

На правах рукописи

СТАНОВЕВИЧ Углеша

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

14.01.12 – онкология

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

Москва – 2016

Работа выполнена в ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России (директор – академик РАН, профессор Солодкий В.А.)

Научный консультант:

академик РАН, профессор, **Солодкий Владимир Алексеевич**

Официальные оппоненты:

Член-корреспондент РАН, профессор, **Кит Олег Иванович** ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт», Минздрава России, директор института.

Доктор медицинских наук, профессор, **Кузьминов Александр Михайлович** ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих» МЗ РФ, отделение общей колопроктологии с группой изучения семейного аденоматоза, руководитель отделения

Доктор медицинских наук, **Любченко Людмила Николаевна**, ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, лаборатория клинической онкогенетики, руководитель лаборатории.

Ведущая организация: Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России

Защита состоится «27» марта 2017 г. 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д.208.081.01 при ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России по адресу: 117997 Москва, ул. Профсоюзная, дом 86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России по адресу: 117997 Москва, ул. Профсоюзная, дом 86.

Автореферат разослан « ____ » февраля 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
Доктор медицинских наук, профессор

Цаллагова З.С.

Общая характеристика работы

Актуальность

Колоректальный рак (КРР) занимает одно из ведущих мест в структуре онкологической заболеваемости и смертности в мире, несмотря на имеющийся арсенал высокочувствительных диагностических методов как рутинных (эндоскопических, рентгенологических, исследование кала на скрытую кровь), так и высокотехнологичных (КТ, МРТ, ПЭТ, молекулярно-генетический анализ энтероцитов в кале) [Каприн А.Д. и соавт., 2016; WHO, 2012; Vinefa G. et al., 2014]. В России ситуация по КРР характеризуется ростом заболеваемости и поздним выявлением (на IV стадии в 25% наблюдений), что свидетельствует об отсутствии эффективных мер профилактики [Vode Z. et al., 2010]. Широко дискутируемыми остаются ряд вопросов, связанных с особенностями постадийного лечения КРР: необходимость адъювантной химиотерапии (АПХТ) при II стадии, прогнозирование ответа на назначение химио- и таргетных препаратов, целесообразность проведения циторедуктивной операции при IV стадии [Vinefa G. et al., 2014.] При использовании клинико-морфологических факторов прогноза нередко отмечается прогрессирование заболевания, что, в свою очередь, говорит об их недостаточной точности.

В течение последних двух десятилетий пристально изучаются различные молекулярные маркеры, которые могли бы выступать в качестве предикторов эффективности адъювантного лечения и увеличить общую выживаемость [Labianca R. et al., 2013]. До настоящего времени отсутствует однозначное мнение по использованию полученных молекулярно-генетических данных для назначения адъювантной терапии больным КРР. Возможным решением проблемы может быть выделение категории пациентов с высоким риском рецидивирования (в т.ч. местного рецидива, отдаленного метастазирования) с использованием методов молекулярно-генетического анализа, в частности, анализа экспрессии генов, способного дать дополнительную информацию о пролиферативной и метастатической активности опухоли [Wang Y. et al., 2004; Barrier A. et al., 2007]. Существующие прогностические модели (OncotypeDXcoloncancer™ (GenomicHealth, Inc.), Coloprint (Agendia), ColDx) [Goel G., 2014; Kopetz S. et al. 2015; Brenner B. et al., 2106,] моделируют вероятность рецидива на основе оценки уровня экспрессии генов в ткани опухоли. Однако, данные модели не дают возможность прогнозировать эффективность планируемой адъювантной полихимиотерапии (АПХТ) и, в связи с этим, не рекомендованы к клиническому использованию [Labianca R. et al., 2013; NCCN, 2015]. Кроме того, ни одна из существующих моделей не позволяет прогнозировать длительность периода

безрецидивной выживаемости [Goel G. 2014; Kopetz S. et al. 2015; Brenner B. et al., 2016].

Одной из причин отсутствия детального прогноза времени рецидива, эффективности адьювантного лечения является углубление и детализация молекулярных характеристик преимущественно первичной опухоли, при этом систематически упускается из виду системность опухолевого процесса как такового. Анализ экспрессии генов в «морфологически неизменной ткани толстой кишки, окружающей опухоль», исследование, которое не проводится ни в одной из прогностических моделей, также может быть независимым фактором прогноза безрецидивной и общей выживаемости больных [Barrier A. Et al., 2007; Lax S. et al., 2012]. Несмотря на отдельные публикации, комплексное прогностическое значение сравнительного анализа экспрессии генов в опухоли и тканях, окружающих опухоль, до настоящего времени не изучалось. Большинство исследователей в качестве образцов контроля используют «морфологически неизменную кишку» того же пациента, что противоречит работам патоморфологов, обнаруживавших микроскопические и ультрамикроскопические особенности как опухоли, так и прилегающих участков толстой кишки [Jimenez Cardoso J.M. et al., 1971; Phelps P.C. et al., 1979; Motta P.M. et al., 1988]. Выше сказанное ставит под сомнение правильность клинической трактовки полученных отличий в экспрессии тех или иных генов в ткани опухоли по сравнению с прилегающими участками толстой кишки, свободными от опухолевой инвазии. Изучение молекулярно-генетических особенностей КРР все больше указывает на значительную гетерогенность опухоли данной локализации даже при сходной морфологической картине (степень дифференцировки, глубина инвазии, наличие регионарных и отдаленных метастазов) и необходимости дополнения морфологического диагноза молекулярным [WHO 2012; Vinefa G. et al., 2014].

Таким образом, очевидна необходимость продолжения фундаментальных клинических исследований в данном направлении, результаты которых могут стать основой для изменения диагностической, лечебной и профилактической концепции как при КРР, так и при злокачественном росте в целом.

В связи с выше изложенным избрана **цель настоящего исследования:** изучить и клинически оценить результаты молекулярно-генетических исследований толстой кишки для обоснования оптимизации лечебно-диагностического алгоритма при колоректальном раке.

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

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

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

3. Проанализировать экспрессию 64 генов, ответственных за пролиферацию, апоптоз, ангиогенез, адгезию, ремоделирование межклеточного матрикса, регуляцию врожденного и приобретенного иммунитета в четырех группах образцов: образцах ткани опухоли, метастаза, слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком и контрольных образцах.

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

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

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

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

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

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

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

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

Научная новизна

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

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

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

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

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

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

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

Практическая значимость

Практическая значимость работы заключается в основанных на учете выявленных клинических особенностей первично-множественного злокачественного поражения при колоректальном раке (молочные железы, предстательная железа, другой отдел ободочной и прямой кишки, эндометрий, яичники, почки, желудок) предложениях по уточнению диагностического алгоритма при КРР и включению маммографии, ультразвукового исследования предстательной железы и анализа крови на PSA при аденокарциноме толстой кишки, а также колоноскопии при аденокарциноме молочных желез, предстательной железы и почек.

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

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

Определена необходимость оценки экспрессии генов P16, IL7, IL2, BAX, CD56, MMP11, IL12a, TLR4, CD45, GNLV, LIFR, IL15, MMP2, IL2Ra, CD69, VEGFA121 собственно в первичной опухоли и генов CTSL2, CCNB1, MYBL2, TERT, GREM1, CYP19A в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста у больных колоректальным раком для формирования групп риска по прогрессированию колоректального рака и

обоснована целесообразность проведения молекулярно-генетического исследования слизистой оболочки толстой кишки без макро- и микроскопических признаков опухолевого роста в указанных группах.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

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

Внедрение результатов в практику

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

Апробация работы:

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

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

Публикации.

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

Структура и объем диссертации.

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

Материал и методы исследования

Для решения поставленной цели в исследование включено 605 человек, обратившихся в ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ с 1996 по 2015 год (рис. 1). Из них 555 человек, страдающих КРР различных стадий, составили основную группу, и 50 человек, сопоставимых по возрасту и полу здоровых волонтеров с верифицированным инструментально и морфологически отсутствием заболевания толстой кишки, а также онкологическим процессом другой локализации, которые составили контрольную группу (далее по тексту контрольная группа). Исследование одобрено комитетом по этике ФГБУ «РНЦРР» МЗ России.

Сбор клинического материала проводился на базе научно-исследовательского отдела хирургии и хирургических технологий в онкологии. Обследование и лечение пациентов осуществлялось в профильных клинических подразделениях ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ согласно утвержденным клиническим протоколам РНЦРР. Морфологическое исследование выполнено в патологоанатомическом отделении ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ (зав. отделением, д.м.н. О.П. Близнюков). Молекулярно-генетическое исследование проведено в научно-исследовательском отделе молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей - подразделение ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ (зав. отделом, д.м.н., профессор, заслуженный врач России – В.К. Боженко).

Критериями включения в исследование для основной группы явилось морфологически подтвержденное наличие злокачественной эпителиальной опухоли ободочной или прямой кишки. Критериями исключения для пациентов основной группы явились: отказ пациента от включения в исследование, рак анального канала и рак аппендикса, неэпителиальная злокачественная опухоль ободочной и прямой кишки, рак, развившийся на фоне диффузного семейного полипоза, проведение неoadъювантной химио-, лучевой или химиолучевой терапии. Для пациентов контрольной группы критериями включения являлись – информированное добровольное согласие на включение в исследование, согласие на проведение биопсийного забора слизистой ободочной кишки при плановой колоноскопии, отсутствие онкологического заболевания в анамнезе и на момент исследования, как и отсутствие воспалительных заболеваний и полипов ободочной и прямой кишки.

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

Дизайн исследования характеризовался наличием ретро- и проспективной составляющей основной группы 375 и 180 больных соответственно (Рис. 1). В контрольную группу больных вошли 50 добровольцев. Из них мужчин 27 (54,0%) и 23 женщины (46,0%) в возрасте от 39 до 75 лет, средний возраст пациентов в контрольной группе составил 60,1±7,25 года.

