитии колоректального рака; выявлены молекулярно-генетические особенности колоректальной аденокарциномы, связанные с ее расположением в различных эмбрионально-анатомических отделах толстой кишки; расширены возможности выявления патологических изменений слизистой толстой кишки на основе исследования экспрессионного профиля клеточного материала слизистой прямой кишки; уточнено влияние соматических мутаций генов семейства *RAS* на молекулярный фенотип колоректального рака в локальных стадиях; изучена взаимосвязь клинико-

морфологических и молекулярно-генетических характеристик аденокарциномы с отдаленными результатами лечения КРР для прогнозирования риска его прогрессирования; проведена объективная стратификация риска прогрессирования колоректального рака, разработаны математические прогностические модели и проведена кластеризация полученных данных с формированием молекулярных фенотипов на основании изучения морфологических данных, экспрессионного и мутационного профиля опухоли; определены критические значения показателей экспрессии мРНК генов, формирующих прогностическую математическую модель прогрессирования колоректального рака; разработаны предложения и рекомендации по совершенствованию третичной профилактики КРР на основе использования разработанных клиничко-молекулярных фенотипов и математических моделей оценки риска его прогрессирования.

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.

В их числе исследовано 787 образцов от 590 человек, проходивших в ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ с 2011 по 2021 год лечение резектабельного колоректального рака 0-III стадии различных локализаций. В анализируемый материал 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, 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 нижеампулярного отдела прямой

кишки и 63 дополнительных образца слизистой, полученных путем щеточной биопсии нижеампулярного отдела прямой кишки).

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 [221]. 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 период проведения исследования мы обратили внимание, что произошел существенный рост числа пациентов получавших неоадьювантное лечение, кардинально изменилась методика хирургических операций, лапароскопический доступ стал основным, радиотерапевты стали шире использовать крупное фракционирование дозы облучения. А вот изменений принципов адьювантного лекарственного лечения практически не произошло. Тем не менее, особый интерес с этой точки зрения представляла «фокусная группа», включавшая 465 пациентов, имевших в нашем исследовании II (213 пациентов) и III (252 пациента) стадию КРР, соответственно. Именно в ней, согласно классическим критериям, нами оценивался риск прогрессирования с учетом результатов молекулярно-генетических исследований. При анализе различий в частоте назначения основных типичных схем цитостатиков в послеоперационном периоде нами выявлено не было. Схемы аХТ, включающие капецитабин, применялись у 67,8% пациентов (315 человек), а препарат платины - оксалиплатин, у 54,1% (298 больных). 5-фторурацил был включен в схему у 129 (29%) пациентов.

Капецитабин оказался самым используемым цитостатиком у пациентов с КРР в нашей работе с учетом его использования в качестве радиомодификатора при проведении неоадьювантной дистанционной лучевой терапии, основного препарата первой линии при индукционной и консолидирующей неоадьювантной химиотерапии. Только 4,5% пациентов (21 наблюдение) не получили адьювантной терапии во II и III стадиях КРР в нашем исследовании, при этом связи с установленными группами риска мы не выявили. Мы готовы предположить, что программа лекарственного лечения КРР при II и III стадиях заболевания будет корректироваться в сторону ограничения использования цитостатиков в подгруппах низкого риска.

Приступив к работе, на первом этапе мы изучили особенности слизистой оболочки толстой кишки у здоровых людей и оценили принципиальную возможность молекулярно-генетической дифференцировки образцов, отобранных в разных эмбрионально-анатомических ее отделах. В результате было выявлено четкое разделение молекулярных экспрессионных фенотипов слизистой, характерных для естественной эмбрионально-анатомической асимметрии толстой кишки. Мы сформировали математическую 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 имевшейся в нашем распоряжении панели. Значимые различия были получены для уровней экспрессии 16 генов: *MGB*, *HER2*, *BAG1*, *PGR*, *SCUBE2*, *MMP2*, *PAPPA*, *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. Оказалось, что 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 [220]. Кроме того, 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). Процесс естественного старения человека приводит к ряду молекулярных и клеточных изменений. Сама по себе биология старения сложна, но его неоднородность очевидна. Угнетение эндогенных механизмов репарации ДНК способствует накоплению соматических мутаций, являющихся движущими силами механизмов канцерогенеза совместно с эпигенетическими изменениями в естественном процессе старения. Пожилой возраст является одним из наиболее изученных факторов риска развития рака, в том числе колоректального. С течением времени физиологические и молекулярные изменения, происходящие в слизистой толстой кишки, влияют на пролиферацию и регенеративную способность эпителия, интенсивность воспалительных процессов, приводящих, в свою очередь, к хроническому ее повреждению и развитию различных неоплазий. Мы предположили, что

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

Для этого мы поставили перед собой цель изучить возрастные особенности экспрессии мРНК генов нашей панели в образцах нормальной слизистой толстой кишки, полученных из различных ее отделов. 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*.

Обсуждая полученные результаты, 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 как в стабильности генома, так и 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 [49]. 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 *P14ARF* позволяет предположить повышенную митогенную стимуляцию в этой группе и инициацию апоптоза p53-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 [233]. Ген-участник *GATA3* кодирует белок семейства транскрипционных факторов GATA. Они специфически экспрессируются в предшественниках белых адипоцитов и непосредственно участвуют в процессе дифференцировки Т-хелперов при иммунных и воспалительных реакциях, а также являются участниками эстроген-зависимого сигнального пути регуляции экспрессии генов. 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.

Убедившись в изменении молекулярных характеристик слизистой оболочки в зависимости от эмбрионально-анатомического отдела толстой кишки у здоровых людей, мы провели аналогичную оценку экспрессионных

профилей образцов неизменной слизистой при наличии гиперпролиферативных и воспалительных процессов в ней, построив соответствующую математическую модель, позволяющую дифференцировать образцы по эмбрионально-анатомическим отделам толстой кишки уже при наличии патологии. Ее сформировали показатели экспрессии 6 генов: *CCND1*, *IL12a*, *IL15*, *IL1b*, *TNFa*, *TGFb*. Общая точность молекулярной классификации образцов в такой ситуации в сравнении со здоровыми снизилась с 92% до 86,5%.

Прролиферативная активность аденом ассоциирована со степенью дисплазии [1]. Задавшись вопросом, как при этом изменяются молекулярные характеристики неизменной слизистой, мы разделили имеющиеся образцы пациентов с полипами на 2 подгруппы. В группу со слабой дисплазией вошел 31 образец, в группу с умеренной дисплазией вошло 27 образцов. Определены 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 [261]. 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.

Далее мы изучили уровень экспрессии образцов неизменной слизистой при наличии аденомы (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*. Таким образом, мы убедились в существовании молекулярных отличий неизменной слизистой при гиперпластических полипах и аденомах с учетом степени их дисплазии.

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 из 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.

Щипцовая биопсия как метод забора образцов является достаточно травматичной процедурой, требующей специальных навыков и оснащения. Однако биологический материал в виде щеточной биопсии (цитологического соскоба) слизистой прямой кишки с использованием урогенитального зонда получить значительно проще, при этом практически не требуется ее подготовка. И мы решили выяснить, каковы молекулярные характеристики таких соскобов, и подойдут ли они в качестве объекта исследования для диагностики патологических изменений слизистой толстой кишки молекулярно-диагностическим методом.

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.

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%.

Можно предположить, что механизмы изменения профилей экспрессии образцах щеточной биопсии неизменной слизистой толстой кишки в норме и при патологии могут быть связаны с миграцией в нее нейтрофилов и лимфоцитов в роли иммунокомпетентных клеток [87, 259, 290].

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. 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).

В зависимости от цели предлагаем использовать разные панели. 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.

Подводя промежуточный итог работы, хотим поделиться некоторыми 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://онкопоискаха.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.

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 гипохэкспрессия *PTEN* является одним из немногих супрессоров PI3K/АКТ/mTOR-сигнального пути.

Профиль экспрессии в образцах колоректальной аденокарциномы различной степени дифференцировки отражает тенденцию к повышенной пролиферативной активности (*CCNB1*) и подавлению активности онкосупрессоров (*PTEN*). Эти данные соответствуют современным научным представлениям о том, что наличие низкой дифференцировки (G3) по-прежнему является одним из факторов негативного прогноза. Актуальные клинические рекомендации по лечению рака ободочной и прямой кишки подтверждают, что степень дифференцировки опухоли не участвует в формировании стадии.

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.

Обратив внимание на роль матричных металлопротеиназ при увеличении размера опухоли, в первую очередь *MMP7*, которая способствует адгезии раковых клеток и увеличивает вероятность метастазирования КРР, Higashi et al. [147], было установлено, что *MMP7* гиперэкспрессируется в аденоматозных полипах с тяжелой дисплазией. Кроме того, *MMP7* участвует в трансформации ворсинчатых аденом в рак и способствует его росту [246].

Оценивая уровни экспрессии генов в образцах колоректальной аденокарциномы в зависимости 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.

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 (Kn) 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 линейной 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). 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 использовании дискриминантной модели определения принадлежности исследуемого образца к эмбрионально-анатомическому отделу, разработанной на биологическом материале здоровых людей, в 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%, что связано с большим числом молекулярных событий при локализации опухолей в нем. 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 специфическое ингибирование мутированного *KRAS* влияет на микроокружение опухоли, может привести к новым подходам к сочетанию ингибирования *RAS* с иммунотерапией [60]. 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. Был использован метод логистической регрессии бинарного выбора. В ходе исследования было установлено, 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», которое позволило оценить их для описания мутированного (*RAS-mut*) и «дикого» (*RAS-wt*) фенотипов.

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 [326], 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.

Приступая к решению задач исследования, связанных с улучшением третичной профилактики КРР, мы решили использовать морфологические и молекулярно-генетические характеристики аденокарциномы и ее окружения, выявленные в результате нашей работы, для оценки риска его прогрессирования.

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 оказался равен 0,31. Мы сочли его неудовлетворительным с точки зрения надежности и 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. Добавление новых объясняющих переменных в модель значительно повысило ее точность. 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*, *GPLY*, *MMP7*, *HLA.G5*.

В 2015 году Simone et al. [102] опубликовали результаты исследования, где было показано, что *IL-17A*, *IL-22*, и *IL-6* активируют *STAT3/NF-κB*, способствующих пролиферации раковых клеток у пациентов с КРР. В работе мы выявили повышение экспрессии в образцах неизменной слизистой при КРР провоспалительного цитокина *IL1b*, что, возможно, и объясняет его участие в модели регионарного метастазирования.

