

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

*На правах рукописи*

**ЗАХАРЕНКО МАРГАРИТА ВЛАДИМИРОВНА**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В  
ОПТИМИЗАЦИИ ДИАГНОСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

д.м.н., профессор

**Боженко Владимир**

**Константинович**

Москва – 2021 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ТОЛСТОЙ КИШКИ.	
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	16
1.1 Молекулярные механизмы, ответственные за нормальное функционирование (гомеостаз) тканей толстой кишки.....	16
1.1.1 Молекулярные механизмы регуляции клеточного обновления кишечного эпителия в норме.....	17
1.1.2 Роль микробиоты в патогенезе колоректального рака.....	18
1.1.3 Молекулярные механизмы иммунной регуляции в кишечном эпителии в норме.....	19
1.2 Молекулярные механизмы злокачественной трансформации при спорадическом колоректальном раке. Начало неоплазии.....	22
1.2.1. Наследственные формы колоректального рака .....	24
1.2.2. Влияние эпигенетических событий на неопластическую трансформацию клеток (спорадический колоректальный рак).....	25
1.2.3. Сигнальные пути клетки, участвующие в колоректальном канцерогенезе.....	26
1.2.4. Колоректальный рак, ассоциированный с воспалительными заболеваниями толстой кишки. Сравнение со спорадическим колоректальным раком.....	29
1.3. Злокачественная трансформация доброкачественных опухолей толстой кишки. Молекулярно-генетические исследования колоректального канцерогенеза из аденоматозных и плоских зубчатых поражений прямой и ободочной кишки.....	32
1.4. Методы диагностики заболеваний толстой кишки. Роль и место методов молекулярной диагностики в колопроктологии.....	34
1.4.1. Лучевые методы диагностики колоректального рака.....	36

1.4.2. Лабораторные методы диагностики колоректального рака .....	37
1.4.3. Методы ранней диагностики и скрининга колоректального рака.. .....	38
1.4.4. Использование молекулярно-генетических технологий в диагностическом алгоритме колоректального рака.....	40
1.5. Исследования морфологически неизмененных тканей при злокачественных опухолях различных локализаций.....	42
1.6. Молекулярно-генетические технологии в прогнозе колоректального рака.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
2.1 Объекты и дизайн молекулярно-генетического исследования. Формирование групп.....	47
2.1.1 Этапы и объекты исследования. ....	48
2.1.2. Первый этап исследования. Описание групп.....	49
2.1.2.1. Критерии отбора нормальной (морфологически неизменной слизистой толстой кишки), как референсного стандарта.....	50
2.1.2.2. Формирование групп для оценки профилей экспрессии мРНК в неизмененном эпителии толстого кишечника при патологии и в «норме» в зависимости от отдела толстой кишки. Особенности получения материала биопсии.....	51
2.1.2.3. Клинико-морфологические данные пациентов.....	52
2.1.3. Второй этап исследования. Описание и формирование групп.....	55
2.2. Методы исследования.....	56
2.2.1. Морфологический анализ образцов.....	57
2.2.2. Методы выделения мРНК из образцов морфологически неизменной ткани толстой кишки и проведения ПЦР с обратной транскрипцией.....	59
2.2.3. Методы определения и расчета уровня относительной экспрессии исследуемых генов по контрольным генам.....	61

2.2.4 Краткая характеристика исследуемых генов.....	62
2.2.5. Статистическая обработка полученных результатов.....	67
ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. ....	69
3.1 Первый этап исследования. Анализ молекулярно-генетических показателей в неизмененных тканях толстой кишки в норме и при заболеваниях толстой кишки.....	69
3.1.1 Анализ экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки здоровых доноров.....	69
3.1.1.1 Исследование экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки здоровых доноров в зависимости от анатомического отдела толстой кишки.....	70
3.1.1.2 Исследование экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки здоровых доноров в зависимости от возраста.....	78
3.1.2 Анализ экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки при доброкачественных гиперпролиферативных процессах.....	83
3.1.2.1 Анализ экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки при доброкачественных гиперпролиферативных процессах в зависимости от анатомического отдела.....	83
3.1.2.2 Анализ экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки при доброкачественных гиперпролиферативных процессах в зависимости от клинико-морфологических характеристик.....	86
3.1.2.3. Анализ экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки в зависимости от степени дисплазии аденомы.....	87
3.1.2.4. Анализ экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки в зависимости от гистологического типа полипа.....	88
3.1.3. Анализ экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки при колоректальном раке.....	89
3.1.3.1. Анализ экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки при	

колоректальном раке в зависимости от анатомического отдела.....	89
3.1.3.2. Анализ экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при колоректальном раке в зависимости от клинико-морфологических характеристик опухоли.....	91
3.1.3.3. Анализ экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при колоректальном раке в зависимости от прогрессирования заболевания.....	97
3.1.3.4. Анализ экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при колоректальном раке в зависимости от пола.....	98
3.2. Второй этап исследования. Оценка возможности использования клеточного материала соскобов из прямой кишки, как объекта для молекулярно-генетического исследования патологических процессов в толстой кишке.....	100
3.2.1 Сравнение профиля экспрессии генов в тканях толстой кишки в зависимости от типа патологического процесса.....	101
3.2.2 Оценка возможности использования анализа профиля экспрессии генов клеточного материала соскоба из прямой кишки для дифференциальной диагностики патологических процессов в толстой кишке.....	102
3.2.2.1. Анализ экспрессии генов в морфологически неизменном эпителии прямой кишки пациентов с диагнозом КРР.....	107
3.2.2.2. Анализ экспрессии генов в морфологически неизменном эпителии прямой кишки пациентов с доброкачественными гиперпролиферативными процессами в толстой кишке.....	110
3.2.3. Анализ экспрессии генов в морфологически неизменном эпителии прямой кишки пациентов с неспецифическим язвенным колитом.....	111
3.3. Определение оптимальной панели биомаркеров для диагностики патологического процесса в толстой кишке. Алгоритм применения полученной панели генов в обследовании пациентов с патологией в толстой	

кишке.....	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	117
ВЫВОДЫ.....	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	129

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Колоректальный рак (КРР) — злокачественное новообразование, возникающее из трансформированных клеток слизистой оболочки ободочной и прямой кишки. Рак ободочной и прямой кишки занимает одну из лидирующих позиций по заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований. По статистике заболеваемости населения России за 2018 КРР занимает 3-е место после рака молочной железы и кожи у женщин, рака легких и предстательной железы у мужчин. При этом за период с 2008 – 2018 год заболеваемость раком ободочной и прямой кишки у мужчин выросла на 39%, у женщин на 28,5%. [8]. В 2018 году в России зарегистрировано 34351 впервые выявленных случаев среди мужчин и 39886 случаев среди женщин. Американское общество онкологов опубликовало результаты анализа GLOBOCAN 2020 согласно которым колоректальный рак занимает 3-е место по числу выявляемых злокачественных заболеваний, составляя 10,0% (1,9 млн. случаев), и является второй по частоте - 9,4% (0,94 млн. случаев) причиной смертности после рака легких [139].

Прогноз течения заболевания напрямую зависит от стадии КРР на момент постановки диагноза. При локализованном процессе диапазон 5-летней выживаемости больных колеблется от 90% до 68%. Тем не менее, несмотря на различные программы скрининга, на ранних стадиях КРР выявляется менее чем в 40% случаев. Для распространённого в региональные лимфоузлы и метастатического рака показатели 5-летней выживаемости при этой патологии не превышают 10% [99]. Таким образом, ранняя диагностика и скрининг онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта является чрезвычайно актуальной проблемой, требующей поиска новых решений этой клинически важной задачи.

В последние несколько лет появилось много публикаций, в основном у зарубежных авторов, доказывающих, что колоректальный рак, как и другие виды

рака, имеет многофакторную этиологию, и одним из важных факторов, влияющих на развитие заболевания и его прогноз, является молекулярно-генетическая характеристика опухоли [122,156].

Известно, что основными молекулярно-генетическими механизмами канцерогенеза являются нарушения таких клеточных процессов как передача пролиферативных сигналов, уклонение от апоптоза, развитие иммуносупрессии, создание возможности репликативного бессмертия, индукция ангиогенеза, активация механизмов инвазии и метастазирования [81]. В настоящее время основное внимание исследователей сосредоточено на изучении молекулярно-генетических изменений в опухолевой ткани и клетках. В то же время в ряде исследований подчеркивается важность молекулярно-генетического анализа морфологически неизменной ткани пораженного опухолью органа. Впервые попытку исследовать морфологически нормальный эпителий при пероральной карциноме и описать в научной статье развитие множественных опухолевых поражений, возникающих после лечения в полости рта, сделал Slaughter с соавторами в 1953 году [134]. Одной из концепций, объясняющих возможные молекулярные изменения в окружающей опухоль морфологически нормальной ткани, является концепция «опухолевого поля». Согласно теории опухолевого «поля», на начальной стадии многоступенчатого процесса канцерогенеза стволовая клетка подвергается генетическим изменениям, образуя клональную единицу измененных дочерних клеток. Дальнейшие изменения преобразуют клон в «поле» пред-неопластических клеток. Хотя только одна клетка становится опухолевой, оставшееся «поле» (неизменная слизистая оболочка), состоящее из морфологически нормальных, но биологически измененных эпителиальных клеток, продолжает находиться в пред-неопластическом состоянии. В исследованиях, посвященных ультрамикроскопическим морфологическим изменениям в тканях опухолевого окружения, авторы исключали возможность существования опухоли на фоне «здоровой» слизистой оболочки толстой кишки [54,69]. Так гистологические заключения, датируемые 20-м и началом 21-го века, обычно содержали подробное описание ультрамикроскопических изменений в



слизистой оболочке толстой кишки [11,18]. В период 60х-70х годов 20 века патоморфологи подробно описывают такие признаки как «цилиндрические клетки со светлой цитоплазмой» в верхних слоях крипт и поверхностном эпителии, увеличение количества лизосом и везикул в колоноцитах, наличие малых электронно-плотных телец в морфологически неизменной слизистой оболочке толстой кишки при раке толстой кишки. В настоящее время эти признаки «традиционно» не описываются патоморфологами ввиду отсутствия клинической значимости обнаруженных изменений. Повышение интереса к исследованию неизмененных тканей при злокачественном поражении органов возник в связи с развитием в последние несколько лет новых молекулярно-генетических технологий, таких как микроматричный анализ транскриптома, исследование экспрессии генов и других. Рядом авторов были выполнены исследования, в которых подчеркивается важность изучения неизмененных тканей при злокачественном поражении органа, и подтверждается связь прогрессирования КРР с влиянием опухолевого микроокружения [34,44,57,64]. В исследованиях Egeblad с соавторами установлено, что опухолевые клетки могут инициировать изменения в окружающей ткани, способствующие злокачественному росту [63]. В исследованиях Graham с соавторами, были обнаружены изменения экспрессии ряда генов сигнального каскада MAPK (mitogen activated protein kinase) в контралатеральной молочной железе у пациенток с семейным анамнезом рака молочной железы (РМЖ) или положительным статусом носителя мутации гена *BRCA*, перенесших профилактическую мастэктомию не пораженной злокачественной опухолью, здоровой молочной железы. [78]. В 2017 году были опубликованы результаты анализа молекулярного фенотипа ткани опухоли разных локализаций, здоровых тканей и морфологически неизмененных тканей (МНТ) при раке, взятых на расстоянии от 2 до 15 см. от опухоли, объединяющие все известные данные в международных базах [26]. В статье представлены результаты исследования наиболее часто встречающихся 8 злокачественных новообразований: рака молочной железы, рака предстательной железы, легкого, колоректального рака, щитовидной железы и других локализаций. Главный вывод

данной статьи – МНТ отличается по молекулярному фенотипу от здоровой ткани соответствующего органа. Надо отметить, что результаты по анализу экспрессии в здоровых органах представлены в данной работе на основании анализа аутопсийного материала. Авторы пришли к заключению, что обнаруженные изменения, в отличие от теории «опухолевого поля», инициируются самой опухолью. Известно, что микроокружение опухолей, состоящее из гетерогенной популяции стромальных клеток, таких как фибробласты и иммунные клетки, а также внеклеточных матричных структур, секретируемых факторов, работает в сложном взаимодействии через внутриклеточную сигнализацию, регуляцию экспрессии генов, трансмембранные межклеточные рецепторы и т.д. Следовательно, колоректальная опухоль не является изолированной сущностью, растущей вне связи с организмом: при ее возникновении кишечник пациента представляет собой среду опухолевого развития, тесно связанную с такими процессами как воспаление, образование кровеносных сосудов, питание и состав микроокружения [81].

Проведенные нами исследования показали, что при наличии злокачественной опухоли толстой кишки в МНТ края резекции опухоли происходят изменения экспрессии большой группы генов, отличающие эту ткань, как от опухолевой, так и от нормальной слизистой здоровых доноров, что подтверждает выводы авторов зарубежных исследований [17]. На основании литературных данных и полученных ранее результатов, подтверждающих молекулярные изменения в ткани края резекции опухоли толстой кишки в 15-25 см. от опухолевого узла, нами сделано предположение о возможном наличии молекулярно-генетических изменений, происходящих в морфологически нормальных тканях и на более отдаленной дистанции. Углубленное исследование профиля экспрессии генов в неизменной ткани пораженного органа, поможет глубже раскрыть понимание сложного процесса взаимодействия гистологически измененных клеток с морфологически «нормальными», выявить диагностически значимые гены для определения начальных изменений, характерных для данного

патологического процесса, а также, возможно, дать начало новым методам диагностики и терапии.

### **Цель исследования**

Исследование профилей экспрессии генов в морфологически неизменных тканях разных отделов толстой кишки в норме и при патологии для дифференциальной диагностики доброкачественных, злокачественных новообразований и воспалительных процессов в толстой кишке.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать молекулярно-генетические характеристики слизистой оболочки толстой кишки в норме в зависимости от отдела и возраста.
2. Исследовать молекулярно-генетические особенности неизменных тканей при полипах в зависимости от отдела толстой кишки и клинико-морфологических характеристик.
3. Исследовать молекулярно-генетические особенности неизменных тканей толстой кишки при колоректальном раке в зависимости от отдела и клинико-морфологических характеристик.
4. Сравнить профиль экспрессии генов в тканях толстой кишки в зависимости от типа патологического процесса.
5. Изучить возможности применения метода анализа профиля экспрессии генов для дифференциальной диагностики патологического процесса в толстой кишке, где в качестве объекта исследования используется клеточный материал соскоба из прямой кишки.

### **Научная новизна**

Впервые проведено исследование экспрессии генов в морфологически неизменных тканях толстой кишки в норме, при доброкачественной и злокачественной патологии толстой кишки, в зависимости от анатомического отдела толстой кишки и клинико-морфологических данных.

Впервые определены особенности экспрессионного профиля неизменной слизистой прямой кишки при различных патологических процессах толстой

кишки, включающих хронические воспалительные заболевания. Проведенное исследование позволило установить, что в морфологически неизменной ткани при различных патологических процессах на достаточном отдалении от очага поражения (в других отделах толстой кишки) наблюдаются молекулярно-генетические изменения, характерные для данного типа поражения.

Впервые установлено, что полученный с помощью молекулярно-генетического анализа экспрессионный фенотип клеточного материала соскоба из прямой кишки с высокой чувствительностью и специфичностью отражает патологические изменения в толстой кишке.

Показано, что анализ экспрессионных профилей морфологически неизменных тканей слизистой толстой кишки может являться основой для создания нового метода дифференциальной диагностики патологических процессов толстой кишки.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Выявленные особенности экспрессионных фенотипов неизменных тканей при различных патологических процессах в толстой кишке способствуют более глубокому пониманию фундаментальных основ заболеваний толстой кишки. Проведенное исследование позволило выявить молекулярно-генетические изменения в отдаленных от очага поражения отделах органа, что имеет большое значение для оценки влияния патологического процесса на орган в целом. Полученные результаты могут быть использованы в учебно-методическом процессе студентов, аспирантов и ординаторов по специальности онкология.

Полученные фенотипические особенности ткани толстой кишки будут использованы для разработки молекулярно-генетической технологии при скрининге и дифференциальной диагностике патологий толстой кишки. Применение данной технологии возможно как на амбулаторном этапе оказания медицинской помощи, так и в практике работы специализированных стационарных учреждений.

### **Методы и методология исследования**

В исследование включены пациенты, проходившие лечение в ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России и Научном Центре Колопроктологии в период с 2011 по 2019 гг. От каждого пациента получено добровольное информированное согласие. Протокол исследования №4 от 26.04.19 одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ "Российский научный центр рентгенорадиологии" Минздрава России.

Анализ оценки уровня экспрессии 65 генов (62 функциональных и 3 референсных) проведен методом ПЦР в реальном времени для 926 образцов, полученных от 519 пациентов. Исследование разделено на два этапа. На первом этапе определено общее влияние развития патологического процесса в толстой кишке на морфологически неизменные ткани толстой кишки. Исследована зависимость уровня экспрессии от анатомического отдела толстой кишки и клинико-морфологических данных для групп условно здоровых доноров, пациентов с полипами толстой кишки и колоректальным раком. В анализ взяты биоптаты из толстой кишки в объеме 1,5 – 2 мм<sup>2</sup>. Для 253 пациентов с морфологически подтвержденной аденокарциномой ТК разной степени злокачественности уровень экспрессии проанализирован в образцах тканей края резекции без морфологических признаков опухолевого роста, взятых на расстоянии не менее 15 см от опухолевого узла и биоптатах из 5 отделов толстой кишки на разном удалении от опухоли (n=310). Для 29 пациентов с аденоматозными и гиперпластическими полипами ТК проанализирован уровень экспрессии в образцах неизмененных тканей без морфологических признаков опухолевого роста, взятых на расстоянии 10 – 15 см от полипа и в 5 отделах толстой кишки на разном удалении от полипа (n=73). В контрольной группе, включающей 55 условно здоровых доноров без патологии в толстой кишке, проанализирован уровень экспрессии в биоптатах из слизистой оболочки 5 анатомических отделов (n=177). На втором этапе исследования мы оценивали возможность использования для диагностики патологического процесса в толстой

кишке клеточного материала из ампулярного отдела прямой кишки полученного с помощью урогенитального зонда «Цитощетка». Объектом исследования являлся биологический материал пациентов с колоректальным раком (n=44), полипами толстой кишки (n=18), неспецифическим язвенным колитом (n=55). Контрольную группу «норма» составили условно здоровые доноры (n=63) без патологии в толстой кишке. Статистическая обработка включала стандартные параметрические и непараметрические методы оценки достоверности отличий и комплекс многомерных методов статистического анализа.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. При физиологической норме отмечена четкая дифференциация экспрессионных фенотипов эпителиальных тканей в разных анатомических отделах толстой кишки. Уровень экспрессии в отделах толстой кишки достоверно изменяется в разных возрастных группах.

2. Уровень экспрессии в неизмененных тканях при полипах отличается в отделах толстой кишки и коррелирует со степенью дисплазии эпителиальных клеток и гистологическим типом полипа.

3. Уровень экспрессии в морфологически неизмененных тканях толстой кишки при колоректальном раке отличается в отделах толстой кишки и коррелирует с глубиной прорастания опухоли, наличием лимфогенного и гематогенного метастазирования, степенью злокачественности.

4. Определение экспрессионного фенотипа в клеточном материале соскоба из ампулярного отдела прямой кишки позволяет дифференцировать образцы неизмененных тканей при патологии в толстой кишке от тканей здоровых доноров. В перспективе, анализ экспрессии генов может быть использован для дифференциальной диагностики патологических процессов в толстой кишке и скрининга колоректального рака.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Апробация диссертации состоялась на совместном заседании научно-практической конференции и совета по апробациям кандидатских диссертаций

ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России 31 мая 2021 года. Материалы диссертации представлены на III и IV Международном онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2017 г., 2018 г.), III Научно-практической конференции «Парадигмы лекарственной терапии у онкологических больных» (Обнинск, 2021 г.).

По материалам диссертации опубликовано 16 работ: из них 10 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, тезисов в материалах научных конференций – 6.

# **Глава 1. РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ТОЛСТОЙ КИШКИ.**

## **ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**

### **1.1 Молекулярные механизмы, ответственные за нормальное функционирование (гомеостаз) тканей толстой кишки**

Проблема возникновения злокачественных опухолей в разных концепциях канцерогенеза рассматривается с разных сторон. Как известно, канцерогенез индуцируется действием различных факторов физической, химической, биологической природы экзогенного или эндогенного происхождения. Рак ободочной и прямой кишки, как и другие виды злокачественных заболеваний, имеет многофакторную этиологию. Развитие рака толстой кишки (ТК) связано с наличием известных наследственных синдромов. У остальных пациентов рак ободочной кишки и прямой кишки имеет спорадический характер. В качестве факторов риска развития данной патологии рассматривается наличие аденоматозных полипов ТК, хронические воспалительные заболевания ТК, возраст старше 50 лет, курение, алкоголь, преобладание в рационе красного мяса, наличие сахарного диабета, ожирение или повышенный индекс массы тела, низкая физическая активность. Эти факторы оказывают влияние на возникновение определенных генетических изменений в клетке: нарушение механизмов репарации ДНК, появление делеций, инсерций, транслокаций, микромутаций, а также с эпигенетическими изменениями в механизмах регуляции функций ряда ключевых белков, задействованных во внутриклеточных сигнальных путях. Сигнальный путь обычно начинается с активации рецепторных тирозинкиназ факторами роста, цитокинами, различными гормонами и образуется соответствующий комплекс. Далее, через промежуточных участников сигнал передается на киназы «ниже» по сигнальному каскаду, которые запускают экспрессию большого числа генов. Заканчивается сигнальный путь активацией семейств факторов транскрипции, контролирующих экспрессию генов пролиферации или апоптоза [102]. Опухолевые клетки обеспечивают



независимую от ростовых факторов активацию сигнальных путей при отсутствии внешних сигналов. Нормальные клетки, в отличие от опухолевых, могут пролиферировать только при наличии определенных условий, таких как наличие факторов роста и отсутствие антиростовых сигналов.

Особенностью кишечника человека является очень высокая скорость самообновления кишечного эпителия, которая сравнима со скоростью деления стволовых клеток. Этот орган также отличает его многофункциональность. Тонкая кишка принимает участие во всех этапах пищеварения, в ней вырабатываются ферменты, которые способствуют расщеплению пищи и всасыванию питательных веществ. Кроме переваривания, всасывания и транспортирования пищевых масс, тонкая кишка также выполняет функции иммунологической защиты и секреции гормонов. В толстой кишке происходит окончательное расщепление белков и микробиологический синтез витаминов, особенно некоторых витаминов из группы В и витамина К.

В этом разделе будет рассмотрено, каким образом происходит поддержание динамического равновесия регуляции процессов клеточного самообновления, роль микробиоты и регуляция иммунной защиты в здоровом кишечнике. Далее, с какими молекулярно-генетическими событиями связан переход от здорового состояния к развитию патологического процесса в ТК.

### **1.1.1 Молекулярные механизмы регуляции клеточного обновления кишечного эпителия в норме**

В норме в клетках кишечного эпителия обеспечивается поддержание баланса между процессами пролиферации, апоптоза, дифференцировки клеток кишечного эпителия, направленной миграции клеток. Нарушение баланса создает условия для развития патологических процессов, малигнизации [121,131]. Обновление эпителия толстой кишки происходит каждые 5 -7 дней, что примерно соответствует сроку возникновения клеток-предшественников из мультипотентных клеток, миграции предшественников со дна крипты к поверхности и их дифференцировке [150]. Этот процесс контролируется через

сигнальный путь WNT. Он регулирует связывание в ядре  $\beta$ -катенина с транскрипционными факторами TCF/LEF, стимулируя транскрипцию зависимых генов. Самыми важными генами в сигнальном пути WNT являются APC (Adenomatous Polyposis Coli), *cMYC*, сурвивин, матриксные металлопротеазы (MMP). Процессы пролиферации и дифференцировки регулируются комплексом  $\beta$ -Catenin/TCF. В норме белки WNT, синтезируемые клетками мезенхимы, индуцируют пролиферацию мультипотентных клеток и клеток-предшественников, которые дифференцируются в клетки Панета, бокаловидные, энтероэндокринные, энтероциты. В процессе миграции при достижении клеткой-предшественником середины крипт, в ядре клеток снижается активность сигнала WNT и комплекса  $\beta$ -Catenin/TCF. В результате этого процесса клетки прекращают деление и дифференцируются. Процесс апоптоза эпителиальных клеток регулируется сигнальным каскадом p53/Rb.