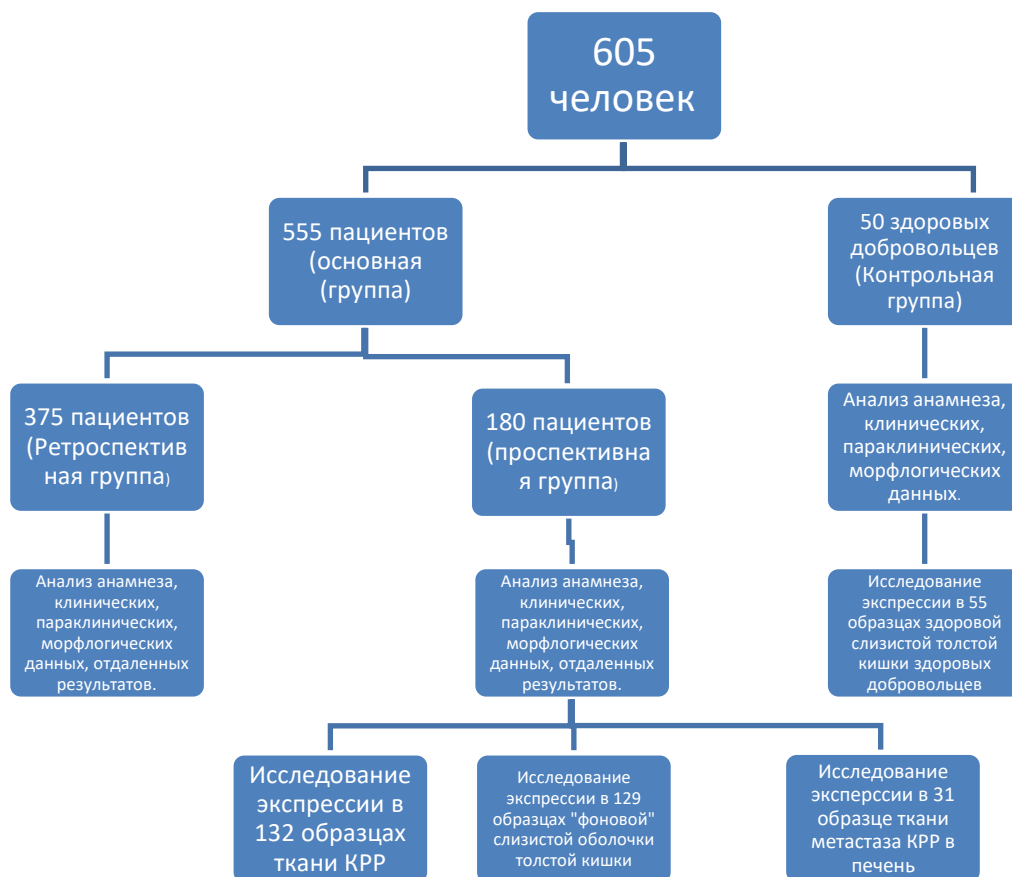


Рис 1. Дизайн исследования

Формирование групп сравнения проводилось в зависимости от решаемой задачи. Репрезентативность групп определяли по формулам оценки репрезентативности для количественных и качественных признаков при неодинаковом числе наблюдений в группах.

Клиническое сравнение больных КРР осуществлялось по традиционным параметрам: клинико-anamнестические особенности, морфологическая характеристика опухоли (локализация и размер, гистологическое строение, глубина инвазии, степень злокачественности, наличие регионарных и отдалённых метастазов, сосудистая и периневральная инвазия), а также непосредственным и отдаленным результатам лечения. На каждого обследованного пациента заполнялась карта и электронная база данных, позволяющая фиксировать, а затем анализировать возраст, антропометрические показатели, жалобы, данные семейного и аллергологического анамнеза, наличие и характер течения

соматических заболеваний, гинекологический статус у женщин, данные морфологического и молекулярно-генетического исследований, вид, характер, эффективность проводимой терапии. Специальное онкологическое обследование включало эндоскопические, лучевые, морфологические и молекулярно-генетические методы обследования.

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

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

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

Первым этапом исследования явилось создание базы данных пациентов, прошедших лечение в РНЦРР по поводу КРР за период с 1996 по 2011 годы (375 человек). Изучены непосредственные и отдаленные результаты лечения в зависимости от клинико-anamnestических особенностей больных КРР, морфологических параметров опухоли (локализация и размер опухоли, глубина инвазии, гистологическое строение, степень злокачественности, наличие регионарных/отдаленных метастазов). Параллельно создана проспективная база данных больных КРР, проходивших лечение в условиях центра с 2012 по 2015

год включительно – 180 человек. У данной группы пациентов также проведен анализ клинико-anamнестических данных, морфологических параметров опухоли, изучены непосредственные и отдаленные результаты лечения. Кроме того, произведено определение уровня экспрессии генов MGB1, CTSL2, BCL2, MYC, BIRC5, CCND1, NDRG1, CD68, Ki-67, TERT, HER2, PTEN, BAG1, PGR, CCNB1, ESR1, GRB7, MMP11, STK15, MYBL2, P16, SCUBE2, MMP9, GSTM1, GNLY, P14, IGF1, COX-2, IGF2, CYP19A, GREM1, MMP2, PAPPА, MMP7, IL-2, MMP8, IL-2Ra, IL-6, IL-12a, IL-7, IL-15, IL-8, IL-1 β , IL-10, TPA, IFN- γ , CD45, TNF- α , CD56, TGF- β , CD69, VEGFA121, BAX, VEGFA165, TLR2, VEGFA189, TLR4, HLA-G1, TLR7, HLA-G5, GATA3, LGALS1, LIF, LIFR методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в следующих образцах ткани:

1. Ткань аденокарциномы толстой кишки - 132 образца (КРР).
2. Ткань метастазов КРР - 31 образец (мтс).
3. Ткань толстой кишки больных КРР без морфологических признаков опухолевого роста /край резекции - 129 образцов (норма-).
4. В качестве контрольной группы сравнения мы исследовали морфологически неизмененную ткань слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев - 50 образцов (норма+).

В последующем проведен сравнительный анализ экспрессии генов:

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

Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени дает возможность определить количество искомым транскриптов в исследуемом образце. По окончании реакции исследователь получает информацию в графической и цифровой форме о количестве молекул

мРНК определенных генов в исследуемом образце, что позволяет косвенно судить об уровне экспрессии этих генов. Сравнительный анализ значения экспрессии в образцах патологической и неизменной ткани может дать информацию об активности биологических процессов в условиях патологии по сравнению с нормой. Для выделения мРНК использовали набор колонок для выделения РНК из свежей/замороженной ткани RNeasy kit фирмы Qiagen USA. После получения РНК немедленно проводился этап обратной транскрипции. Реакцию ставили, используя наборы НПО «ДНК Технология» согласно инструкции. Для постановки ПЦР использовались реактивы фирмы «ЗАО НПФ ДНК-Технология». Контроль отсутствия реакции на геномной ДНК ставили с образцами, не прошедшими реакцию обратной транскрипции. Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов (Ср). Фактически уровень экспрессии приравнивается к 1 в образце с минимальным уровнем экспрессии. В остальных образцах данный показатель (уровень экспрессии) отражает во сколько раз экспрессия гена выше по отношению к данному образцу. Используемые в группах методы исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. Методы исследования, N=605

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

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

** морфологическое исследование биопсийного материала.

Методы лечения

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

Статистический анализ данных

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

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Клиническая характеристика обследованных больных

В группу больных КРР (всего 555 человек) вошли 274 мужчин (49,4%) и 281 женщин (50,6%) в возрасте от 22 до 88 лет. Средний возраст пациентов составил $62,9 \pm 10,4$ лет, что соответствует мировым эпидемиологическим значениям. Достоверных гендерных отличий при анализе по возрастным подгруппам не получено.

По стадии опухолевого процесса больные разделились следующим образом: I стадия диагностирована у 111 (20,0%) человек; II стадия - у 197 (35,5%); III стадия - у 141 (25,4%) и IV стадия - у 106 (19,1%). Регионарные метастазы выявлены у 235 больных (42,3%). Местно-распространенная опухоль с прорастанием соседних органов обнаружена у 52 (9,4%) человек. Постадийно: местно-распространенный рак отмечен у 9 (4,6%) пациентов II стадии, в 27 (19,2%) случаях - III стадии и у 16 (15,1%) больных - IV стадии заболевания. Опухолевое поражение локализовалось в различных анатомических отделах ободочной и прямой кишок: из них опухоли правой половины толстой кишки (слепая кишка, восходящая ободочная кишка, печеночный угол, поперечная ободочная кишка) - 155 случаев – (27,9%); опухоли дистального отдела ободочной кишки (селезеночный угол, нисходящая ободочная кишка, сигмовидная кишка) – 178 случаев (32,1%). Локализация опухоли в прямой кишке и ректосигмоидном отделе встретила в 40,0% (222 человека) клинических наблюдений. При этом мы обнаружили изменение структуры опухолевого процесса по локализации в зависимости возраста пациента (рис.2).

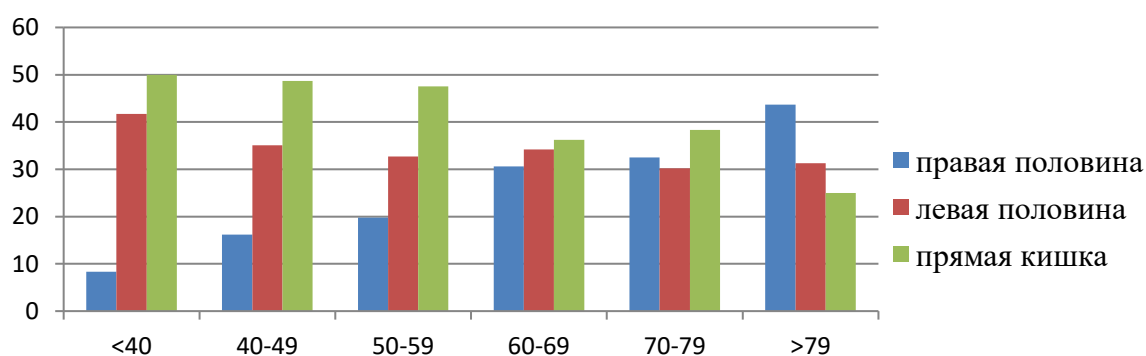


Рис. 2 Локализация опухолевого процесса при КРР в зависимости от возраста пациента (%), N=555.

Патогномоничные жалобы для право- и левосторонней локализации опухоли нами не выявлены.

Всем пациентам проведено полное клинико-лабораторное обследование, обязательно включавшее колоноскопию, морфологическое исследование

удаленных препаратов. Сочетание КРР с аденоматозным/ми полипом/ами данного или другого отдела толстой кишки выявлено в 25,8% (143 человек) наблюдений. Различий в частоте фоновой патологии толстой кишки у больных КРР различной локализации не выявлено.

Проведен анализ частоты встречаемости первично-множественных синхронных и метакронных злокачественных опухолей среди всех пациентов. Частота первичной множественности составила 19,3% (107 человек: 52 мужчины и 55 женщин). У пяти пациентов выявлено две вторичные злокачественные опухоли, а у трех - три. (табл.2)

Таблица 2. Частота поражения других органов у пациентов КРР при первичной множественности, N=118, где N – количество опухолей.

Локализации син-/метакронной опухоли	Абсолютное количество	Частота, %*
Другие отделы ободочной и прямой кишки	23	19,5
Молочные железы	21	17,8/38,2*
Предстательная железа	15	12,8/28,9*
Желудок	8	6,8
Эндо метрий	10	8,5/18,2*
Почки	10	8,5
НЗО	8	6,8
Яичники	7	5,9/12,3*
Кожа/меланома	5	4,3
Мочевой пузырь	4	3,4
Остальные	7	5,7

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

Средний индекс массы тела (ИМТ) в подгруппе больных с первичной множественностью составил $29,2 \pm 3,1$ кг/м², а среди пациентов с локализацией процесса в нескольких органах этот показатель составил $34,1 \pm 2,8$ кг/м². При сочетании КРР со злокачественным поражением эндометрия или почек, средний индекс массы тела составил $30,7 \pm 4,6$ кг/м².