Особенности экспрессии указанных генов в образцах неизменной слизистой, в первую очередь, объясняются биологическими функциями *BIRC5*, *NDRG1*, *Ki67*, *IGF2*, *CYP19A*, *GPLY*, *MMP7*, *HLA.G5*. В нашей работе было зафиксировано увеличение экспрессии *GPLY* в неизменной слизистой, который является одним из маркеров цитотоксических лимфоцитов. Анализ литературных данных выявил, что при сравнении пациентов КРР с наличием регионарных или отдаленных метастазов и без таковых получены сведения о самостоятельном прогностическом значении экспрессии *GPLY* [69]. Экспрессия гена *HLA-G5* также повышается при развитии прогрессирования, а сам ген является мишенью для иммунотерапии КРР.

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 [228, 267, 272]. В ходе клинических исследований FIRE-3 и CRYSTAL было доказано, что локализация первичной опухоли в проксимальном отделе толстой кишки является неблагоприятным прогностическим фактором [34]. 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.

Методом кластеризации k-средних, используя данные объединенного массива показателей экспрессии панели генов, полученных для образцов колоректального рака и образцов неизменной слизистой, нами были созданы три молекулярно-генетические фенотипа (кластера). Мы провели оценку их клинической значимости с точки зрения прогнозирования результатов лечения. Обсуждая полученные результаты с этих позиций, 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. Нами был проведен сравнительный анализ локализации опухоли, консенсусного 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%).

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.

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 из использованной нами панели 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 неоадьювантной 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.

В этом разделе была использована регрессионная модель PLS-SEM с надстройкой IPMA. Применение метода IPMA позволило более глубоко проанализировать влияние выделенных факторов (групп) на зависимую переменную. Хотя в данном случае мы не можем говорить о потенциальных областях, на которые можно повлиять и которым отдать приоритеты (как, например, характер мутаций, опухолевое почкование, пол и т.д.), однако этот

метод позволил подробнее проанализировать значимость переменных (выделенных групп) и их влияние 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. Нельзя исключить и значение точечных мутаций на результаты лечения КРР в целом, однако модель демонстрирует слабый положительный коэффициент этого влияния. Примечательно, что факт проведения неоадьювантной химиотерапии имеет более высокий положительный коэффициент влияния на безрецидивную выживаемость на модели IPMA, хотя рандомизированными клиническими исследованиями не подтверждается увеличение выживаемости при проведении неоадьювантной химиотерапии при опухолях ободочной кишки в II и III стадиях с факторами высокого риска, однако доказана ее безопасность [171].

В нашей работе мы также решили проверить, существует ли различие в экспрессии панели генов в зависимости от наличия или отсутствия факторов риска. Чтобы оценить влияние клинико-морфологических факторов риска (согласно критериям NCCN и RUSSCO) при II стадии КРР мы изучили молекулярные особенности в этой подгруппе, в которую вошло 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.

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.). Важно отметить также, что перспектива решения этой проблемы лежит в плоскости поиска надежных и воспроизводимых предикторов прогрессирования колоректального рака вне патоморфологической стадии, которая и сейчас, по сути, главным образом и определяет дифференцированный подход к лечению КРР.

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 клиническо-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:

$$X_2 (\text{прогрессирование}_{36_мес.}) =$$

$$-0.83*\text{дифференцировка} - 2.44*\text{факторы_риска} - 1.51*\text{лимфоузлы} + 0.0516*\text{возраст} + 0.72*\text{локализация} + 0.332$$

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 (клинико-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:

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

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 клиничко-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 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. 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 [3].

Вторая отобранная нами предиктивная модель, построенная методом «случайных лесов», 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, вероятно, за счет активации апоптоза [266], что может в ряде случаев объяснить лучшие отдаленные результаты лечения IIIa стадии в сравнении с IIIb и IIIc [234]. А далее, при наличии метастатических лимфоузлов, слабое влияние на прогноз будет оказывать увеличение экспрессии генов *PTEN* и *CD68*, что может свидетельствовать о стимуляции апоптоза через работу

онкосуппрессора *P TEN* и стимуляции активности тканевых макрофагов через гиперэкспрессию *CD68*.

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: клиничко-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.

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, ESRI, 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*, *PAPPA*, *IL6*, *IL15* в образцах неизмененной 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*, *TNFa*, *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:

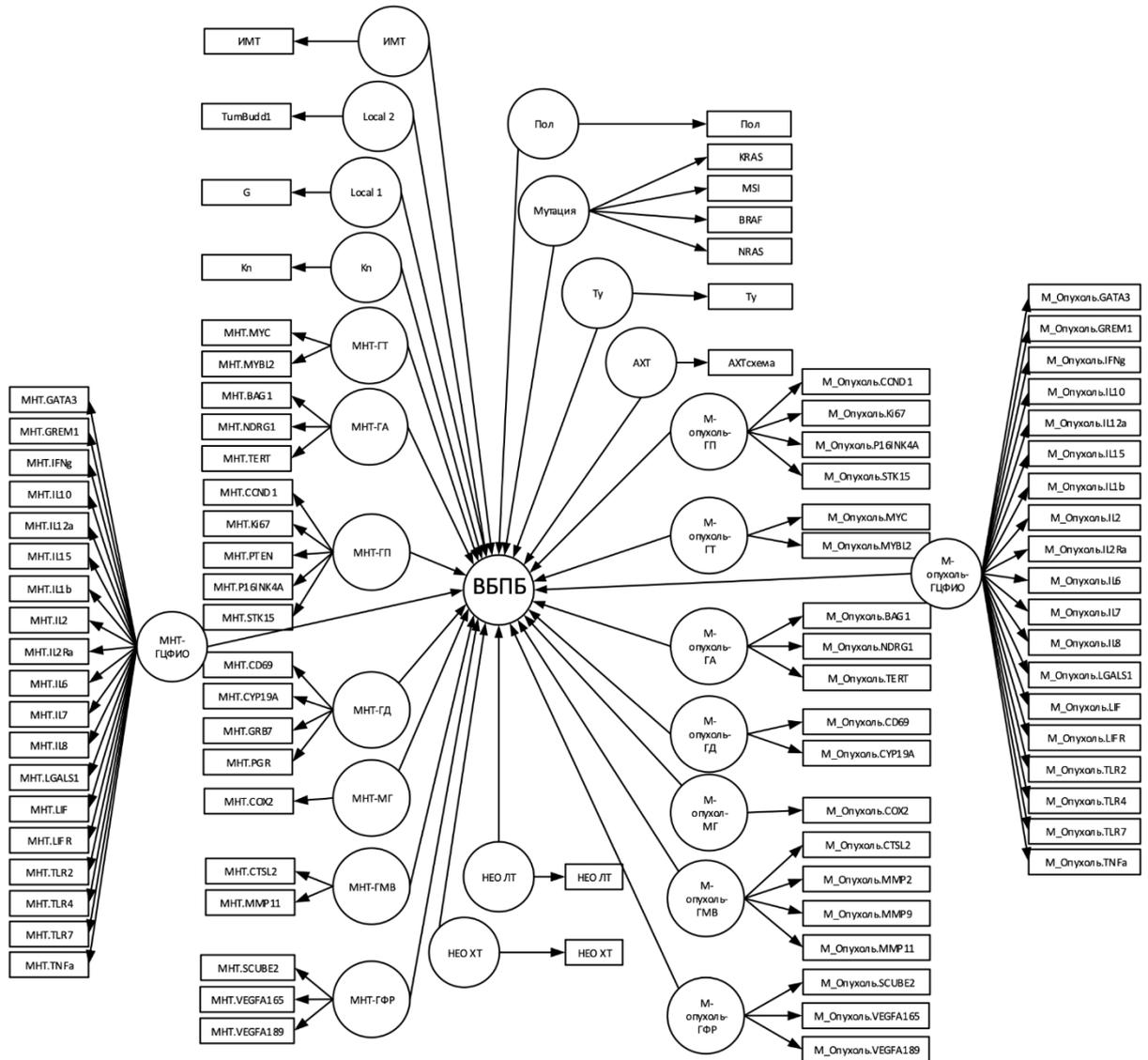
1. Панель диагностики колоректального рака, включающая 7 генов: *CTSL2, ESR1, GRB7, GNLV, MMP2, TERT* Точность панели 96,7% при уровне специфичности 100%;
2. Панель диагностики воспалительных изменений включает 5 генов: *CTSL2, BCL2, MYC, BIRC5, CD68*. Отсутствие патологии толстой кишки при использовании 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, TNF α 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, PAPP, IL1b, IFNG, CD56, CD69, HLA-G5* для оценки целесообразности адьювантной лекарственной терапии.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Рисунок 2. Базовая модель влияния. Схема с весами



Примечание: ВБПБ- безрецидивная выживаемость

Таблица 3. Индикаторы качества

показатель	Коэф Кронбаха	rho_A	надежность	Average Variance Extracted (AVE)
АХТ	1.000	1.000	1.000	1.000
G_	1.000	1.000	1.000	1.000
Кп	1.000	1.000	1.000	1.000
МНТ-ГА	0.840	0.881	0.894	0.681
МНТ-ГД	0.934	1.019	0.945	0.742
МНТ-ГМВ	0.777	0.765	0.812	0.533
МНТ-ГП	0.967	0.996	0.974	0.880
МНТ-ГТ	0.917	0.973	0.947	0.855
МНТ-ГФР	0.926	1.050	0.937	0.717
МНТ-ГЦФИО	0.951	0.865	0.947	0.585
МНТ-МГ	0.736	1.295	0.712	0.433
TumBudd1	1.000	1.000	1.000	1.000
Ty (локализация)	1.000	1.000	1.000	1.000
ИМТ	1.000	1.000	1.000	1.000
М-опухоль-МГ	1.000	1.000	1.000	1.000
М-опухоль-ГА	0.702	0.935	0.746	0.613
М-опухоль-ГД	0.786	0.740	0.808	0.601
М-опухоль-ГМВ	0.617	0.569	0.791	0.728
М-опухоль-ГП	1.000	1.000	1.000	1.000
М-опухоль-ГТ	1.000	1.000	1.000	1.000
М-опухоль-ГФР	0.600	0.603	0.833	0.714
М-опухоль- ГЦФИО	0.611	0.875	0.721	0.783
Мутация	0.651	0.724	0.621	0.507
НЕО ЛТ	1.000	1.000	1.000	1.000
НЕО ХТ	1.000	1.000	1.000	1.000
Пол	1.000	1.000	1.000	1.000
срок выживаем	1.000	1.000	1.000	1.000

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агейкина Н.В. Комбинированное эндоскопическое лечение малигнизированных полипов толстой кишки. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.17 / Агейкина Наталья Владимировна. М., — 2011. — 110 с.
2. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. Москва : ТриадаХ, 1998. стр. 496. 5-8249-0004-3.
3. Богданова И.М., Болтовская М.Н., Рахмилевич А.Л., Артемьева К.А. Ключевая роль опухоль-ассоциированных макрофагов в прогрессировании и метастазировании опухолей Иммунология. 2019; 40 (4): 41-7. doi: 10.24411/02064952-2019-14005 (in Russian)
4. Важенин А.В., Бехтерева Е.И., Бехтерева С.А., Гюлов Х.Я. Очерки первичной множественности злокачественных опухолей. Челябинск : б.н., 2000. стр. 170. 616-006.04.
5. 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;7(6):347-352. DOI: 10.32364/2587-6821-2023-7-6-2.
6. Дильман В.М. Эндокринологическая онкология. Ленинград : Медицина, 1983. стр. 312
7. Егоренков В.В., Моисеенко Ф.В. Скрининг рака толстой кишки // Практическая онкология. – 2010. м Т.11. - №2. – С. 81-87.
8. Захаренко М.В. Молекулярно-генетические исследования в оптимизации диагностики колоректального рака. Дисс.. кандидата биологических наук. Москва, 2021 г.

9. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. Российский Центр информационных технологий и эпидемиологических исследований в области онкологии. Москва 2022
- 10.Кашин С.В. Доказательная гастроэнтерология, 2012, №2 стр. 89-99;
- 11.Кит О.И., Водолажский Д.И. Молекулярная биология колоректального рака в клинической практике. Мол биол 2015;49(4):531-40 [Kit O.I., Vodolazhsky D.I. Molecular biology of colorectal cancer in clinical practice. Mol biol 2015; 49(4):531-40].
- 12.Кит О.И., Водолажский Д.И., Геворкян Ю.А.и др. Наследственный колоректальный рак: генетика и скрининг // Рос. Журн. Гастроэнтерологии гепатологии, колопроктологии 2018;28(3): 18-25
- 13.Ковтун Д.П., Аничков Н.М., Полушин О.Г., Пономарева Е.В., Хрыков Г.Н., Любимов А.И., Калинина Е.Ю.. Опухолевое почкование на ii стадии колоректального рака — показание к химиотерапии? oncology bulletin of the volga region Vol. 10, no. 4. 2018
- 14.Краевский Н.А., Смольникова А.В., Саркисова Д.С. Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. Москва : Медицина, 1993. стр. 560. 5-225-00684-1
- 15.Лавникова Г.А. (1976) Некоторые закономерности лучевого патоморфоза опухолей человека и их практическое использование. Вестн. АМН СССР, 6: 13–19.
- 16.Лавникова Г.А. (1979) Гистологический метод количественной оценки терапевтического повреждения опухоли. Москва.: Методические рекомендации, 13 с.

17. Лавникова Г.А., Гош Т.Е., Талалаева А.В. (1978)
Гистологический метод количественной оценки степени
лучевого повреждения опухоли. Мед. радиол., 3: 6–9.
18. Пальцев М.А., Залетаев Д.В. Системы генетических и
эпигенетических маркеров в диагностике онкологических
заболеваний. Москва : Медицина, 2009. стр. 384. 5-225-03384-9
19. 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
г, том 20, номер 2, стр.1441-161;
20. Солодкий В.А., Чхиквадзе В.Д., Станоевич У., Дехисси Е.И.
Ранняя диагностика колоректального рака // Русский врач,
11.2012, с.20-23
21. Станоевич У. Клиническое значение результатов молекулярно-
генетических исследований толстой кишки при колоректальном
раке. Дис. ... докт. мед. наук. Москва. 2016. – 235 с.
22. Струков А.И., Серов В.В., Саркисова Д.С. Общая патология
человека: руководство для врачей. Москва : Медицина, 1990.
стр. 448. 5-225-00700-7
23. Трякин А.А., Федянин М.Ю., Цуканов А.С., Шельгин Ю.А.,
Покатаев И.А. и др. Микросателлитная нестабильность как
уникальная характеристика опухолей и предиктор
эффективности иммунотерапии. Злокачественные опухоли
2019; 9(4) DOI: 10.18027 / 2224-5057-2019-9-4-59-69
24. Успенская Ю.Б., Кузнецова И.В. Гендерные аспекты
профилактики и скрининга колоректального рака у женщин //
Гинекология. – 2013. - №01. – С. 80-84.

25. Aaltonen L, Pentomaki P., Leach F. et al. *Science*. 1993. Vol. 260. P. 812-816
26. Abdelkader A, Hartley C, Hagen C. Tubulovillous adenomas with serrated features are precursors to KRAS mutant colorectal carcinoma. *Modern Pathol*. 2017; 30:157. A621
27. Afshar S, Kelly SB, Seymour K, Lara J, Woodcock S, Mathers JC. The effects of bariatric surgery on colorectal cancer risk: systematic review and meta-analysis. *Obes Surg*. 2014;24(10):1793–1799.
28. Ahlquist DA, Zou H, Domanico M, Mahoney DW, Yab TC, Taylor WR, et al. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. *Gastroenterol*. 2012; <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.031>.
29. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(10):1626–34.
30. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med* 2010; 9: 145-152
31. American Society for Clinical Oncology. Accelerating progress against cancer. ASCO's blueprint for transforming clinical and translational cancer research. November 2011
32. Andre T, de Gramont A, Vernerey D, et al. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III colon cancer: Updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC study. *J Clin Oncol*. 2015; 33:4176–4187
33. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2012; 5: 19-27
34. Arnold D., Lueza B., Douillard J-Y et al. Prognostic and predictive

- value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials // *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017. № 8 (28). C. 1713–1729
35. Arredondo J, González I, Baixauli J, Martínez P, Rodríguez J, Pastor C, et al. Tumour response assessment in locally advanced colon cancer after neoadjuvant chemotherapy. *J Gastrointest Oncol*. 2014;5:104–11.
36. Atkin W.S., Edwards R., Kralj-Hans I., Wooldrage K., Hart A.R., Northover J.M., Parkin D.M., Wardle J., Duffy S.W., Cuzick J. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 г., 375 (9726), стр. 1624–1633
37. Bachet JB, Lucidarme O, Levache CB, Barbier E, Raoul JL, Lecomte T, et al. FOLFIRINOX as induction treatment in rectal cancer patients with synchronous metastases: results of the FFCD 1102 phase II trial. *Eur J Cancer*. 2018;104:108–16.
38. Bagozzi R.P., Yi Y., 1994. Advanced topics in structural equation models. In: Bagozzi, R.P. (Ed.), *Advanced Methods of Marketing Research*. Blackwell, Oxford, pp. 1–51;
39. Bahnassy AA, Zekri AR, Salem SE, Abou-Bakr AA, Sakr MA, Abdel-Samiaa AG, Al-Bradei M. Differential expression of p53 family proteins in colorectal adenomas and carcinomas: Prognostic and predictive values. *Histol Histopathol* 2014; 29: 207-216
40. Barault L., Charon Barra C., Jooste V., de la Vega M.F. et al. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population based series of 582 cases. 2008. *Cancer Res*. 68, 8541–8546.

41. Berekati Z, Radpour R, Lu Q, Bitzer J, Zheng H, Toniolo P, Lenner P, Zhong XY. Methylation signature of lymph node metastases in breast cancer patients. *BMC Cancer* 2012; 12: 244
42. Bartak BK, Kalmar A, Galamb O, Wichmann B, Nagy ZB, Tulassay Z, et al. Blood collection and cell-free DNA isolation methods influence the sensitivity of liquid biopsy analysis for colorectal cancer detection. *Pathol Oncol Res.* 2018; <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0382-z>.
43. Bartak BK, Kalmar A, Peterfia B, Patai AV, Galamb O, Valcz G, et al. Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2, and PRIMA in plasma samples. *Epigenetics.* 2017;12(9):751–63.
44. Bastaminejad S., Taherikalani M., Ghanbari R., et al. Investigation of microRNA-21 expression levels in serum and stool as a potential non-invasive biomarker for diagnosis of colorectal cancer // *Iran Biomed. J.* **21**, (2016). 106-113.
45. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141–96.
46. Bazzoli F., Fossi S., Sottili S. et al. The risk of adenomatous polyps in asymptomatic first-degree relatives of persons with colon cancer // *Gastroenterology.* - 1995. - Vol. 109. - P. 783-788.
47. Bennouna J, André T, Campion L, Huret S, Miglianico L, Mineur L, et al. Rationale and design of the IROCAS study: multicenter, international, randomized phase 3 trial comparing adjuvant modified (m) FOLFIRINOX to mFOLFOX6 in patients with high-risk stage III (pT4 and/or N2) colon cancer – a Unicancer GI-PRODIGE trial. *Clin Colorectal Cancer.* 2019; 18:e69–73.