### 1.1.2 Роль микробиоты в патогенезе колоректального рака

Среди факторов окружающей среды все большее признание получает роль микроорганизмов в биологии рака, в том числе рака толстой кишки. В ободочной кишке содержится приблизительно  $3 \times 10^{13}$  микроорганизмов, с которыми кишечный эпителий постоянно взаимодействует. Эти микроорганизмы необходимы для нормальной физиологии желудочно-кишечного тракта. Микробиота кишечника здоровых людей отличается высоким видовым разнообразием микроорганизмов. Микробиота при КРР демонстрирует дисбиоз по сравнению с микробиотой здоровых людей, отражая иную экологическую среду у пациентов с КРР. В исследованиях на людях показано, что микробиота кишечника при КРР отличается меньшим количеством потенциально защитных таксонов (например, *Roseburia*), и повышенным количеством проканцерогенных таксонов (таких как *Bacteroides*, *Escherichia*, *Fusobacterium* и *Porphyromonas*). [68]. В ряде исследований показаны устойчивые ассоциации КРР с несколькими бактериями разных популяций [60,130]. Микробиота кишечника может влиять на колоректальный канцерогенез через множество механизмов,

включая микробные факторы, такие как метаболиты или генотоксины. Кроме того, некоторые бактерии могут быть непосредственно проканцерогенными (бактерии-драйверы) или размножаться как условно-патогенные микроорганизмы в микросреде, ассоциированной с опухолью (бактерии-переносчики) [158].

### **1.1.3 Молекулярные механизмы иммунной регуляции в кишечном эпителии в норме**

Существует сложная взаимосвязь между резидентной микробиотой желудочно-кишечного тракта и иммунной системой кишечника. Эволюционно клетки кишечного эпителия приспособлены обнаруживать бактериальные антигены, а также инициировать и регулировать как врожденные, так и адаптивные иммунные ответы. В слизистой оболочке кишечника локализовано около 80% всех иммунокомпетентных клеток организма. Около 25% слизистой оболочки кишечника состоит из иммунологически активной лимфоидной ткани, которая является самой большой совокупностью организованных лимфоидных тканей в организме. Лимфоидная ткань в стенке пищеварительного тракта расположена в четырех анатомических зонах. Во-первых, к ней относятся интраэпителиальные лимфоциты, расположенные базально между эпителиальными клетками слизистой оболочки. Во-вторых, лимфоциты, расположенные в соединительной ткани собственного слоя слизистой оболочки. Также в слизистой оболочке тонкой кишки находятся специфические скопления лимфоидных клеток, в частности, в тощей кишке расположены пейеровы бляшки. В-четвертых, в слизистой оболочке находятся солитарные лимфоидные фолликулы [14].

Через молекулы, экспрессируемые на поверхности эпителиальных клеток, например, молекулы главного комплекса гистосовместимости I и II (HLA) и Toll-подобные рецепторы (TLR), соседним иммунным клеткам, таким как макрофаги, дендритные клетки и лимфоциты, могут передаваться сигналы от бактерий [45,86]. TLR предупреждают иммунную систему о присутствии высококонсервативных микробных антигенов, называемых «патоген-

ассоциированными молекулярными структурами» (PAMP – Pathogen-associated molecular pattern), присутствующими в большинстве микроорганизмов. Примеры PAMP включают липополисахарид (LPS), пептидогликан, флагеллин и микробные нуклеиновые кислоты. Известно не менее десяти типов TLR человека. У здоровых взрослых TLR экспрессируются в большинстве тканей, включая миеломоноцитарные клетки, дендритные клетки, эндотелиальные и эпителиальные клетки. Взаимодействие TLR и бактериальных молекулярных паттернов приводит к активации сложного внутриклеточного сигнального каскада, усилению регуляции воспалительных генов, продукции провоспалительных цитокинов, интерферонов и привлечению миелоидных клеток, экспрессии костимулирующих молекул, необходимых для индукции адаптивного иммунного ответа антигенпрезентирующих клеток [143]. Уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов TLR3, TLR4, TLR5 и TLR7 в эпителии толстой кишки достаточно высок [163]. TLR4 распознает липополисахариды (LPS) [117], входящие в состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий, в то время как TLR2 реагируют с более широким спектром бактериальных продуктов, таких как липопроотеины, пептидогликаны и липотейхоевая кислота. Они присутствуют, как в грамотрицательных бактериях, так и в грамположительных бактериях [128].

Помимо TLR еще одно семейство мембраносвязанных рецепторов (NOD-подобные рецепторы - NLR) обнаруживает белки. NLR взаимодействуя с TLR, обеспечивают регуляцию воспалительной реакции. Располагаясь в цитоплазме, они участвуют в обнаружении бактериальных PAMP, которые проникают в клетку. В эпителиальных клетках желудочно-кишечного тракта, где клетки находятся в постоянном контакте с микробиотой, экспрессия TLR в норме должна подавляться, чтобы избежать чрезмерной стимуляции. С другой стороны, если эпителиальные клетки кишечника заражаются инвазивными бактериями или бактериями, непосредственно взаимодействующими с плазматической мембраной, TLR вступают в контакт с NLR и могут активировать защитные механизмы [73]. NLR также участвуют в восприятии других эндогенных

предупреждающих сигналов, которые приводят к активации воспалительных сигнальных путей, таких как ядерный фактор – каппа В (NF-κB) и митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК). Способность NRL регулировать, например, передачу сигналов ядерного фактора- каппа В (NF-κB) и продукцию интерлейкина-1- бета (IL-1β), указывает на их важность в патогенезе воспалительных заболеваний человека.

В иницировании, поддержании и разрешении воспаления решающую роль играют макрофаги и их предшественники – моноциты [72]. При воспалении макрофаги выполняют функции презентации антигена, фагоцитоз инфекционных агентов и иммуномодуляцию за счет продукции различных цитокинов и факторов роста. В нормальных физиологических условиях макрофаги продуцируют широкий спектр биологически активных молекул, участвующих, как в благоприятных, так и в неблагоприятных исходах воспалительных реакций. Макрофаги образуют разные фенотипы в зависимости от того, с какими сигналами они сталкиваются [151]. Провоспалительные макрофаги класса M1, индуцированные провоспалительными медиаторами, такими как липополисахариды (LPS), IL-1β и IFN-γ, продуцируют провоспалительные цитокины (TNF-α, IFN-γ, IL-6 и IL-12) и генерируют реактивные формы кислорода. Макрофаги класса M2, активируемые, например, интерлейкинами IL-4, IL-13 и IL-10, продуцируют меньше провоспалительных цитокинов, чем M1, передают, в основном, противовоспалительные сигналы, например, через IL-10, который является антагонистом рецепторов TGF-β и IL-1[75]. Считается, что макрофаги M2 участвуют в блокаде воспалительных реакций и способствуют регенерации тканей [106]. Таким образом, разные подмножества макрофагов обеспечивают баланс в воспалении, модуляции иммунного ответа или иммунной толерантности при физиологической норме.

Плазматические клетки, находящиеся в собственной пластинке, продуцируют и транспортируют в просвет кишки с помощью рецептора полииммуноглобулина молекулы IgA, IgG и IgM. Класс молекул IgA

способствует формированию специфического иммунитета, улавливая антигены и подавляя их проникновение через слизистые оболочки [46].

С собственной пластинкой слизистой оболочки кишечника связаны дендритные клетки. Они могут представлять антиген Т-клеткам, мигрировать в зоны Т-клеток, в мезентериальные лимфатические узлы или взаимодействовать с В-клетками памяти [115]. Кроме того, распознавать микробные антигены могут интраэпителиальные лимфоциты, расположенные в эпителии [49].

Четкая координированность систем, ответственных за поддержание гомеостаза в тканях кишечника, обеспечивает нормальное функционирование, защиту от внешних повреждающих факторов и высокую сопротивляемость заболеваниям. Однако, при нарушении этого баланса, может произойти активация проканцерогенных сигнальных путей, которые, в конечном итоге, будут являться ключевой точкой в развитии патологического процесса.

## **1.2 Молекулярные механизмы злокачественной трансформации при спорадическом колоректальном раке. Начало неоплазии**

Установлено, что в самообновляющихся тканях, к которым относится кишечный эпителий, клеточная регенерация происходит с очень высокой скоростью по сравнению с другими тканями организма. В тканях кишечного эпителия с возрастом положительно коррелирует число соматических мутаций [138]. Эти мутации происходят в преднеопластической фазе, то есть при росте нормальных клеток, которые пополняют кишечный эпителий каждые 5-7 дней в зависимости от отдела толстой кишки. Все предопухолевые мутации являются «пассажирскими», то есть не оказывают прямого или косвенного влияния на преимущество избирательного роста клетки, в которой они произошли. Начало неоплазии определяется как возникновение первой иницирующей или инактивирующей мутации гена, обеспечивающей избирательное преимущество роста нормальной эпителиальной клетки. Эта мутация позволяет перерастить окружающие ее клетки и стать микроскопическим клоном за счет разницы между рождением и смертью в клеточной популяции [92]. Гены, в которых происходят

мутации, придающие клеткам преимущество избирательного роста, имеют название драйверных, являясь онкогенами или супрессорами опухоли. Установлено, что каждая мутация гена-драйвера обеспечивает клетке небольшое преимущество роста, увеличивая разницу между рождением и гибелью клетки примерно на 0,4%, однако в течение многих лет это небольшое преимущество значительно возрастает [36]. Мутации при раке толстой кишки, чаще всего встречаются в ключевом супрессоре опухоли – гене *APC* [94]. Согласно каноническому пути развития спорадического КРР, подробно представленному Fearon E.R. и Vogelstein В. потеря функции *APC*, обычно является наиболее ранним молекулярным событием в патогенезе КРР. Небольшая аденома, возникающая в результате этой мутации, растет достаточно медленно. Следующая мутация, возникающая в гене *k-RAS*, запускает второй этап клонального роста, который также позволяет увеличить преимущество роста клеток [66]. Таким образом, по мере прогрессирования аденомы (увеличение размеров и степени дисплазии эпителия) происходят молекулярные изменения, связанные с хромосомной (CIN) или микросателитной (MSI) нестабильностью, индукцией прото-онкогена *k-RAS*, и гиперэкспрессией циклооксигеназы-2 (*COX-2*), которая способствует росту опухоли, ангиогенезу и метастазированию. В более чем 60% колоректальных карцином также обнаруживаются делеции в области длинного плеча хромосомы 18q21, которые сопровождаются потерей функций генов – супрессоров опухолей *DCC* и *DPC4*, расположенных в потерянной области [144]. На поздних стадиях происходит потеря функции гена *p53*, что считается определяющим событием, приводящим к карциноме спорадического КРР. В математических моделях, имеющих сходство с моделью эволюционных часов в биологии, изучено накопление соматических мутаций в типичных опухолях взрослого человека и установлено, что колоректальный онкогенез протекает через четко определенные клинические стадии, связанные с характерными мутациями, при этом 57% «пассажирских» соматических мутаций появляется до начала неоплазии [145]. При оценке количества мутаций и числа общих мутаций в первичных опухолях прямой кишки и метастазах установлено,

что время, необходимое для развития событий: микроаденома – большая аденома – инвазивная аденокарцинома – метастатический процесс, соответствует в среднем 17 годам. Таким образом, чтобы доброкачественная опухоль превратилась в запущенный рак необходимо порядка 25 лет от возникновения первой мутации драйверного гена до начала метастазирования. Приобретение способности метастазировать для клеток аденокарциномы составляет, в среднем, около 2 лет [92]. Если учитывать, что мутации в опухолях самообновляющихся тканей происходят с вычисляемой скоростью, то применение модели эволюционных часов к этим данным приводит к однозначному выводу: для развития метастатического рака требуются десятилетия. Это также свидетельствует о больших возможностях развития технологий ранней диагностики и методов скрининга для обнаружения предраковых поражений и КРР на ранних стадиях.

### 1.2.1 Наследственные формы колоректального рака

Среди всех других видов рака у человека КРР в наибольшей степени связан с семейной заболеваемостью. Наследственная предрасположенность к КРР встречается в 5 - 15% случаев [111]. Семейный аденоматозный полипоз встречается чаще. Заболевание связано с наличием мутации в гене *APC* [7,12]. Частота малигнизации при этой патологии достигает 100%. Наследственный не полипозный рак толстой кишки (ННКРР, или синдром Линча I и II типа) встречается более редко, на его долю приходится около 5% всех форм наследственного КРР [61]. Возникновение ННКРР связано с герминальными мутациями в MMR - генах – *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EpCAM*. При этом, 95% наследственных мутаций выявляются в 2-х генах – *MLH1* и *MSH2* и риск развития КРР достигает 80-85% [85]. MMR-гены отвечают за репарацию ДНК. Инактивация этих генов ведет к «микросателлитной нестабильности» [27], характерной для 95 % пациентов с синдромом Линча. В большинстве случаев развитие КРР носит спорадический характер [65].



### **1.2.2 Влияние эпигенетических событий на неопластическую трансформацию клеток (спорадический колоректальный рак)**

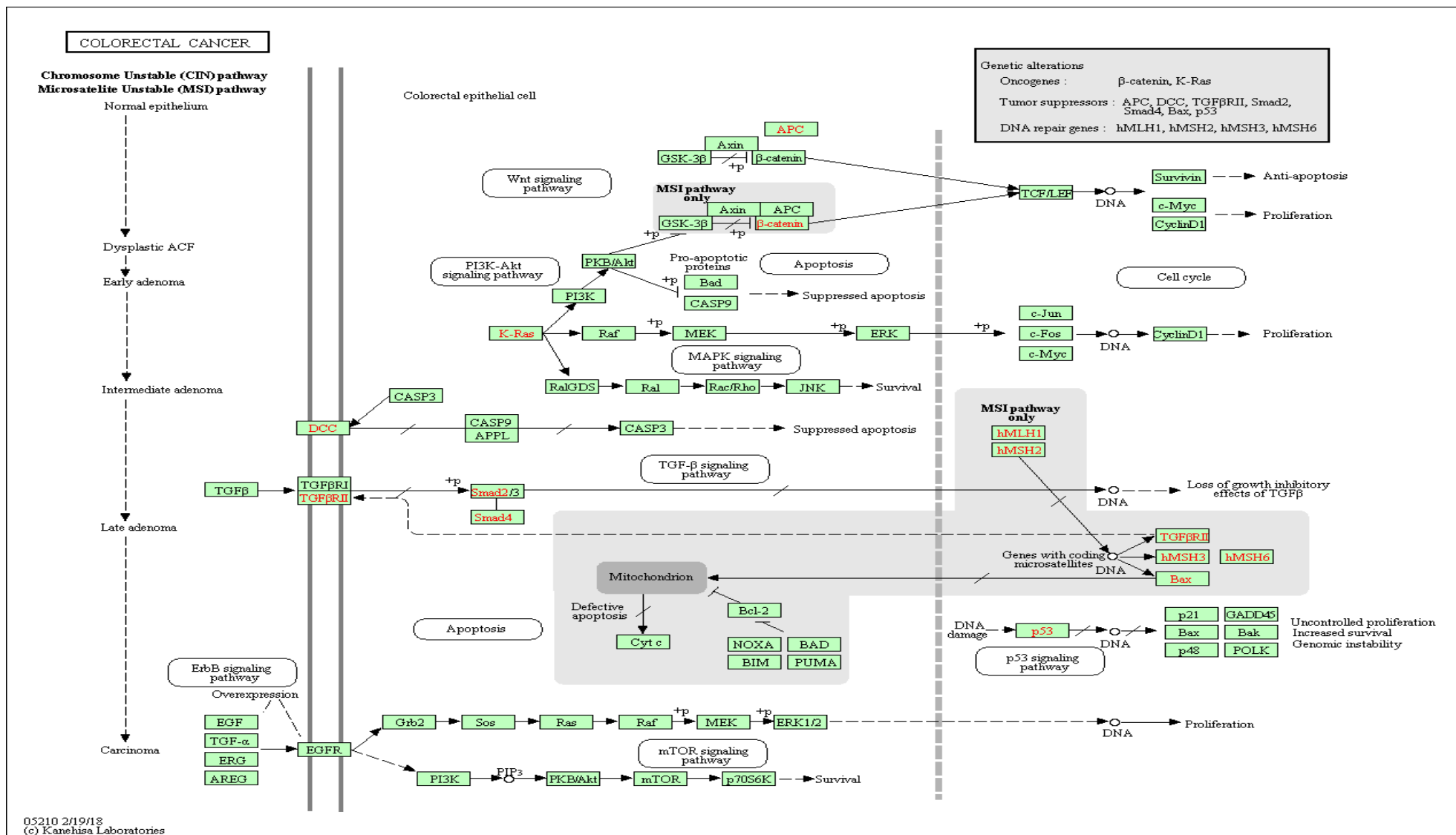
Эпигенетические события, такие как метилирование ДНК и изменения экспрессии ряда генов играют важную роль в событиях канцерогенеза. Известно, что прогрессирование клеточной атипии с изменением морфологии непосредственно связано с определенными генетическими событиями в клетке, такими как нарушение механизмов репарации ДНК, возникновение делеций, инсерций, транслокаций и микромутаций. В то же время некоторые аспекты онкогенности регулируются рядом генов, которые содержат мало мутаций или вообще мутаций не содержат. Эти гены сверхэкспрессируются, недостаточно экспрессируются или эпигенетически изменяются в опухолях, способствуя ранним стадиям канцерогенеза, или обеспечивают избирательное преимущество роста клетки [67,91]. Таким образом, эпигенетические изменения, также как и генетические, оказывают влияние на механизмы регуляции функций ряда ключевых белков задействованных во внутриклеточных сигнальных путях [6]. Ряд авторов считает, что к изучению процесса канцерогенеза необходим подход с позиции системности развития патологических изменений. Так неопластический процесс может сопровождаться функциональными изменениями иммунной и нейроэндокринной систем, которые могут происходить задолго до морфологического подтверждения наличия опухолевого процесса. Длительно воздействующие системные отклонения иммунной и нейроэндокринной регуляции в комплексе с локально воздействующими факторами, например, такими как состав кишечной микробиоты, обеспечивают направленный отбор и дифференцировку клеток слизистой оболочки ТК, отличающихся от нормы по совокупности экспрессированных белков. Создаваемые таким образом в течение длительного времени молекулярные изменения остаются недоступными не только для эндоскопических и морфологических методов исследования, но по ряду генов – и для тестирования ДНК ввиду отсутствия в них мутаций [5,22]. Таким образом, генетические и эпигенетические изменения осуществляют совместную работу – предоставляют клетке избирательное преимущество роста, прямо или косвенно.

### 1.2.3 Сигнальные пути клетки, участвующие в колоректальном канцерогенезе

Исследования последних лет позволили более глубоко изучить молекулярные механизмы злокачественной трансформации, прогрессирования и выделить основные сигнальные пути, в которых обнаруживаются нарушения в передаче пролиферативных и апоптотических сигналов. Кроме того, ряд авторов считает, что существует только ограниченное количество путей передачи сигналов, через которые можно получить преимущество в росте. Сигнальный путь обычно начинается с активации рецепторных тирозинкиназ факторами роста, цитокинами, различными гормонами с образованием соответствующего комплекса, передается через промежуточных участников и заканчивается активацией семейств факторов транскрипции, контролирующей экспрессию генов пролиферации или апоптоза [102]. Основные сигнальные пути, подверженные мутациям при колоректальном раке показаны в таблице 1 и на рисунке 1.

**Таблица 1** – Основные сигнальные пути, подверженные мутациям при колоректальном раке

Сигнальный путь	Промежуточные участники		Функция
	Онко-протеин	Белки опухолевой супрессии	
MAPK/ ERK	kRas, B-Raf	нейрофибромин	Пролиферация
PI3K/АКТ	PI3K, АКТ	Гумартин, туберин, PTEN, FOXO	Пролиферация, ингибирование апоптоза
mTOR		PTEN	Передача сигнала пролиферации на аппарат трансляции, поддержание высокой скорости синтеза белка
WNT	В-катенин, TCF/LEF, комплекс	Axin, APS	Пролиферация, дифференцировка, метастазирование, регуляция стволовых клеток
TP53/Rb	Mdm2	Rb, P53, ATM	Пролиферация, апоптоз, геномная стабильность
Notch	Notch1		Пролиферация, дифференцировка
JAK/STAT	STAT3, STAT5	STAT1, SOCS1	Пролиферация
TGFβ/SMAD	SMAD6, SMAD7	TGFβ-рецептор, TGFβ, SMAD2, SMAD4	Пролиферация
NF/κB	C-REL	CYLD	Пролиферация, апоптоз



**Рисунок 1** – Сигнальные пути клетки, участвующие в колоректальном канцерогенезе. Источник [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa05210](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa05210)

В колоректальном канцерогенезе в разной степени участвуют все сигнальные пути клетки. Как уже было сказано выше, сигнальный каскад WNT является важнейшим. В ряде исследований подтверждено, что соматические мутации в компонентах этого каскада – APC, Axin встречаются в 80% sporadических опухолей толстой кишки [94]. Мутации сигнального каскада WNT способствуют поддержанию фенотипа опухолеиницирующих клеток и эпителиально – мезенхимальному переходу, который необходим для метастазирования. Помимо мутаций, сигнальный путь WNT также активируется через другие сигнальные пути MAPK, PI3K/AKT и инактивацию сети p53/Rb.

Сигнальный путь MAPK (mitogen activated protein kinase) принимает существенное участие в регуляции экспрессии генов. MAPK регулирует клеточный цикл, транскрипцию, а также в иммунный ответ [37,52].

Активация сигнальной сети PI3K/AKT сети подавляет апоптоз, смещая равновесие в клетке в сторону выживания и повышения пролиферативной активности. Фосфоиндол-3-киназа (PI3K) в составе сигнальной сети PI3K/AKT является одним из ключевых эффекторов рецепторных тирозинкиназ. В этом сигнальном пути мутациям подвержен драйверный ген – опухолевый супрессор *PTEN*. В опухолях толстой кишки наиболее типично возникновение мутаций в точке малых ГТФаз Ras [35]. Также часто встречаются активирующие мутации в основных эффекторах Ras – киназах RAF. При колоректальном раке, часто при правосторонних опухолях, наблюдается мутация в гене *B-RAF*.

Сеть p53/Rb, объединяет важные сигнальные пути, которые регулируют процессы пролиферации, митохондриального апоптоза и репарации ДНК. Опухолевый супрессор p53, регулирует экспрессию гетеродимерного комплекса BAX/BCL2, действующего как активатор апоптоза. В литературных источниках отмечено, что мутации гена *BAX* связаны с колоректальным канцерогенезом [164].

Сигнальный путь mTOR является ключевым в регуляции скорости трансляции белков. Активация сигнального пути отмечается при многих злокачественных новообразованиях, в том числе и при КРР. Белок mTOR относится к классу серин-триониновых протеинкиназ. В составе комплекса

mTORC2 принимает участие в регуляции актинового цитоскелета. В ответ на стимул обеспечивается повышение скорости трансляции синтезируемой мРНК и быстрая подготовка аппарата синтеза белка. На mTOR замыкаются многие сигнальные пути опухолевых клеток, в первую очередь, такие как пролиферативные и антиапоптотические. Этот сигнальный путь имеет очень сложную систему избирательного взаимодействия с сигнальным путем PI3K/AKT, подавляя или усиливая апоптоз.

Сигнальные белки семейства Notch осуществляют передачу сигнала при непосредственном физическом взаимодействии между двумя клетками, одна из которых имеет Notch-лиганд. Эти трансмембранные рецепторы регулируют пролиферацию, апоптоз, дифференцировку, изменяют свойства фибробластов стромы, участвуют в формировании преметастатических ниш, индуцируют неоангиогенез. Механизм взаимодействия осуществляется через связывание лиганда с рецептором, что приводит к отщеплению его внутриклеточной части, ее транслокации в ядро с последующим взаимодействием с факторами транскрипции для активации транскрипции целевых генов. Notch-зависимые гены непосредственно регулируют клеточный цикл (*циклин D1, TP21, NF- $\kappa$ B*) и процессы неопластической трансформации клеток (*C-MYC, ICF1-R, SURVIVIN, SLUG*).

#### **1.2.4 Колоректальный рак, ассоциированный с воспалительными заболеваниями толстой кишки. Сравнение со sporадическим колоректальным раком**

Хронические воспалительные заболевания толстого кишечника (ВЗК), такие как неспецифический язвенный колит и болезнь Крона являются известным предрасполагающим фактором риска развития КРР. Развитие КРР на фоне ВЗК составляет 1-2% всех случаев КРР у населения в целом, а смертность пациентов от КРР, на фоне болезни Крона и язвенного колита, составляет около 15%. Риск развития КРР увеличивается с продолжительностью течения этих заболеваний более десяти лет, началом заболевания в молодом возрасте, а также

распространенностью поражения и наличии осложнений [104]. Примерно через 8–10 лет после возникновения ВЗК возрастает риск возникновения КРР, увеличиваясь через 30 лет до 15-20%. В случаях развития КРР на фоне ВЗК последовательность «аденома-карцинома» при спорадических случаях изменяется на последовательность «воспаление-дисплазия-карцинома». У пациентов с ВЗК дисплазия может быть полипоидной, плоской, локализованной, диффузной или мультифокальной, указывая на то, что под повышенным риском неоплазии находится вся толстая кишка. Ряд исследований подтверждают, что повышенный риск развития рака при воспалительных заболеваниях кишечника является результатом болезни, а не наследственной предрасположенности [40].