При анализе клинических данных, особое внимание уделялось изучению отдаленных результатов лечения. В общей группе отдаленные результаты отслежены у 487 (86,1%) пациентов и средние сроки наблюдения составили $43,4 \pm 37,2$ мес. (от 1-го до 260 месяцев), при этом сроки наблюдения пациентов в проспективной группе составили $20,1 \pm 12,7$ мес. Прогрессирование процесса среди пациентов с отслеженными отдалёнными результатами отмечено у 173 (35,5%) человек в сроки от 2 до 144 ($21,5 \pm 22,7$) месяцев. При этом наступление

прогрессирования слабо положительно коррелировало ($r=0,21$, $p<0,05$) со стадией процесса, но не коррелировало с уровнем дифференцировки опухоли ($r=0,11$, $p>0,05$). Самым частым характером прогрессирования явились метастазы в печень, в частности, изолированные метастазы в печень в 58 (65,9%) наблюдениях. В тоже время только у 7 (16,3%) больных отмечено изолированное метастатическое поражение легких. При этом метастазы в легких в 21 случае из 43 (48,8%) сочетались с метастазами в печень и в 11 (25,6%) случаях - с местными рецидивами.

Морфологическая характеристика удаленных препаратов

Морфологическому исследованию подверглись удаленные макропрепараты оперированных больных. Во всех клинических наблюдениях край резекции не содержал признаков опухолевого роста. Таким образом, морфологическое строение наиболее удаленного края резекции мы условно приняли за «фоновую слизистую оболочку толстой кишки», т.е. слизистую оболочку толстой кишки без специфических микроскопических признаков опухолевого роста. Слизеобразование различной степени выраженности в опухоли наблюдалось в 108 (19,5%) случаях и положительно коррелировало с локализацией опухоли в правых отделах ободочной кишки ($r=0,36$, $p<0,05$) и возрастом старше 70 лет ($r=0,33$, $p<0,05$). Гистологическое строение метастатических очагов соответствовало аденокарциноме кишечного типа данного пациента. Высокодифференцированные аденокарциномы выявлены у 190 (34,2%), умереннодифференцированные - у 313 (56,4%), низкодифференцированные - у 52 (9,4%) пациентов. Мы не обнаружили достоверной зависимости между степенью дифференцировки опухоли и ее локализацией.

При анализе степени дифференцировки опухоли в зависимости от возраста и по мере увеличения возраста пациентов анализируемой подгруппы, отмечено увеличение доли низкодифференцированных опухолей и снижение умереннодифференцированных ($p>0,05$). (рис. 3)

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

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

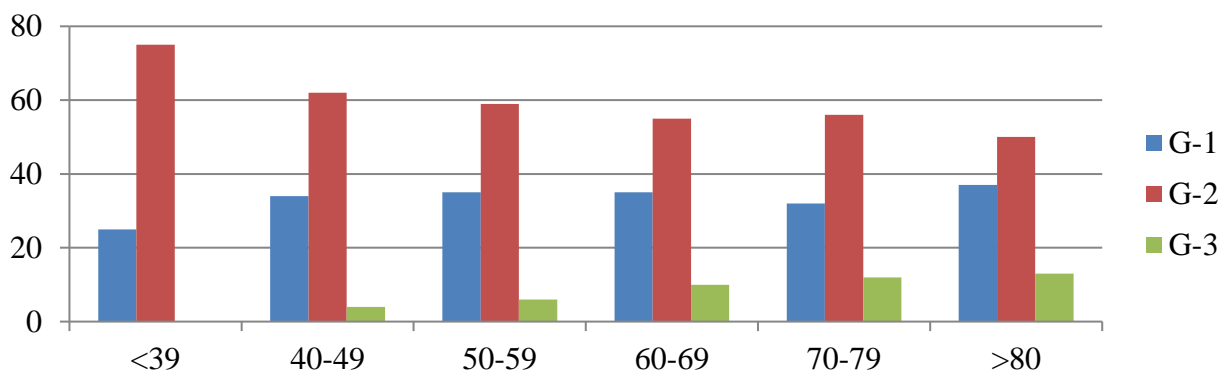


Рис. 3. Степень дифференцировки опухоли в зависимости от возраста больных КРР (%), N=555

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

На первом этапе молекулярно-генетического исследования мы определили и сравнили уровень экспрессии избранной панели генов между сравниваемыми группами образцов. Выявлены отличия по 59 из 64 изученных генов.

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

При сравнении экспрессии прямого маркера пролиферации Ki-67 получены данные, свидетельствующие о более низкой пролиферативной активности слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста по сравнению с другими группами образцов и сходной интенсивности пролиферации в ткани первичного и метастатического КРР и слизистой оболочке здоровых добровольцев. (рис 4)

Помимо этого, ткань первичного и метастатического КРР характеризуется достоверным повышением экспрессии генов, ответственных за прогрессию клеточного цикла, таких как CCND1 ($p < 0,00001$), MYC ($p < 0,00001$), CCNB1 ($p < 0,00001$), STK15 ($p < 0,00001$), MYBL2 ($p < 0,00001$), BIRC5 ($p < 0,00001$). (рис. 5,6)

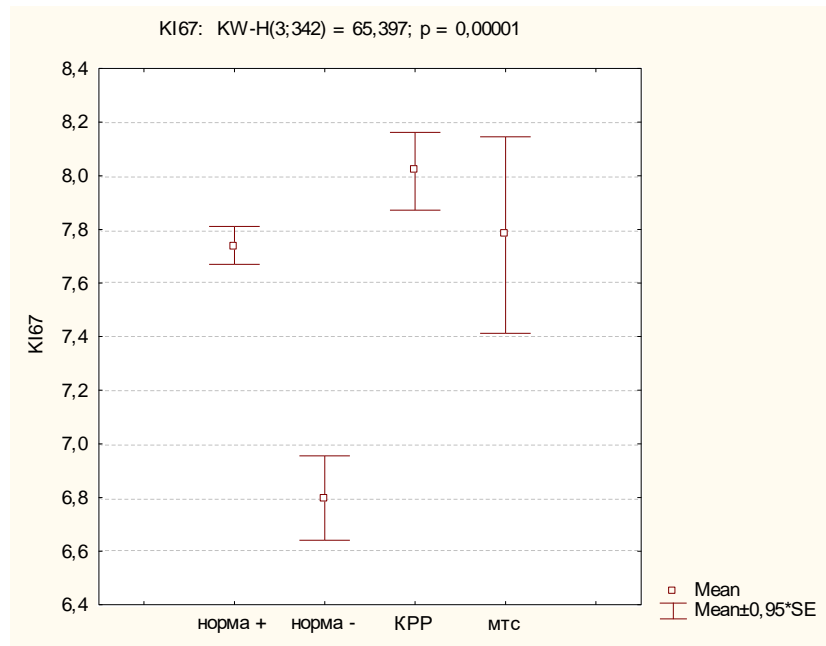


Рис.4 Уровень экспрессии Ki-67 в исследованных группах образцов.

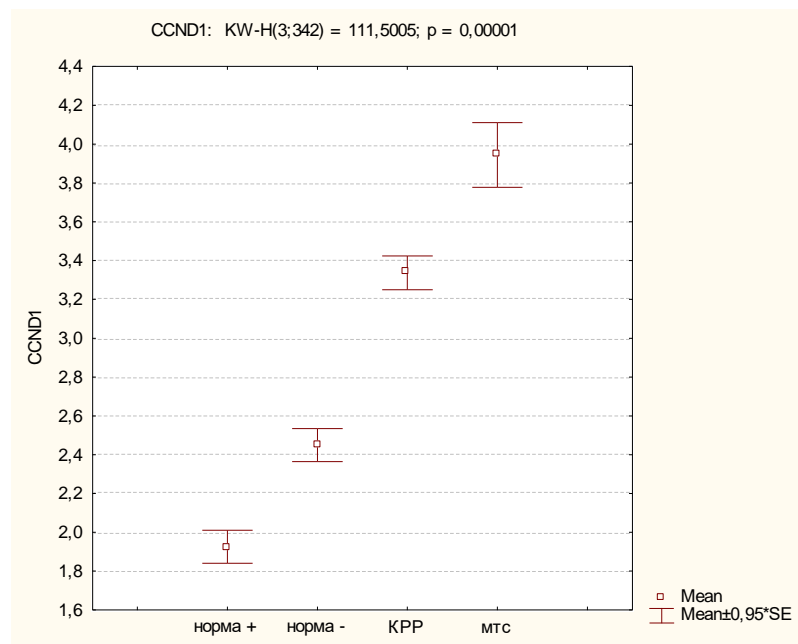


Рис.5 Уровень экспрессии CCND1 в исследованных группах образцов

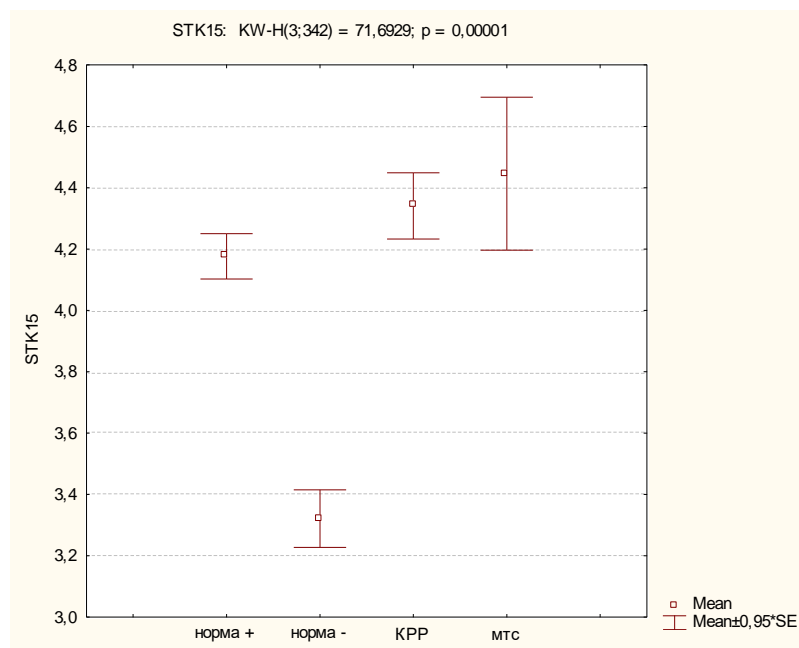


Рис.6 Уровень экспрессии *BIRC5* в исследованных группах образцов.