48. Berger BM, Ahlquist DA. Stool DNA screening for colorectal neoplasia: biological and technical basis for high detection rates. *Pathology*. 2012;44:80–8.
49. Bertorelle R, Rampazzo E, Pucciarelli S, Nitti D, De Rossi A. Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Feb 28;20(8):1940-50. doi: 10.3748/wjg.v20.i8.1940. PMID: 24616570; PMCID: PMC3934464.
50. Bläker H, Alwers E, Arnold A, Herpel E, Tagscherer KE et al. The Association Between Mutations in BRAF and Colorectal Cancer-Specific Survival Depends on Microsatellite Status and Tumor Stage. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019; 17: 455–462.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.04.015>
51. Blanco-Oliver A., Irimia-Diequez A., & Reguera-Alvarado N. (2016). Prediction-oriented PLS path modeling in microfinance research. *Journal of Business Research*, 69(10), 4643–4649. <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2016.03.054>
52. Blons H, Emile JF, Le Malicot K, et al. Prognostic value of KRAS mutations in stage III coloncancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset. *Ann Oncol*. 2014; 25:2378–2385
53. Boguski M. S., McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives // *Nature*. 1993. № 6456 (366). C. 643–654.
54. Bond CE, Nancarrow DJ, Wockner LF, Wallace L, Montgomery GW, Leggett BA, Whitehall VL. Microsatellite stable colorectal cancers stratified by the BRAF V600E mutation show distinct patterns of chromosomal instability. *PLoS One* 2014; 9: e91739
55. Bonelli L., Martines H., Conio M. et al. Family history of colorectal cancer as a risk factor for benign and malignant tumours of the large

- bowel. A case-control study // *Int. J. Cancer.* - 1988. - Vol. 41. - P. 513-517.
56. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682–9.
57. Bosset, J. F. EORTC Radiotherapy Group Trial 22921. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer / J. F. Bosset, L. Collette, G. Calais et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 355. – №. 11. – P. 1114-1123.
58. Botchkina I. L., Rowehl R. A., Rivadeneira D. E., Karpeh M. S., Jr., Crawford H., Dufour A., et al. Phenotypic subpopulations of metastatic colon cancer stem cells: genomic analysis. (2009). *Cancer Genomics Proteomics*, 6(1), 19–29.
59. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 2008;134(2):388–395
60. Boumelha J., Molina-Arcas M., Downward J. Facts and Hopes on RAS Inhibitors and Cancer Immunotherapy // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* – 2023. – T. 29. – №. 24. – C. 5012-5020.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-3655>
61. Brenner B. Impact of the 12-Gene Colon Cancer Assay on Clinical Decision Making for Adjuvant Therapy in Stage II Colon Cancer Patients / B. Brenner, R. Geva, M. Rothney, et al. // *Value in health.* – 2016. – Vol. 19. – №1. – P. 82-7.
62. Bretthauer M. Colorectal cancer screening. *Journal of internal medicine*. 2011 г., T. 270, 2, стр. 87-98
63. Bretthauer M. Evidence for colorectal cancer screening. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2010 г., T. 4, 24, стр. 417–25.

64. Brosens L.A., van Hattem W.A., Jansen M. et al. Gastrointestinal polyposis syndromes. *Curr Mol Med* 2007;7:29-46
65. Brunet Vega, A., Pericay, C., Moya, I. et al. (2013). microRNA expression profile in stage III colorectal cancer: circulating miR-18a and miR-29a as promising biomarkers. *Oncol. Rep.* **30**, 320-326. doi:10.3892/or.2013.2475
66. Burgess AW, Henis YI, Hynes NE, Jovin T, Levitzki A, Pinkas-Kramarski R, Yarden Y. EGF receptor family: twisting targets for improved cancer therapies. *Growth Factors.* 2014;32:74–81
67. Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays / S. A. Bustin // *Journal of Molecular Endocrinology.* – 2000. – Vol. 25. – P. 169–193.
68. Çakıt E., Olak A. J., Karwowski W., Marek T., Hejduk I., & Taiar R. (2020). Assessing safety at work using an adaptive neuro-fuzzy inference system (ANFIS) approach aided by partial least squares structural equation modeling (PLS-SEM). *International Journal of Industrial Ergonomics*, 76. <https://doi.org/10.1016/j.ergon.2020.102925>
69. Camus M., Tosolini M., Mlecnik B. et al. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence // *Cancer research.* 2009. № 6 (69). C. 2685–2693.
70. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337 (2012). The Cancer Genome Atlas genome-scale analysis of 276 samples, including exome sequencing, and analysis of DNA copy number, promoter methylation and expression of mRNA and microRNA.
71. Cancer Research UK. <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/> (Accessed July 2012).

72. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, Del Barrio Mg, Portillo F And Nieto MA: The Transcription Factor Snail Controls Epithelial-Mesenchymal Transitions By Repressing E-Cadherin Expression. *Nat Cell Biol* 2: 76-83, 2000
73. Caputo F, Santini C, Bardasi C, Cerma K, Casa-dei-gardini A et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 5369. <https://doi.org/10.3390/ijms20215369>
74. Carethers JM. Differentiating Lynch-like from Lynch syndrome. *Gastroenterology* 2014; 146: 602-604
75. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485-490
76. Casey G, Conti D, Haile R, et al. Next generation sequencing and a new era of medicine. *Gut* 2011;62:920–32
77. CDC Data & Statistics | Feature. Top 10 Cancers Among Women; 2011. May Internet. Available from: <http://198.246.98.21/Features/dsWomenTop10Cancers/>
78. Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK, Van den Berg JG, Aalbers AG, Sikorska K, et al. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. *Nat Med.* 2020;26:566–76.
79. Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, et al. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol.* 2002;160:1823–1830.
80. Chan D.S. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies / D.S. Chan, R. Lau, D. Aune et al. // *PLoS ONE* 2011; 6: e20456.

- 81.Chan TL, Zhao W, Leung SY, Yuen ST. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. Cancer Genome Project. 2003. Cancer Res. 63:4878–81
- 82.Chao C, Zatarain JR, Ding Y, et al. Cystathionine-beta-synthase inhibition for colon cancer: Enhancement of the efficacy of aminooxyacetic acid via the prodrug approach. Mol Med. 2016 May 16:22
- 83.Chen J., Wang, W., Zhang, Y., et al.(2014b). The roles of miR-200c in colon cancer and associated molecular mechanisms. Tumour Biol. **35**, 6475-6483. doi:10.1007/s13277-014-1860-x
- 84.Chen WD, Han ZJ, Skoletsy J, Olson J, Sah J, Myeroff L, et al. Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene. J Natl Cancer Inst. 2005;97(15):1124–32.
- 85.Ciardello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. Clin Cancer Res. 2001;7:2958–2970.
- 86.Clark S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. J Clin Oncol. 2008;26:2013–2019.
- 87.Coffelt S.B. Neutrophils in cancer: neutral no more / M.D. Wellenstein, K.E. de Visser // Nature Reviews Cancer. – 2016. – Vol. 16. – №7. – P. 431.
- 88.Colicev A., de Giovanni P., & Vinzi V. E. (2016). An empirical investigation of the antecedents of partnering capability. International Journal of Production Economics, 178, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2016.05.013>

89. Conroy T, Lamfichekh N, Etienne PL, Rio E, Francois E, Mesgouez-Nebout N, et al. Total neoadjuvant therapy with mFOLFIRINOX versus preoperative chemoradiation in patients with locally advanced rectal cancer: final results of PRODIGE 23 phase III trial, a UNICANCER GI trial. *J Clin Oncol*. 2020;38(15 suppl.):4007.
90. Conte Verri, C., Borzi, C., et al. (2015). Novel method to detect microRNAs using chip-based QuantStudio 3D digital PCR. *BMC Genomics* **16**, 849. doi:10.1186/s12864-015-2097-
91. Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, et al. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res* 2010; 70:2406.
92. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:11–20.
93. Curtin K., Slattery M.L., Samowitz W.S. CpG Island Methylation in Colorectal Cancer: Past, Present and Future. *Pathology Research International*. 2011 г., Т. 2011, стр. 8.
94. Dai Z, Xu YC, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol*. 2007;13(31):4199–4206.
95. Danielsen S.A., Lind G.E., Bjørnslett M., Meling G.I., Rognum T.O., Heim S., Lothe R.A. 2008. Novel mutations of the suppressor gene PTEN in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability and TP53 mutation status. *Hum. Mutat*. 29, E252–E262
96. Davies H. Mutations of the BRAF gene in human cancer / H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, et al. // *Nature*. – 2002 – Jun. – Vol.417 – №6892 – P. 949-54.

97. Davies R.J., Miller R., Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis // *Nat. Rev. Cancer.* – 2005. – Vol. 5. – P. 199209.
98. De Craene B., Berx G.: regulatory networks defining emt during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 13: 97-110, 2013
99. De Greon Piet. History of the Endoscope. *Proceedings of the IEEE.* 2017. V. 105. No. 10. P. 1987-1995.
100. De Kok J.B. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes / J. B. De Kok, R.W. Roelofs, B.A. Giesendorf, et al. // *LabInvest* – 2005. – Vol 85. – №1. P.154–159.
101. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, et al. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol.* 2008; 19:508–515.
102. De Simone V, Franzè E, Ronchetti G, Colantoni A, Fantini MC, Di Fusco D, Sica GS, Sileri P, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G, Stolfi C. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF-kB to promote colorectal cancer cell growth *Oncogene*// 2015 Jul;34(27):3493-503. doi: 10.1038/onc.2014.286. Epub 2014 Sep 1.
103. DeBarros Mia Outcome comparison following colorectal cancer surgery in an equal access system / Mia DeBarros, M.W. Causey, E.K. Johnson et al. // *Journal of surgical research* 2013; 184: 507-513.
104. Dehal A, Graff-Baker A, Vuong B, Nelson D, Chang SC, Lee DY, et al. Correlation between clinical and pathologic staging in colon cancer: implications for neoadjuvant treatment. *J Gastrointest Surg.* 2018;22:1764–71.

105. Dehal A, Graff-Baker AN, Vuong B, Fischer T, Klempner SJ, Chang S-C, et al. Neoadjuvant chemotherapy improves survival in patients with clinical T4b colon cancer. *J Gastrointest Surg.* 2018;22:242–9.
106. Dehal AN, Newton CC, Jacobs EJ, et al. Impact of diabetes mellitus and insulin use on survival after colorectal cancer diagnosis: the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. *J Clin Oncol* 2012; 30:53.
107. Deng L, Gui Z, Zhao L, et al. Diabetes mellitus and the incidence of colorectal cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2012; 57:1576
108. DeVita V.T., Lawrence T.S., Rosenberg S.A. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2015. стр. 2280. 978-1-4511-9294-0
109. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017 Jan 4.
110. Ding Di , Siyu Han, Hui Zhang, Ye He, Ying Li Predictive biomarkers of colorectal cancer // *Comput Biol Chem.* 2019 Dec;83:107106. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2019.107106. Epub 2019 Sep 3.
111. Dobre M, Comănescu M, Arsene D, Iosif C, Bussolati G. K-ras gene mutation status in colorectal cancer: comparative analysis of pyrosequencing and PCR-RFLP. *Rom J Morphol Embryol* 2013; 54: 567-574
112. Domingo E., Laiho P., Ollikainen M., Pinto M. et al. 2004. BRAF screening as a lowcost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J. Med. Genetics.* 41, 664–668.