Колоректальный рак, возникающий на фоне неспецифического язвенного колита, имеет отличия от спорадического КРР во времени возникновения молекулярных изменений и частоте их встречаемости. Неопластические поражения при ВЗК в основном возникают в тех областях слизистой оболочки, которые участвуют в воспалении. При этом дисплазия или рак являются многофокусными, что отражает более широкое изменение «поля». Потеря функции *APC*, часто возникающая на ранней стадии спорадического КРР в последовательности событий: колит – дисплазия – карцинома, встречается в менее чем в 14% случаев и, в основном, на поздней стадии [30,120,141]. Ранним значимым молекулярным событием при колите является потеря функции *p53*. Мутация *p53* положительно коррелирует с увеличением степени дисплазии [39]. Делеция *p53* встречается в 50-85% случаев рака [161]. Интересно, что высокая частота мутаций *p53* в слизистой оболочке ТК встречается у пациентов с ВЗК без дисплазии или слабой дисплазией, что указывает на влияние хронического воспаления на возникновение мутаций в *p53*. [39,42]. Таким образом, слизистая оболочка толстой кишки при хроническом воспалении демонстрирует изменения в молекулярных путях до появления каких-либо гистологических признаков дисплазии или рака. Хотя причины этого неизвестны, вероятно, здесь может играть роль окислительный стресс. Активные формы кислорода и азота, продуцируемые клетками, участвующими в воспалении, могут взаимодействовать

с ключевыми генами, участвующими в сигнальных путях канцерогенеза, такими как *p53* и генами репарации ДНК. Другие факторы, такие как ядерный фактор – NF-κB и циклооксигеназы, также могут вносить свой вклад в этот процесс. В то же время, при КРР, ассоциированным с колитом, частота CIN (85%) и MSI (15%) остается примерно такой же, как при спорадическом КРР [157].

Различия в морфологии и биологическом поведении не только делают клиническое наблюдение за раком у пациентов с колитом более сложным, чем у населения в целом, они поднимают важный вопрос о том, как хроническое воспаление способствует развитию КРР. На сегодняшний день не выявлено никакой известной генетической основы, объясняющей предрасположенность к колоректальному раку при воспалительных заболеваниях кишечника. По данным литературных источников, при сравнении образцов клеточного материала из толстой кишки при спорадических аденомах и неспецифическом язвенном колите, в последних определяют более высокую митотическую активность и уровень апоптоза, особенно в областях активного воспаления. Увеличение скорости клеточного обновления эпителиальных клеток, по-видимому, способствует канцерогенезу, так как увеличивается количество мутаций и может возникать устойчивое повреждение ДНК, вызванное факторами клеточного микроокружения на фоне воспаления.

Ряд авторов провели исследования, целью которых была оценка риска возникновения колоректального рака на фоне воспалительных заболеваний кишечника. Так Colliver D.W. et al. изучали изменения экспрессии генов в тканях слизистой оболочки толстой кишки при неспецифическом язвенном колите без дисплазии, с дисплазией и при КРР, развившемся на фоне язвенного колита. Авторы обнаружили значительные различия в уровне экспрессии пяти генов (*CCND1*, *SERPINB6*, *PAP*, *IL - 8* и *NOS2A*), которые являлись общими при дисплазии и КРР, ассоциированным с язвенным колитом, в сравнении с тканями без дисплазии [51]. Исследование Rekow et al. также показало, что уровень экспрессии 468 генов был достоверно выше, а 541 гена был значительно ниже, у пациентов с язвенным колитом и неопластическими изменениями по сравнению с

пациентами с язвенным колитом без неоплазии [114]. Авторы в своем исследовании использовали микроматричный анализ. Для подтверждения результатов микроматричного анализа параллельно проводилось иммуногистохимическое исследование. Они обнаружили усиление экспрессии S100A9 и REG1 $\alpha$  в участках слизистой оболочки с неопластическими изменениями в сравнении с тканями, взятыми на некотором удалении от неопластического поражения. Эти две группы тканей достоверно отличались от контрольной группы с доброкачественно протекающим язвенным колитом без неопластических изменений [114]. Рядом авторов сделаны предположения об участии генов *TIMP1*, *ZEB1*, *CD133*, *CYP27B1*, *RUNX3*, *SAMSN1*, *EDIL3*, *NOL3*, *CXCL9*, *ITGB2* и *LYN* в развитии прогрессирования язвенного колита [55,88,154].

Результаты этих исследований предполагают возможность включения анализа экспрессии генов в обследование категории больных неспецифическим язвенным колитом с целью выявления пациентов с высоким риском развития рака, а также повышения эффективности наблюдения и ведения этой группы пациентов [154]. Использование анализа экспрессии мРНК для создания карт фенотипического профиля толстой кишки может выявить потенциальные биомаркеры и определить механизмы, лежащие в основе прогрессирования заболевания, а также улучшить наше понимание биологии КРР, развивающегося на фоне воспалительных заболеваний кишечника, и задать направление для будущих исследований молекулярных механизмов рака.

### **1.3 Злокачественная трансформация доброкачественных опухолей толстой кишки. Молекулярно-генетические исследования колоректального канцерогенеза из аденоматозных и плоских зубчатых поражений прямой и ободочной кишки**

Первое место среди предраковых заболеваний, ведущих к развитию рака толстой кишки, занимают аденоматозные полипы. Аденоматозный полип является локальным диспластическим предшественником неоплазии. По данным разных авторов, частота малигнизации полипов колеблется от 56% до 95%



случаев [1]. Согласно международной гистологической классификации (2010), диспластические образования, включают три варианта аденом: тубулярная аденома, ворсинчатая аденома, тубулярно-ворсинчатая аденома. В 2010 году в группу предопухолевых поражений толстой кишки также включены зубчатые образования, которые в современной классификации разделены на три основные категории: гиперпластический полип (HP), зубчатая аденома/полип на широком основании (SSA/P) и традиционная зубчатая аденома (TSA) [135].

В литературных источниках присутствуют описания двух в значительной степени независимых путей спорадического колоректального онкогенеза. Первый основной WNT-путь канцерогенеза сопровождается традиционной последовательностью аденома-карцинома, ассоциированной с мутацией в гене *APC*, которая при раке толстой кишки встречается в 75% случаев [92]. Вторым альтернативным путем – возникновение КРР из плоских зубчатых поражений, особенностью которого являются преимущественно проксимальное расположение, микросателлитная нестабильность ДНК (MSI), мутация гена *BRAF* и обширное метилирование ДНК [79]. В ряде исследований показана очень высокая частота мутации гена *KRAS* (93%) в плоских аденомах с тубуловидной архитектурой. Мутации *KRAS* обнаружены в 18% HP, в 60% SSA/P и в 0% TSA. Мутации *BRAF* обнаружены в 36% HP, в 20% SSA/P и в 100% TSA. Мутации *BRAF* и *KRAS* при этом являются взаимоисключающими [47]. Показано, что в плоских тубулярных аденомах и полиповидных поражениях вместе со степенью дисплазии изменяется апоптотическая активность. Экспрессия опухолевого супрессора *p53* увеличивается, в то же время экспрессия *BCL-2* (ингибитора апоптоза) в плоских тубулярных аденомах остается низкой по сравнению с полиповидными опухолями [124]. В исследованиях иммуногистохимического профиля, оцененного по белкам плотных контактов (клаудин-1, -3, -4), транскрипционным факторам – *beta-catenin*, *CDX2*, *p53*, опухолевым стволовым клеткам – *CD44*, *Msi-1* и маркеру пролиферативной активности *Ki67*, показано принципиальное отличие традиционной зубчатой аденомы (TSA) по уровню экспрессии *CDX2* от

гиперпластическим полипов (НР) и зубчатой аденомы на широком основании (SSA/P) [20].

#### **1.4 Методы диагностики заболеваний толстой кишки. Роль и место методов молекулярной диагностики в колопроктологии**

Высокая частота заболеваний ТК, их социальная и экономическая значимость диктуют необходимость как можно более раннего выявления данных патологий. Поиск универсального скринингового метода диагностики заболеваний ТК, является актуальной и клинически важной задачей. Отличия в молекулярных изменениях, происходящих в тканях ТК при разных заболеваниях, могут являться основой для создания такого метода. На сегодняшний день в мире активно ведутся исследования в области использования молекулярно-генетических методов для дифференциальной диагностики заболеваний ТК, однако до настоящего времени не удалось создать/разработать диагностический алгоритм, отвечающий условиям высокой точности, чувствительности и специфичности диагностики заболеваний ТК (Рисунок 2).

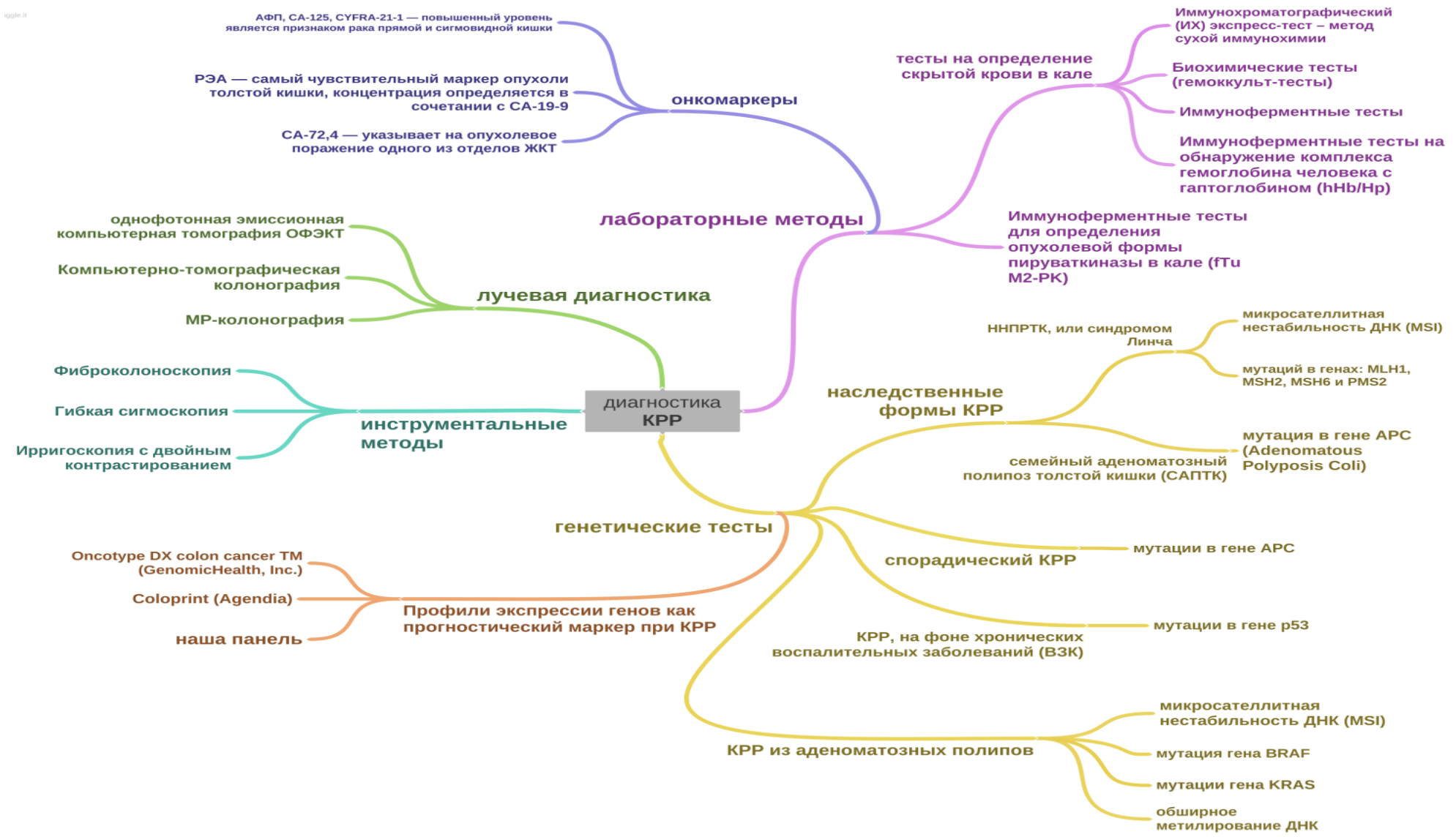


Рисунок 2 – Диагностика колоректального рака

В настоящее время, большой кластер исследований на пути создания программы активного выявления КРР и предраковых заболеваний ободочной и прямой кишки связан в последние годы с эндоскопическими и лучевыми методами, такими как фиброколоноскопия (ФКС), сигмоидоскопия, ирригография с двойным контрастированием (ИДК), «виртуальная колоноскопия» с 2D- и 3D-моделированием. Однако, проведение систематических обследований населения эндоскопическими методами (как первый этап в активном выявлении КРР) пока не представляется возможным (и не только в России) ввиду экономических соображений.

#### **1.4.1 Лучевые методы диагностики колоректального рака**

Ирригоскопия является рентгенологическим методом диагностики, который выполняется после ректального введения раствора сульфата бария (метод с простым контрастированием) или в сочетании введения бария с воздухом (метод двойного контрастирования). Метод с двойным контрастированием позволяет выявлять 85% КРР и подавляющее (70-90%) число полипов размером более 1 см. По данным литературы метод достаточно эффективен для определения опухоли с инфильтративным ростом. Для небольших новообразований чувствительность данного метода снижается. Широкое распространение приобретает компьютерная колоноскопия, преимуществами которой является неинвазивность исследования и минимальный риск травмирования ТК. Она может выполняться пациентам, которым противопоказано проведение колоноскопии. Чувствительность данного метода при диагностике полипов более 1 см составляет 90%, при полипах размером 0,5–0,9 см – 80% и 67% – при полипах до 5 мм. Специфичность метода зависит от размера новообразования [136]. Недостатками метода является ограничение его применения для пациентов с выраженным ожирением и высокая доза рентгеновского облучения, которая, примерно, соответствует уровню, приобретаемому человеком в течение 1,5 лет. Применение узкоспектральной (NBI) и магнификационной (Zoom) эндоскопии, эндосонографии и конфокальной эндоскопии ограничено в широкой клинической

практике из-за экономических проблем (дорогостоящее оборудование) и сложной интерпретации полученных результатов.

#### **1.4.2 Лабораторные методы диагностики колоректального рака**

Основанием для разработки тестов на выявление скрытой крови в каловых массах является то, что аденомы и карциномы могут кровоточить, и обнаружение крови в кале может быть выявлено задолго до появления клинических симптомов КРР. В настоящее время используются ряд тестов.

Гемоккульт-тест (gFOBT – guaiac fecal occult-blood test) основан на способности гемоглобина (Hb) катализировать окисление гваяковой смолы перекисью водорода. Модернизированным Греггерсеном аналогом гемоккульт-теста является бензидиновая проба (с использованием бензидина вместо гваяковой смолы и пероксида бария вместо перекиси водорода). Оба теста основаны на биохимической оценке псевдопероксидазной активности гемоглобина в кале. Однако эти методы имеют ряд ограничений и часто демонстрируют ложноположительные результаты (т.е. низкую специфичность) [24].

Иммуноферментный метод (iFOBT - immunochemical fecal occult-blood test или FIT – fecal immunochemical test) обнаружения в кале скрытой крови по гемоглобину человека (hHb) с использованием в тесте специфических моноклональных антител к hHb полностью исключает этот тип ложноположительных результатов.

Иммуноферментный тест для выявления в кале комплекса гемоглобина человека с гаптоглобином (hHb/Hp) позволяет выявлять гемоглобин при кровотечениях и из верхних отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Гаптоглобин (Hp) – глобулин плазмы крови, с высокой аффинностью связывает выделившийся из эритроцитов гемоглобин человека и ингибирует его окислительную активность, что позволяет комплексу hHb/Hp оставаться устойчивым к действию пищеварительных протеолитических ферментов [105].

Иммуноферментный метод выявления в кале димерной опухолевой формы пируваткиназы М2-типа (Tumor pyruvate kinase, type M2 – Tu M2-PK) – одного из ключевых ферментов гликолиза. Метод строится на том, что интенсивность анаэробного гликолиза в раковых клетках в 10-15 раз выше, чем в норме. При опухолях ЖКТ происходит слущивание опухолевых клеток в просвет кишечника и, следовательно, преобладание в кале повышенных значений Tu M2-PK (fTu M2-PK, f-fecal) может служить плохим прогностическим признаком и основанием для проведения дообследования ЖКТ [83,110].

Серологические опухолевые маркеры, такие как раково-эмбриональный антиген (РЭА), СА-19-9, СА-72,4 не оправдали возложенных на них надежд, как надежные скрининговые маркеры [19,108]. Пробный скрининг на КРР с использованием РЭА не дал удовлетворительных результатов.

### **1.4.3 Методы ранней диагностики и скрининга колоректального рака**

Многочисленные исследования показали, что никакое другое злокачественное новообразование не демонстрирует такого обилия предопухолевых и / или предраковых заболеваний, что сильно отличает колоректальный рак от большинства злокачественных новообразований, поражающих человека. Кроме того, эти заболевания в толстой кишке человека могут быть обнаружены на раннем этапе и удалены. Таким образом, развитие заболевания можно предотвратить путем вмешательства в процесс онкогенеза, который начинается с неконтролируемого роста инициированных клеток крипты, продолжается с образованием аденоматозного полипа или дисплазии и, в конце концов, через много лет перерастает в эпителиальное злокачественное образование. Даже в этой фазе онкогенеза есть время для вмешательства, потому что локализованные поражения в большинстве случаев излечимы хирургическим путем и / или могут быть предотвращены химиопрофилактикой. Выявление предраковых заболеваний и рака толстой кишки на ранней стадии является одним из важнейших направлений в онкологии. В настоящее время разработаны различные программы скрининга колоректального рака, которые направлены на

раннее выявление опухоли. 01 марта 2021 г. American College of Gastroenterology опубликовала руководство по скринингу на колоректальный рак [133]. Согласно руководству, как первичные скрининговые методы, к применению рекомендуются колоноскопия и фекальный иммунохимический тест. Колоноскопия является «золотым стандартом». Данный эндоскопический метод является самым чувствительным и специфичным при выявлении колоректального рака (85-95%). Он позволяет выполнить осмотр всех отделов толстой кишки, осуществить забор ткани для гистологического исследования, а также удалить полип или участок гиперплазии. Недостатком метода является существенная болезненность для пациента, возможность возникновения таких осложнений, как перфорация стенки толстой кишки, и кровотечение (по данным литературы перфорация стенки кишки возникает у 1 из 1000 пациентов и кровотечение у 1 из 3000 пациентов) [2]. В то же время, это единственный метод, который позволяет выполнить забор биопсии для гистологического исследования и, следовательно, морфологически верифицировать диагноз.

На съезде Всемирной гастроэнтерологической организации (WEO) в Сан-Диего в 2012 году, посвященном скринингу КРР, были приведены данные об ограниченных возможностях фиброколоноскопии (ФКС) в выявлении новообразований правой ободочной кишки. Так, нерадикально выполненная полипэктомия может способствовать развитию интервального рака толстой кишки после колоноскопии (рака, возникшего после неполной резекции малигнизированного полипа, а также из полипов, пропущенных при ФКС и возникших в течение года) [116]. По данным T.R. de Wijkerslooth и соавт., представленным на съезде, выявляемость аденом в правой ободочной кишке в значительной степени зависит от опыта эндоскописта, качества подготовки толстой кишки к исследованию, а также от времени, затраченного на ФКС [155]. Эти факторы снижают диагностическую значимость ФКС, как метода скрининга КРР.

Другим методом, включение которого в программы скрининга КРР обсуждается, является гибкая сигмоскопия (ГС). При сравнении с ФКС,

преимуществом метода является более простая и быстрая подготовка кишечника к ГС, а также возможность проведения исследования без применения седативных препаратов. В исследовании, проведенном в Великобритании, было выявлено снижение общей смертности от КРР на 31% после однократной скрининговой сигмоидоскопии [28,29]. Итальянское исследование SCORE показало снижение смертности от КРР на 38% после однократной скрининговой ректороманоскопии [129]. В то же время, очевидным недостатком ГС является возможность обследования только дистального отдела ободочной кишки, что снижает чувствительность метода в отношении всей ТК до 35-70% при специфичности 89-100% [15].

#### **1.4.4 Использование молекулярно-генетических технологий в диагностическом алгоритме колоректального рака**

В основе любого патологического процесса лежит нарушение механизмов взаимодействия генов и других биологически активных молекул, таких как РНК и белки. В течение последних двух десятилетий широко изучаются различные молекулярные маркеры, которые могли бы спрогнозировать эффективность адьювантного лечения и увеличить общую выживаемость. Сравнительное изучение внутриклеточного гомеостаза в норме и при патологии позволяет выявить конкретные молекулярные каскады, изменение активности которых связано с развитием заболевания и выявить новые терапевтические мишени. Анализ экспрессии генов с использованием технологии ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) является одним из подходов для такого рода исследований. Классический дизайн исследования чаще всего предполагает поиск и анализ групп генов, уровень экспрессии которых значимо повышен или снижен в исследуемой ткани или при исследуемом патологическом состоянии. Изменение уровня экспрессии гена трактуется как маркер активности биологического процесса и определения молекулярного фенотипа ткани [153,87]. В основе метода лежит объединение в одну группу наиболее высоко экспрессируемых генов характеризующих подтип опухолей и специфические изменения в ткани [98;160].



С использованием аналогичных подходов авторы описывают ткани, окружающие опухоль, природа которых не всегда трактуется однозначно [126]. В настоящее время создано несколько тест-систем для определения прогноза заболевания или эффективности терапии, в основе которых используются технологии микроматричного анализа или ОТ-ПЦР. Существующие прогностические модели (Oncotype DX colon cancer TM (Genomic Health, Inc.)), (ColoPrint (Agendia), ColDx) определяют вероятность рецидива на основе оценки уровня экспрессии генов в ткани опухоли [38,74,96].

Модель для прогноза рецидива у больных КРР OncotypeDX® Colon Cancer Assay представляет собой 12 генную панель. В тест-системе использован метод ОТ-ПЦР. Тест дает индивидуальную количественную оценку риска рецидива рака толстой кишки у пациентов II и III стадии и применяется в комплексе со стандартными методами для индивидуального планирования лечения рака толстой кишки. Основной задачей данной тест-системы является определение экспрессии 7 функциональных генов и 5 контрольных генов в ткани опухоли у пациентов с КРР. Выбор генов, используемых для OncotypeDX® Colon Cancer Assay, был основан на результатах четырёх клинических исследований с участием 1851 пациентов и выборкой 761 генов, проведённых NSABP и Cleveland Clinic Foundation (CCF) в сотрудничестве с Genomic Health, Inc. Была выявлена статистическая связь между этими генами и рецидивом рака толстой кишки. Гены включают группу регуляции клеточного цикла (*Ki-67*, *MYBL2*, *C-MYC*) и группу стромы (*FAP*, *INHBA*, *BGN*). Дополнительные пять референсных генов использовались для нормализации. Алгоритм использования данной разработки был подтверждён в исследованиях QUASAR, CALGB 9581 и NSABPC-07 [137,162].

Программа ColoPrint была разработана с использованием данных об экспрессии всего генома и проверена в нескольких независимых проверочных группах пациентов с II стадией КРР. Анализ включал 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 молекулярному профилю в образце был определен низкий или высокий риск прогрессирования, который определялся как возникновение первого события рецидива или смерти от рака толстой кишки. Большинство пациентов (70%) не получали адъювантную химиотерапию. Средний срок наблюдения составил 81 месяц. Программу ColoPrint сравнили с клиническими факторами риска, описанными в рекомендациях Национальной комплексной сети рака (NCCN) по раку толстой кишки (2013 год). В совокупности эти результаты дополнительно подтвердили, что расчет индекса риска рецидива ColoPrint обеспечивает воспроизводимую, клинически значимую оценку риска прогрессирования, которую можно использовать для лечения пациентов.

### **1.5 Исследования морфологически неизмененных тканей при злокачественных опухолях различных локализаций**

Анализ публикаций последних 10-20 лет свидетельствует о детальном исследовании молекулярных особенностей первичной опухоли в сравнении с «морфологически неизменённой кишкой», образцы которой получены от того же пациента. Однако, если посмотреть публикации 40- и 50-летней давности, когда в период активного изучения тканей, и в частности, тканей окружающей опухоль, с помощью электронной микроскопии, сделан вывод о невозможности существования рака на фоне «здоровой» слизистой оболочки толстой кишки, становится очевидным необходимость более детального изучения не только самой ткани опухоли, но и морфологически неизмененных тканей рядом с опухолью и макроорганизма в целом [54, 69].