Синергичная закономерность обнаружена по ряду генов ингибиторов апоптоза. Так, ингибитор ядерной транслокации β -катенина *NDRG1* достоверно снижен в ткани первичного КРР по сравнению с «фоновой» кишкой ($p < 0,02$). Сходную закономерность показал негативный регулятор Акт-пути восприятия внешних сигналов - ген *PTEN* ($p < 0,00001$). (рис. 7,8)

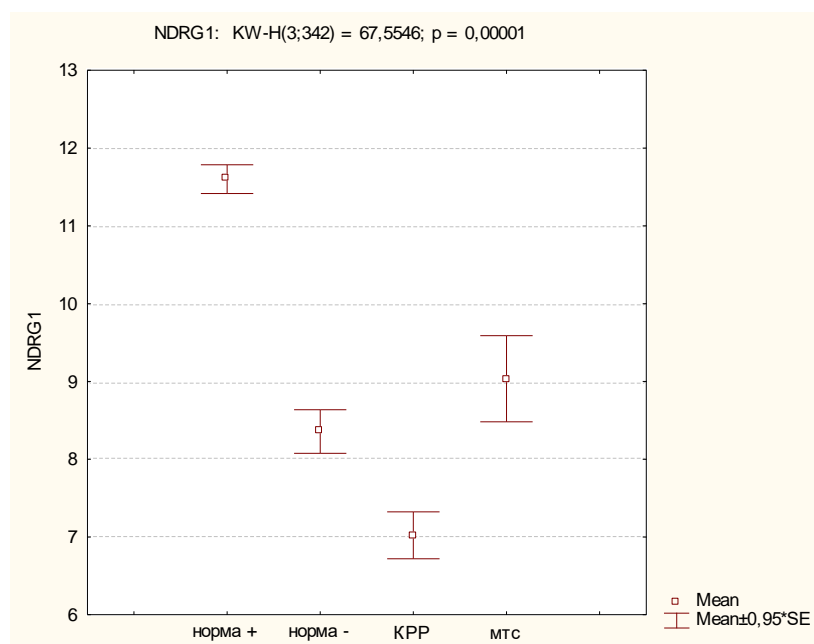


Рис. 7 Уровень экспрессии *NDRG1* в исследованных группах образцов.

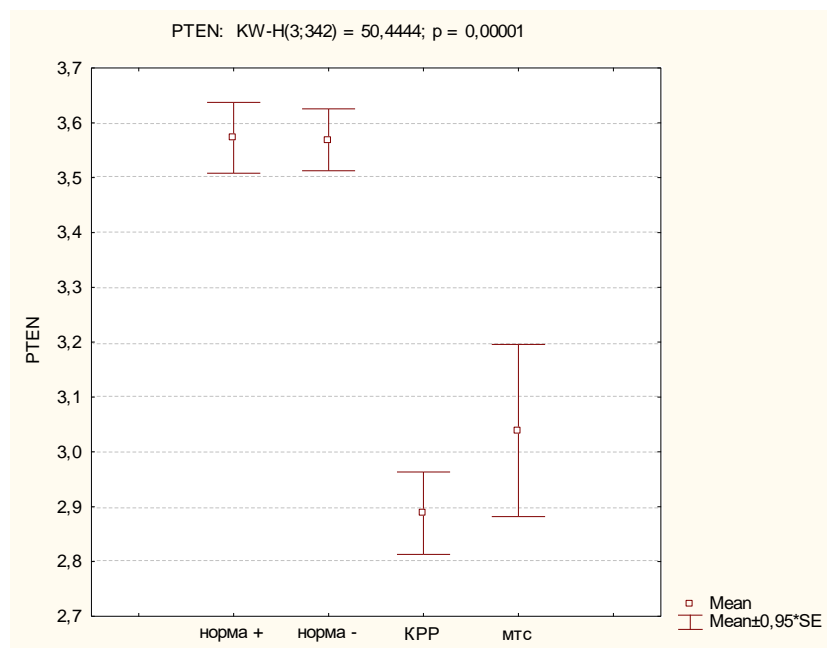


Рис. 8 Уровень экспрессии *PTEN* в исследованных группах образцов.

Кроме того, повышение экспрессии продемонстрировали факторы ангиогенеза VEGFA121 ($p < 0,00001$), VEGFA156, ($p < 0,01$) и VEGFA189 ($p < 0,02$). Применительно к оценке интенсивности **ангиогенеза** в «классическом» ряду сравнения - «фоновая» слизистая оболочка - «KPP» - «МТС» на основании оценки уровня экспрессии 121, 165, и 189 субъединиц VEGFA мы получили данные, которые полностью укладываются в сформированное представление об интенсификации процессов неоангиогенеза в опухоли. При этом сравнение полученной закономерности с контролем показало достоверно более низкую экспрессию указанных субъединиц VEGFA во всех группах образцов тканей больных KPP. Выявленные различия экспрессии факторов пролиферации в слизистой оболочке толстой кишки здоровых добровольцев и ткани опухоли при достоверно равных уровнях пролиферации (по Ki-67) свидетельствуют об отличных от нормы механизмах (сигнальных путях) поддержания уровня пролиферативной активности в опухоли. (рис. 9)

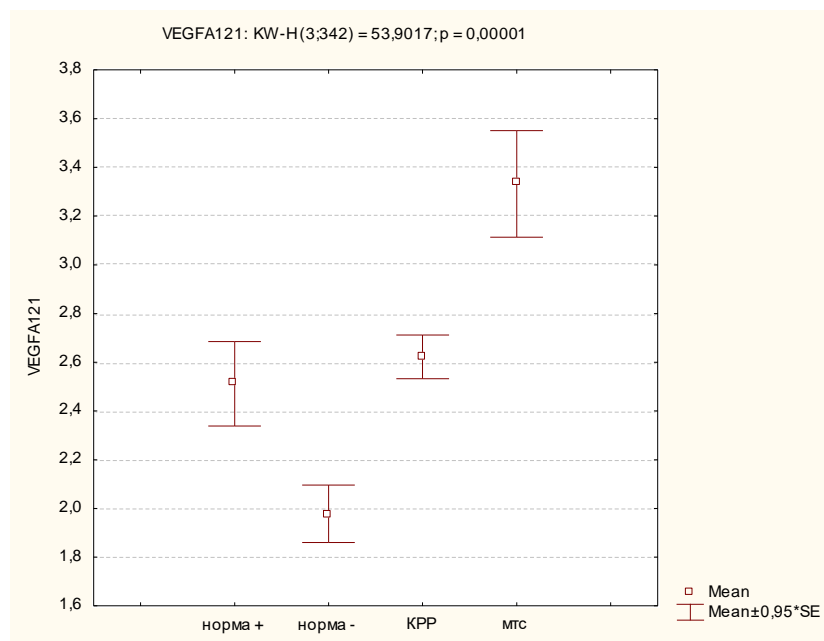


Рис.9 Уровень экспрессии VEGFA121 в исследованных группах образцов.

Применительно к положению об угнетении **апоптоза** в опухолевой ткани мы получили следующую закономерность: ген BCL2 – ингибитор митохондриального пути апоптоза - линейно снижается от контроля к «фоновой» кишке и образцам первичной опухолевой ткани; ген BAG достоверно снижается от образцов слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста к образцам первичного KPP. (рис. 10)

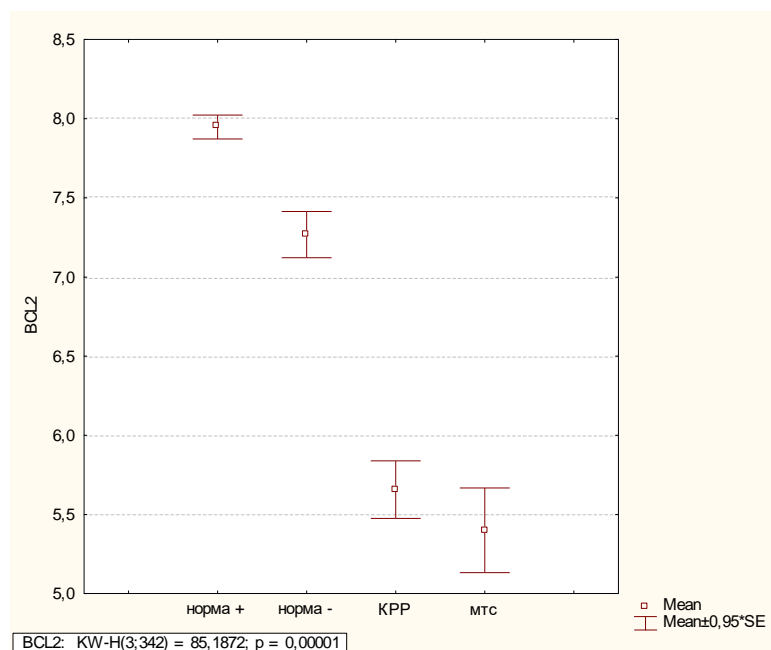


Рис.10 Уровень экспрессии BCL2 в исследованных группах образцов.

Применительно к важным факторам ремоделирования межклеточного матрикса мы обнаружили, что ткань первичного КРР характеризуется достоверно большей экспрессией MMP 7,8,9,11 в сравнении с «фоновой» кишкой и меньшей экспрессией MMP2. При этом экспрессия MMP 7,8 и 11 между контролем и «фоновой» слизистой оболочкой не различалась. По экспрессии MMP9 образцы опухолевой ткани достоверно не отличались от контроля. (рис. 11,12)

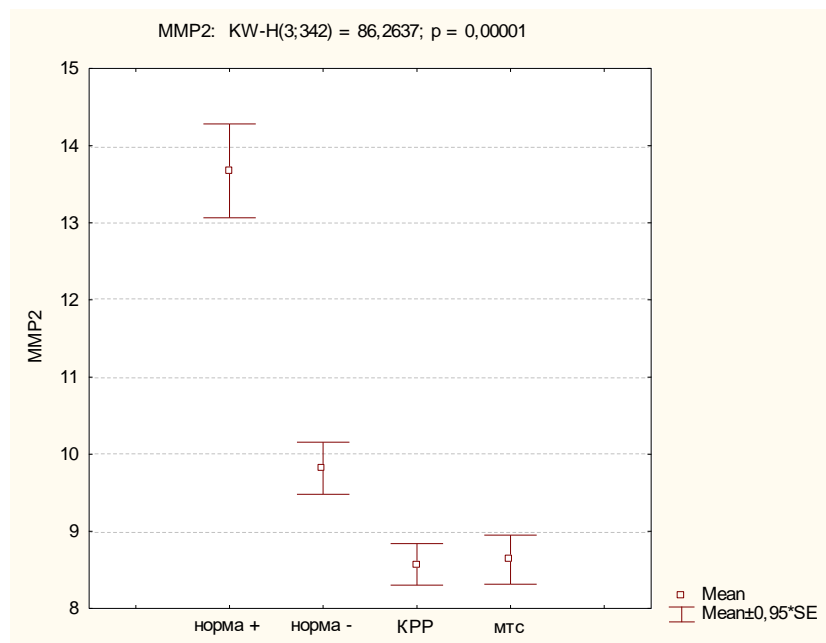


Рис.11 Уровень экспрессии MMP2 в исследованных группах образцов.