113. Dong Y., Wu W. K. K., Wu C. W. et al. (2011). MicroRNA dysregulation in colorectal cancer: a clinical perspective. *Br. J. Cancer* **104**, 893-898. doi:10.1038/bjc.2011.57
114. Dragovich T., Tsikitis V. Colon Cancer, Adenocarcinoma; 2012. February Internet. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/277496-overview>
115. Eddy D.M. *Ann. Intern. Med.*, 1990, Vol.113, p. 373-384.
116. Eurboonyanun K, Lahoud RM, Kordbacheh H, Pourvaziri A, Promsorn J et al. Imaging predictors of BRAF mutation in colorectal cancer. *Abdom Radiol* 2020; 45: 2336–2344. <https://doi.org/10.1007/s00261-020-02484-9>
117. European Colorectal Cancer Screening Guidelines Working Group. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: Overview and introduction to the full Supplement publication. *Edoscopy*. 2013. V. 45. No. 1. P. 51-59.
118. Fearon E.R. A genetic model for colorectal tumorigenesis / E. R. Fearon, B. Vogelstein // *Cell*. – 1990. – Vol. 61. – P. 759–767.
119. Fedyanin M., Rice A, Polyanskaya E., Gordeev S., Mammadli Z, Tjulandin S, Tryakin A. Prognosis of patients with resected stage II colon cancer -T4 versus T3 with two or more high-risk factors: A retrospective single-center cohort study / *Journal of Clinical Oncology* 40(16_suppl): e15608-e15608 June 2022 DOI:10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.e15608
120. Ferrari P, Jenab M, Norat T, et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2007;121(9):2065–2072.

121. Fessler E, Drost J, van Hooff SR, et al. TGFbeta signaling directs serrated adenomas to the mesenchymal colorectal cancer subtype. *EMBO Mol Med.* 2016; 8:745–760.
122. Fleming M., Ravula S., Tatishchev S.F., Wang H.L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects // *J. Gastrointest. Oncol.* — 2012. — Vol. 3, №3. — P. 153-173.
123. Foxtrot Collaborative Group. Feasibility of preoperative chemotherapy for locally advanced, operable colon cancer: the pilot phase of a randomized controlled trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:1152–60.
124. Gérard, J. P. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203 / J. P. Gérard, T. Conroy, F. Bonnetain et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – № 28. – P. 4620-4625.
125. Gerlinger M., & Swanton, C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. (2010). *British Journal of Cancer*, 103(8), 1139–1143.
126. Giacosa A., Franceschi S., La Vecchia C. et al. Energy intake, overweight, physical exercise and colorectal cancer risk // *Eur. J. Cancer Prev.* - 1999. - Vol. 8. - Suppl. 1. - P. 53-60
127. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, et al. Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:265.
128. Giovannucci E. Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control* 1995; 6:164.
129. Glöckner SC, Dhir M, Yi JM, McGarvey KE, Van Neste L, Louwagie J, et al. Methylation of TFPI2 in stool DNA: a potential novel biomarker for the detection of colorectal cancer. *Cancer Res.* 2009;69(11):4691–9.

130. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med.* 1965 Sep 1;122(3):467-81. doi: 10.1084/jem.122.3.467. PMID: 4953873; PMCID: PMC2138078.
131. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2008; 135: 1079-1099
132. Grady WM, Rajput A, Myeroff L, et al. Mutation of the type II transforming growth factor- β receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res.* 1998;58:3101–3104.
133. Gray R, Barnwell J, McConkey C, et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 2007;370:2020–2029.
134. Graziano F., Cascinu S. Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? // *Ann. Oncol.* – 2003. – Vol. 14. – P. 1026-1038.
135. Green DR, Kroemer G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458:1127–30
136. Grimm M. Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 expression on CD133+ cells in colorectal cancer points to a specific role for inflammation-induced TLRs in tumorigenesis and tumour progression // *European Journal of Cancer.* 2010. № 15 (46). C. 2849–2857.
137. Guinney J. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* 21, 1350–1356 (2015). Cross-comparison of six independent gene expression-based classification

- systems revealed marked interconnectivity coalescing into four consensus molecular subtypes with distinguished biological features.
138. Gupta S. Screening for Colorectal Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2022 Jun;36(3):393-414. doi: 10.1016/j.hoc.2022.02.001. Epub 2022 Apr 30. PMID: 35501176; PMCID: PMC9167799.
 139. Hair J.F., Jr.; Hult G.T.M.; Ringle C.M.; Sarstedt M.; Castillo Apraiz J.; Cepeda Carrión G.A.; Roldán J.L. *Manual de Partial Least Squares Structural Equation Modeling (PLS-SEM) (Segunda Edición)*; OmniaScience (Sage Publications): Barcelona, Spain, 2019; ISBN 978-84-947996-2-4.
 140. Hair Jr, Sarstedt M., Hopkins L. and G. Kuppelwieser V. (2014), "Partial least squares structural equation modeling (PLS-SEM): An emerging tool in business research", *European Business Review*, Vol. 26 No. 2, pp. 106-121. <https://doi.org/10.1108/EBR-10-2013-0128>
 141. Hanafi M., Tenenhaus, M., 2007. A bridge between PLS path modelling and multi-block data analysis. In: Esposito Vinzi, V., Henseler, J., Chin, w., Wang, H. (Eds.);
 142. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144:646–674.
 143. Harnack L, Jacobs DR Jr, Nicodemus K, et al. Relationship of folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. *Nutr Cancer* 2002; 43:152.
 144. Hase K, Shatney C, Johnson D, et al. Prognostic value of tumor ‘budding’ in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993;36:627–635.
 145. Heim C, Bernhardt W., Jalilova S., Wang Z., Motsch B., Ramsperger-Gleixner M., Burzlaff N., Weyand M., Eckardt K.U., Ensminger S.M. Prolyl-hydroxylase inhibitor activating hypoxia-

- inducible transcription factors reduce levels of transplant arteriosclerosis in a murine aortic allograft model. *Interactiv angiovascular and thoracic surgery*. 2016 г., Т. 22, 5, стр. 561-70
146. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A. Clinical relevance of EGFR and KRAS status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. 2009. *Cancer Treat. Rev.* 35:262–71
147. Higashi S, Oeda M, Yamamoto K, Miyazaki K (2008). "Identification of amino acid residues of matrix metalloproteinase-7 essential for binding to cholesterol sulfate". *J. Biol. Chem.* 283 (51): 35735–44. doi:10.1074/jbc.M806285200. PMID 18955490.
148. Hofslie, E., Sjursen, W., Prestvik, W. S., et al. (2013). Identification of serum microRNA profiles in colon cancer. *Br. J. Cancer* **108**, 1712-1719. doi:10.1038/bjc.2013.121
149. Hu FB, Manson JE, Liu S, et al. Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:542.
150. Huang Z., Huang D., Ni, S., et al. (2010). Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **127**, 118-126. doi:10.1002/ijc.25007
151. Hunter C, Siddiqui M, Georgiou Delisle T, Blake H, Jeyadevan N, Abulafi AM, et al. CT and 3-T MRI accurately identify T3c disease in colon cancer, which strongly predicts disease-free survival. *Clin Radiol.* 2017;72:307–15.
152. Ha M., Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509 524. doi:10.1038/nrm3838
153. Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development // *J. Pathol.* 2005. Vol. 205 (2). P. 130–144

154. Imai T. The growth of human carcinoma: a morphological analysis // *Fukuoka Igaku Zasshi*. — 1954. — Vol. 45. — P. 72-102.
155. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *New Eng J Med*. 2014;370(14):1287–97.
156. Inoue M, Iwasaki M, Otani T, et al. Diabetes mellitus and the risk of cancer: results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Arch Intern Med* 2006; 166:1871.
157. Isella C. et al. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nat. Genet.* 47, 312–319 (2015).
158. Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, et al. Histopathologic determinants of regional lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Cancer* 2008;112:924–933.
159. Jakobsen A, Andersen F, Fischer A, Jensen LH, Jørgensen JC, Larsen O, et al. Neoadjuvant chemotherapy in locally advanced colon cancer. A phase II trial. *Acta Oncol*. 2015;54:1747–53.
160. Jankiraman M, Vakiani E, Zeng Z, Pratilas CA, Taylor BS, Chitale D, et al. Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer. *Cancer Res* 2010; 70(14): 5901–11.
161. Jass J.R. Gastrointestinal polyposes: clinical, pathological and molecular features. *Gastroenterol Clin N Am* 2007;36:927-46, VIII.
162. Jee SH, Ohrr H, Sull JW, et al. Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women. *JAMA* 2005; 293:194.
163. Jones, S., Chen, W.-D., Parmigiani, G., Diehl, F., Beerwinkler, N., Antal, T., et al. (2008). Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4283–4288. doi:10.1073/pnas.

164. Jung BH, Beck SE, Cabral J, Chau E, Cabrera BL, et al. 2007. Activin type 2 receptor restoration in MSI-H colon cancer suppresses growth and enhances migration with activin. *Gastroenterology* 132:633–44
165. Kaalby L, Deding U, Kobaek-Larsen M, Havshoi AV, Zimmermann-Nielsen E, Thygesen MK, Kroeijer R, Bjørsum-Meyer T, Baatrup G. Colon capsule endoscopy in colorectal cancer screening: a randomised controlled trial. *BMJ Open Gastroenterol.* 2020 Jun;7(1):e000411. doi: 10.1136/bmjgast-2020-000411. PMID: 32601101; PMCID: PMC7326244.
166. Kadari M, Subhan M, Saji Parel N, Krishna PV, Gupta A, Uthayaseelan K, Uthayaseelan K, Sunkara NABS. CT Colonography and Colorectal Carcinoma: Current Trends and Emerging Developments. *Cureus.* 2022 May 11;14(5):e24916. doi: 10.7759/cureus.24916. PMID: 35719832; PMCID: PMC9191267.
167. Kadiyska T, Nossikoff A. Stool DNA methylation assays in colorectal cancer screening. *World J Gastroenterol.* 2015;21(35):10057–61.
168. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2015; 181:832.
169. Karamitopoulou E, Zlobec I, Koelzer VH, Langer R, Dawson H, Lugli A. Tumour border configuration in colorectal cancer: proposal for an alternative scoring system based on the percentage of infiltrating margin. *Histopathology* 2015; 67:464–73.
170. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O’Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359(17):1757–65.