Изучение морфологически неизменной ткани широко обсуждалось после исследований Slaughter и др. впервые сформулировавшего теорию «опухолевого поля», сущность которой состоит в поэтапном накоплении генетических изменений в процессе канцерогенеза [134]. Ткань рядом с опухолью при этом, согласно теории, состоит из морфологически нормальных клеток, но остается в промежуточном, преднеопластическом состоянии, так как изменения уже

произошли на молекулярном уровне. В исследованиях последних лет появились результаты, доказывающие, что в некоторой части пораженного органа действительно может присутствовать полевой эффект, в то же время на экспрессию генов значительно влияют полиморфизмы зародышевой линии [127]. В последнее десятилетие проведен ряд исследований профилей экспрессии генов для морфологически неизменных тканей при разных злокачественных новообразованиях. В них подчеркивается важность влияния внеклеточной среды в развитии опухолевого процесса, однако биологическая значимость полученных результатов остается до настоящего времени мало изучена. Часть исследователей пришли к заключению, что внеклеточный матрикс играет решающую роль в развитии рака, предположительно, в период до начала инвазивного процесса.

Например, авторы исследования К. Graham et al. сравнили экспрессию в образцах неизменных тканей молочной железы в трех группах пациенток [77]. В группу 1 (контроль) вошли женщины с обычным риском рака молочной железы, подвергшиеся пластической операции на молочной железе. Группа (2) включала женщин, перенесших операцию по поводу РМЖ с рецепторным статусом ER + или ER-. Группа высокого риска РМЖ (3), состояла из женщин с семейным анамнезом РМЖ или положительным статусом носителя мутации *BRCA*, перенесших профилактическую мастэктомию здоровой молочной железы. Результаты исследования показали, что экспрессия генов сигнального пути MAPK в группе 3, в целом имеет сходство с группой 2, а не с образцами контроля. Что указывает на то, что профиль экспрессии в группе 3 не является эффектом опухоли, поскольку образцы были получены из молочной железы без опухоли. Позже те же авторы в исследованиях молекулярного профиля при раке молочной железы у пациенток с экспрессией рецептора эстрогена ER + и ER- обнаружили, что гистологически нормальный эпителий молочной железы имеет сходство с опухолевой тканью [78]. Они также определили, что профили экспрессии неизменных тканей при ER + раке и ER- раке различны и отражают молекулярные различия подтипов рака молочной железы. Таким образом, авторы приходят к выводам, что геномные изменения, характерные для определенных

подтипов рака молочной железы, могут быть обнаружены до гистологического подтверждения, что может помочь выделить профиль экспрессии, характерный для риска развития определенного подтипа рака молочной железы и определить начальные геномные различия между подтипами. В другом исследовании Chandran et.al. изучали дифференциальную экспрессию генов при первичном раке простаты в образцах опухоли, неизменной ткани рядом с опухолью и нормальной ткани, взятой от условно здоровых доноров, используя микроматричный анализ. Они обнаружили в ткани опухоли и прилегающей к ней неизменной ткани значительную повышенную экспрессию генов, связанных с пролиферацией, включая транскрипционные факторы и факторы роста, по сравнению с донорской тканью [48]. В работе Sanz-Pamplona et al. был сделан транскриптомный анализ образцов опухолевой ткани и неизменной ткани рядом с опухолью, взятых в паре от пациентов с колоректальным раком, и 50 образцов слизистой оболочки толстой кишки здоровых доноров. Они выявили ряд генов, которые были активированы в слизистой оболочке пациентов с КРР, и не активированы в слизистой оболочке здоровых доноров. Были также обнаружены перекрестные взаимосвязи между белками, секретируемыми опухолью, и рецепторами, активированными в неизменной ткани толстой кишки, и наоборот [126]. Hawthorn с командой исследовали количество хромосомных нарушений в ткани колоректальной опухоли и неизменных тканях из областей, прилегающих к опухоли, в пределах от 1 до 10 см. Изменения в опухоли отражали те, о которых уже ранее сообщалось в литературе. Количество и размер хромосомных нарушений было значительно ниже в клетках из областей, окружающих опухоль. В то же время, интересно, что они не были одинаковыми в разных участках тех же самых образцов пациентов, что указывало, по мнению авторов, на область хромосомной нестабильности, окружающей опухоль [84].

Самое масштабное исследование неизменных тканей было проведено Dvir Aran et.al. [26]. Авторы изучили транскрипционные профили 8 типов ткани (молочной железы, толстой кишки, печени, почки, щитовидной железы, простаты, матки, мочевого пузыря), включающих 1558 образцов нормы

(посмертные биопсии пациентов без онкологических заболеваний), 428 образцов морфологически неизменной ткани (область более 2 см от опухоли, не содержащая опухолевых клеток по гистологическому заключению), а также 4500 образцов первичной опухоли. Авторы получили результаты, которые показали, что морфологически неизменная ткань вне зависимости от типа рака, имеет общее сходство, отличаясь как от опухолевой, так и от здоровой. Она отличалась изменением активности передачи сигнала пути p53 и нарушением регуляции апоптоза. Ряд генов, включенных в сигнальный путь TNF- $\alpha$ , показал специфическую активацию в морфологически неизменных тканях семи типов рака. При анализе данных в неизменной ткани было также обнаружено усиление экспрессии гепарин-связывающего EGF-подобного фактора роста взаимодействующего с EGFR, ERBB2 и ERBB4. Секретция опухолью этого и других белков активирует в неизменной ткани сигнальные пути TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta$  связанные с индуцированием каскада транскрипционных факторов и ферментов. Общий профиль экспрессии генов для неизменной ткани характеризовался активацией генов провоспалительного немедленного ответа, демонстрируя «опухолеподобную» тенденцию; гены, отвечающие за адипогенез и миогенез, показали «градиентную» тенденцию; экспрессия генов *MYC* и *E2F* и *G2M* не отличалась от экспрессии в нормальных тканях. В отличие от теории поляризации, авторами сделано предположение об активном участии опухоли в формировании фенотипа неизменной ткани, в частности, индукцией опухолью изменений в строме и распространении провоспалительных сигналов.

## **1.6 Молекулярно-генетические технологии в прогнозе колоректального рака**

Определение экспрессии генов является одним из методов исследования молекулярного фенотипа ткани. Метод позволяет количественно оценить в цитоплазме клетки транскрипты матричной РНК (мРНК). Активность генов (экспрессия) на молекуле ДНК отражается количеством мРНК молекул в клетке и коррелирует с количеством кодируемого белка, повышение или снижение концентрации которого способно приводить к изменению функционального

состояния клетки [43]. Технологии с использованием микрочипов или ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) позволяют определить количество транскриптов мРНК в материале. Эти технологии широко описаны в литературе [23,103]. Как известно, практически, каждый случай КРР развивается на фоне предшествующей дисплазии. Заключение о наличии дисплазии дается на основании признаков, к которым обычно относят цитологические. Обычно атипия имеет морфологическое сходство с инвазивной карциномой. Гистологическое заключение о наличии или об отсутствии дисплазии в качестве предшественника карциномы дается на основании исследования биопсийного материала из участка патологического очага. В ряде случаев, при редких, плоских формах поражений слизистой оболочки ТК постановка достоверного диагноза бывает затруднена. Достаточно высок риск ошибочной диагностики не только дисплазии, но и рака при хронических воспалительных заболеваниях ТК. Постановка достоверного диагноза нередко возможна только при полном удалении патологического очага с последующим морфологическим изучением полученного материала.

В связи со сложностью дифференциальной диагностики в морфологии возникает необходимость разработки технологий для создания карт фенотипического профиля тканей при различных патологических состояниях. Молекулярно-генетические технологии могут являться современными объективными инструментами для предсказания и поддержки принятия решений врачом по дальнейшему обследованию пациентов и выбору тактики лечения.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты и дизайн молекулярно-генетического исследования.

#### Формирование групп

Проведенное исследование одобрено Этическим комитетом ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России. Получение материала для анализа было выполнено совместно с Научным центром Колопроктологии. От всех пациентов получено информированное согласие на взятие биопсии. Исследование морфологически неизмененных тканей (МНТ) ТК (n=926), в целом, осуществлено у 519 пациентов (Рисунок 3).



**Рисунок 3** – Дизайн молекулярно-генетического исследования

Всего в исследование было включено 95 условно здоровых доноров, проходивших плановое профилактическое обследование, 29 пациентов с полипами ободочной кишки, 55 пациентов с неспецифическим язвенным колитом и 253 больных колоректальным раком (стадии I-IV), получивших хирургическое лечение по поводу рака ободочной и/или прямой кишки в период с 2011 по 2019 год. Это позволило сравнить группы неизмененных тканей и сопоставить уровень экспрессии исследуемых маркеров с типом патологического процесса. Критерием

отбора онкологических больных, пациентов с полипами в ТК и неспецифическим язвенным колитом являлся морфологически подтвержденный (после окончания обследования и лечения) диагноз, установленный по МКБ. Стадия опухолевого заболевания у пациентов установлена по системе TNM в 6-ой редакции (2002г.).

Получение материала осуществляли во время оперативного вмешательства и при проведении контрольной колоноскопии (Рисунок 4).



**Рисунок 4** – Получение материала

Для анализа проводилось взятие биопсийного материала из 5 отделов ТК и соскобов из прямой кишки. Для всех образцов сделан ПЦР анализ и определен уровень экспрессии мРНК 62 функциональных и 3 контрольных генов.

### **2.1.1 Этапы и объекты исследования**

Дизайн нашего исследования был обусловлен поставленными целью и задачами, и включал 2 этапа. Первый этап посвящен решению задач 1–4.

Объектом исследования первого этапа являлось собрание образцов «свежей ткани» – биоптатов неизменной ткани из отделов толстой кишки, взятых в



объеме 1 – 2 мм<sup>2</sup> во время хирургического вмешательства и планового эндоскопического исследования от условно здоровых доноров, пациентов с колоректальным раком и пациентов с полипами ТК.

Второй этап исследования посвящен решению задачи 5. Мы оценивали возможность дифференцировать патологию в толстой кишке по материалу соскоба из прямой кишки. Объектом исследования являлся клеточный материал из средне- и нижеампулярного отдела прямой кишки полученный с помощью урогенитального зонда тип D «Цитощетка» от здоровых доноров, пациентов с колоректальным раком, полипами ТК и неспецифическим язвенным колитом.

### 2.1.2 Первый этап исследования. Описание групп

По типу ткани были сформированы 3 основные группы: со злокачественным поражением толстой кишки (рак ободочной и прямой кишки), доброкачественной гиперпролиферативной патологией (полипы толстой кишки), и группа контроля (условно здоровые доноры) (Таблица 2).

**Таблица 2** – Распределение исследуемых образцов по типам тканей

Группа	Количество образцов	Морфологическая характеристика ткани	Описание образцов
Контроль «норма»	n=291	Морфологически неизменная слизистая толстой кишки здоровых доноров.	Образцы получены в ходе профилактической колоноскопии от доноров без патологии в ТК.
МНТ края резекции, биопсии из отделов толстой кишки	n=310	Морфологически неизменная ткань ТК при раке ободочной и прямой кишки.	Образцы края резекции получены из зоны на расстоянии 15-20 см от опухолевого узла, образцы из 5 отделов ТК получены во время проведения колоноскопии. Отсутствие злокачественных клеток при гистологическом исследовании.

Группа	Количество образцов	Морфологическая характеристика ткани	Описание образцов
“МНТ аденомы”	n=73	Морфологически неизменная ткань при тубулярных, тубулярно-ворсинчатых аденомах и гиперпластических полипах ТК	Образцы морфологически неизменной ткани слизистой ТК, взяты на расстоянии не менее 10 см от аденомы и участка гиперплазии, а также из 5 отделов ТК на разном удалении от полипа. Отсутствие морфологических изменений при гистологическом исследовании.

### 2.1.2.1 Критерии отбора нормальной (морфологически неизменной слизистой толстой кишки), как референсного стандарта

В контрольной группе доноров без патологии в толстой кишке во время прохождения плановой профилактической видеокколоноскопии был выполнен забор биопсийного материала из неизменной слизистой оболочки в отделах ободочной (восходящий, поперечный, нисходящий, сигмовидной) и прямой кишки (Таблица 3). Из группы были исключены пациенты, имеющие на момент исследования полипы ТК, КРР и воспалительную патологию. Группа контроля включала пациентов с геморроем (К64.0) вне стадии обострения, дивертикулезом ТК (К57).

**Таблица 3** – Анатомический отдел получения биопсийного материала в контрольной группе

Анатомический отдел	Восходящая ободочная кишка	Поперечная ободочная кишка	Нисходящая ободочная кишка	Сигмовидная ободочная кишка	Прямая кишка
Контроль (n=177)	32	34	34	42	35

### 2.1.2.2 Формирование групп для оценки профилей экспрессии мРНК в неизмененном эпителии толстого кишечника при патологии и в «норме» в зависимости от отдела толстой кишки. Особенности получения материала биопсии

Уровень экспрессии в неизмененных тканях при патологии и в «норме» сравнивали в зависимости от анатомического отдела забора материала и клинико-морфологических данных. Забор биопсийного материала при полипах ободочной кишки осуществляли по такому же принципу, как в группе контроля. Дополнительно брали образцы из зоны в 10 - 15 см от полипа (Таблица 4).

**Таблица 4** – Анатомический отдел получения биопсийного материала в группе пациентов с полипами толстой кишки

Анатомический отдел	Восходящая ободочная кишка	Поперечная ободочная кишка (n)	Нисходящая ободочная кишка	Сигмовидная ободочная кишка	Прямая кишка
Полипы толстой кишки (n=73)	10	11	6	21	25

Забор морфологически неизмененного эпителия толстой кишки у больных КРР производился интраоперационно (край резекции) и во время проведения колоноскопии. Из зоны края резекции, после срочного морфологического исследования, в котором подтверждено отсутствие морфологических признаков опухолевого роста, брали образец ткани на расстоянии не менее 15 см от опухолевого узла. Получение образцов МНТ для исследования в зависимости от отдела локализации опухоли было сопряжено с определенными техническими трудностями, связанными с особенностями объема хирургического лечения. У пациентов с раком прямой кишки и ректосигмоидного соединения, при проведении операции в объеме передней резекции или брюшно-промежностной экстирпации, образцы края резекции брали из сигмовидной кишки (левой

ободочной кишки ближе к ректосигмоидному соединению). У пациентов при расположении опухоли в нижней и средней трети сигмовидной кишки, при проведении резекции сигмовидной кишки, взятие МНТ проводили из верхней трети сигмовидной кишки (проксимальной части левой ободочной кишки). При опухоли, расположенной в верхней трети сигмовидной кишки, нисходящей ободочной и селезеночном углу ободочной кишки, проводили левостороннюю гемиколэктомию. В этом случае образец неизменной слизистой брали из участка поперечной ободочной кишки ближе к селезеночному изгибу. При расположении опухоли в печеночном углу, восходящей ободочной и слепой кишке, пациентам проводили правостороннюю гемиколэктомию. Образцы МНТ в этом случае брали из поперечной ободочной кишки (проксимальная часть правой ободочной кишки). У пациентов с КРР, впервые выявленном на профилактической колоноскопии, проводили забор биопсийного материала во время эндоскопического исследования. Образцы получили из проксимальных и дистальных отделов ТК на разном удалении от опухолевого узла, в том числе, и из прямой кишки. Таким образом, из-за особенностей взятия материала, исследование морфологически неизменных тканей при КРР проведено в отделах: правая ободочная кишка, левая ободочная кишка, прямая кишка (Таблица 5).

**Таблица 5** – Анатомический отдел получения биопсийного материала в группе пациентов с КРР

Анатомический отдел	Правая ободочная кишка (n)	Левая ободочная кишка (n)	Прямая кишка (n)
КРР (n=310)	54	184	72

### 2.1.2.3 Клинико-морфологические данные пациентов

Сравнение по клинико-морфологическим показателям в группах неизменных тканей, полученных от пациентов с КРР и полипами в ТК,

проведено без группировки на отделы. Оценивалась общее влияние морфологических особенностей опухоли на неизменные ткани всего пораженного органа (толстую кишку).

В таблице 6 представлены основные клиничко-морфологические показатели, по которым сравнивали уровень экспрессии в образцах неизменных тканей ТК. Для тканей опухоли и полипа исследование не проводилось.

**Таблица 6** – Клиничко-патологические характеристики для образцов пациентов, у которых была проанализирована гистологически неизменная ткань ТК

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	ОБРАЗЦЫ МОРФОЛОГИЧЕСКИ НЕИЗМЕННЫХ ТКАНЕЙ	
	<i>n</i>	%
<i>Злокачественная патология (аденокарцинома)</i>		
<b><i>ГЛУБИНА ПРОРАСТАНИЯ ОПУХОЛИ</i></b>		
(T1) прорастающая подслизистый слой	17	6,74%
(T2) прорастающая собственно мышечный слой	28	11,11%
(T3) прорастающая субсерозную или внебрюшинные перибодочные или периректальные ткани	138	58,33%
(T4) врастающая в другие органы и/или перфорирующая висцеральную брюшину	57	23,8 %
<b><i>МЕТАСТАЗЫ В ЛУ</i></b>		
Нет (N0)	128	52,4%
Есть (N1-N3)	112	47,6%
<b><i>ГЕМАТОГЕННЫЕ МЕТАСТАЗЫ</i></b>		
Нет (M0)	183	75,4%
Есть (M1)	56	24,6%
<b><i>СТЕПЕНЬ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ</i></b>		
G1(высокая)	107	48,5%
G2(умеренная)	93	45,04%
G3(низкая)	15	6,43%
<b><i>КЛИНИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ</i></b>		
Первично-множественный рак	22	13,58%
Первичная опухоль	140	86,42%
<b><i>ПРОГРЕССИРОВАНИЕ</i></b>		
Есть	63	28,25%
Нет	160	71,75%

Продолжение таблицы 6

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	ОБРАЗЦЫ МОРФОЛОГИЧЕСКИ НЕИЗМЕНЕННЫХ ТКАНЕЙ	
	<i>n</i>	%
<i>Доброкачественная патология (полипы)</i>		
Гиперпластический полип	15	18,29%
Тубулярная и тубулярно-ворсинчатая аденома	58	70,73%
Ворсинчатая аденома	9	10,97%
<i>Дисплазия</i>		
Степень дисплазии низкая	31	53,44%
Степень дисплазии умеренная	27	46,56%
<i>Условно здоровые доноры (неизменная ткань)</i>		
Возраст до 45 лет	48	26,52%
Возраст 45-60 лет	43	23,76%
Возраст старше 60 лет	90	49,72%

Нами проведен анализ образцов неизмененных тканей ( $n=926$ ), полученных от 519 пациентов. По морфологическим характеристикам у пациентов с КРР ( $n=253$ ) во всех случаях злокачественные новообразования были представлены аденокарциномой (G1 – G3). У пациентов с полипами ТК по данным гистологического исследования тубулярные аденомы определены у 18, тубулярно-ворсинчатые – у 4, гиперпластические полипы – у 6 пациентов. Средний возраст пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом рак ободочной/прямой кишки составил 64,5 года, доля мужчин – 57,5%; с диагнозом полипы ободочной/прямой кишки – 62,6 лет, доля мужчин 48,2%. В контрольной группе здоровых доноров средний возраст составил 55,45 лет, доля мужчин 12,24%.

Локализация доброкачественного и злокачественного опухолевого процесса представлена в таблице 7.

**Таблица 7 – Локализация опухолевого процесса**

Анатомический отдел / Тип патологии	Восходящая ободочная кишка	Поперечная ободочная кишка	Нисходящая ободочная кишка	Сигмовидная ободочная кишка	Прямая кишка
Колоректальный рак	41 случай 16,27%	17 случаев 6,74%	14 случаев 5,55%	72 случая 28,57%	108 случаев 42,85%
Полипы толстой кишки	8 случаев 28,57%	2 случая 7,14%	1 случай 3,57%	12 случаев 42,85%	5 случаев 17,85%

### 2.1.3 Второй этап исследования. Описание и формирование групп

Для построения модели дифференциальной диагностики патологии ТК и оценки ее эффективности набрана группа, которая включала 178 пациентов. От всех пациентов после получения добровольного информированного согласия брали образцы клеточного материала с помощью урогенитального зонда тип D «Цитощетка» из ампулярного отдела прямой кишки во время проведения профилактической или контрольной колоноскопии. У пациентов с КРР и полипами ТК опухоль располагалась в разных отделах ТК. Группы сформированы по типу патологии в толстой кишке: злокачественная (рак), гиперпролиферативная доброкачественная (полипы), воспалительная (неспецифический язвенный колит). Контрольную группу «норма» составили условно здоровые доноры без патологии в толстой кишке (Таблица 8).

**Таблица 8** – Группы исследуемых образцов, сформированных по типу тканей

Группа	Количество образцов	Морфологическая характеристика ткани	Описание образцов
“норма”	n=63	Соскоб морфологически неизменной слизистой из средне- и нижеампулярного отдела прямой кишки. Отсутствие интраэпителиальных изменений при цитологическом исследовании	Образцы получены от доноров без патологии в толстой кишке на момент исследования.
“МНТ при КРР”	n=44		Образцы получены от пациентов с раком ободочной и прямой кишки.
“МНТ при аденомах”	n=18		Образцы получены от пациентов с тубулярной, тубулярно-ворсинчатой аденомой и гиперпластическими полипами ТК
«неспецифический язвенный колит»	55		Образцы получены от пациентов с несспецифическим язвенным колитом

Для образцов проведено цитологическое исследование. У пациентов с несспецифическим язвенным колитом цитологическое исследование не проводилось.

## 2.2 Методы исследования

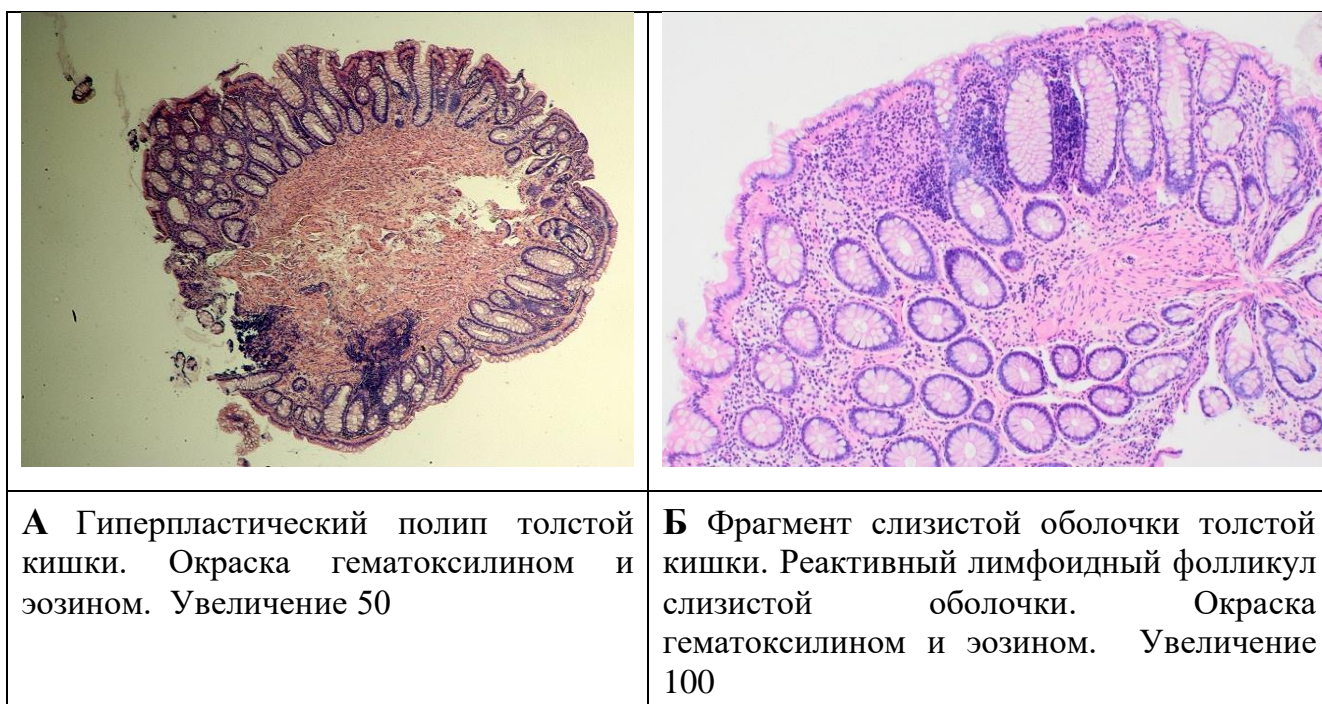
Наше исследование от момента забора материала до получения результатов включало четыре основных этапа: морфологическое исследование образцов тканей, молекулярно-генетический анализ, формирование базы данных (данные анамнеза, клинико-морфологические характеристики заболевания, результаты молекулярного исследования) и статистический анализ.