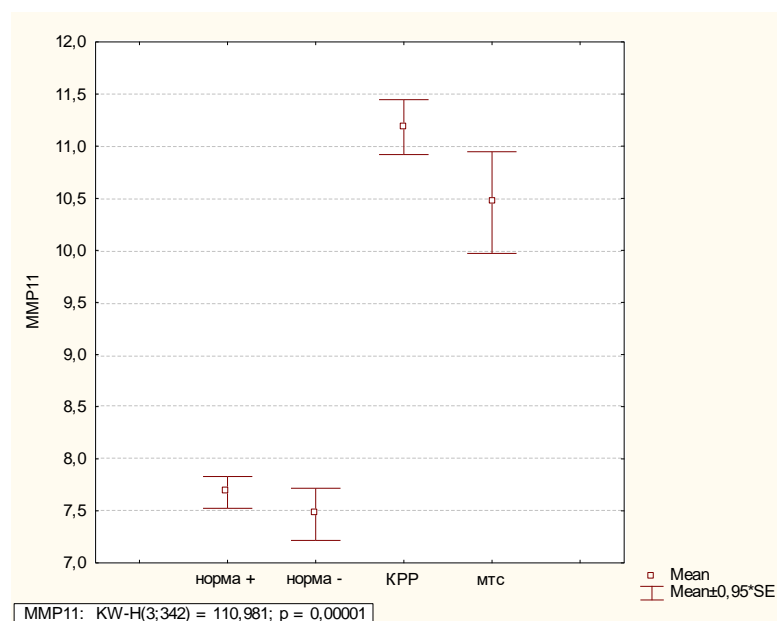


Рис.12 Уровень экспрессии MMP11 в исследованных группах образцов.

Таким образом «фоновая» слизистая оболочка толстой кишки у больных КРР отличается угнетением пролиферации, ангиогенеза и ремоделирования межклеточного матрикса.

Полученные нами результаты по уровню экспрессии различных **иммунных факторов и цитокинов** в подавляющем большинстве случаев характеризуются достоверными отличиями между контролем и образцами тканей, полученных от больных КРР. Так, в образцах тканей, полученных от пациентов с КРР, нами отмечены достоверно более низкие показатели экспрессии генов COX2, IL-2, IL-12a, IL-15, IL-10, INF- γ , CD45, TNF- α , CD56, TLR2, TLR4, TLR7, TGF- β , HLA-G1, HLA-G5, LIF, LIFR. (рис. 13-16)

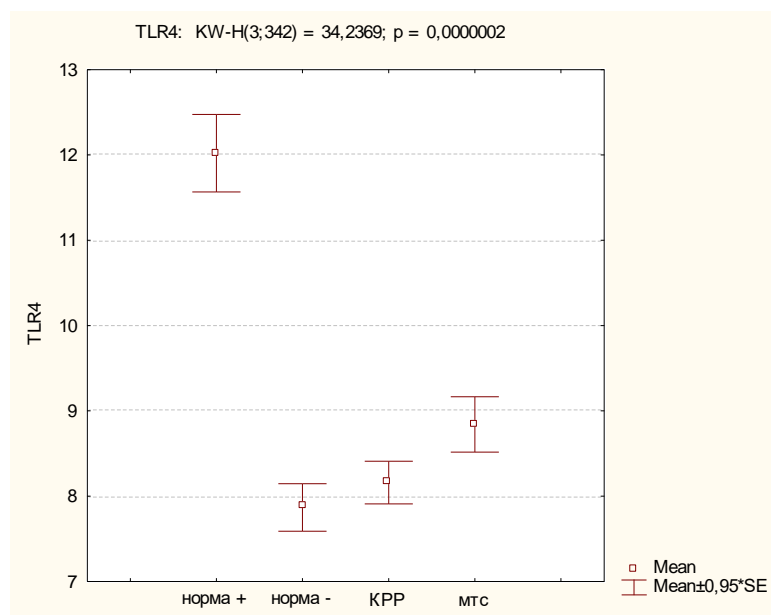


Рис.13 Уровень экспрессии TLR4 в исследованных группах образцов.

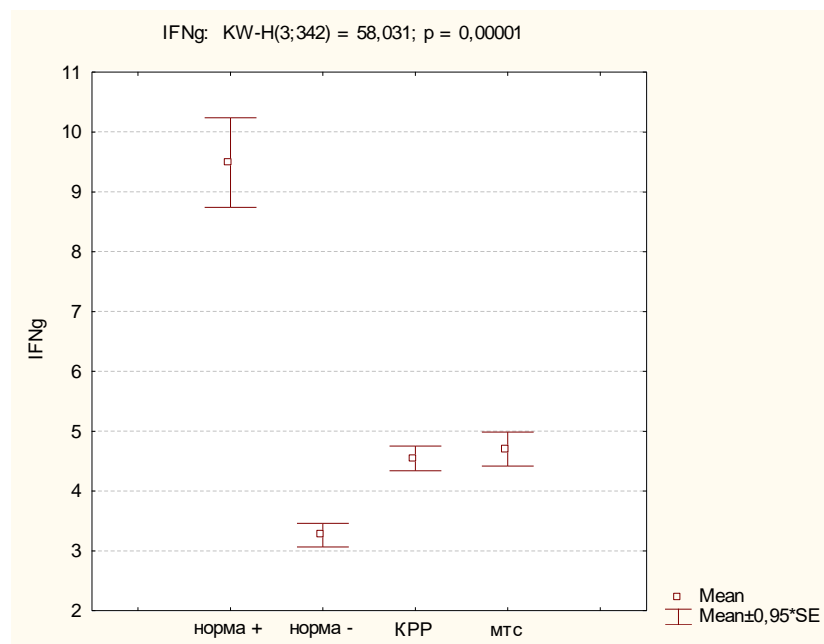


Рис.14 Уровень экспрессии IFN γ в исследованных группах образцов.

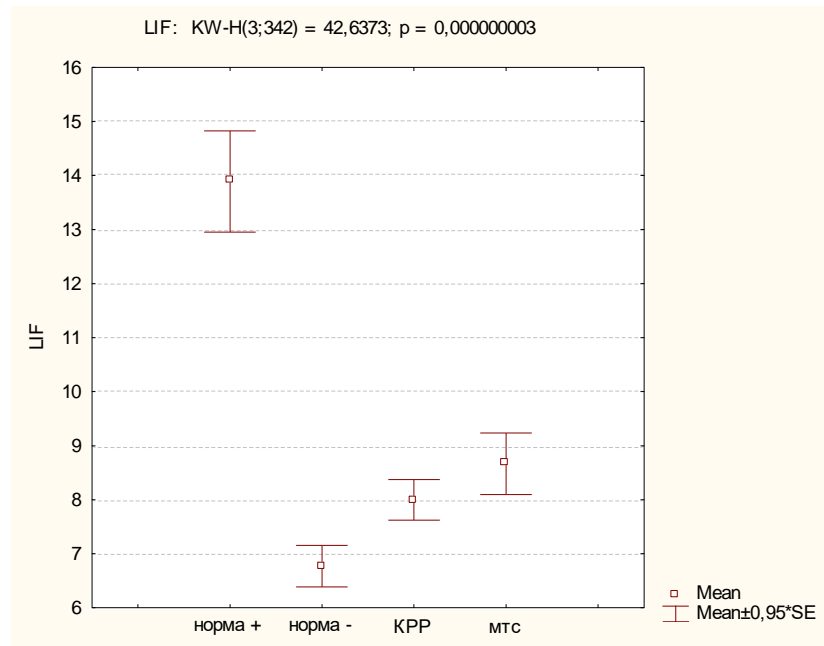


Рис.15 Уровень экспрессии LIF в исследованных группах образцов.

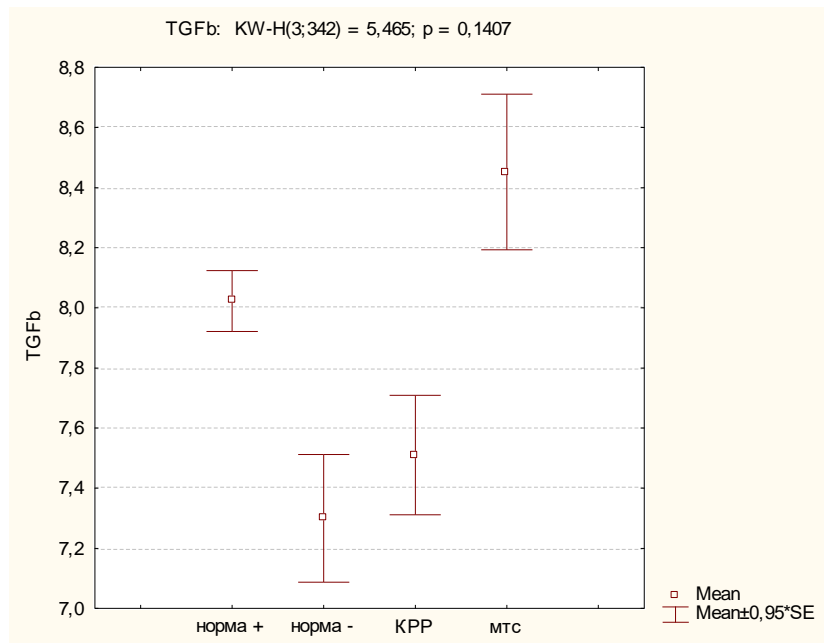


Рис.16 Уровень экспрессии TGF-β в исследованных группах образцов.

Достоверным повышением у больных КРР характеризовались CD68, IL-6, IL-7, IL-8. Различия между образцами тканей больных КРР получены по гену CD68, IL-2R (достоверно повышены в ткани метастаза), IL-8 (достоверно выше в ткани первичного и метастатического КРР), IL-1β (достоверно выше в образцах первичной опухоли по сравнению с «фоновой» слизистой оболочкой и МТС), IFN-γ (достоверно наименьшие значения в «фоновой» слизистой оболочке), CD56 (наименьшие значения в ткани первичного и метастатического КРР), TLR2, TGF-β

и HLA-G5 (достоверно выше в ткани МТС), TLR7 и LIFR (достоверно наименьшие значения в образцах первичного КРР). (рис. 17,18)

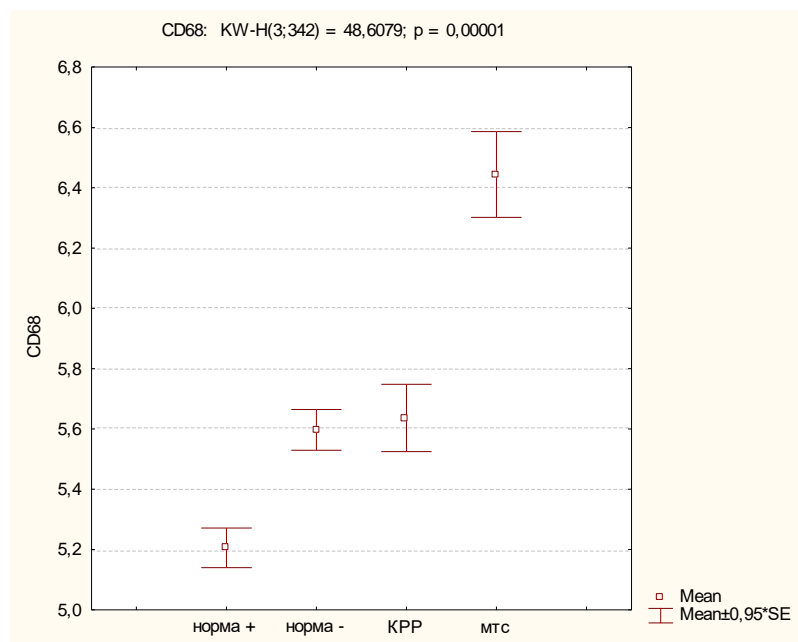


Рис.17 Уровень экспрессии CD68 в исследованных группах образцов.