171. Karoui M., Gallois C, Piessen G., Legoux J-L, Barbier E, Chaisemartin C, Lecaille C, Bouche O, Ammarguella H, Brunetti F., Prudhomme M., Regimbeau J-M, Glehen O., Lievre A., Portier G, Hartwig J, Goujon G, Romain B, Lepage C, Taieb J, Does neoadjuvant FOLFOX chemotherapy improve the prognosis of high-risk Stage II and III colon cancers? Three years' follow-up results of the PRODIGE 22 phase II randomized multicentre trial/ Colorectal Disease Volume23, Issue 6 June 2021 Pages 1357-1369 <https://doi.org/10.1111/codi.15585>
172. Kastrinos F, Syngal S. Inherited colorectal cancer syndromes. *Cancer J* 2011;**17**:405–15.
173. Kavuri SM, Jain N, Galimi F, et al. HER2 activating mutations are targets for colorectal cancer treatment. *Cancer Discov.* 2015; 5:832–841.
174. Kim YM, Park SY, Pyo H. Cyclooxygenase-2 (COX-2) negatively regulates expression of epidermal growth factor receptor and causes resistance to gefitinib in COX-2overexpressing cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 1367-1377
175. Kjaer-Frifeldt, S., Hansen, T. F., Nielsen, B. S., et al. (2012). The prognostic importance of miR-21 in stage II colon cancer: a population-based study. *Br. J. Cancer* **107**, 1169-1174. doi:10.1038/bjc.2012.365
176. Koenuma M, Yamori T, Tsuruo T. Insulin and insulin-like growth factor 1 stimulate proliferation of metastatic variants of colon carcinoma 26. *Jpn J Cancer Res* 1989; 80:51.
177. Kopetz S. Genomic classifier ColoPrint predicts recurrence in stage II colorectal cancer patients more accurately than clinical factors / S. Kopetz, J. Tabernero, R. Rosenberg, et al. // *The oncologist.* – 2015. – Vol. 20. – №2. – P. 127-133.

178. Kovacevic Z, Richardson DR . "The metastasis suppressor, Ndr-1: a new ally in the fight against cancer". *Carcinogenesis*. December 2006; 27 (12): 2355–66. doi:10.1093/carcin/bgl146. PMID 16920733.
179. Kulda V., Pesta M., Topolcan O., et al. (2010). Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. *Cancer Genet. Cytogenet.* **200**, 154-160. doi:10.1016/j.cancergencyto.2010.04.015
180. Kundu S. Common and mutation specific phenotypes of KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer cells revealed by integrative -omics analysis // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2021. № 1 (40). C. 1–19.
181. Lamouille S. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition/ S.Lamouille, J.Xu, R.Derynck. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2014. – № 15. – p. 178-96.
182. Land, S. R. Compliance with patient-reported outcomes in multicenter clinical trials: methodologic and practical approaches / S. R. Land, M. W. Ritter, J. P. Costantino et al. – 2007. – P. 5113-5120.
183. Langlois M.J., Bergeron S., Bernatchez G., Boudreau F., Saucier C., Perreault N., Carrier J.C., Rivard N. 2010. The PTEN phosphatase controls intestinal epithelial cell polarity and barrier function: role in colorectal cancer progression. *PLoS ONE*. 5, e15742
184. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., et al. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645–648.
185. Larsen I.K. Impact of colorectal cancer screening on future life style choices: a three-year randomized controlled trial / Larsen I.K.,

- T. Grotmol, K. Almendingen et al. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2007; 5(4): 477–483.
186. Latan H. (2018). PLS path modeling in hospitality and tourism research: The golden age and days of future past. In F. Ali, M. S. Rasoolimanesh, & C. Cobanoglu (Eds.), *Application of Partial Least Squares – Structural Equation Modeling (PLS-SEM) in Tourism and Hospitality Research*. Bingley: Emerald.
187. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 2016; 375:794
188. Lee S.L., Ryu H., Son A.R., Seo B., Kim J., Jung S.Y., Song J.Y., Hwang S.G., Ahn J. TGF- β and Hypoxia/Reoxygenation Promote Radioresistance of A549 Lung Cancer Cells through Activation of Nrf2 and EGFR. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016 г., стр. 2016:6823471.
189. Li N., Ma, J., Guarnera, M. A., et al. (2014a). Digital PCR quantification of miRNAs in sputum for diagnosis of lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **140**, 145-150. doi:10.1007/s00432-013-1555-5
190. Liang Y., Zhong, Z., Huang, Y., Deng, W., Cao, J., Tsao, G., et al. Stem-like cancer cells are inducible by increasing genomic instability in cancer cells. (2010). *Journal of Biological Chemistry*, 285(7), 4931–4940.
191. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS Mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26(3):374-9.
192. Lin HH, Wei NC, Chou TY, Lin CC, Lan YT, Chang SC, Wang HS, Yang SH, Chen WS, Lin TC, Lin JK, Jiang JK. Building

- personalized treatment plans for early-stage colorectal cancer patients
Oncotarget 2017 Feb 21;8(8):13805-13817. doi:
10.18632/oncotarget.14638.
193. Lin S., Gregory R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 321-333. doi:10.1038/nrc3932
194. Lind G.E. Identification of an epigenetic biomarker panel with high sensitivity and specificity for colorectal cancer and adenomas / G. E. Lind, S.A. Danielsen, T. Ahlquist, et al. // *Mol. Cancer*. – 2011. – Jul. – Vol. 10. – P. 85.
195. Link A., Balaguer F., Shen Y., et al. (2010). Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **19**, 1766-1774. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0027
196. Liu S, Jiang T, Xiao L, Yang S, Liu Q, Gao Y, Chen G, Xiao W. Total Neoadjuvant Therapy (TNT) versus Standard Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oncologist*. 2021 Sep;26(9):e1555-e1566. doi: 10.1002/onco.13824. Epub 2021 Jun 7. PMID: 33987952
197. Llosa N. J. et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* **5**, 43–51 (2015). 4
198. Loboda A, Nebozhyn MV, Watters JW, et al: EMT is the dominant program in human colon cancer. *Bmc Med genomics* **4**: 9, 2011
199. Loeb L, Springgate C., Battula N. II *Cancer Res.* 1974. Vol. 34. P. 2311-2321
200. Loughrey M.B., Quirke Ph., Shepherd N.A. Standards and datasets for reporting cancers: Dataset for histopathological reporting

- of colorectal cancer. — London: Royal College of Pathologists (UK), 2017. — 62 p.
201. Lugli A., Kirsch R., Ajioka Yo., et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016 // *Modern Pathology*. — 2017. — Vol. 30, №9. — P. 1299-1311.
202. Luo X., Stock, C., Burwinkel, B. and Brenner, H. (2013). Identification and evaluation of plasma microRNAs for early detection of colorectal cancer. *PLoS ONE* **8**, e62880. doi:10.1371/journal.pone.0062880
203. Maak M, Simon I, Nitsche U, Roepman P, Snel M, Glas AM, Schuster T, Keller G, Zeestraten E, Goossens I, Janssen KP, Friess H, Rosenberg R. Independent validation of a prognostic genomic signature (ColoPrint) for patients with stage II colon cancer. *Ann Surg*. 2013 Jun; 257(6): 1053-8. doi: 10.1097/SLA.0b013e31827c1180. PMID: 23295318
204. Mackay I.M. Real-time PCR in virology / I.M. Mackay, E.K. Arden, A. Nitsche // *Nucleic Acids Research*. — 2002. — Vol. 30. — P. 1292-1305.
205. Mahmood S, MacInnis RJ, English DR, Karahalios A, Lynch BM. Domain-specific physical activity and sedentary behaviour in relation to colon and rectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2017;46(6):1797–1813.
206. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer*. 1994; 73: 2680 - 6.
207. Mandhani J., Nayak J., Parida M. (2020). Interrelationships among service quality factors of Metro Rail Transit System: An

- integrated Bayesian networks and PLS-SEM approach.
Transportation Research Part A Policy and Practice. 140. 320-336.
10.1016/j.tra.2020.08.014
208. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, et al. 1995. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268:1336–38
209. Martina L. Veigl, Lakshmi Kasturi, Joseph Olechnowicz et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers *PNAS* July 21, 1998 95 (15) 8698-8702
210. Maughan TS, Adams RA, Smith CG et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* 2011; 377: 2103-2114
211. McSorley S.T., Horgan P.G., McMillan D.C. The impact of the type and severity of postoperative complications on long-term outcomes following surgery for colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016 г., 97, стр. 168-77
212. Mitchell SM, Ho T, Brown GS, Baker RT, Thomas ML, McEvoy A, et al. Evaluation of methylation biomarkers for detection of circulating tumor DNA and application to colorectal cancer. *Genes (Basel)*. 2016; <https://doi.org/10.3390/genes7120125>.
213. Mitchell SM, Ross JP, Drew HR, Ho T, Brown GS, Saunders NF, et al. A panel of genes methylated with high frequency in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2014;14:54.
214. Mitrovic B., Schaeffer D.F., Riddel R.H., Kirsch R. Tumor bidding in colorectal carcinoma: time to take notice // *Modern Pathology*. — 2012. — Vol. 25, №10. — P. 1315-1325.

215. Mogoantă S.S., Vasile I., Totolici B. Colorectal cancer - clinical and morphological aspects. *Rom J Morphol Embryol* 2014; 55(1):103-10.
216. Mori K, Toiyama Y, Otake K, Proteomics analysis of differential protein expression identifies heat shock protein 47 as a predictive marker for lymph node metastasis in patients with colorectal cancer // *Int J Cancer*. 2017 Mar 15;140(6):1425-1435. doi: 10.1002/ijc.30557.
217. Morikawa T, Kato J, Yamaji Y, Wada R, Mitsushima T, Shiratoti Y. A comparison of the immunochemical fecal occult blood test and total colonoscopy in the asymptomatic population. *Gastroenterol*. 2005;129(2):422–8.
218. Morodomi T., Isomoto H., Shirouzu K., et al. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer // *Cancer*. - 1989. - Vol. 63, №3. - P. 539-543.
219. Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, et al. Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2008;51:568–572.
220. Nakamura, M., Abe, Y. and Tokunaga, T. (2002), Pathological significance of vascular endothelial growth factor A isoform expression in human cancer. *Pathology International*, 52: 331-339. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.2002.01367.x>
221. National Comprehensive Cancer Network. National Comprehensive Cancer Network. [В Интернетe] <https://www.nccn.org/>.
222. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2009; 205(12):858–62.