## 2.2.1 Морфологический анализ образцов

### Гистологическое исследование

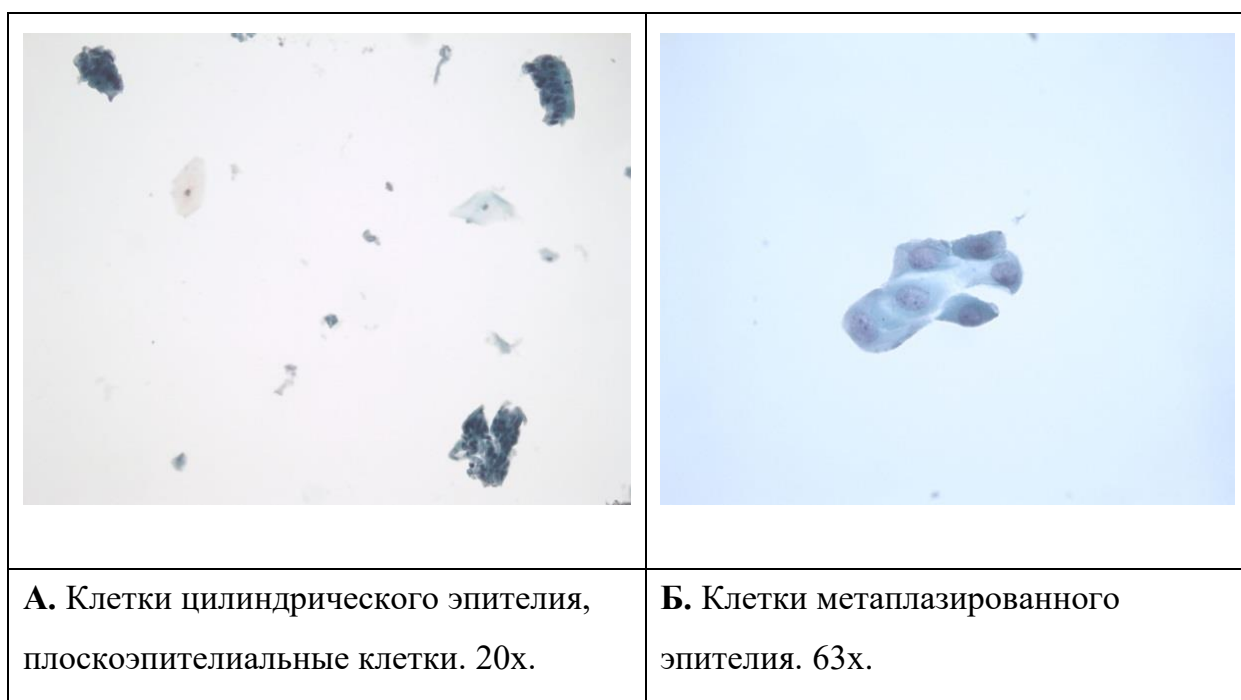
Во всех клинических случаях ткань края резекции не содержала микроскопических признаков опухолевого роста. Во всех наблюдениях обнаружены морфологические признаки иммунного ответа (нерезко выраженные признаки воспалительной инфильтрации). У 19 пациентов в резецированных участках толстой кишки определено наличие фокусов гиперплазии (Рисунок 5А). Еще одной морфологической характеристикой удаленного макропрепарата служила гиперплазия мезотелия (реактивная?) и выраженная лимфоидная инфильтрация субсерозного слоя при приближении морфологических границ опухоли к серозной оболочке кишки (Рисунок 5Б). В ряде случаев при размерах опухоли более 4-5 см с прорастанием далее мышечного слоя кишки формировалось изъязвление опухоли с развитием фибриноидного некроза, активным привлечением нейтрофилов.



**Рисунок 5** – Гистологическое исследование морфологически неизменной ткани толстой кишки

### Цитологическое исследование

Цитологическое исследование проведено для клеточного материала соскобов из прямой кишки. Подготовка тонкослойных цитологических препаратов из материала флакона с консервирующим раствором Пап-теста CellPrep (Biodyne Co., LTD, Корея) выполнена при помощи процессора для приготовления препаратов для тонкослойного цитологического исследования CellPrep Plus 4.63 (Biodyne Co., LTD, Корея). После фиксации в течение 30 минут в 95% растворе этанола окрашивание стеклопрепаратов по Папаниколау выполнено на Autostainer Leica XL (Leica Microsystems Nussloch GmbH) с использованием красителей Leica Surgipath EA-50, OG6, гематоксилин Гарриса. Цитологические заключения давались согласно рекомендациям классификации Bethesda (The Bethesda System – TBS) для цитологического исследования анального канала [13]. Согласно цитограмме, исследуемый материал, полученный от здоровых доноров, представлен цилиндрическим эпителием, плоскоэпителиальными клетками преимущественно поверхностных, промежуточных слоев (Рисунок 6 А).



**Рисунок 6** – Цитологическое исследование материала соскоба неизменной слизистой оболочки прямой кишки. Жидкостная цитология по методу Cell Prep. Окраска по Папаниколау

У ряда пациентов с полипозом в материале соскоба также присутствуют отдельные клетки метаплазированного эпителия и эритроциты (Рисунок 6 Б). У пациентов с колоректальным раком в исследуемых образцах обнаружены нейтрофильные лейкоциты в умеренном и значительном количестве, единичные плоскоэпителиальные клетки преимущественно поверхностных слоев с признаками гиперкератоза. Согласно цитологическому заключению: показано отсутствие интраэпителиальных изменений.

### **2.2.2 Методы выделения мРНК из образцов морфологически неизменной ткани толстой кишки и проведения ПЦР с обратной транскрипцией**

#### **Выделение мРНК**

Каждый образец ткани и клеточного материала соскоба сразу помещали в раствор солей, стабилизирующих РНК EverFresh RNA (Клоноген, Санкт-Петербург). Образцы сразу использовали для анализа или хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . На этапе выделения РНК использовались коммерческие наборы колонок RNeasy mini Kit (Qiagen, Германия). Обработку исследуемого материала проводили в соответствии с протоколом компании-производителя. Из протокола был исключен этап обработки ДНКазой I, так как использовались праймеры, специфические только для кДНК. РНК элюировали в 100 мкл DEPC-обработанной воды. Объем конечного раствора составлял 100 мкл со средней концентрацией РНК в нем 35-40 мкг/мл.

#### **Проведение обратной транскрипции и ПЦР (двухстадийная ПЦР)**

Технология полимеразной цепной реакции (ПЦР) «в реальном времени» в комбинации с методом обратной транскрипции (ОТ) широко применяется в области количественной оценки экспрессии генов на молекуле ДНК (Palmer et al., 2003). Метод позволяет оценить количество транскриптов матричной РНК (мРНК) в цитоплазме клетки. Активность генов (экспрессия) отражается изменением количества мРНК молекул и коррелирует с количеством кодируемого белка, что приводит к изменению функционального состояния клетки. Поскольку

полимеразы, используемые для ПЦР, узнают в качестве матрицы только молекулы ДНК, первым этапом исследования мРНК являлась реакция обратной транскрипции (синтез первой цепи) в которой синтезируются копии комплиментарной ДНК (кДНК) на матрице РНК с использованием фермента обратной транскриптазы. Реакцию обратной транскрипции ставили в отдельной пробирке сразу после получения РНК, используя ген-специфичные праймеры, наборы реагентов, протоколы и оборудование ЗАО «НПФ ДНК-Технология» (Россия). Реакцию проводили при температуре 40°C в течение 30 минут, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 минут. Для увеличения объемов образцов после ОТ кДНК разводили в 2 раза в воде, не содержащей РНК-каз, до конечного объема 40 мкл. Полученный раствор кДНК либо сразу использовали для ОТ-ПЦР, либо хранили при -20°C.

Для постановки ПЦР использовали реактивы и протокол фирмы «ДНК-Технология». Контроль отсутствия реакции на геномную ДНК ставили с образцами, не прошедшими реакцию обратной транскрипции, которые разводили в ТЕ-буфере в конечной концентрации, эквивалентной конечной концентрации кДНК. В каждой постановке ПЦР использовали отрицательный контроль. Для оценки отсутствия контаминации использовали реакционную смесь без матрицы. На образцах, прошедших все стадии выделения РНК без добавления фермента для обратной транскрипции, оценивали возможное наличие амплификации примесей геномной ДНК. В контрольных образцах после 50 циклов продукт амплификации отсутствовал. Реакцию амплификации проводили в дублях, из которых в расчет брали среднее значение точки пересечения (crossing point,  $C_p$ ). ДНК-зонды, которые использовали для детекции продуктов амплификации исследуемых и референсных генов, были помечены флуоресцентным красителем FAM. Оптимальную температуру отжига праймеров и зондов подбирали экспериментально с использованием режима «градиент температур», для всех тест-систем эта температура составила 64°C. Амплификацию выполняли в режиме «реального времени» в объеме 12 мкл по следующей программе: 1 цикл – 80°C, 30 сек, 94°C 1 мин; 50 циклов – 94°C 10 сек, 64°C 20 сек, использовали

приборы “ДТ-96” и “ДТ-Prime 5” производства фирмы ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64°C.

### 2.2.3 Методы определения и расчета уровня относительной экспрессии исследуемых генов по контрольным генам

Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, методом сравнения индикаторных циклов ( $C_p$ ) с использованием нормализации по контрольным генам (House Keeping Gene) согласно методике, предложенной Vandesompele et al. 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 [100,132,142]. 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 учёта 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:

$$NF = \sqrt[3]{NF_{b2m} \times NF_{gusb} \times NF_{hprt1}}$$

Уровень экспрессии генов с учётом 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 образцов 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».

#### 2.2.4 Краткая характеристика исследуемых генов

Для каждого образца анализировалась экспрессия 62 функциональных генов и 3 контрольных. В панель вошли различные маркеры, активность которых может быть нарушена как при злокачественном, так и при доброкачественном патологическом процессе. Для удобства исследования гены были объединены в несколько функциональных групп по доминирующей функции: маркеры пролиферации, апоптоза, транскрипции, межклеточных взаимодействий, гены клеточной дифференцировки, факторы иммунного ответа, факторы роста и мембранные рецепторы. В таблице 9 перечислен список генов-кандидатов, выбранных для анализа в данном исследовании.

Таблица 9 – Гены, включённые в анализ

Группа	Название гена	Сигнальный каскад	Функция
Пролиферация	<i>KI67</i>		Маркер клеточной пролиферации. Экспрессируется в фазы G1, S, G2, M и не экспрессируется в G0
	<u><i>CCND1</i></u>	WNT TP53 Akt Notch, Pathway in the Colorectal Cancer Metastasis SuperPath	Кодирует белок циклин D1 семейства циклинов. Образует комплекс с циклин-зависимыми киназами CDK4 и CDK6, который в свою очередь способствует смене клеточного цикла и переходу из G1 в S-фазу.
	<i>CCNB1</i>		Кодирует белок циклин B1 семейства циклинов, контролирующих смену фаз клеточного цикла. Активация комплекса циклин B-Cdk2 необходима для перехода фаз G2/M.
	<u><i>PTEN</i></u>	Akt/ПКВ	Кодирует белок с фосфотазной активностью, фосфорелирующий молекулярные мишени пролиферативного каскада Akt/ПКВ, чем и объясняются его антипролиферативные свойства как опухолевого супрессора
	<i>STK-15 (AURKA)</i>	TP53	Киназа участвует в формировании и / или стабилизации микротрубочек на полюсе веретена во время сегрегации хромосом. Заболевания, связанные с AURKA, включают колоректальный рак и колоректальную аденокарциному.
	<i>P16INK4A</i>	WNT TP53 Akt	P16INK4a и P14ARF участвуют в регуляции клеточного цикла. Являются супрессорами опухоли. P16INK4a Экспрессируется на всех активных стадиях клеточного цикла (G1, S, G2, M) и отсутствует в G0. P14ARF инициирует p53-зависимую остановку клеточного цикла и, соответственно, апоптоз.
	<i>P14ARF</i>		

Группа	Название гена	Сигнальный каскад	Функция
Транскрипция	<i><u>MYC</u></i> , <i>MYBL2</i> , <i>GATA3</i>	WNT	Ген <i>MYC</i> является протоонкогеном, кодирует ядерный фосфопротеин, который играет роль в регуляции клеточного цикла, апоптозе и клеточной дифференцировке. <i>MYBL2</i> участвует в регуляции клеточного цикла.
Апоптоз	<i><u>BCL2</u></i>	TP53, Pathway in the Colorectal Cancer Metastasis SuperPath	Кодируемый белок ингибирует апоптоз. Образуя комплекс с белком BAG, блокирует выделение цитохрома С из межмембранного пространства митохондрии.
	<i>BAX</i>	TP53, Pathway in the Colorectal Cancer Metastasis SuperPath	Белок этого гена положительно регулирует высвобождение цитохрома С и по сути является антагонистом BCL2 и BAG
	<i>BAG1</i>	TP53	Коактиватор BCL2, является ингибитором апоптоза
	<i>NDRG1</i>	TP53	Кодирует белок, необходимый для p53 опосредованной активации каспаз, чем и объясняются его выраженные проапоптотические свойства
	<i><u>BIRC5</u></i> ( <i>SURVIVIN</i> )	JAKs-Stat3 Notch, Pathway in the Colorectal Cancer Metastasis SuperPath	Многозадачный белок, который играет двойную роль в стимулировании пролиферации клеток и предотвращении апоптоза в фазе G2 / M. Подавляет STAT3-трансактивацию промоторов гена-мишени.
	<i>TERT</i>	WNT	Кодирует обратную транскриптазу теломеразы. Этот фермент, необходим для репликации концевых фрагментов хромосом. В норме активность фермента низкая, что после определенного количества делений клетки приводит к активации апоптоза.



Группа	Название гена	Сигнальный каскад	Функция
Факторы роста	<i>VEGFa 121, VEGFa 165, VEGFa 189</i>	ErbB	Ответственны за коллатеральное кровообращение. Белки VEGF усиленно продуцируются клетками некоторых опухолей, способствуя образованию новых сосудов опухоли. Активны в эмбриогенезе.
	<i>SCUBE2</i>	GPCR	Корцептор клеточной поверхности для VEGFR2, участвующий в VEGFR2-опосредованном ангиогенезе
	<i>IGF-1, IGF-2,</i>	MAPK3 / ERK1 MAPK1 / ERK2 и АКТ1	Инсулиноподобные факторы роста. Действуют как лиганды. Индуцирует фосфорилирование и активацию сигнальных каскадов MAPK3 / ERK1, MAPK1 / ERK2 и АКТ1
	<i>TGFb</i>	TGFβ/ SMAD, Pathway in the Colorectal Cancer Metastasis SuperPath	Трансформирующий фактор роста-бета связывает различные TGF-бета-рецепторы, что приводит к активации факторов транскрипции семейства SMAD, которые регулируют экспрессию генов.
Дифференцировка/рецепторы	<i>HER2 (ERB-B2)</i> Рецептор тирозинкиназы 2	RET Stat3 MAP	Член семейства рецепторных тирозинкиназ эпидермального фактора роста (EGF). Ниже по сигнальному каскаду регулирует рост и стабилизацию периферических микротрубочек. Является важным компонентом передачи сигналов IL6 через сигнальный путь киназы MAP.
	<i>ESR, PGR</i>	Notch	Рецепторы эстрогена контролирует многие клеточные процессы, включая рост, пролиферацию и дифференцировку. Снижает ДНК-связывающую активность NF-каппа-В и ингибирует NF-каппа-В-опосредованную транскрипцию с промотора IL6.
	<i>CYP19A1</i>		Эстроген-синтетаза катализирует последние этапы биосинтеза эстрогена. Промотор CYP19 в жировой ткани регулируется цитокинами класса I, такие как IL-6 и IL-11, а также TNF-альфа.
	<i>C-erbB2, GRB7</i>	PI3K / АКТ	Тирозинкиназа <i>C-erbB2</i> рецептора эпидермального фактора роста (EGF) и его гомолог

Группа	Название гена	Сигнальный каскад	Функция
Дифференцировка/рецепторы	<i>Молекулы CD 45,56, 68</i>	JAKs-Stat3,5	Тирозиновые протеинфосфатазы регулируют передачу сигнала от T- и B-клеточных рецепторов антигена. Подавляют JAK-киназы, и, таким образом, блокируют передачу сигнала от цитокиновых рецепторов
	<i>LIF LIFR</i>	JAKs-Stat3,5	LIF (leukemia inhibitory factor) многофункциональный цитокин семейств интерлейкинов. Рецептор (LIF-R) является компонентом комплексов рецепторов клеточной мембраны. LIF взаимодействует с LIF-рецептором (LIF-R) и трансмембранным переносчиком – гликопротеином gp130 с последующей активацией внутриклеточных сигнальных каскадов, регулирующих дифференцировку разных типов клеток.
Многофункциональные гены	<i>CD-56(N-CAM-1)</i>	передача сигналов RET и гамма-интерферона	Молекулы клеточной адгезии (CAM) представляют собой большое семейство трансмембранных белков, которые участвуют в связывании клетки с другой клеткой или с внеклеточным матриксом. Они играют роль в пролиферации, дифференцировке, подвижности, переносе, апоптозе и архитектуре клеток.
	<i>LGALS1</i>	угнетение транскрипции и C-Мyc и передачи сигналов киназы MAP	участвует в регуляции межклеточных взаимодействий. Генный продукт может действовать как аутокринный негативный фактор роста, регулирующий пролиферацию клеток.
Межклеточные взаимодействия	<i>MMP11, MMP2, MMP7, MMP8, MMP9, CTSL2, PAPPА</i>	WNT, Pathway in the Colorectal Cancer Metastasis SuperPath	Функции матриксных металлопротеиназ (MMP), заключаются в разрушении межклеточных контактов. Особенно активны в эмбриональном развитии. CTSL2 играет важную роль во внутриклеточном катаболизме белка. Участвует в деградации межклеточного матрикса. PAPPА кодирует секретлируемую металлопротеиназу, которая расщепляет белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста (IGFBP).

Группа	Название гена	Сигнальный каскад	Функция
Цитокины и факторы иммунного ответа	<i>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, <b>GATA3</b></i>	JAKs-Stat3,5 сигнализация ERK и сигнальный путь Toll-like Receptor,	Факторы врожденного иммунного ответа (семейство Toll-подобных рецепторов TLR), про- и противовоспалительного иммунного ответа (интерлейкины IL). Антигены главного комплекса гистосовместимости HLA класса G. GATA-3 является Т-клеточно-специфическим фактором транскрипции. Белок GNLY присутствует в цитотоксических гранулах цитотоксических Т-лимфоцитов, естественных киллерных клетках и обладает противомикробной активностью.
Контрольные гены	<i>GUSB, B2M, HPRT.</i>		Гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма. Экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Гены «домашнего хозяйства» функционируют повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма
Примечание. Жирным шрифтом с подчеркиванием отмечены гены – драйверы.			

### 2.2.5 Статистическая обработка результатов

Работа проводилась путем последовательного исследования данных разными статистическими методами обработки в программном пакете Statistica 10. Полученные значения уровня экспрессии были логарифмированы, что позволило использовать параметрические критерии для нормального распределения в группах. Первоначально использовали Т-критерий Стьюдента. При распределении, которое отличалось от нормального, использовали методы непараметрической статистики (U-критерий Манна-Уитни), расчет коэффициента ранговой корреляции r- Спирмена. Для классификации образцов (разделения

пациентов на группы по типу патологического процесса, определения молекулярных отличий отделов толстой кишки), формирования обучающей выборки и выявления диагностически значимых генов использовали многомерный статистический метод – классификационный дискриминантный анализ с обучением. Задачей метода является отнесение изучаемого объекта к одной из нескольких групп на основе измерения у него ряда признаков (переменных). В нашем случае изучаемым объектом были образцы пациентов с разной патологией, взятые в разных отделах ТК. Признаками являются значения экспрессии 62 генов. Результатом является решение уравнения линейной дискриминантной функции (ЛДФ):  $Y = Y = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + \dots + a_nx_n + C$ , где  $X_1$  – наиболее информативные из анализируемых признаков (ген),  $A_1$  – коэффициенты (уровень экспрессии гена),  $C$  – константа.

Обучение дискриминантной модели проводилось путем оценки апостериорной вероятности, что данный образец пациента принадлежит к определенной группе. Для выбора наиболее значимых генов был проведен дискриминантный анализ с пошаговым включением в модель 62 генов, основанный на проверке многомерного F– критерия Фишера (при уровне значимости меньше, чем 0,05). Идентификацию других аналогичных наблюдений, не включенных в обучающую выборку, проводили на обученной модели. Этот метод позволил классифицировать исследуемые типы ткани по типу патологического процесса. Одним из главных результатов дискриминантного анализа является матрица классификации. В нашем случае в матрице показано, какое количество объектов исследования (образцов ткани) правильно отнесены в свою группу (отдел толстой кишки, тип патологии, морфологические характеристики патологического процесса и др.). Если количество распознавания высокое (более 90% в каждой из исследуемых групп), то можно считать модель достаточно эффективной [16].

## **Глава 3. СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **3.1 Первый этап исследования. Анализ молекулярно-генетических показателей в неизмененных тканях толстой кишки в норме и при заболеваниях толстой кишки**

В этом разделе приведены результаты исследования неизмененных тканей толстой кишки полученных во время контрольного эндоскопического исследования от условно здоровых доноров (без доброкачественных, злокачественных новообразований и хронической воспалительной патологии в толстой кишке), пациентов с полипами толстой кишки и пациентов с раком ободочной и прямой кишки. Объектом исследования первого этапа являлось собрание образцов «свежей ткани» – биоптаты неизмененной ткани из ТК взятые в объеме 1 – 2 мм<sup>2</sup> во время хирургического вмешательства и планового эндоскопического исследования.

#### **3.1.1 Анализ экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки здоровых доноров**

Для более полного понимания молекулярных изменений, происходящих в опухолях толстой кишки, необходимо знание процессов, происходящих на клеточном уровне в отделах толстой кишки у здоровых людей. Изучение и понимание процессов клеточного обновления слизистой оболочки и участия в нем генов, определяющих баланс между процессами пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза, позволяет по-новому рассмотреть процесс нормального клеточного обновления в толстой кишке, дать новую трактовку событиям онкогенеза и обеспечить теоретическое обоснование для новых стратегий лечения. Изучение здоровых тканей в толстой кишке является важным этапом для понимания фундаментальных молекулярных механизмов, обеспечивающих внутриклеточный гомеостаз/баланс, а также является более точным методом при анализе изменений, наблюдаемых при патологии.

### 3.1.1.1 Исследование экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки здоровых доноров в зависимости от анатомического отдела толстой кишки

На первом этапе исследования был проведен анализ образцов тканей контрольной группы (n=177). Нами впервые детально проанализированы изменения экспрессии 62 генов, ответственных за основные внутриклеточные процессы, в отделах толстой кишки здоровых доноров. На этапе статистической обработки использовали U-тест Манна Уитни, метод оценки суммарных рангов ( $p < 0,05$ ). Было проведено сопоставление экспрессии 62 исследуемых генов с 5 группами образцов, соответствующих анатомическим отделам, из которых был взят биопсийный материал для исследования. Мы провели парное сравнение отделов ТК. Были выявлены достоверные отличия уровня экспрессии мРНК 34 генов, которые представлены в таблице 10. Эти маркеры включают все функциональные кластеры исследуемых генов.