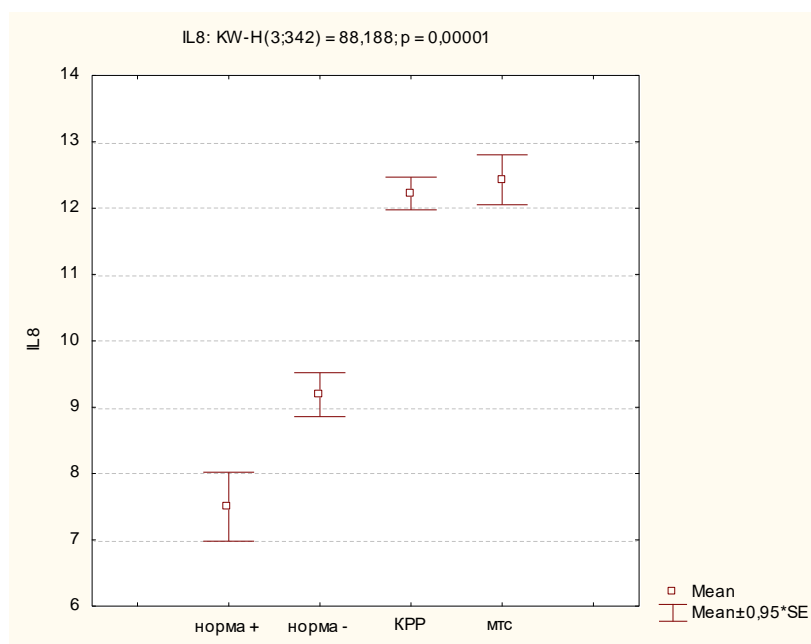


Рис.18 Уровень экспрессии IL-8 в исследованных группах образцов.

Экспрессия только 7-ми изученных генов в «фоновой» слизистой оболочке не отличается от контроля, что дает обоснованное право впредь не рассматривать «фоновую кишку» больного КРР в качестве контрольных образцов, а экспрессию различных биомолекулярных маркеров в данных образцах - как физиологическую норму. Более того, в ряде случаев изменения экспрессии в

слизистой оболочке здоровых добровольцев и больных КРР по отношению к самой ткани опухоли носят разнонаправленный характер.

На основании дискриминантного анализа, мы доказали возможность различить слизистую оболочку толстой кишки здоровых добровольцев от слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста больных КРР с вероятностью 99,4% в общей группе и 99,1% при I и II стадиях опухолевого процесса. (рис. 19,20 и табл. 3,4)

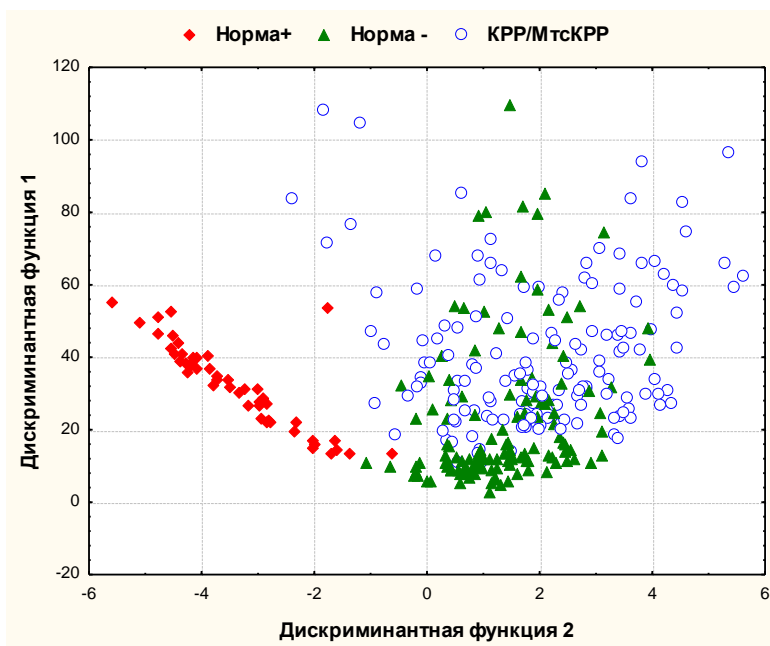


Рис.19 Решение дискриминантной функции для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев (норма +), морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР (норма -), ткани опухоли и метастазов.

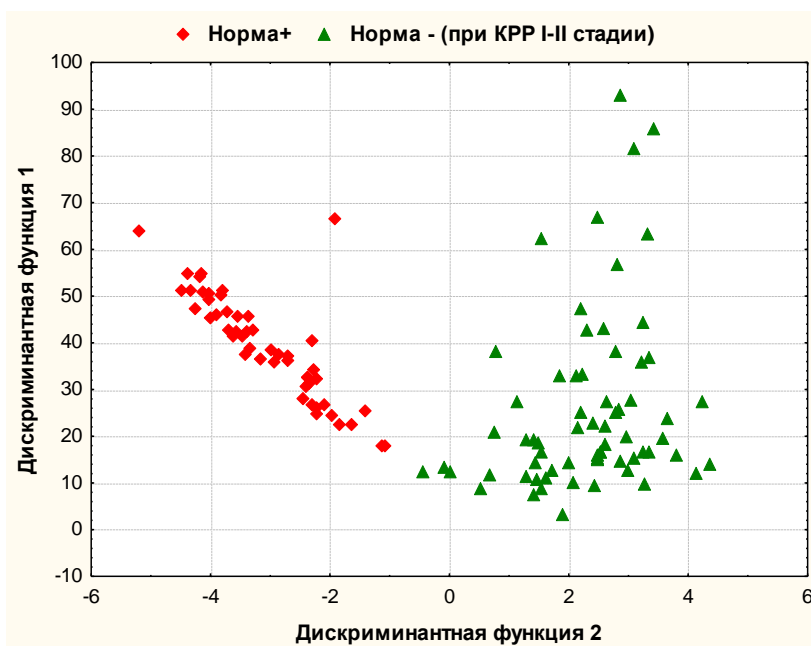


Рис.20 Решение дискриминантной функции для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев (норма +) и морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР (норма -) при I и II стадиях.

Таблица 3 Значение лямбды Уилкса и уровень статистической значимости для генов, включенных в уравнение дискриминантной функции для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев и морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР.			Таблица 4 Значение лямбды Уилкса и уровень статистической значимости для генов включенных в уравнение дискриминантной функции для морфологически неизменной слизистой оболочки здоровых добровольцев и морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки у пациентов КРР при I-II стадии заболевания.		
	Wilks's	p-level		Wilks's	p-level
HLA-G1	0,198571	0,000146	IFNg	0,133372	0,004056
IL6	0,202955	0,000024	IL8	0,151993	0,000005
TNFα	0,198909	0,000127	IL15	0,160791	0,000000
NDRG1	0,220122	0,000000	NDRG1	0,156048	0,000001
CD68	0,194927	0,000695	CD68	0,138806	0,000512
P16INK4A	0,196958	0,000290	BAG1	0,144898	0,000058
LGALS1	0,220042	0,000000	TNFα	0,132440	0,005871
PTEN	0,191970	0,002565	STK15	0,128737	0,027159
MYBL2	0,189563	0,007681	KI67	0,186298	0,000000
GREM1	0,196600	0,000338	CCNB1	0,168980	0,000000
KI67	0,196100	0,000419	IL6	0,153570	0,000003
VEGFA121	0,193560	0,001265	TERT	0,136322	0,001296
CCNB1	0,189477	0,007994	CCND1	0,142432	0,000137
IL8	0,199422	0,000102	GRB7	0,144778	0,000060
COX-2	0,189642	0,007404	P16INK4A	0,135113	0,002057
VEGFA189	0,191071	0,003846	MYBL2	0,133913	0,003278
MMP11	0,195039	0,000662	BIRC5	0,129560	0,019129
ESR1	0,195289	0,000594	PTEN	0,130277	0,014172
CTSL2	0,191872	0,002680	SCUBE2	0,138973	0,000481
TERT	0,185869	0,045305	IL10	0,131420	0,008860

При исследовании взаимосвязи глубины инвазии опухоли и экспрессии различных генов отмечено отсутствие стойких корреляционных связей экспрессии биомолекулярных маркеров и глубины инвазии опухоли, однако, при выделении группы пациентов с прорастанием всей стенки толстой кишки (Т4) и группы пациентов без инвазии всех стенок (Т1-Т3) получены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия в экспрессии значительного количества генов (CD56, MMP2, GNLy, IL-2, BAX, LIF, IL-7, CD45, TLR4, SCUBE2, IL-2Ra, IL-15, CD68, VEGFA165, IL-12a, LGALS1, IL-6, PAPPa, LIFR, CD69, COX-2, TLR2, TLR7, P16). Сходные отличия выявлены и при исследовании «фоновой» слизистой оболочки толстой кишки, однако, в меньшем количестве генов (SCUBE2, CD56, BAX, IL-15, PTEN, GNLy, LGALS1, LIF, IL-12a, PAPPa).

В ткани опухоли получены значимые отличия по двум генам в зависимости от наличия регионарных метастазов: циклин-D1 и P16, а в «фоновой» слизистой оболочке - по Ki-67 и IL-6.

Наличие отдаленных гематогенных метастазов характеризовалось статистически значимыми отличиями экспрессии 13 генов в ткани опухоли (BAX, TGF-β, TLR4, P16INK4A, GNLY, GATA3, IGF1, IL7, LIFR, CD45, HLA-G5, IL6, LIF), тогда как в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки отличия получены по 2 генам (P14, TGF-β).