223. Nowell P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. Science. 1976 г., Т. 194, 4260, стр. 23-28.
224. Nunez C, Nair-Shalliker V, Egger S, et al. Physical activity, obesity and sedentary behaviour and the risks of colon and rectal cancers in the 45 and up study. BMC Public Health 2018; 18:325.
225. Obaro AE, Burling DN, Plumb AA. Colon cancer screening with CT colonography: logistics, cost-effectiveness, efficiency and progress. Br J Radiol. 2018 Oct;91(1090):20180307. doi: 10.1259/bjr.20180307. Epub 2018 Jul 5. PMID: 29927637; PMCID: PMC6350489.
226. Ochs-Balcom Heather M., Kanth Priyanka, Farnham James M. Colorectal cancer risk based on extended family history and body mass index // Genetic Epidemiology Volume 44, Issue 7, First published: 16 July 2020
227. Oh TJ, Oh HI, Seo YY, Jeong D, Kim C, Kang HW, et al. Feasibility of quantifying SDC2 methylation in stool DNA for early detection of colorectal cancer. Clin Epigenetics. 2017;9:126.
228. Okita A. Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer // Oncotarget. 2018. № 27 (9). C. 18698–18711.
229. Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M . Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. Dis Colon Rectum 2003;46:1400–1406.
230. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H . Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. J Surg Oncol 2003;83:42–47.

231. Onieva-García MÁ, Llanos-Méndez A, Baños-Álvarez E, Isabel-Gómez R. A systematic review of the clinical validity of the Cologuard™ genetic test for screening colorectal cancer. *Rev Clin Esp (Barc)*. 2015 Dec;215(9):527-36. English, Spanish. doi: 10.1016/j.rce.2015.08.002. Epub 2015 Oct 2. PMID: 26434810.
232. Oue N., Anami, K., Schetter, A. J., et al. (2014). High miR-21 expression from FFPE tissues is associated with poor survival and response to adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Int. J. Cancer* **134**, 1926-1934. doi:10.1002/ijc.28522
233. Paul P. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance / P. Paul, N. Rouas-Freiss, I. Khalil-Daher, et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 95. – P. 4510-451
234. Pei JP, Zhang CD, Fu X, Ba Y, Yue S, Zhao ZM, Dai DQ. A Novel TNM Classification for Colorectal Cancers based on the Metro-ticket Paradigm. *J Cancer*. 2021 Apr 5;12(11):3299-3306. doi: 10.7150/jca.55097. PMID: 33976739; PMCID: PMC8100802.
235. Petter S. (2018). “Haters gonna hate”: PLS and information systems research. *The DATA BASE for Advances in Information Systems*, 49(2), 10–13.
236. Phipps AI, Buchanan DD, Makar KW, Win AK, Baron JA, Lindor NM, et al. KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers. *Br J Cancer* 2013; 108(8):1757-64.
237. Pino M.S., Chung D.C., The chromosomal instability pathway in colon cancer, *Gastroenterology* 138 (2010) 2059–2072.
238. Pinto M.T., Covas D.T., Kashima S., Rodrigues C.O.. Endothelial Mesenchymal Transition: Comparative Analysis of Different Induction Methods. *Biological procedures online*. 2016 г.,

- T. 27, 18, стр. 10.
239. Porta C, Paglino C and Mosca A: targeting Pi3K/Akt/mtor signaling in cancer. *Front Oncol* 4: 64, 2014.
240. Potter NT, Hurban P, White MN, Whitlock KD, Lofton-Day CE, Tetzner R, et al. Validation of a real-time PCR-based qualitative assay for the detection of methylated SEPT9 DNA in human plasma. *Clin Chem*. 2014;60(9):1183–91.
241. Powell S.M., Zilz N., Beazer-Barclay Y., Bryan T.M., et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis // *Nature*. 1992. Vol. 359 (6392). P. 235–237
242. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. (2007). *Histopathology*, 50(1), 151–62.
243. Pretlow TP, Pretlow TG. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? 2005. *Biochim. Biophys. Acta* 1756:83–96
244. Primrose JN, Falk S, Finch-Jones M, Valle JW, O'Reilly D, Siriwardena A, et al. Systemic chemotherapy with or without cetuximab in patients with resectable colorectal liver metastasis: the New EPOC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2014;15:601
245. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 2011;60:116–29
246. Qasim BJ, Ali HH, Hussein AG (2013). "Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-7 in human colorectal adenomas using specified automated cellular image analysis system: a clinicopathological study". *Saudi J Gastroenterol*. 19 (1): 23–7. doi:10.4103/1319-3767.105916.PMC 3603485. PMID 23319034.

247. Quirke P., Dixon M.F. The prediction of local recurrence in rectal adenocarcinoma by histopathological examination. *Int J Colorect Dis* 1988;3(2):127–31.
248. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. 2002. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418:934
249. Ramli N. A., Latan H., & Nartea G. V. (2018). Why should PLS-SEM be used rather than re-gression? Evidence from the capital structure perspective. In N.Avkiran, & C. Ringle (Eds.), *Partial least squares structural equation modeling* (pp.171–209). Cham: Springer International.
250. Ramli N. A., Latan H., & Solovida G. T. (2019). Determinants of capital structure and firm financial performance—A PLS-SEM approach: Evidence from Malaysia and Indonesia. *Quarterly Review of Economics and Finance*, 71, 148–160.
<https://doi.org/10.1016/j.qref.2018.07.001>
251. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*. 1997;275:967–969
252. Rangul V, Sund ER, Mork PJ, et al. The associations of sitting time and physical activity on total and site-specific cancer incidence: Results from the HUNT study, Norway. *PLoS One* 2018; 13:e0206015.
253. Rasmussen SL, Krarup HB, Sunesen MB, Johansen MB, Stender MT, Perderson IS, et al. Hypermethylated DNA, a circulating biomarker for colorectal cancer detection. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180809.

254. Ren A., Dong, Y., Tsoi, H. and Yu, J. (2015). Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 2810-2823. doi:10.3390/ijms16022810
255. Rex D. K. et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am. J. Gastroenterol.* **107**, 1315–1329 (2012).
256. Richardson RB. p53 mutations associated with aging-related rise in cancer incidence rates. *Cell Cycle* 2013; **12**: 2468-2478
257. Rigdon E., Ringle C., 2011. Assessing heterogeneity in customer satisfaction studies: across industry similarities and within industry differences. *Adv. Int. Mark.* **22**, 169–194.
258. Robb K.A. The impact of individually tailored lifestyle advice in the colorectal cancer screening context: a randomized pilot study in North-West London. / K.A. Robb, E. Power, I. Kralj Hans et al. // *Preventive Medicine* 2010; **51** (December (6)): 505–508.
259. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types. / C. Rosales // *Front Physiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 113.
260. Rouanet P, Rullier E, Lelong B, Maingon P, Tuech JJ, Pezet D, et al. Tailored treatment strategy for locally advanced rectal carcinoma based on the tumour response to induction chemotherapy: preliminary results of the French phase II multicenter GRECCAR4 trial. *Dis Colon Rectum.* 2017;**60**:653–63.
261. Sada M. Cell kinetics, p53 and bcl-2 expression, and c-Ki-ras mutations in flat-elevated tubulovillous adenomas and adenocarcinomas of the colorectum: comparison with polypoid lesions. / M. Sada, H. Mitomi, M. Igarashi, et al. // *Scand J Gastroenterol.* – 1999. – Aug. – Vol. 34. – №8. – P. 798-807.
262. Saeidi P., Saeidi S. P., Sofian S., Saeidi S. P., Nilashi M., &

Mardani A. (2019). The im-pact of enterprise risk management on competitive advantage by moderating role of information technology. *Computer Standards and Interfaces*, 63, 67–82.

<https://doi.org/10.1016/j.csi.2018.11.009>

263. Said A.H., Raufman J-P., Xie G. The role of matrixmetalloproteinases in colorectal cancer. *Cancers*. 2014; 6 (1):366–375
264. Saliari M., Jalal R., Javadmanesh A. Differential expression analysis of genes and long non-coding RNAs associated with KRAS mutation in colorectal cancer cells// *Scientific Reports*. 2022. № 1 (12)
265. Samowitz W.S., Powers M.D., Spirio L.N., Nollet F., van Roy F., Slattery M.L. Beta catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. 1999. *Cancer Res*. 59, 1442–1444
266. Santamaría I, G Velasco, M Cazorla, A Fueyo, E Campo, C López-Otín. Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. *Cancer Res*. 1998 Apr 15;58(8):1624-30.
267. Sawayama H. Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification // *Annals of gastroenterological surgery*. 2020. № 5 (4). C. 528–539
268. Schee K., Boye K., Abrahamsen, T. W., et al. (2012). Clinical relevance of microRNA miR-21, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-106a and miR-145 in colorectal cancer. *BMC Cancer* **12**, 505. doi:10.1186/1471-2407-12-505
269. Schetter A. J., Leung, S. Y., Sohn, J. J., et al.(2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome

- in colon adenocarcinoma. JAMA 299, 425-436.
doi:10.1001/jama.299.4.425
270. Schoenfeld P, Cash B, Flood A, et al. Colonoscopic screening of average-risk women for colorectal neoplasia. N Engl J Med 2005; 352:2061
271. Schoenfeld P, Cash B, Flood A, et al. Colonoscopic screening of average-risk women for colorectal neoplasia. N Engl J Med 2005; 352:2061
272. Schrag D., Rifas-Shiman S., Saltz L. et al. Adjuvant chemotherapy use for medicare beneficiaries with stage II colon cancer // Journal of Clinical Oncology. 2002. № 19 (20). C. 3999–4005
273. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nat Rev Cancer 2007; 7(4):295–308.
274. Seligmann JF, Fisher D, Smith CG, Richman SD, Elliott F et al. Investigating the poor outcomes of BRAFmutant advanced colorectal cancer: analysis from 2530 patients in randomised clinical trials. Ann Oncol 2017; 28: 562–568. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw645>
275. Seymour MT, Morton D, on behalf of the International FOxTROT Trial Investigators. FOxTROT: an international randomised controlled trial in 1052 patients evaluating neoadjuvant chemotherapy for colon cancer. J Clin Oncol. 2019;37:3504. (suppl; abstr#3504).
276. Sharif S. P. and Lai M. M. (2015). The effects of corporate disclosure practices on firm per-formance, risk and dividend policy. International Journal of Disclosure and Governance, 12(4):311{326.
277. Shaukat A, Dostal A, Menk J, Church TR. BMI is a risk factor for colorectal cancer mortality. Dig Dis Sci. 2017;62(9):2511–2517

278. Shaw RJ and Cantley LC: Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441: 424-430, 2006
279. Shibuya H., Inuma, H., Shimada, R., et al. (2010). Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer. *Oncology* **79**, 313-320. doi:10.1159/000323283
280. Shinde A.V., Frangogiannis N.G.. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014 г., 70, стр. 74-82.
281. Sieber O.M., Tomlinson I.P., Lamlum H. The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor – genetics function and disease // *Mol.Med. Today*. 2000. Vol. 6. P. 462–469.
282. Siegmund K.D., Marjoram, P., Woo, Y. J., Tavaré, S., & Shibata, D. Inferring clonal expansion and cancer stem cell dynamics from DNA methylation patterns in colorectal cancers. (2009). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4828–4833.
283. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2011; 103:863–875.
284. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953 Sep;6(5):963-8. doi: 10.1002/1097-0142(195309)6:5<963::aid-cnrcr2820060515>3.0.co;2-q. PMID: 13094644.
285. Smit VT, Boot AJ, Smits AM, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, Bos JL. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(16):7773–82.