**Таблица 10** – Достоверность различий дифференциальной экспрессии исследованных генов в тканях, полученных от условно здоровых доноров при парном сравнении отделов ТК. Отделы ТК: В - восходящий, П - поперечный, Н - нисходящий, С- сигмовидный, ПК – прямая кишка

Гены/ отделы ТК	В / П	В / Н	В / С	В / ПР	П / Н	П / С	П / ПР	Н / С	Н / ПР	С / ПР
<i>CTSL2</i>	-	-	0,045	-	-	-	-	-	-	0,018
<i>CCND1</i>	0,024	<0,001	0,005	<0,001	-	-	<0,001	-	<0,001	<0,001
<i>CCNB1</i>	0,046	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>CD68</i>	-	-	0,040	-	-	-	-	-	-	0,027
<i>TERT</i>	0,005	0,001	0,001	-	-	-	<0,001	-	<0,001	<0,001
<i>NDRG1</i>	-	-	-	0,035	-	-	0,001	-	0,039	-
<i>PTEN</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,042	-
<i>BAG1</i>	-	-	-	0,005	-	-	0,035	-	0,028	-
<i>ESR1</i>	-	-	-	<0,001	-	-	<0,001	-	<0,001	<0,001
<i>MMP11</i>	-	-	-	-	-	-	0,022	-	0,031	-
<i>P16INK4A</i>	-	-	-	<0,001	-	-	<0,001	-	<0,001	<0,001
<i>MYC</i>	-	-	-	0,005	-	-	0,002	-	-	-
<i>SCUBE2</i>	-	-	-	<0,001	-	-	<0,001	-	<0,001	<0,001
<i>P14ARF</i> ( <i>P19ARF</i> )	-	-	-	<0,001	-	-	<0,001	-	<0,001	<0,001
<i>COX-2</i>	-	-	-	<0,001	-	-	<0,001	-	<0,001	0,004

Гены/ отделы ТК	В / П	В / Н	В / С	В / ПР	П / Н	П / С	П / ПР	Н / С	Н / ПР	С / ПР
<i>IGF2</i>	-	-	-	0,015	-	-	-	-	-	-
<i>GREM1</i>	-	-	-	<0,001	-	-	<0,001	-	<0,001	<0,001
<i>MMP2</i>	-	-	0,006	0,009	-	-		-	-	
<i>MMP7</i>	-	-	-	0,024	-	-	<0,001	-	<0,001	<0,001
<i>IL2</i>	-	-	-	0,002	0,016	0,010	<0,001	-	0,013	0,015
<i>IL12a</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,043
<i>IL10</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	0,024
<i>IL2Ra</i>	-	-	-	0,010	-	-	0,015	-	-	
<i>IL8</i>	-	-	-	<0,001	-	-	<0,001	-	<0,001	<0,001
<i>IL1b</i>	-	-	-	0,002	-	-	<0,001	-	<0,001	0,002
<i>CYP19A</i>	-	-	-	-	-	0,031	0,002	-	0,023	-
<i>PAPPA</i>	-	-	-	-	-	-	0,014	-	0,012	-
<i>VEGFA121</i>	-	-	-	<0,001	-	-	<0,001	-	<0,001	-
<i>VEGFA165</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,04	<0,001	-
<i>VEGFA189</i>	-	-	-	0,03	-	-	0,03	-	-	-
<i>TLR4</i>	-	-	-	0,02	-	-	0,02	-	<0,001	0,03
<i>LIF</i>	-	-	-	<0,001	-	-	<0,001	0,04	0,01	0,03
<i>LGALS1</i>	-	-	-	-	-	-			0,02	0,05
<i>LIFR</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02

Примечание. В таблице указаны значения  $p < 0,05$ , полученные с помощью критерия Манна- Уитни (U-тест) при парном сравнении отделов ТК. «-» отличия не достоверны

При парном сравнении отделов ТК нами было определено, что у здоровых людей слизистая оболочка прямой кишки значительно отличается по молекулярному фенотипу от слизистой ободочной кишки, что можно объяснить анатомо-физиологическими особенностями этого отдела (Таблица 10). Из 62 исследованных генов для прямой кишки определены достоверные отличия значений экспрессии 34 генов разных функциональных групп. Отделы ободочной кишки при парном сравнении достоверно отличались по 10 генам. Среди них наиболее значимые: маркер пролиферации *CCND1*, антиапоптотический фактор *TERT* и провоспалительный цитокин *IL2*. Фермент TERT необходим для репликации хромосомных концов у большинства эукариот. Он активен в клетках-предшественниках, а также в эпителии самообновляющихся тканей кишечника. Интересным фактом является непосредственное участие этого гена в сигнальном

пути WNT, мутации в котором в 80% случаев наблюдаются при раке ТК [94]. Уровень экспрессии *TERT* был самым высоким в сигмовидном отделе ободочной кишки (Таблица 11). Ген *TERT* взаимодействует с циклином D (*CCND1*), активность которого необходима для перехода G1 / S клеточного цикла. Повышенная экспрессия *CCND1* часто наблюдаются во множестве опухолей и способствует опухолегенезу. Уровень экспрессии гена *CCND1* при физиологической норме был самым высоким в прямой кишке (Таблица 11). Цитокин *IL2* необходим для пролиферации Т- и В-лимфоцитов и других процессов, облегчающих активацию воспалительного иммунного ответа. Заболевания, связанные с *IL2*, включают в себя перинатальный некротизирующий энтероколит. Также интересным фактом является развитие язвенного колитоподобного заболевания при целевом разрушении аналогичного гена у мышей. Установлена связь однонуклеотидных полиморфизмов (rs2069762, rs6822844 и rs11938795) *IL2* в патогенезе КРР и выживаемости пациентов с разными аллельными вариантами [58]. Кроме вышеописанных маркеров, при сравнении восходящего/поперечного отделов нами определены достоверные отличия уровня экспрессии маркера пролиферации – циклина В (*CCNB1*), регулирующего клеточный цикл G2/М. В восходящем отделе уровень экспрессии этого гена был выше, чем в поперечном. При сравнении восходящего/сигмовидного отделов определены достоверные отличия маркеров клеточной адгезии (*MMP2*, *CTSL2*) и маркера активированных макрофагов (*CD68*). Поперечный/сигмовидный достоверно различались по уровню экспрессии *CYP19A* и *IL2*. Эстроген-синтетаза *CYP19A* отвечает за превращение стероидов-предшественников андрогенов в эстрогены, непосредственно участвует в регуляции биосинтеза эстрогена в жировой ткани и, следовательно, может играть роль в регулировании массы жировой ткани и ее распределении. Нисходящий/сигмовидный имеют достоверные отличия фактора роста сосудистого эндотелия *VGFA165* и цитокина *LIF*. Таким образом, на первом этапе исследования тканей ТК здорового человека мы можем предположить участие разных молекулярных механизмов поддержания гомеостаза в прямой и



ободочной кишке, которые, возможно, отражают физиологические процессы и определяют молекулярные фенотипы данных отделов.

Для оценки характера отличий мы провели анализ значений медианы (*Me*) экспрессии 62 генов в каждом из 5 отделов ТК. Были определены гены с высокой и низкой экспрессией в каждом из отделов толстой кишки (Таблица 11).

**Таблица 11** – Отличия медианы экспрессии генов в отделах толстой кишки здоровых доноров. (U-критерий Манна-Уитни)

Отделы ТК	Высокий уровень экспрессии относительно других отделов	Низкий уровень экспрессии относительно других отделов
Восходящий	<i>CCNB1, IL2Ra, IFNg, TGFb, CD68.</i>	<i>BAG1, P16INK4A, MMP2</i>
Поперечный	<i>NDRG1, MMP11, CD56, SCUBE2.</i>	<i>IL2, STK15, MYBL2.</i>
Нисходящий	<i>PAPPA, VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189.</i>	<i>CCND1, P14ARF, CYP19A, MMP7, MMP9, CD45, TGFb, LGALS, IL6, IL8, IL1b, COX-2, IGF2, BAX, HLA-G1, GATA3</i>
Сигмовидный	<i>TERT.</i>	<i>PGR, ESR1, IL6, IL12a, IL10, LIFR, CCNB1, IL2Ra, TNFa, CD69, CD68, CTSL2</i>
Прямая кишка	<i>CCND1, P14ARF, ESR1, MMP7, HLA-G5, GREM1, IL1b, IL6, IL8, IL12a, IL10, IGF2, LIF, P16INK4A, MYC, CTSL2, BAG1, BAX, PGR, CYP19A, MMP2, MMP9, CD45, TNFa, LGALS1, GNLY, IL2, IL10, COX-2, LIFR.</i>	<i>NDRG1, TERT, MMP11, IFNg, PAPPA, VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, TLR4.</i>

По результатам анализа уровень экспрессии 30 исследуемых генов в прямой кишке был выше, в сравнении с отделами ободочной кишки (Таблица 11). Данные гены являются звеньями разных сигнальных путей, обеспечивая в клетках контроль процессов пролиферации, апоптоза, образование межклеточных контактов, иммунный ответ организма. В прямой кишке отмечен самый высокий уровень следующих генов: циклооксигеназы-2 (*COX-2*), которая является ключевым ферментом в биосинтезе простагландинов, участвующих в воспалении и митогенезе. Имеются данные о существенной корреляции между генотипом

GX-носителей COX-2 1195 и кишечной метаплазией. Заболевания, связанные с COX-2, включают семейный аденоматозный полипоз [147]. Этот фермент усиленно экспрессируется в эндотелии в физиологических условиях, а также в патологических состояниях, например, при раке. Повышенная экспрессия также связана с повышенной адгезией клеток, фенотипическими изменениями, ангиогенезом опухолей и устойчивостью к апоптозу. Индуцирует циклооксигеназу-2 (COX2) провоспалительный цитокин *IL1b*, уровень экспрессии которого также определен как самый высокий в прямой кишке. Отмечен высокий уровень фактора некроза опухоли *TNFa*, который стимулирует продукцию провоспалительных интерлейкинов *IL6*, *IL8*. Нарушения регуляции *TNFa* у человека ассоциированы с различными заболеваниями, включающими болезнь Крона и неспецифический язвенный колит. *IL12a* может действовать в качестве фактора роста на активированные Т-лимфоциты и природные клетки-киллеры, стимулирует выработку интерферона (IFN) гамма. Обладает широким спектром биологической активности. Цитокин *IL10* является важнейшим иммунорегулятором в кишечном тракте. Он подавляет экспрессию цитокинов Th1 и костимулирующих молекул на макрофагах, что позволяет увеличить выживаемость В-клеток, пролиферацию и выработку антител. Фактор роста *IGF2* участвует в метаболизме глюкозы в жировой ткани. Факторы роста и цитокины взаимодействуют с базальными мембранами эндотелия сосудов, клетками крови и микросредой. На основании проведенных исследований, был сделан вывод, согласующийся с литературными данными: для тканей прямой кишки характерна высокая скорость иммунных реакций, высокая экспрессия генов, ответственных за иммунный ответ. Можно также объяснить полученные результаты, наличием большого количества иммунокомпетентных клеток в собственной пластинке прямой кишки, особенно лимфоцитов и тканевых базофилов. В прямой кишке также отмечается самый высокий уровень молекул, участвующих в деградации экстрацеллюлярного матрикса – матриксных металлопротеиназ *MMP2*, *MMP7*, *MMP9*. Деградация внеклеточного матрикса является неотъемлемой частью физиологических процессов: например, роста и регенерации тканей. Стоит

отметить, что в нисходящем отделе ободочной кишки уровень экспрессии генов *CCND1*, *P14ARF*, *CYP19A*, *MMP7*, *MMP9*, *CD45*, *TGFb*, *LGALS*, *IL6*, *IL8*, *IL1b*, *COX-2*, *IGF2*, *BAX*, *HLA-G1*, *GATA3* был самым низким в сравнении с другими отделами ТК. В то же время в этом отделе наблюдали самый высокий уровень факторов сосудистого роста *VEGF*. Можно предположить, что низкий уровень маркеров пролиферации, провоспалительных цитокинов и матриксных металлопротеиназ в нисходящем отделе ободочной кишки при физиологической норме определяет достаточно редкое возникновение опухолей ТК в этом отделе. Таким образом, анализ уровня экспрессии исследуемых генов позволил выделить гены с высокой и низкой экспрессией в отделах толстой кишки, что, возможно, отражает физиологические процессы и определяет молекулярный фенотип данных отделов. Можно отметить, что молекулярный фенотип тканей прямой кишки, по-видимому, имеет существенные отличия от других отделов. Нижнеампулярный отдел прямой кишки, из которого осуществляли забор образцов ткани, имеет отличное от ободочной кишки и верхнеампулярного отдела гистологическое строение и представлен многослойным плоским неороговевающим эпителием. Для определения возможности классификации отделов ТК по молекулярному фенотипу был проведен многофакторный анализ дискриминантных функций с пошаговым включением переменных. Из 65 генов 39 являлись значимыми в модели классификации по экспрессионному фенотипу для заданных ранее подгрупп (5 отделов толстой кишки). Это маркеры разных функциональных групп, отвечающие за контроль пролиферации – *CCND1*, *TERT*, *PTEN*; контроль апоптоза – *BAG1*, *BAX*, *BCL2*, *NDRG1*; иммунный статус – *IL1b*, *IL2*, *IL2Ra*, *IL7*, *IL8*, *IL10*, *IL12a*, *IL15*, *TLR4*, *LIF*, *LIFR*, *IFNg*, *GATA3*, *LGALS1*; дифференцировку/рецепторный статус – *ESR1*, *PGR*, *HER2*, *GBR7*, *CYP19A*, *CD45*; межклеточную адгезию – *MMP2*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP11*, *PAPPA*, а также факторы роста – *VEGFA121*, *VEGFA165*, *VEGFA189*, *SCUBE2*, *TGFb*, *IGF1*, *IGF2*. Дискриминантный анализ, продемонстрировал высокие показатели точности распределения образцов ткани к заданным подгруппам. В таблице приведены результаты, показывающие, что молекулярный фенотип каждого из отделов

толстой кишки отличается с высокой достоверностью. Суммарный процент правильности классификации более 84%. Дискриминантный анализ подтвердил, отличия молекулярного фенотипа тканей прямой кишки от других отделов, (точность его дифференцировки составила 100%). Наиболее высокие показатели отмечены для групп: прямая кишка, сигмовидный отдел и восходящий отдел (100, 90 и 84% соответственно); меньшие – в группах поперечный и нисходящий отдел (73 и 70 %) (Таблица 12).

**Таблица 12** – Результаты дискриминантного анализа: соответствие классификации образцов по молекулярному фенотипу с их принадлежностью к отделу ТК для 5 анатомических отделов ТК согласно дискриминантной модели, включающей 39 генов

Отдел ТК	Частота совпадения классификации %	Распределение образцов по отделам ТК согласно дискриминантной модели (n)				
		Восходящий	Поперечный	Нисходящий	Сигмовидный	Прямая кишка
Восходящий	84,37	27	4	0	1	0
Поперечный	73,52	3	25	3	3	0
Нисходящий	70,58	1	5	24	4	0
Сигмовидный	90,47	0	2	2	38	0
Прямая кишка	100	0	0	0	0	35
Общая точность классификации %	84,18	31	36	29	46	35

Примечание. В таблице представлено число корректно классифицированных образцов исследуемого отдела ТК (на диагонали таблицы) и тех, которые попали не в свои группы (другие отделы ТК). Строки обозначают истинное количество образцов в группе

Надо отметить, что ошибки классификации, как правило, возникают из-за сходства фенотипов соседних отделов ободочной кишки. Это также показано в ранее проведенном парном сравнении отделов (Таблица 10). Данный факт можно объяснить вариабельностью длины и, соответственно, функции каждого конкретного участка, таким образом, забор материала мог быть осуществлен как около печеночного, так и ближе к селезеночному изгибу. Для снижения эффекта

субъективности, мы объединили образцы в 3 отдела толстой кишки: «правая ободочная кишка», «левая ободочная кишка», «прямая кишка». При таком объединении образцов общая точность классификации составила 92%. При этом снова точность классификации для прямой кишки составила 100% (Таблица 13).

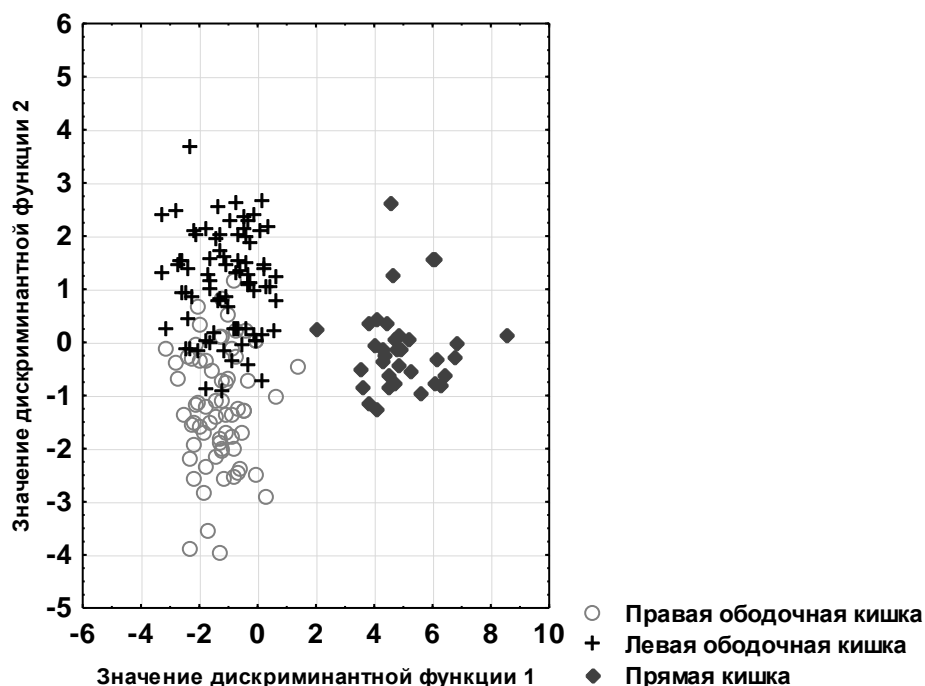
**Таблица 13** – Результаты дискриминантного анализа: соответствие классификации образцов по молекулярному фенотипу с их принадлежностью к отделу ТК для 3 анатомических отделов ТК согласно дискриминантной модели

Отдел ТК	Частота совпадения классификации (%)	Распределение образцов по отделам ТК согласно дискриминантной модели (n)		
		Правая ободочная кишка	Левая ободочная кишка	Прямая кишка
правая ободочная кишка	86,36	57	9	0
левая ободочная кишка	93,51	5	72	0
Прямая кишка	100	0	0	34
Общая точность классификации %	92,09	62	81	34

Примечание. В таблице представлено число корректно классифицированных образцов исследуемого отдела ТК (на диагонали таблицы) и тех, которые попали не в свои группы (другие отделы ТК). Строки обозначают истинное количество образцов в группе

На рисунке 7 графически представлены решения дискриминантных функций (корней) для трех групп образцов, сформированных по анатомическому отделу ТК. Решение дискриминантной функции 1 по оси X, в основном показывает отсутствие пересекающихся значений для группы «прямая кишка» и объединением групп правая и левая ободочная кишка относительно центральной линии (0). По вертикальной оси Y (решение дискриминантной функции 2)

заметно не большое объединение точек (образцов ткани правой и левой ободочной кишки) относительно центральной линии (0).



**Рисунок 7** – График двух канонических функций для 3 групп образцов правого, левого отдела ободочной кишки и прямой кишки.

Таким образом, по результатам проведенного исследования неизмененных тканей ТК здоровых доноров отмечены фенотипические отличия отделов толстой кишки и особый молекулярный фенотип прямой кишки, классифицирующийся с точностью 100%.

### **3.1.1.2 Исследование экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки здоровых доноров в зависимости от возраста**

Одним из основных факторов риска развития рака толстой кишки у формально здорового человека является возраст. Так, заболеваемость РТК у пациентов в возрасте 40 лет и меньше составляет 8 на 100 000 населения, а у людей 60 лет и старше - 150 на 100 000 населения, причем это относится и к мужчинам и к женщинам [8]. Учитывая важность фактора риска «возраст пациента», представляет интерес анализ того, как экспрессия генов разных функциональных групп у здоровых доноров связана с возрастом и с отделом ТК.

С этой целью нами проведен расчет коэффициента ранговой корреляции  $r$ -Спирмена для 62 генов.

Вначале была исследована зависимость возраста с уровнем экспрессии во всей толстой кишке без учета ее отделов. С увеличением возраста было обнаружено 20 слабых отрицательных корреляций ( $r \leq 0,29$ ) для маркеров: *MYC*, *MMP9*, *MMP11*, *IL2Ra*, *IL6*, *IL10*, *IL15*, *CD45*, *CD56*, *CD69*, *TNFa*, *TGFb*, *IGF1*, *IGF2*, *GNLY*, *LGALS*, *HER2*, *PGR*, *LIFR*, *BCL2*, и *TERT*. Положительные слабые корреляции были получены для 3 маркеров: *CTSL2*, *P14ARF*, *HLA-G5*. Умеренные корреляции ( $0,30 \leq r \leq 0,7$ ) были получены для гена *HLA-G5* ( $r=0,33$ ), кодирующего белок главного комплекса гистосовместимости, и ингибитора апоптоза *TERT* ( $r=-0,34$ ). Белок HLA-G изоформа 5 индуцирует выработку провоспалительных цитокинов и ингибирует функции естественных клеток-киллеров. Рядом авторов установлено, в злокачественных клетках следствием увеличения экспрессии HLA-G5 является уклонение опухолей от иммунологического надзора [113].

В восходящем отделе были определены умеренные отрицательные корреляции для маркеров *CD68* ( $r=-0,40$ ), *MMP9* ( $r=-0,35$ ), *CD69* ( $r=-0,35$ ), *LIFR* ( $r=-0,40$ ) и положительная корреляция *HLA-G5* ( $r=0,53$ ). В поперечном отделе определены 3 умеренные корреляционные зависимости: две отрицательные для антиапоптотических маркеров *BCL2* ( $r=-0,34$ ), *TERT* ( $r=-0,38$ ), и одна положительная для гена *HLA-G5* ( $r=0,48$ ). В нисходящем отделе также определены 3 корреляционные зависимости. Отрицательная корреляция показана для маркера *IL10* ( $r=-0,40$ ), – ингибитора активности ядерного транскрипционного фактора (NF)- $\kappa$ B, который участвует в регуляции иммунного и воспалительного ответа. По данным литературы этот цитокин является одним из важнейших иммунорегуляторов в кишечном тракте. Отрицательная корреляция получена для *CD69* ( $r=-0,39$ ). Экспрессия этого кодируемого белка индуцируется при активации Т-лимфоцитов и может играть роль в пролиферации. Положительная корреляция определена также для *HLA-G5* ( $r=0,56$ ).

Сигмовидный отдел показал самое большое число корреляционных взаимодействий. Отрицательные умеренные корреляции определены для генов

*TERT* ( $r=-0,53$ ), *PGR* ( $r=-0,37$ ), *MMP7* ( $r=-0,39$ ), *IL2* ( $r=-0,38$ ), *IL6* ( $r=-0,56$ ), *TNF $\alpha$*  ( $r=-0,37$ ), *CD69* ( $r=-0,38$ ), *GATA3* ( $r=-0,32$ ). Положительные корреляции показаны для маркеров *CTSL2* ( $r=0,32$ ) и *HLA-G5* ( $r=0,50$ ). В отделе прямой кишки с возрастом отрицательно коррелировали фактор транскрипции *MYC* ( $r=-0,52$ ) и провоспалительный цитокин *IL8* ( $r=-0,35$ ).

Стоит отметить, что в морфологически нормальной ткани слизистой оболочки толстой кишки в каждом отделе существует статистически значимая положительная умеренная корреляция между экспрессией мРНК маркера *HLA-G5* и увеличением возраста у здоровых доноров. В сигмовидной кишке отмечена также положительная корреляция цистеиновой протеиназы катепсина *L* (*CTSL2*). Увеличение экспрессии этого маркера усиливает инвазивную активность и неоваскуляризацию [149]. Таким образом, мы можем предположить, что с увеличением возраста в тканях ТК здорового человека, происходят изменения уровня экспрессии ряда генов. Данные изменения имеют определенные закономерности и, возможно, увеличивают риск развития КРР. В неизменной слизистой оболочке проксимальных и дистальных отделов толстой кишки человека отмечаются разная частота, сила корреляционных зависимостей и участие разных генов.

Нами также был проанализирован уровень экспрессии 62 генов в тканях ТК разных возрастных групп с использованием Т-критерий Стьюдента. Обследованные доноры были разделены на 3 группы: группа 1 – пациенты моложе 45 лет, 2 – пациенты в возрасте от 45 до 60 лет, 3 – пациенты старше 60 лет. Сравнение возрастных групп 1 и 2 показало достоверные отличия 11 маркеров *KI67*, *CCNB1*, *GRB7*, *STK15*, *MYBL2*, *COX-2*, *GREM1*, *IL7*, *IL8*, *IL10*, *VEGFA121*. Сравнение возрастных групп 2 и 3 показало достоверные отличия 20 маркеров *CD68*, *TERT*, *CCNB1*, *GRB7*, *STK15*, *P14ARF* (*P19ARF*), *COX-2*, *CYP19A*, *GREM1*, *PAPPA*, *IL12 $\alpha$* , *IL7*, *IL15*, *IL8*, *IFN $\gamma$* , *VEGFA121*, *BAX*, *HLA-G5*, *GATA3*, *LGALS1*. Сравнение возрастных групп 1 и 3 показало достоверные отличия 8 маркеров *CTSL2*, *TERT*, *P14ARF* (*P19ARF*), *IL6*, *IL12 $\alpha$* , *IL15*, *HLA-G5*, *LIFR*. Дискриминантный анализ, показал отличия молекулярного фенотипа тканей ТК



для трех возрастных групп. Наиболее высокие показатели точности распределения (более 93%) отмечены для групп доноров в возрасте 45-60 лет и старше 60 лет (Таблица 14).

**Таблица 14** – Результаты дискриминантного анализа: соответствие классификации тканей ТК здоровых доноров по возрастным группам согласно дискриминантной модели

Возрастные группы	Частота совпадения классификации %	Распределение по возрастным группам согласно дискриминантной модели (n)		
		Менее 45 лет	45-60 лет	Старше 65 лет
Менее 45 лет	77,08	37	0	11
45-60 лет	93,02	0	40	3
Старше 60 лет	93,33	4	2	84
Общая точность классификации	88,95	41	42	98

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

Использование модуля дискриминантного анализа с пошаговым исключением переменных позволило дифференцировать возрастную группу доноров старше 60 лет с точностью 81% при включении в модель 4 генов *GRB7*, *TNFa*, *HLA-G5*, *GATA3* для классификации группы (Таблица 15).

**Таблица 15** – Гены, включенные в модель фенотипических отличий тканей ТК здоровых доноров 3 возрастных групп

Наименование гена	Лямбда Уилкса	Частная Лямбда	F-значение	P - значение
<i>GRB7</i>	0,72	0,87	12,88	<0,001
<i>TNFa</i>	0,79	0,80	22,32	<0,001
<i>HLA-G5</i>	0,74	0,85	15,21	<0,001
<i>GATA3</i>	0,77	0,82	19,60	<0,001

Продукт гена *GRB7* взаимодействуют с рядом рецепторных тирозинкиназ и сигнальных молекул. Ген кодирует белок, связывающий рецептор фактора роста, который взаимодействует с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR).