Нами обнаружена связь между степенью отличия слизистой оболочки толстой кишки больных КРР от слизистой оболочки толстой кишки здоровых добровольцев и рядом клинико-морфологических характеристик опухолевого роста: количеством пораженных метастазами органов, стадией заболевания и прогрессированием. Для указанных характеристик выявлена общая закономерность: взаимосвязь параметров с возрастанием степени отличий «фоновой» кишки от здоровой ($p=0,0344$, $p=0,0116$, $p=0,00009$ соответственно). Таким образом, чем более похожа «фоновая» слизистая оболочка больных КРР на слизистую оболочку здоровых добровольцев, тем меньше стадия, реже встречаются метастазы и наступает прогрессирование. (рис. 21-23)

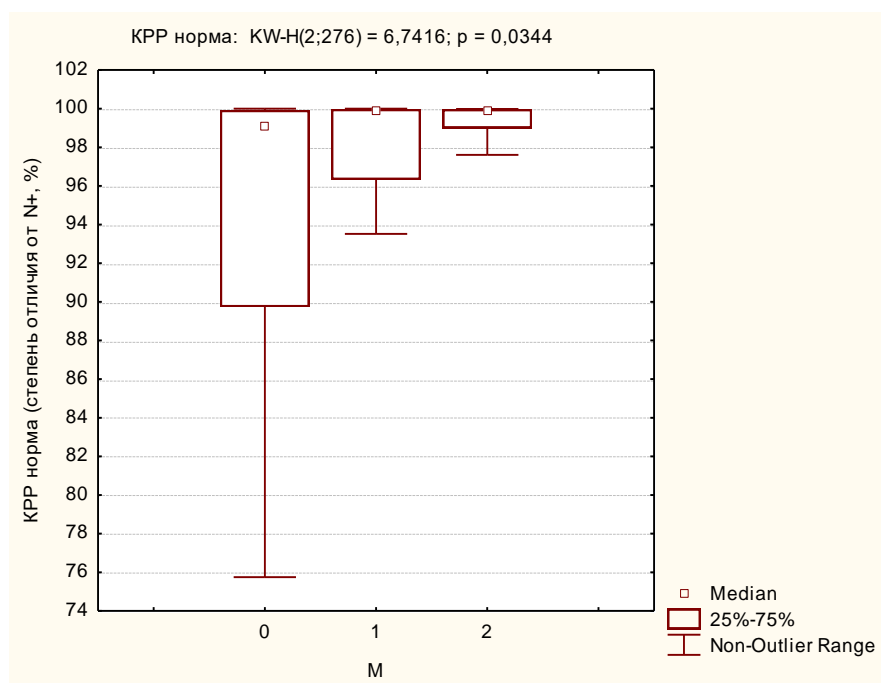


Рис. 21 Частота встречаемости метастазов (M0 – M1a – M1б) в зависимости от степени отличия «норма+» и «норма-» (апостериорная вероятность)

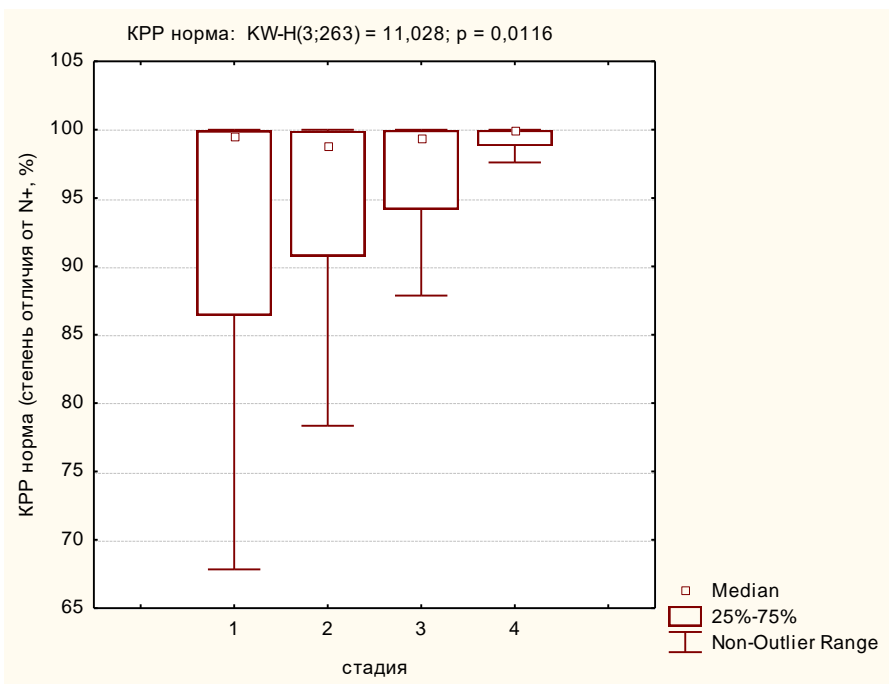


Рис.22 Стадия заболевания в зависимости от степени отличия «норма+» и «норма-» (апостериорная вероятность)

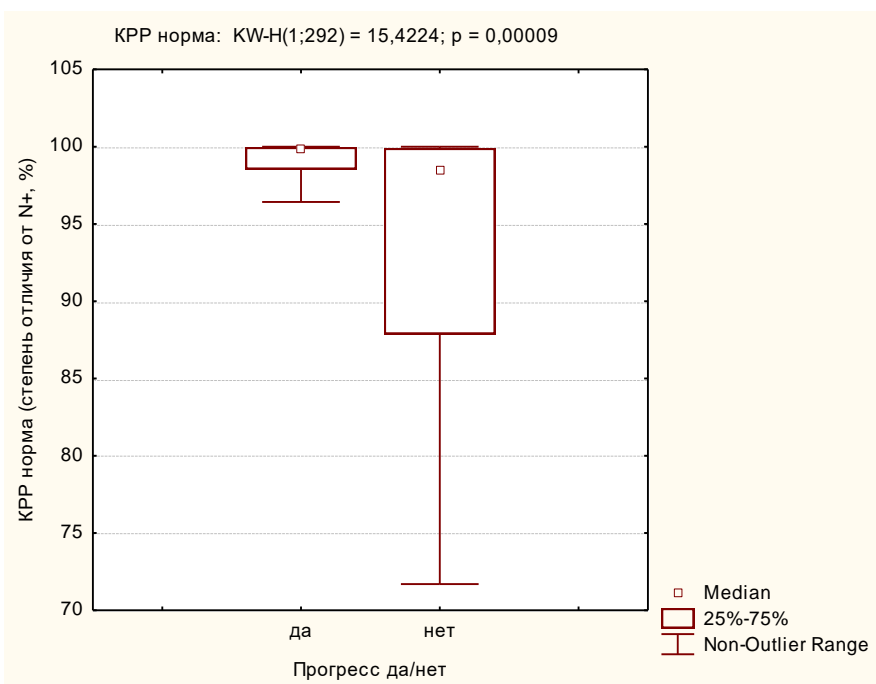


Рис. 23 Частота прогрессирования в зависимости от степени отличия «норма+» и «норма-» (апостериорная вероятность)

При изучении молекулярно-генетических особенностей прогрессирования нами выявлены гены, достоверно отличающиеся в зависимости от течения процесса - без прогрессирования / с прогрессированием. (табл.5)

Таблица 5 Различия экспрессии генов в ткани опухоли в зависимости от наличия/отсутствия прогрессирования у пациентов I-III стадии КРР

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

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

Таблица 6 Перечень генов с достоверными отличиями экспрессии в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки у больных КРР при I-III стадии в зависимости от наступления прогрессирования

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

Таким образом, на основании сопоставления профиля экспрессии изученных генов в различных группах образцов больных КРР в зависимости от клинического течения опухолевого процесса мы пришли к мнению о существовании предрасполагающего к прогрессированию профиля экспрессии ряда генов (BAX, TGF- β , TLR4, P16, GNL1, GATA3, IGF1, IL-7, LIFR, CD45, HLA-G5, IL-6, LIF) собственно в первичной опухолевой ткани, который имеет преимущественное значение для развития отдаленных метастазов, а также о существовании профиля экспрессии ряда генов в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки у больных КРР (Ki-67, IL-6, P14, TGF- β), который отличается от профиля экспрессии генов в опухолевой ткани и ассоциирован с развитием как местного, так и отдаленного рецидива. Изучение экспрессии панели генов в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки больных КРР и ткани опухоли в биоптатах на дооперационном этапе может быть использовано для оптимизации и персонализации лечебно-диагностической тактики.

Несмотря на относительную ясность и доказанность основных факторов риска КРР, которые преимущественно связаны с особенностями пищевого поведения и образа жизни как такового, выявление данного заболевания у лиц без основных факторов риска/их сочетания в глубоком смысле заставляет задуматься о широчайшем спектре факторов инициации и промоции канцерогенеза в толстой кишке, а современная медицинская и смежные науки, как прикладная отрасль науки в целом, занимается изучением наиболее часто реализуемых в конкретных условиях механизмов опухолевого роста.

Нарастанию количества молекулярно-генетических событий (накопление мутаций и и) в клетках опухоли придавалось и продолжает придаваться ведущее значение в прогрессировании злокачественного процесса. Поиск поэтапного изменения того или иного маркера в первичной опухолевой ткани или сочетание нескольких маркеров как при КРР, так и при злокачественных опухолях других локализаций, а также связь этих изменений с прогрессированием является важнейшим направлением развития клинической онкологии.

Согласно нашему исследованию, в котором в качестве контроля использована слизистая оболочка толстой кишки здоровых добровольцев, а не «фоновая» кишка или культура клеток, нет оснований говорить о повышенной пролиферативной активности клеток опухоли по сравнению с нормой. Выявленная особенность дает основание рассматривать молекулярно-генетические события в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки как молекулярную основу функциональной атрофии и трактовать данный процесс как результат системного

ответа организма на опухоль, к которому клетки с меньшими отличиями от нормы более чувствительны.

Между тем, определённый уровень экспрессии выделенной нами группы генов первичной опухоли, (P16, IL-7, IL-2, BAX, CD56, MMP11, IL-12a, TLR4, CD45, GNLY, LIFR, IL-15, MMP2, IL-2Ra, CD69, VEGFA121) и в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки (CTSL2, CCNB1, MYBL2, TERT, GREM1, CYP19A) предрасполагает развитию отдаленных метастазов, что имеет важное практическое значение. Необходимо подчеркнуть, что развитие отдаленных метастазов связано с изменением уровня экспрессии различных генов как в ткани опухоли, так и «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки. Установленная нами ассоциированность профиля экспрессии CTSL2, CCNB1, MYBL2, TERT, GREM1, CYP19A в «фоновой» слизистой оболочке больных КРР в развитии отдаленных метастазов говорит в пользу активной роли окружающих опухоль тканей в прогрессировании опухолевого процесса.

Применительно к развитию местного рецидива мы не обнаружили предрасполагающего профиля экспрессии генов ни в ткани первичной опухоли, ни в «фоновой» слизистой оболочке толстой кишки, что совпадает с мнением большинства клиницистов-исследователей, рассматривающих нерадикальность выполненной операции, как основную причину местного рецидива. В связи с изложенным выше, выделенная нами панель генов впервые предложена для персонализации лечебно-диагностической тактики. Принимая во внимание относительно малые средние сроки наблюдения проспективной группы обследованных больных, практическое использование данной модели затруднено и может быть рекомендовано только после клинической апробации. Необходимо продолжать дальнейшее исследование в этом направлении: определить относительные риски развития и прогрессирования КРР, предрасполагающие к метастазированию молекулярно-генетические особенности органов – «акцепторов» метастазов, а также разработать принципы персонализированного подбора мультитаргетной терапии при КРР.