286. Stegeman I. Colorectal cancer risk factors in the detection of advanced adenoma and colorectal Cancer / I. Stegeman, T.R. de Wijkersloothb, E.M. Stoop et al. // *Cancer Epidemiology* 2013; 37: 278–283.
287. Stewart B.W., Wild C.P. World cancer report. Lyon : IARC, 2014. стр. 916. 978-92-832-0432-9
288. Strubberg A, Madison B. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications *Disease Models & Mechanisms* 2017 10: 197-214; doi: 10.1242/dmm.027441
289. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 978312
290. Swierczak A. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* / A. Swierczak, K. A. Mouchemore, J. A. Hamilton, et al. // – 2015. – Vol. 34. – №4. – P. 735–751.
291. Takagi, Y., Kohmura, H., Futamura, M., Kida, H., Tanemura, H., Shimokawa, K., et al. Somatic alterations of the DPC4 gene in human colorectal cancers in vivo. (1996) *Gastroenterology*,111(5), 1369–1372.
292. Tan C, Du X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18(37):5171- 80.
293. Tang L.H., Berlin G., Branton Ph., et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum // *CAP Cancer Protocols and Checklists.* — 2016. — URL: [http:// www.cap.org/apps/cap.portal](http://www.cap.org/apps/cap.portal) (дата обращения: 30.06.2018).
294. Taylor DP, Canon-Albright LA, Sweeney C, Williams MS, Haug PJ, Mitchell JA, et al. Comparison of compliance for colorectal

- cancer screening and surveillance by colonoscopy based on risk. *Genet Med.* 2011;13(8):737–43.
295. Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, Zhao Y, Harris DC, Zheng G. E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 567305
296. TNM Classification of Malignant Tumors, 8th Edition / J.D. Brierley, M.K. Gospodarowicz, Ch. Wittekind (eds). — New-York: Wiley Blackwell, 2016. — 272 p.
297. Toiyama Y., Hur, K., Tanaka, K., et al. (2014). Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Ann. Surg.* **259**, 735-743. doi:10.1097/SLA.0b013e3182a6909d
298. Toiyama Y., Takahashi, M., Hur, K., et al. (2013). Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 849-859. doi:10.1093/jnci/djt101
299. Towler B. P., Jones, C. I. and Newbury, S. F. (2015). Mechanisms of regulation of mature miRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 1208-1214. doi:10.1042/BST20150157
300. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 710-715
301. Tsukanov AS, Shelygin YA, Semenov DA, Pikunov DY, Polyakov AV. [Lynch syndrome: current status.] *Medical Genetics* 2017; 16: 11–18
302. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for colorectal cancer: recommendation and Rationale. *Ann Inter Med.* 2002;137:129–31.

303. Vacante M, Borzi MB, Basile F, Biondi A. Biomarkers in colorectal cancer: Current utility and future perspectives. *World J Gastroenterol.* 2018;6(15):869–81.
304. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011; 29(15):2011–9.
305. Van Cutsem E. Improving outcomes in colorectal cancer: Where do we go from here? / E. Van Cutsem, J.M. Borra`sb, A. Castells et al. // *European Journal of Cancer* 2013; 49, 2476–2485.
306. Van Cutsem E., Borra`sb J.M., Castells A. *Eur. J. of Cancer*, 2013, Vol. 49, p. 2476–2485.
307. Vedeld HM, Goel A, Lind GE. Epigenetic biomarkers in gastrointestinal cancers: the current state and clinical perspectives. *Sem Cancer Biol.* 2017; <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.12.004>.
308. Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 2010; 10(12):842–57.
309. Villamil B.P. Colon cancer molecular subtypes identified by expression profiling and associated to stroma, mucinous type and different clinical behavior. / BP. Villamil, AR. Lopez, SH. Prieto. // *BMC Cancer.* – 2012. – Vol. 12. – P. 260.
310. Vodolazhskiy DI, Kit OA, Gevorgyan YuA, Soldatkina NV. Features of KRAS utation in advanced colorectal cancer. *Eurasian J Oncol* 2014; 3(3):82-4

311. Waluga M, Zorniak M, Fichna J, Kukla M, Hartleb M. Pharmacological and dietary factors in prevention of colorectal cancer. *J Physiol Pharmacol*. 2018 Jun;69(3). doi: 10.26402
312. Wang C., Ma L., Zhang Y., Chen N., & Wang W. (2022). Spatiotemporal dynamics of wetlands and their driving factors based on PLS-SEM: A case study in Wuhan. *The Science of the total environment*, 806(Pt 3), 151310.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151310>
313. Wang CY, Shao C, McDonald AC, Amonkar MM, Zhou W, Bortnichak EA, Liu X. Evaluation and Comparison of Real-World Databases for Conducting Research in Patients With Colorectal Cancer. *JCO Clin Cancer Inform*. 2023 Jul;7:e2200184. doi: 10.1200/CCI.22.00184. PMID: 37437227.
314. Wang DR, Tang D. Hypermethylated sFRP2 gene in fecal DNA is a high potential biomarker for colorectal cancer noninvasive screening. *World J Gastroenterol*. 2008;14(4):524–31.
315. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009;33:134–141.
316. Wang W, Liu Sh, Jiang Ch, High Expression of RARβIs a Favorable Factor in Colorectal Cancer // Volume 2019 Article ID 7138754 <https://doi.org/10.1155/2019/7138754>
317. Wang X., Wang, J., Ma, H., et al., (2012). Downregulation of miR-195 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Med. Oncol*. **29**, 919-927. doi:10.1007/s12032-011-9880-5
318. Wang YM, Zhou QY, Zhu JZ, Zhu KF, Yu CH, Li YM. Systematic review with meta-analysis: alcohol consumption and risk of colorectal serrated polyp. *Dig Dis Sci*. 2015;60(7):1889–1902.

319. Watkins LF, Lewis LR, Levine AE. Characterization of the synergistic effect of insulin and transferrin and the regulation of their receptors on a human colon carcinoma cell line. *Int J Cancer* 1990; 45:372.
320. Waye J.D., Rex D.K., Williams C.B. *Colonoscopy: Principles and Practice*: Wiley-Blackwell. 2005. ISBN-13 978-1-4051-1449-3.
321. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M. et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38: 787-793
322. Wimmer K, Kratz CP, Vasen HF, Caron O. et al. Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'care for CMMRD' (C4CMMRD). *J Med Genet* 2014; 51: 355-365
323. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. 2007. *Science* 318:1108–13
324. Woods MO, Younghusband HB, Parfrey PS, et al. The genetic basis of colorectal cancer in a population-based incident cohort with a high rate of familial disease. *Gut* 2010;59:1369–77.
325. Xi Y., Formentini A., Chien M., et al. (2006). Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights* 2, 113-121
326. Xie M, Zhao F, Zou X, Jin Sh, Xiong Sh. The association between CCND1 G870A polymorphism and colorectal cancer risk: A meta-analysis/ *Medicine (Baltimore)*. 2017 Oct;96(42):e8269. doi: 10.1097/MD.00000000000008269.
327. Yao Z, Yaeger R, Rodrik-outmezguine VS, Tao A, Torres NM et al. Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the

- inhibition of activated RAS. *Nature* 2017; 548: 234–238.
<https://doi.org/10.1038/nature23291>
328. Yari A, Samoudi A, Afzali A, Karam ZM, Karimaldini NK et al. Mutation Status and Prognostic Value of KRAS and BRAF in Southeast Iranian Colorectal Cancer Patients: First Report from Southeast of Iran. *J Gastrointest Cancer* 2021; 52: 557–568.
<https://doi.org/10.1007/s12029-020-00426-8>
329. Yersal O. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. /, O. Yersal, S. Barutca // *World J Clin Oncol.* – 2014. – Vol. 5, –№3. – P. 412–424.
330. Yin T., Du R., Wang Y., Huang J., Ge, S., Huang Y., Tan Y., Liu Q., Chen Z., Feng H., Du J., Wang Y., & Wang G. (2021). Two-stage degradation and novel functional endothelium characteristics of a 3-D printed bioresorbable scaffold. *Bioactive materials*, 10, 378–396. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.08.020>
331. Yoon Dae Han, Tae Jeong Oh, Tae-Ha Chung, Hui Won Jang, Youn Nam Kim, Sungwhan An & Nam Kyu Kim. Early detection of colorectal cancer based on presence of methylated syndecan-2 (SDC2) in stool DNA // *Clinical Epigenetics* volume 11, Article number: 51 (2019)
332. Yothers G. Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin. / G. Yothers, MJ. O'Connell, M. Lee, et al. // *J Clin Oncol.* – 2013. – Dec 20. – Vol. 31. – №36. – P. 4512-4519
333. Yun J. et al. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* 325, 1555–1559 (2009).

334. Zatarain JR., Thanki, K., Nicholls, ME., et al. Cystathionine- β -Synthase (CBS) and the progression of colorectal carcinogenesis; Proceedings of the AACR; 2017.
335. Zhang G. J., Zhou T., Liu Z. L., (2013b). Plasma miR-200c and miR-18a as potential biomarkers for the detection of colorectal carcinoma. *Mol. Clin. Oncol.* **1**, 379-384. doi:10.3892/mco.2013.61
336. Zhang H, Zhu Y, Wu Y, Zhang P, Qi J. Detection of promoter hypermethylation of Wnt antagonist genes in fecal samples for diagnosis of early colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(20):6329–35.
337. Zhao F, Bai P, Xu J, Li Z, Muhammad S, Li D, Zhang Z, Gao Y, Liu Q. Efficacy of cell-free DNA methylation-based blood test for colorectal cancer screening in high-risk population: a prospective cohort study. *Mol Cancer.* 2023 Sep 28;22(1):157. doi: 10.1186/s12943-023-01866-z. PMID: 37770864; PMCID: PMC10538018.
338. Zhu Y., Xu, A., Li, J., et al. (2016). Fecal miR-29a and miR-224 as the noninvasive biomarkers for colorectal cancer. *Cancer Biomark* **16**, 259-264. doi:10.3233/CBM-150563