Способствует активации протеинкиназ ниже по сигнальному каскаду, включая STAT3, AKT1, MAPK1 и / или MAPK3, HRAS. Играет роль в регуляции клеточной пролиферации и клеточной миграции. Ген *TNFA* кодирует многофункциональный провоспалительный цитокин семейства факторов некроза опухолей (TNF). Этот цитокин в основном секретируется макрофагами, участвует в регуляции широкого спектра биологических процессов, включая пролиферацию клеток, дифференцировку, апоптоз, а также метаболизм липидов и коагуляцию. Индуцирует резистентность к инсулину в адипоцитах посредством ингибирования индуцированного инсулином фосфорилирования тирозина IRS1 и индуцированного инсулином поглощения глюкозы. Молекулы гистосовместимости HLA-G класса I подавляют функции естественных клеток - киллеров. Рядом авторов установлено, что экспрессия HLA-G в злокачественных клетках позволяет опухолям уклоняться от иммунологического надзора [113]. Ген *GATA3* кодирует белок семейства транскрипционных факторов GATA. *Gata2* и *Gata3* специфически экспрессируются в предшественниках белых адипоцитов. Непосредственно участвует в процессе дифференцировки T-helper 2 (Th2) при иммунных и воспалительных реакциях. Снижает дифференцировку жировых клеток. Непосредственно регулирует процесс биосинтеза цитокинов. Является участником эстроген-зависимого сигнального пути регуляции экспрессии генов. Наши результаты косвенно подтверждают причинно-следственную связь между дисрегулированной экспрессией вышеперечисленных генов, обнаруженной нами в группе доноров старше 60 лет и увеличением риска развития патологического процесса в толстой кишке, связанного с возрастом. Суммируя полученные данные, можно сказать, что каждый отдел ТК здорового человека хорошо дифференцируется с разной степенью точности. Нами отмечен молекулярный фенотип прямой кишки, который классифицируется с точностью 100%. В этом отделе ТК показан высокий уровень экспрессии провоспалительных цитокинов *IL1b*, *IL6*, *IL8*, интерлейкинов *IL12a*, *IL10*, *IL2*, фермента COX-2, маркеров пролиферации *MYC*, *CCND1*, *P16INK4A*, *P14ARF*, маркеров межклеточной адгезии *MMP2*, *MMP7*, *MMP9*, *CTSL2*, маркеров митохондриального апоптоза

*BAG1*, *BAX*, дифференцировки *CD45*, *PGR*, *ESR1*, *CYP19A*, фактора роста *IGF2*, и ряда других маркеров. При физиологической норме уровень экспрессии этих генов обуславливает тонкое поддержание баланса/гомеостаза в тканях прямой кишки. Точность классификации левой и правой половины ободочной кишки по молекулярному фенотипу несколько ниже (86,36% и 93,51%, соответственно). Это обусловлено вариабельностью длины ободочной кишки и, как следствие, отсутствием точных критериев локализации забора материала. В подтверждение этого, основную погрешность в модели классификации внесли образцы поперечно-ободочной (точность 73,5%) и нисходящей ободочной кишки (70,5%). В отличие от прямой и слепой кишки, в этих отделах не существует четких ориентиров, позволяющих определить точную локализацию.

### **3.1.2 Анализ экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при доброкачественных гиперпролиферативных процессах**

Колоректальный рак (КРР) является гетерогенной группой заболеваний с различными предраковыми поражениями, которые могут развиваться через разные сложные патофизиологические процессы, включающие генетические и эпигенетические изменения. В 75% случаев предшественником КРР является аденома, которая проходит классический многоэтапный процесс [66]. Особенно важное клиническое значение определяется возможностью малигнизации аденоматозных полипов. В этом разделе будут рассмотрены результаты анализа неизменной ткани толстой кишки при полипах. Мы исходили из предположения, что полипы, как предшественники, могут демонстрировать некоторые ранние молекулярные признаки, которые потенциально могут иметь прогностическое значение или могут привести к развитию КРР.

#### **3.1.2.1 Анализ экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при доброкачественных гиперпролиферативных процессах в зависимости от анатомического отдела**

Обычная аденома проходит через классический путь аденома-карцинома, который составляет около 75% опухолей толстой кишки [76]. Эти опухоли

приобретают микросателлитно стабильный генотип, часто содержат активирующие мутации гена *KRAS*, и обычно расположены в левом отделе ободочной кишки и прямой кишке. Тем не менее, приблизительно 25% карцином возникают по альтернативному пути образования злокачественных опухолей, из предшественника, известного как плоский зубчатый полип (также называемый сидячей зубчатой аденомой). Зубчатые аденомы в основном расположены в правой ободочной кишке, часто приобретают мутацию онкогена *BRAF* на ранних стадиях развития и имеют микросателлитно не стабильный генотип [53]. Эти мутации происходят на ранней и поздней стадиях последовательности полипа-карциномы. Принимая во внимание, что опухоли правой и левой ободочной кишки часто развиваются из разных предшественников, мы провели исследование неизмененных тканей при полипах в зависимости от отдела ТК.

В результате проведенных нами исследований, было определено, что при парном сравнении отделов ТК неизмененные ткани прямой кишки при полипозе отличаются по экспрессионному фенотипу от тканей ободочной кишки. Мы получили достоверные отличия уровня экспрессии мРНК 22 генов, которые представлены в таблице 16. Эти маркеры включают кластеры всех исследуемых функциональных генов.

**Таблица 16** – Достоверность отличий уровня экспрессии панели генов ( $p < 0,05$ ) при парном сравнении неизмененных тканей при полипозе в отделах ТК (В - восходящий, Н - нисходящий, П - поперечный, С- сигмовидный, ПР - прямая кишка)

Гены/ Отделы ТК	В / П	В / Н	В / С	В / ПР	П / Н	П / С	П / ПР	Н / С	Н / ПР	С / ПР
<i>BCL2</i>	-	0,036	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>BIRC5</i>	-	-	-	0,009	-	-	-	-	0,021	-
<i>CCND1</i>	-	-	-	0,002	-	-	-	-	0,002	-
<i>NDRG1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,038	-
<i>TERT</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,031	0,035
<i>BAG1</i>	-	0,028	-	0,009	-	-	0,017	-	-	-
<i>ESR1</i>	-	-	-	0,047	-	-	0,015	-	-	0,006

Гены/ Отделы ТК	В / П	В / Н	В / С	В / ПР	П / Н	П / С	П / ПР	Н / С	Н / ПР	С / ПР
<i>GRB7</i>	-	-	-	-	-	-	0,045	-	-	-
<i>MYBL2</i>	-	-	-	0,029	-	-	-	-	-	-
<i>P16INK4A</i>	-	-	-	0,023	-	-	0,007	-	0,025	0,007
<i>COX-2</i>	-	-	-	-	-	-	0,018	-	-	-
<i>GREM1</i>	-	-	-	0,040	-	-	0,016	-	-	0,022
<i>PAPPA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,027	-
<i>MMP7</i>	-	-	-	0,013	-	-	0,006	-	0,036	0,001
<i>IL2Ra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,033
<i>IL8</i>	-	-	-	0,005	-	-	0,001	-	0,007	0,001
<i>IL1b</i>	-	-	-	0,011	-	-	0,005	-	-	0,014
<i>IL10</i>	-	-	-	0,034	-	-	-	-	-	-
<i>TNFa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,036
<i>HLA-G1</i>	-	0,040	-	0,049	-	-	-	-	-	-
<i>HLA-G5</i>	-	-	-	-	-	-	0,049	-	-	-
<i>LIF</i>	-	-	-	-	-	-	0,029	-	-	-

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

Проведенный анализ показал, что неизмененные ткани при полипозе в отделах ТК имеют сходство с тканью здоровых людей по уровню экспрессии 14 маркеров: *CCND1*, *NDRG1*, *TERT*, *BAG1*, *ESR1*, *P16INK4A*, *COX-2*, *GREM1*, *PAPPA*, *MMP7*, *IL2Ra*, *IL8*, *IL1b*, *IL10*. В то же время мы наблюдали достоверные отличия экспрессии 7 генов в отделах ТК, которые отсутствовали в тканях здоровых доноров. Это маркеры: *BCL2* – ингибитор митохондриального апоптоза, *BIRC5* (*SURVIVIN*) активатор пролиферации и ингибитор апоптоза в фазе, G2 / M, транскрипционный фактор *MYBL2*, фактор некроза опухоли *TNFa*, молекулы комплекса гистосовместимости *HLA-G1*, *HLA-G5* и *GRB7* - тирозинкиназа *CerbB2* рецептора эпидермального фактора роста, способствующая активации протеинкиназ ниже по сигнальному каскаду, включая *STAT3*, *AKT1*, *MAPK1* и *MAPK3*. Одной из функций этих молекул является индукция выработки

провоспалительных цитокинов, главным образом связанных с ремоделированием ткани за счет взаимодействия с рецептором KIR2DL4 на макрофагах.

Отсутствие достоверных отличий этих маркеров в тканях здоровых доноров и появление отличий в неизменных тканях при полипозе предполагает наличие связи с доброкачественным опухолевым процессом. Сравнение неизменной слизистой здоровых доноров и пациентов с полипозом показало меньшее число генов, определяющих фенотипические отличия отделов ТК. Фенотипические отличия между отделами ТК при полипозе сглаживаются. Не наблюдается достоверных отличий отделов ободочной кишки друг от друга по уровню экспрессии исследуемых генов, за исключением трех маркеров *HLA-G1*, *BCL2*, *BAG1*, которые отличались в паре восходящий/нисходящий отдел. В то же время отдел прямой кишки отличается от каждого из отделов ободочной кишки по уровню экспрессии 20 генов. Таким образом, не смотря на морфологическое сходство, неизменная ткань при полипозе в отделах толстой кишки отличается от неизменной ткани здорового человека.

### **3.1.2.2 Анализ экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при доброкачественных гиперпролиферативных процессах в зависимости от клиничко-морфологических характеристик**

На сегодняшний день основными известными показателями риска КРР являются размер полипа, количество и несколько патологических характеристик, таких как размер, степень дисплазии и наличие ворсинчатого компонента [125]. Исследования, проведенные в разных клиниках, свидетельствуют, что с увеличением размеров, степени дисплазии полипов возрастает пролиферативная активность в них, вплоть до злокачественной трансформации. В аденоматозных полипах 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 в 20-30 % случаев [1].

### 3.1.2.3 Анализ экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки в зависимости от степени дисплазии аденомы

Образцы неизменной ткани пациентов с тубулярной аденомой и тубулярно-ворсинчатой аденомой были разделены на 2 подгруппы. В группу со слабой дисплазией вошел 31 образец, в группу с умеренной дисплазией вошло 27 образцов. В таблице 17 проанализирована взаимосвязь уровня экспрессии со степенью дисплазии в аденомах ТК. Определены отличия средних значений экспрессии 26 маркеров, включающих кластеры: пролиферации (*TERT*, *PTEN*, *GATA3*), митохондриального апоптоза (*BCL2*, *BAG1*, *NDRG1*, *BAX*), факторов иммунного ответа (*IL2*, *IL12a*, *TLR2*, *LIF*, *GNLY*, *COX-2*), факторов роста (*IGF2*, *TGFb*, *SCUBE2*, *VEGFA165*), рецепторного статуса и дифференцировки (*PGR*, *CYP19A*, *CD45*, *CD56*, *CD69*), перестройки межклеточного матрикса (*MMP2*, *MMP11*, *PAPPA*, *LGALS1*). Все отличия достоверны ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 17** – Сравнение групп неизменных тканей при полипах в зависимости от степени дисплазии аденомы

Наименование гена	Умеренная дисплазия Среднее	Слабая дисплазия Среднее	Значение p
<i>BCL2</i>	8,19	8,77	0,01*
<i>NDRG1</i>	11,51	13,56	<0,01*
<i>TERT</i>	8,38	9,31	<0,01*
<i>PTEN</i>	17,95	17,55	<0,01*
<i>BAG1</i>	3,71	4,04	0,04*
<i>PGR</i>	9,66	10,55	<0,01*
<i>MMP11</i>	10,93	12,07	<0,01*
<i>SCUBE2</i>	8,96	10,50	<0,01*
<i>GNLY</i>	13,42	15,04	0,01*
<i>COX-2</i>	8,05	9,18	0,04*
<i>IGF2</i>	8,51	10,96	<0,01*
<i>CYP19A</i>	5,51	7,20	0,03*
<i>MMP2</i>	12,38	13,64	<0,01*
<i>PAPPA</i>	11,80	13,47	<0,01*
<i>IL2</i>	6,84	7,95	<0,01*
<i>IL12a</i>	9,01	10,99	0,01*
<i>CD45</i>	6,85	7,87	<0,01*
<i>CD56</i>	7,96	9,53	<0,01*
<i>TGFb</i>	7,65	8,89	<0,01*
<i>CD69</i>	5,31	5,84	0,01*

Наименование гена	Умеренная дисплазия Среднее	Слабая дисплазия Среднее	Значение p
<i>BAX</i>	10,05	12,02	<0,01*
<i>VEGFA165</i>	7,17	7,65	0,01*
<i>TLR2</i>	8,69	9,87	0,01*
<i>GATA3</i>	5,66	6,69	<0,01*
<i>LGALS1</i>	11,20	13,35	<0,01*
<i>LIF</i>	7,08	9,27	0,01*
Примечание. «*» отличия достоверны (p<0,05) (Т- критерий Стьюдента)			

По данным литературы показано, что в тубулярных аденомах и полиповидных поражениях вместе со степенью дисплазии изменяется апоптотическая активность [124]. В нашем исследовании в неизмененных тканях, взятых в 10 см от полипов с умеренной дисплазией, отмечен более низкий уровень экспрессии 25 маркеров, в том числе и маркеров митохондриального апоптоза, чем в неизмененных тканях, взятых при полипах со слабой дисплазией. Исключение составил опухолевый супрессор *PTEN*, уровень экспрессии которого был ниже в образцах со слабой дисплазией.

#### **3.1.2.4 Анализ экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки в зависимости от гистологического типа полипа**

На следующем этапе работы мы проанализировали уровень экспрессии в неизмененных тканях при тубулярной аденоме (n=58) и при гиперпластическом полипе (n=15). Были определены достоверные отличия 6 маркеров в зависимости от гистологического типа полипа (Таблица 18). В группе «тубулярная/ворсинчатая аденома» нами отмечен более высокий уровень экспрессии провоспалительных цитокинов *IL6*, *IL8* и маркера межклеточной адгезии *MMP7*.



**Таблица 18** – Сравнение групп неизмененных тканей при полипах в зависимости от гистологического типа полипа

Наименование гена	МНТ Тубулярная аденома	МНТ Гиперпластический полип	Значение р
<i>CTSL2</i>	6,53	7,02	0,03*
<i>GRB7</i>	15,62	15,91	0,02*
<i>MMP7</i>	5,77	3,79	0,01*
<i>IL6</i>	5,18	4,05	0,04*
<i>IL8</i>	5,67	4,16	<0,01*
<i>HLA-G5</i>	16,54	22,61	<0,01*

Примечание. «\*» отличия достоверны ( $p < 0,05$ ). (Т - критерий Стьюдента)

### **3.1.3 Анализ экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при колоректальном раке**

По данным литературы экспрессия молекулярных маркеров пролиферации, апоптоза, матриксных металлопротеиназ, провоспалительных цитокинов и других маркеров в опухолях пациентов с раком ободочной и прямой кишки может зависеть от локализации первичной опухоли [101]. В небольшом количестве работ показано, что молекулярный фенотип морфологически нормальной ткани, отдаленной от опухоли отличается от молекулярного фенотипа аналогичной ткани здорового органа. Однако до настоящего момента механизмы такого изменения практически не изучены. Также не изучены и закономерности таких изменений в зависимости от локализации и типа опухоли.

#### **3.1.3.1 Анализ экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при колоректальном раке в зависимости от анатомического отдела**

Мы провели исследование уровня экспрессии в гистологически неизмененных тканях края резекции ( $n=310$ ) в зависимости от расположения опухоли: правостороннее (восходящая и поперечная ободочная кишка;  $n=54$ ), левостороннее (нисходящая и сигмовидная кишка;  $n=184$ ) и в прямой кишке ( $n=72$ ) используя критерий Манна-Уитни (Таблица 19).

**Таблица 19** – Отличия уровня экспрессии панели генов ( $p < 0,05$ ) при парном сравнении неизмененных тканей края резекции при КРР в отделах ТК (Правая ОК, Левая ОК, Прямая кишка)

Наименование гена	Прямая кишка/левая ОК	Прямая кишка /Правая ОК	Правая ОК / Левая ОК
<i>CTSL2</i>	<0,001*	0,006*	-
<i>BCL2</i>	0,015*	-	-
<i>MYC</i>	<0,001*	0,003*	-
<i>BIRC5</i>	0,002*	-	-
<i>CCND1</i>	<0,001*	<0,001*	0,004*
<i>NDRG1</i>	<0,001*	0,012*	-
<i>CD68</i>	<0,001*	0,008*	-
<i>HER2</i>	0,009*	-	<0,001*
<i>BAG1</i>	0,007*	<0,001*	0,027*
<i>PGR</i>	0,001*	<0,001*	-
<i>CCNB1</i>	<0,001*	0,033*	0,022*
<i>ESR1</i>	0,024*	-	-
<i>GRB7</i>	0,001*	<0,001*	-
<i>STK15</i>	0,004*	-	-
<i>SCUBE2</i>	<0,001*	<0,001*	0,026*
<i>IGF2</i>	0,002*	-	-
<i>CYP19A</i>	0,007*	0,003*	-
<i>PAPPA</i>	0,025*	0,001*	-
<i>MMP8</i>	0,002*	0,005*	-
<i>IL6</i>	<0,001*	0,002*	-
<i>IL12a</i>	<0,001*	0,031*	-
<i>IL15</i>	<0,001*	0,003*	-
<i>IL1b</i>	0,002*	-	0,039*
<i>CD45</i>	0,004*	0,006*	-
<i>TNFa</i>	0,001*	-	-
<i>VEGFA121</i>	0,021*	0,005*	-
<i>BAX</i>	0,033*	0,015*	-
<i>VEGFA189</i>	0,006*	0,006*	-
<i>TLR7</i>	<0,001*	0,001*	-
<i>GATA3</i>	0,046*	-	-
<i>MMP11</i>	-	0,001*	-
<i>MYBL2</i>	-	0,018*	0,005*
<i>P16INK4A</i>	-	0,044*	-
<i>MMP7</i>	-	0,015*	-
<i>CD69</i>	-	0,042*	-
<i>VEGFA165</i>	-	0,010*	-
<i>KI67</i>	-	-	0,015*

Примечание. «\*» отличия достоверны ( $p < 0,05$ ); «-» отличия не достоверны.

Проведенный анализ показал, что неизменные ткани края резекции при КРР в отделах ТК имеют достоверные отличия. Ткани, полученные из прямой кишки, отличаются от тканей левой ОК по уровню экспрессии 30 маркеров разных групп (Таблица 19). Ткани правой ОК отличаются от тканей прямой кишки по уровню экспрессии 27 генов. Ткани края резекции правой и левой ОК достоверно отличаются по уровню экспрессии 8 маркеров. Таким образом правая и левая ОК имеют большее сходство по молекулярному фенотипу и отличаются от прямой кишки. Стоит отметить достоверные отличия отделов правой, левой ободочной и прямой кишки по уровню экспрессии регуляторов клеточного цикла – циклинов *CCND1*, *CCNB1* и корцептора клеточной поверхности *SCUBE2*, участвующего в VEGFR2-опосредованном ангиогенезе. Уровень экспрессии *CCND1* гена при физиологической норме у здоровых доноров был самым высоким в прямой кишке. Для тканей края резекции эта закономерность сохраняется.

### **3.1.3.2 Анализ экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при колоректальном раке в зависимости от клинико-морфологических характеристик опухоли**

Согласно литературным источникам, изменение экспрессии маркеров опухолевой инвазии, пролиферативной и апоптотической активности в опухолях пациентов с КРР может коррелировать с глубиной инвазии, лимфогенным и гематогенным метастазированием, степенью дифференцировки [3]. В зависимости от клинико-морфологических характеристик мы провели исследование неизменных тканей края резекции, полученных от пациентов с КРР во время хирургического лечения. Неизменные ткани края резекции были дополнительно сгруппированы согласно классификации ВОЗ в зависимости от распространенности опухолевого процесса (TNM), степени злокачественности опухоли (G), а также первично-множественного опухолевого процесса (ПММР и ПМСР), прогрессирования.

Вначале мы проанализировали взаимосвязь уровня экспрессии и стадии злокачественного процесса. В зависимости от глубины прорастания опухоли образцы неизмененных тканей распределились следующим образом: T1 – n=14; T2 – n=29; T3 – n=134; T4 – n=55. Данные о достоверном изменении ( $p < 0,05$ ) экспрессии в зависимости от глубины прорастания опухоли по классификации (ВОЗ) получены для 18 маркеров, которые представлены в таблице 20.

**Таблица 20** – Сравнение уровня экспрессии в группах неизмененных тканей края резекции в зависимости от глубины инвазии опухоли (Т)

Парное сравнение групп	Наименование гена	Среднее значение				p
		T1	T2	T3	T4	
T1/T2	<i>ESR1</i>	6,35	5,08			0,03*
	<i>P16INK4A</i>	6,85	7,55			0,05*
	<i>LIF</i>	6,33	8,68			0,02*
T2/T3	<i>BCL2</i>		7,06	7,75		0,03*
	<i>P14ARF (P19ARF)</i>		8,20	6,84		0,03*
	<i>MMP8</i>		8,41	6,65		0,05*
	<i>LIFR</i>		7,77	8,62		0,02*
T1/T3	<i>BAG1</i>	3,32		4,01		0,01*
	<i>CCNB1</i>	6,43		7,25		0,04*
T1/T4	<i>PTEN</i>	18,00			17,54	0,00*
	<i>BAG1</i>	3,32			3,91	0,01*
T3/T4	<i>CTSL2</i>			6,69	6,10	<0,01*
	<i>ESR1</i>			5,48	6,22	0,01*
	<i>IL10</i>			6,93	7,73	0,03*
	<i>TPA</i>			12,12	11,45	0,03*
	<i>CD56</i>			7,84	6,77	0,04*
	<i>CD69</i>			5,46	5,96	0,03*
	<i>TLR7</i>			6,56	6,01	0,04*
T2/T4	<i>ESR1</i>		5,08		6,22	0,01*
	<i>IL12a</i>		10,43		8,58	<0,01*
	<i>CD69</i>		5,24		5,96	0,04*

Примечание: «\*» отличия достоверны ( $p < 0,05$ ). (Т – критерий Стьюдента)

Мы можем наблюдать дисрегуляцию механизмов пролиферации и апоптоза в неизмененных тканях органа, пораженного опухолью. Так уровень экспрессии маркера опухолевой супрессии *P16INK4A*, регулирующего переход контрольной

точки клеточного цикла G0/G1, и многофункционального цитокина *LIF* достоверно увеличивался в группе T2 (прорастающая собственно мышечный слой), по сравнению с группой T1 (прорастающая подслизистый слой). Между группами T2 и T3 (опухоль инфильтрирует субсерозную оболочку или внебрюшинные перибодочные или периректальные ткани) отмечено снижение экспрессии матриксной металлопротеиназы *MMP8* и ингибитора циклинзависимой киназы *P14ARF*, также участвующего в прохождении контрольной точки G0/G1 клеточного цикла, в группе T3. В то же время уровень экспрессии циклина B1 (*CCNB1*), необходимого для перехода фазы G2 / M клеточного цикла, возрастает в группе T3 при сравнении с группой T1. Также с увеличением глубины инвазии возрастает уровень экспрессии ингибиторов митохондриального апоптоза *BCL2* (сравнение пар T2 / T3) и *BAG1* (сравнение пар T1/T3 и T1/T4). Можно отметить, что экспрессия факторов врожденного иммунного и воспалительного ответа в тканях края резекции также зависит от глубины опухолевой инвазии в окружающие ткани. Мы выяснили что, уровень экспрессии иммунорегулирующего цитокина *IL10* (ингибирует высвобождение провоспалительных цитокинов, включая гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор / GM-CSF, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор / G-CSF, ИЛ-1 альфа, ИЛ-1 бета, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-альфа) увеличивается при прорастании опухолью висцеральной брюшины и распространении на соседние органы. В группе T4 отмечена более низкая активность факторов врожденного иммунного ответа *TLR7* (индуцирует выработку провоспалительных цитокинов и интерферонов, необходимых для развития эффективного иммунитета) и *IL12a* (действует как фактор роста для активированных Т- и НК-клеток).

Интересным фактом в нашем исследовании является связь эстрогена и его рецептора *ESR*, с глубиной инвазии колоректальной опухоли. Согласно литературным данным, эстроген, выполняет физиологические функции не только в качестве полового стероидного гормона, но также в отношении роста или дифференцировки клеток [82].