Таким образом, нами впервые обнаружена ассоциированность клинических параметров колоректальной аденокарциномы с молекулярно-генетическим профилем слизистой оболочки толстой кишки без морфологических признаков злокачественности, что ключевым образом меняет исследовательские стереотипы и служит фундаментом для разработки алгоритма персонализированной лечебно-диагностической тактики при раке толстой кишки.

Выводы:

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

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

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

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

5. Пролиферативная активность в опухоли, метастазе колоректального рака в печень и образцах группы контроля, оцениваемая по содержанию мРНК гена Ki-67, достоверно не отличается: $8,05\pm 0,17$; $7,79\pm 0,38$ и $7,74\pm 0,11$ соответственно ($p>0,05$). При этом слизистая оболочка толстой кишки без морфологических

признаков опухолевого роста характеризуется более низкой пролиферативной активностью ($6,81 \pm 0,18$; $p=0,00001$) по сравнению с другими группами образцов.

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

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

8. Уровень экспрессии 19 из 64 генов (CCND1, NDRG1, CD68, HER2, ESR1, SCUBE2, GREM1, MMP7, IL-2, MMP8, IL-2R, IL-1 β , VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, TLR2, TGF- β , TLR7, HLA-G5) в ткани метастаза достоверно отличается ($p<0,05$) от уровня экспрессии в ткани первичной опухоли, что свидетельствует об отличиях в механизмах регуляции роста (пролиферации, ремоделирование межклеточного матрикса, ангиогенеза) в первичном и метастатическом опухолевом узле.

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

10. Наличие регионарных метастазов аденокарциномы толстой кишки ассоциировано ($p<0,05$) с повышением экспрессии генов CCND1 и P16 в ткани первичной опухоли, а также повышением экспрессии гена Ki-67 и

снижением IL-6 в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста. Наличие отдаленных метастазов аденокарциномы толстой кишки ассоциировано ($p < 0,05$) со снижением экспрессии генов BAX, TGF- β , TLR4, GNLY, GATA3, IGF1, IL7, LIFR, CD45, HLA-G5, IL6, LIF и повышением P16 в образцах первичной опухоли и снижением экспрессии генов P14 и TGF- β в слизистой оболочке толстой кишки без морфологических признаков опухолевого роста, что может быть использовано для выделения группы пациентов, нуждающихся в проведении более агрессивных схем адьювантного и/или неоадьювантного химиолучевого лечения.

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

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

Практические рекомендации

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

2. Принимая во внимание ожирение как фактор риска первично множественного злокачественного поражения толстой кишки, молочных желез у женщин, предстательной железы, эндометрия, яичников, почек и желудка,

пациенты с ИМТ ≥ 30 кг/м² должны подвергаться прицельному комплексному обследованию с целью выявления предраковых заболеваний и ранних стадий злокачественной трансформации соответствующих локализаций.

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

4. Оценка экспрессии генов IFN- γ , IL-8, IL-15, NDRG1, CD68, BAG1, TNF- α , STK15, Ki-67, CCNB1, IL-6, TERT, CCND1, GRB7, P16, MYBL2, BIRC5, PTEN, SCUBE2, IL-10 в слизистой оболочке толстой кишки без макроскопических и морфологических признаков опухолевого роста в группах риска по возникновению колоректального рака перспективна для разработки персонализированного лечебно-диагностического алгоритма при колоректальном раке.

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

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Станоевич У.С. Регионарная химиотерапия через артериальный порт у больных с метастазами колоректального рака в печень. /Чхиквадзе В.Д., Станоевич У.С., Гребенкин Е.Н. // **Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России.** – 2011. Т.4. № 11. С.162-180.
2. Станоевич У.С. Роль регионарной внутриартериальной химиотерапии в лечении больных с метастазами колоректального рака в печень. /Чхиквадзе В.Д., Гребенкин Е.Н., Станоевич У.С., Елтышев Н.А., Дехисси Е.И. // **Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России** - 2012. Т.4. №12 С.14
3. Станоевич У.С. Ранняя диагностика колоректального рака. /Солодкий В., Чхиквадзе В., Станоевич У., Дехисси Е. // **Врач.** - 2012. № 11. С. 20-23.

4. Станоевич У.С. Колоректальный рак при ожирении: патогенетические аспекты /Станоевич У., Дехисси Е., Чхиквадзе В. // **Врач.** - 2012. № 8. С. 23-27.
5. Станоевич У.С. Роль радиочастотной абляции в лечении больных с метастазами колоректального рака в печень /Гребенкин Е., Станоевич У., Чхиквадзе В., Момджян Б. // **Врач.** - 2012. № 5. С. 48-51
6. Станоевич У.С. Радиочастотной абляция метастазов печени колоректальной этиологии /Солодкий В.А., Чхиквадзе В.Д., Гребенкин Е.Н., Станоевич У.С., Елтышев Н.А., Гончаров С.В., Колесников П.Г., Колесников Р.В. // Материалы II Всероссийского научно-практического конгресса радиологов «Рентгенорадиология в России. Перспективы развития» Москва 2012 г.
7. Станоевич У.С. Современные методы лечения больных с метастазами колоректального рака в печень. /Гребенкин Е.Н., Чхиквадзе В.Д., Станоевич У.С., Дехисси Е.И. // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.** - 2013. №3. С.28-32.
8. Станоевич У.С. Лечение печеночной токсичности, вызванной химиотерапией колоректального рака с метастатическим поражением печени. /Станоевич У., Гребенкин Е. // **Врач.** - 2013. №7. С.55-57.
9. Станоевич У.С. Патогенетические особенности колоректального рака на фоне нарушений жирового и углеводного обмена. \Дехисси Е.И., Станоевич У.С., Гребенкин Е.Н., Чхиквадзе В.Д. // **Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России.** - 2013. Т.2. №13. С.5.
10. Станоевич У.С. Роль эстрогенов и их рецепторов в патогенезе колоректального рака. /Станоевич У., Станоевич И., Оксанчук Е., Кудрина Е. // **Врач.** - 2013. №6. С.43-45.
11. Станоевич У.С. Ожирение как фактор неблагоприятного прогноза колоректального рака /Солодкий В.А., Дехисси Е.И., Станоевич У.С. // Материалы VIII съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии. Казань 2014 г. – С.518
12. Станоевич У.С. Прогностическая значимость антропометрических данных в отношении развития первично-множественного колоректального рака / Чхиквадзе В.Д., Станоевич У.С., Елтышев Н.А, Дехисси Е.И., Гребенкин Е.Н., Гончаров С.В., Колесников П.Ш. // Материалы VIII съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии. Казань 2014 г. – С.524-525
13. Станоевич У.С. Прогрессирование колоректального рака в зависимости от степени, характера накопления и гормональной активности жировой ткани. /Солодкий В.А., Чхиквадзе В.Д., Станоевич У.С., Дехисси Е.И. // **Онкология. Журнал им. П.А. Герцена.** - 2015. Т.4. №6. С.25-30.
14. Станоевич У.С. Гинекологический статус больных колоректальным раком. /Солодкий В.А., Станоевич У.С., Станоевич И.В., Зеленина И.А., Чхиквадзе В.Д. // **Сибирский онкологический журнал.** - 2015. №2. С.71-75.

15. Станоевич У.С. Прогноз у больных колоректальным раком при ожирении. /Солодкий В.А., Чхиквадзе В.Д., Станоевич У.С., Дехисси Е.И. // **Фарматека.** - 2015. №18. С.52-56.
16. Станоевич У.С. Индекс массы тела и полинеоплазия /Солодкий В.А., Чхиквадзе В.Д., Станоевич У.С., Рагимов В.А., Дехисси Е.И., Лагожина И.А., Зеленина И.А. // **Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России.** - 2015. Т.15. №1. С.8.
17. Станоевич У.С. Роль адипокинов в прогрессировании колоректального рака. /Чхиквадзе В., Станоевич У., Дехисси Е., Кудинова Е., Кулинич Т., Станоевич И., Троценко И. // **Врач.** - 2015. №6. С.61-63.
18. Станоевич У.С. Возможности использования адипокинов для оценки риска прогрессирования колоректального рака. /Солодкий В.А., Станоевич У.С., Дехисси Е.И., Чхиквадзе В.Д. // Сборник тезисов 1-го Российского онкологического научно-образовательного форума с международным участием «Белые Ночи – 2015». Санкт-Петербург 2015 г. – С. 74-75
19. Станоевич У.С. Комплексное лечение при большом метастазе колоректального рака в печень с вовлечением 3-х печеночных вен. /Ахаладзе Г.Г., Станоевич У., Гребенкин Е.Н., Ахаладзе Д.Г. // **Анналы хирургической гепатологии.** 2016. Т.21. №1. С.89-93.
20. Станоевич У.С. Коррекция факторов риска колоректального рака - путь к первичной патогенетической профилактике /Станоевич У.С. // **Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России.** 2016. Т.16. № 3. С.8
21. Станоевич У.С. Хирургическое лечение рака прямой кишки после неoadьювантной лучевой терапии / Солодкий В.А., Чхиквадзе В.Д., Станоевич У.С., Гребенкин Е.Н., Рагимов В.А., Колесников П.Г. // Материалы Всероссийского Конгресса с международным участием «Хирургия – XXI век: соединяя традиции и инновации» Москва 2016 г. С. 130-131
22. Станоевич У.С. Симультанные лапароскопические резекции печени при метастатическом колоректальном раке /Гребенкин Е.Н., Станоевич У.С., Гончаров С.В., Рагимов В.А. // Сборник тезисов II Петербургского онкологического форума «Белые Ночи – 2016». Санкт-Петербург 2016 г. – С. 113
23. Станоевич У.С. Роль молекулярно-генетических исследований в планировании неoadьювантной химиолучевой терапии при раке прямой кишки /Станоевич У.С., Боженко В.К., Захаренко М.В., Гончаров С.В., Солодкий В.А. // Материалы XX Российского онкологического конгресса, Москва 2016 г. №4, 1-2016 (21) с245
24. Станоевич У.С. Роль молекулярно-генетических исследований в планировании органосохраняющего лечения рака прямой кишки /Станоевич У.С., Боженко В.К., Захаренко М.В., Гончаров С.В., Колесников П.Г., Рагимов В.А.,

Гребенкин Е.Н. Материалы Научно-практической конференции с международным участием «Реконструктивно-пластические и органосохраняющие операции в онкологии» Москва 2016 г.

25. Станоевич У.С. Лапароскопические вмешательства на печени / Ахаладзе Г.Г., Гребенкин Е.Н., **Станоевич У.С.**, Гончаров С.В., Рагимов В.А. // Материалы пленума правления ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ. Челябинск 2016 г. С.13

Список использованных сокращений

АПХТ – Адьювантная полихимиотерапия

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ИМТ – Индекс массы тела

КРР – колоректальный рак

КТ – компьютерная томография

МРТ – магнитно-резонансная томография

ПЭТ – Позитронно-эмиссионная томография