Нами также проведено исследование зависимости уровня экспрессии генов от наличия лимфогенных метастазов. Были сформированы 3 группы больных: T<sub>1-4</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub> (n = 116); T<sub>1-4</sub> N<sub>1</sub> M<sub>0</sub> (n = 62); T<sub>1-4</sub> N<sub>2</sub> M<sub>0</sub> (n = 52). В таблице 21 представлены результаты анализа для генов, по которым получены достоверные отличия (p < 0,05).

**Таблица 21** – Сравнение уровня экспрессии в группах неизмененных тканей края резекции в зависимости от наличия лимфогенных метастазов

Гены	Среднее для групп		p	Среднее для групп		p	Среднее для групп		p
	N1	N0		N2	N0		N1	N2	
<i>KI67</i>	8,53	8,06	0,05	8,63	8,06	0,03*	8,53	8,63	0,64
<i>MMP9</i>	11,84	12,18	0,36	11,42	12,18	0,05*	11,84	11,42	0,28
<i>IL6</i>	7,24	9,14	0,01*	8,12	9,14	0,19	7,24	8,12	0,27
<i>IL1b</i>	15,16	15,57	0,37	14,56	15,57	0,04*	15,16	14,56	0,26
<i>VEGFA121</i>	3,49	3,76	0,03*	3,48	3,76	0,03*	3,49	3,48	0,99

Примечание: «\*» Отмечены достоверные отличия (p < 0,05). (T – критерий Стьюдента)

Исследование уровня экспрессии панели генов в зависимости от наличия лимфогенного метастазирования позволило выявить у пациентов группы T<sub>1-4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub> (поражены 3 и менее лимфоузла) достоверно более низкие средние значения экспрессии провоспалительного цитокина *IL6* и фактора сосудистого роста *VEGFA121* при сравнении пар N1/ N0. В группе пациентов T<sub>1-4</sub> N<sub>2</sub> M<sub>0</sub> (поражены более 3 лимфоузлов) определен более высокий уровень экспрессии прямого маркера пролиферативной активности *KI67* и более низкие значения экспрессии матриксной металлопротеиназы *MMP9*, медиатора воспалительной реакции интерлейкина 1В (*IL1b*) и фактора сосудистого роста *VEGFA121*. Сравнение групп N1/ N2 показало отсутствие достоверных отличий в неизмененных тканях толстой кишки края резекции для маркеров нашей панели. Далее мы проанализировали экспрессию панели генов в неизмененных тканях у пациентов с отдаленными метастазами.

В группе пациентов с отдаленным метастазированием T<sub>1-4</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>1</sub> (n= 65) определены достоверно более низкие значения экспрессии 11 маркеров (p<0,05), чем в группе пациентов без отдаленных метастазов T<sub>1-4</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> (n = 166) (Таблица 22). Исключением является катепсин L2 (*CTSL2*). В ряде исследований отмечено, что этот ген экспрессируется в колоректальной карциноме и карциноме молочной железы, но не экспрессируется в нормальной толстой кишке, или перитуморальных тканях, что предполагает возможную роль этого гена в опухолевых процессах [146].

**Таблица 22** – Сравнение уровня экспрессии в группах неизмененных тканей края резекции в зависимости от наличия отдаленных метастазов (M)

Гены	Среднее для группы M <sub>0</sub>	Среднее для группы M <sub>1</sub>	p
<i>CTSL2</i>	6,38	6,82	0,02*
<i>GNLY</i>	14,18	12,86	0,03*
<i>P14ARF</i> ( <i>P19ARF</i> )	7,37	6,25	0,01*
<i>IGF2</i>	10,54	9,34	0,04*
<i>CYP19A</i>	8,38	6,88	0,04*
<i>MMP7</i>	6,72	5,64	0,02*
<i>IL6</i>	8,96	6,93	<0,01*
<i>IL1b</i>	15,52	14,50	0,02*
<i>IL10</i>	7,42	6,58	0,02*
<i>IFNg</i>	8,38	7,58	0,04*
<i>CD69</i>	5,72	5,20	0,02*
<i>LGALS1</i>	12,55	11,15	0,02*

Примечание: «\*» Отмечены достоверные отличия (p<0,05). (Т–критерий Стьюдента)

Мы проанализировали уровень экспрессии в неизмененных тканях края резекции в зависимости от дифференцировки опухоли: высокодифференцированная аденокарцинома (G1; n=113), умеренно дифференцированная аденокарцинома (G2; n=91), низкодифференцированная аденокарцинома (G3; n=16). Сравнение проводили по Т - критерию Стьюдента в парах. В таблице 23 представлены гены, по которым получены достоверные отличия.

**Таблица 23** – Парное сравнение групп неизмененных тканей края резекции в зависимости от степени злокачественности опухоли (G)

Наименование гена	Сравнение групп Среднее		P	Сравнение групп Среднее		P	Сравнение групп Среднее		P
	G1 / G2	G2 / G3		G1 / G3					
<i>BCL2</i>	7,95	7,35	0,01*	7,35	7,27	0,87	7,95	7,27	0,06
<i>NDRG1</i>	10,14	9,18	0,03*	9,18	8,97	0,81	10,14	8,97	0,17
<i>KI67</i>	8,37	8,13	0,26	8,13	9,13	0,03*	8,37	9,13	0,02*
<i>TERT</i>	8,75	8,95	0,36	8,95	9,65	0,12	8,75	9,65	0,03*
<i>MYBL2</i>	7,37	7,11	0,26	7,11	8,09	0,06	7,37	8,09	0,04*
<i>GNLY</i>	13,14	14,54	0,02*	14,54	15,19	0,62	13,14	15,19	0,05*
<i>CYP19A</i>	7,48	8,98	0,04*	8,98	7,41	0,30	7,48	7,41	0,95
<i>MMP8</i>	6,54	8,01	0,01*	8,01	7,65	0,78	6,54	7,65	0,21
<i>IL6</i>	7,88	9,23	0,04*	9,23	8,25	0,48	7,88	8,25	0,76
<i>TLR7</i>	6,59	5,98	0,02*	5,98	6,47	0,33	6,59	6,47	0,79

Примечание. «\*» Отмечены достоверные отличия (p<0,05). (T– критерий Стьюдента)

Как следует из данных таблицы, уровень экспрессии в неизмененных тканях края резекции зависит от гистологического типа опухоли. Мы определили статистически достоверное увеличение экспрессии прямого маркера пролиферативной активности *KI67* при сравнении пар G1 / G3 и G2 / G3. Обращает на себя внимание факт, что в неизмененных тканях, полученных от пациентов с умеренно дифференцированной аденокарциномой (G2), обнаружен более высокий уровень матриксной металлопротеиназы *MMP8* – маркера, значимого в опухолевой инвазии. Также определены более высокие значения провоспалительного интерлейкина *IL6*, эстроген синтетазы *CYP19A*, маркера *GNLY*, кодирующего антимикробный белок, присутствующий в гранулах цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров. Более низкие значения показаны для маркера врожденного иммунного ответа *TLR7*, *NDRG1*.

При анализе экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при колоректальном раке в зависимости от наличия первично-множественного рака. Было показано, что в группе пациентов (n=22) с первично-множественным метакронным и синхронным раком (ПММР; ПМСР) определены более высокие



значения экспрессии *TERT* ( $p=0,049$ ) при сравнении с группой больных первичным раком толстой кишки ( $n=140$ ) (9,52 и 8,76 соответственно). Для остальных генов нашей панели отличия уровня экспрессии не достигают статистической значимости.

### 3.1.3.3 Анализ экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при колоректальном раке в зависимости от прогрессирования заболевания

Мы обнаружили, что в группе больных с последующим прогрессированием ( $n=63$ ) колоректального рака достоверно более высокий средний уровень экспрессии маркеров *CCND1*, *BAG1*, *ESR1*, *LIFR* и ниже значения экспрессии *IL15*, чем в группе без прогрессирования ( $n=160$ ) (Таблица 24).

**Таблица 24** – Отличия среднего значения экспрессии генов ( $p<0,05$ ) при сравнении неизмененных тканей края резекции у пациентов без прогрессирования и с прогрессированием КРР

Наименование гена	Среднее Без прогрессирования	Среднее Прогрессирование	p
<i>CCND1</i>	8,42	8,84	0,005*
<i>BAG1</i>	3,81	4,11	0,029*
<i>ESR1</i>	5,45	6,17	0,008*
<i>IL15</i>	7,3	6,49	0,025*
<i>LIFR</i>	8,20	8,78	0,034*

Примечания: «\*» Отмечены достоверные отличия ( $p<0,05$ ). (Т – критерий Стьюдента)

Эти гены входят в функциональный кластер пролиферативной активности, ингибирования апоптоза и отвечают за клеточную дифференцировку. Мембранный белок *BAG1*, кодируемый этим геном, связывается с *BCL2* и блокирует одну из ступеней сигнального пути, ведущих к апоптозу. Он усиливает антиапоптотические эффекты *BCL2*, взаимодействуя с рецепторами фактора роста и антиапоптотическими механизмами. Мутации, амплификация и сверхэкспрессия гена *CCND1* в комплексе с *CDK4/CDK6* регулирует клеточный цикл во время перехода G (1) / S. Этот ген также непосредственно участвует в сигнальном пути Wnt. Белок, кодируемый геном *IL15*, регулирует активацию и

пролиферацию Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров, вызывает активацию киназ JAK. Исследования на мышах показали, что этот цитокин может увеличивать экспрессию ингибитора апоптоза BCL2L1 / BCL-x (L), возможно, за счет активности активации транскрипции STAT6, и, таким образом, предотвращать апоптоз. IL15 с помощью G-белка участвует в передаче сигналов ГТФазы семейства Ras и киназных каскадах. Рецептор эстрогена 1 ESR1 оказывает влияние на клеточную пролиферацию и дифференцировку в тканях-мишенях.

Подводя общий итог анализу неизмененных тканей края резекции с учетом клинично-морфологических характеристик КРР, можно заключить, что существует взаимосвязь уровня экспрессии ряда генов с отделом толстой кишки, в котором расположена опухоль, стадией злокачественных новообразований, морфологическими характеристиками, гистологическим типом опухоли, и прогрессированием заболевания.

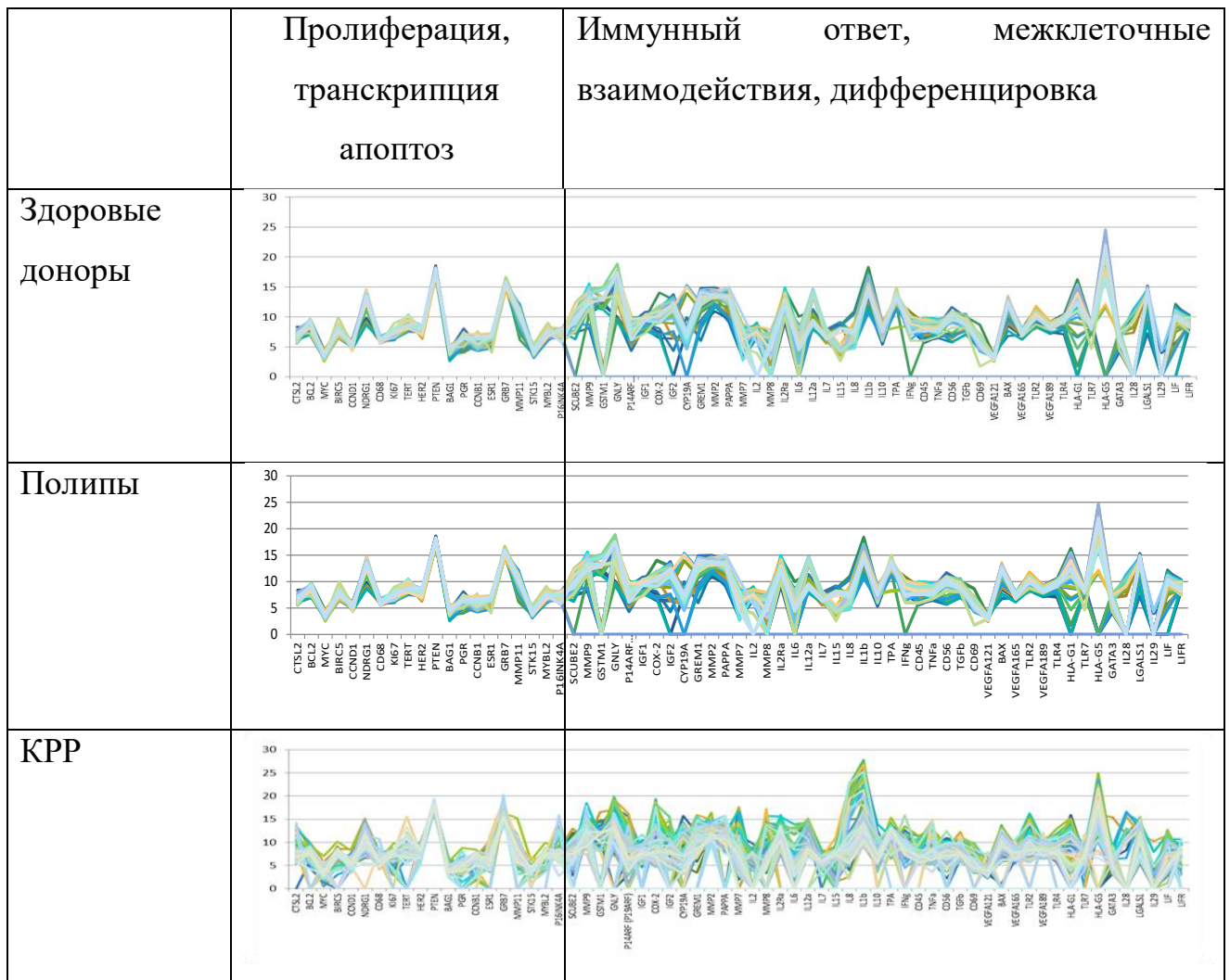
#### **3.1.3.4 Анализ экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки при колоректальном раке в зависимости от пола**

В группе пациентов с КРР было 129 мужчин и 103 женщины. Анализ зависимости уровня экспрессии в неизмененных тканях от пола пациента показал достоверно более высокие значения маркера активности эстрогена *ESR1* и фактора макрофагов *CD68* у женщин, чем у мужчин (*ESR1* – 5,95 и 5,45  $p=0,03$ ; *CD68* – 5,80 и 5,58  $p=0,03$ ).

#### **Заключение**

Суммируя полученные результаты при анализе фенотипических отличий неизмененных тканей в норме и при патологии, мы определили схожие закономерности для прямой кишки: молекулярный фенотип этого отдела, по-видимому, имеет существенные отличия от других отделов ТК, которые присутствуют в норме и сохраняются при патологии в толстой кишке. Результаты исследования экспрессии генов в образцах здоровых доноров и пациентов с полипозом иллюстрируют сходство экспрессионных профилей слизистой в

отделах толстой кишки для этих групп. На графиках, построенных по значениям экспрессии каждого пациента, показано фенотипическое сходство групп тканей здоровых доноров и пациентов с полипами. Можно подчеркнуть – стабильный уровень экспрессии маркеров апоптоза, пролиферации и транскрипционных факторов. В образцах слизистой толстой кишки при КРР, наоборот, отмечается высокая вариабельность уровня экспрессии большинства генов по сравнению с двумя другими группами, и особенно генов, регулирующих иммунный ответ. (Рисунок 8).



**Рисунок 8** – Сравнение экспрессионных фенотипов морфологически неизмененного эпителия тканей кишки: здоровых доноров, пациентов с полипами и КРР

В тоже время уровень экспрессии генов в неизменной ткани толстой кишки при полипах коррелирует со степенью дисплазии эпителиальных клеток и

гистологическим типом полипа. Уровень экспрессии генов в неизмененной ткани толстой кишки при колоректальном раке также коррелирует с клинико-морфологическими характеристиками злокачественного процесса.

### **3.2 Второй этап исследования. Оценка возможности использования клеточного материала соскобов из прямой кишки, как объекта для молекулярно-генетического исследования патологических процессов в толстой кишке**

В связи со сложностью дифференциальной диагностики в морфологии возникает необходимость разработки технологий для создания карт молекулярных профилей тканей при доброкачественных и злокачественных процессах. Эти технологии могут являться современными объективными инструментами для предсказания и поддержки принятия решений врачом по дальнейшему обследованию пациентов и выбору тактики лечения. Ключевой задачей нашего исследования является оценка возможности использования дискриминантной модели кластеризации по экспрессионному фенотипу для диагностики патологического процесса в толстой кишке. В разделе дано описание возможностей статистической программы и модуля дискриминантного анализа для построения модели дифференциальной диагностики патологии в толстой кишке.

Особенностью дизайна исследования являлось изучение экспрессионного фенотипа во всех отделах толстой кишки независимо от локализации патологического процесса. Т.е. опухоль, полип или участки воспаления могли локализоваться в любом анатомическом отделе. С определенной точки зрения наибольший интерес представляют изменения уровня экспрессии генов в прямой кишке, как в наиболее доступном отделе для забора биологического материала. С целью оценки возможности дифференциальной диагностики по материалу соскоба из прямой кишки была сформирована группа проверки алгоритма. Для анализа были взяты соскобы у здоровых доноров, пациентов с неспецифическим язвенным колитом, полипозом в ТК и колоректальным раком. Для этих образцов

было сделано цитологическое исследование. После проведения цитологического исследования, подтверждающего отсутствие опухолевых клеток в биологическом материале, ткани были сгруппированы в зависимости от патологии: полипоз (n=18), НЯК (n=54), КРР (n=46). В контрольную группу «норма» (n=61) вошли пациенты без злокачественной, доброкачественной гиперпролиферативной и воспалительной патологии в ТК на момент проведения колоноскопии.

### **3.2.1 Сравнение профиля экспрессии генов в тканях толстой кишки в зависимости от типа патологического процесса**

В практическом плане важен вопрос выбора генов – кандидатов для дифференциальной диагностики патологии в ТК. На первом этапе статистического анализа мы сравнили уровень экспрессии для сформированных групп в парах. Значения экспрессии были логарифмированы по основанию 2, что позволило использовать параметрический Т- тест Стьюдента. Сравнение пары «норма – полипоз» показало достоверные отличия среднего значения экспрессии генов: *IL6*, *MMP8*, *CD56*, *GSTM1*. Уровень экспрессии *IL6*, *MMP8*, *GSTM1* был ниже, а *CD56* выше в группе «полипоз». Остальные 58 генов не имели достоверных отличий. Сравнение пары «норма – КРР» показало достоверные отличия среднего значения экспрессии 22 генов: *MYC*, *MMP11*, *STK15*, *MYBL2*, *MMP9*, *COX-2*, *CD45*, *CD56*, *TGFb*, *CD69*, *VEGFA121*, *CTSL2*, *CCND1*, *KI67*, *GNLY*, *IGF2*, *GREM1*, *PAPPA*, *IL8*, *TNFa*, *BAX*, *TLR4*. Уровень экспрессии 21 гена в группе «КРР» был выше, чем в «норме», за исключением *CTSL2*. Сравнение пары «норма – неспецифический колит» показало достоверные отличия среднего значения экспрессии 36 генов. В группе «неспецифический колит» отмечен более высокий, чем в «норме» уровень экспрессии 25 генов: *BIRC5*, *KI67*, *PTEN*, *CCNB1*, *MYBL2*, *MYC*, *STK15*, *MMP8*, *MMP9*, *MMP11*, *PAPPA*, *CD45*, *CD56*, *CD69*, *VEGFA121*, *PGR*, *GNLY*, *COX-2*, *GREM1*, *IL2Ra*, *IL8*, *IL10*, *IFNg*, *TLR4*, *LIF*.

Значения ниже, чем в «норме» получены для 11 маркеров: *CTSL2*, *CCND1*, *HER2*, *BAG1*, *GRB7*, *P16INK4A*, *P14ARF* (*P19ARF*), *MMP2*, *IL7*, *IL15*, *ESR1*. При сравнении групп «полипоз – КРР» получены достоверные отличия средних

значений экспрессии для 16 генов. Уровень экспрессии в группе «КРР» был выше для 15 генов: *MYC*, *MYBL2*, *CCND*, *MMP9*, *COX-2*, *GREM1*, *MMP8*, *IL1b*, *IL6*, *IL8*, *CD45*, *CD69*, *TNFa*, *TLR2*, *TLR4*. И только *IL7* показал более высокие значения среднего уровня экспрессии в группе «полипоз».

Таким образом, результаты анализа соскобов из прямой кишки иллюстрируют сходство экспрессионного фенотипа эпителиальных тканей у здоровых людей и пациентов с полипозом ТК. По таким характеристикам, как активность пролиферации, транскрипции и уровень экспрессии маркеров апоптоза профиль экспрессии неизмененных тканей при полипах близок к нормальной ткани. Аналогичный результат мы получили на первом этапе исследования биопсийного материала для всех отделов толстой кишки. На основании результатов Т-критерия были выбраны гены - возможные кандидаты для дифференциальной диагностики патологии в толстой кишке.

### **3.2.2 Оценка возможности использования анализа профиля экспрессии генов клеточного материала соскоба из прямой кишки для дифференциальной диагностики патологических процессов в толстой кишке**

На следующем этапе мы оценили возможность классифицировать образцы на группы: практически здоровые, доброкачественная гиперпролиферативная патология (полипы), воспалительные заболевания (неспецифический колит), КРР. Анализ с пошаговым включением переменных (генов) в модель дискриминантных функций показал возможность модели дифференцировать соскобы неизменной слизистой из прямой кишки пациентов с КРР и неспецифическим колитом от соскобов условно здоровых доноров. Общая правильность классификации составляет 87%. При этом, образцы нормальной слизистой здоровых доноров определяются с точностью до 95%, т.е. с низким количеством ложноположительных результатов. (Таблица 25).

**Таблица 25** – Классификационная матрица фенотипических отличий тканей прямой кишки для групп «норма», «Неспецифический колит», «МНТ при полипах», «МНТ при КРР»

Наблюдаемые группы	Частота совпадения классификации %	Распределение в группы ткани согласно дискриминантной модели (n)			
		Норма	МНТ при полипах	Неспецифический колит	МНТ при КРР
Норма	95,08	58	1	0	2
МНТ при полипах	44,44	10	8	0	0
Неспецифический колит	92,73	2	0	51	2
МНТ при КРР	86,36	5	0	1	38
Всего	87,08	75	9	52	42

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

Мы провели анализ ошибок классификации для каждой из групп. В группе «норма» 2 образца были распределены в «МНТ при КРР» и один в «МНТ при полипах». Изучение анамнеза этих пациентов показало, что в одном случае у пациента ранее был диагностирован рак С18.1 червеобразного отростка Т3N0Mo 2 ст. Было проведено комбинированное лечение. Состояние после правосторонней гемиколэктомии. На момент проведения контрольной видеокколоноскопии в зоне анастомоза и проксимально на протяжении 3.0 см в тонкую кишку распространяется инфильтрация слизистой оболочки с наложениями светлого фибрина. Заключение: эрозивный энтерит? Рецидив С-г? в зоне анастомоза. При дальнейшем исследовании у пациента определено прогрессирование и МТС в повздошные лимфоузлы. В дальнейшем исследовании этот образец был исключен из группы «норма». В двух случаях для образцов группы «норма» ошибочно распределившихся в «МНТ при КРР» и «МНТ при полипах» отсутствует анамнез сопутствующих заболеваний.

Анализ корректности классификации для группы «МНТ при КРР» показал ошибку распределения 13,7%. В одном случае образец с вероятностью 76% был классифицирован как «неспецифический колит». Изучение анамнеза показало, что пациенту на момент исследования было проведено 4 курса неoadьювантной химиотерапии. Согласно гистологическому заключению, опухоль представлена аденокарциномой с признаками лечебного патоморфоза 1 степени. Мы предполагаем наличие у этого пациента изменений воспалительного характера, связанных с проведенной терапией. В 4 случаях распределения образцов «МНТ при КРР» в группу «норма» опухоль располагалась в проксимальных отделах ТК: в 2 случаях – в восходящем отделе ТК, 2 случаях – в селезеночном изгибе. В 1 случае опухоль располагалась в верхнем ампулярном отделе прямой кишки. При этом у пациента отсутствовали регионарные и отдаленные метастазы (T3N0M0). Анализ верно распределившихся образцов неизмененных тканей при колоректальном раке показал, что в 15 случаях опухоль располагалась в отделе прямой кишки, в 6 случаях – в сигмовидном отделе, в 1 случае – в нисходящем отделе, 1 случай в селезеночном изгибе, 2 – в печеночном изгибе и 4 случая в восходящем отделе и слепой кишке. Для 8 пациентов отсутствовали данные об анатомическом расположении первичной опухоли.

Наибольшую ошибку в модель внесли образцы неизмененных тканей при полипах. Точность распределения образцов группы «МНТ при полипах» составила 44,44%. Оказалось, что все образцы неизмененных тканей при полипах делятся на два разных класса один из которых, по таким характеристикам, как активность пролиферации и уровень экспрессии маркеров апоптоза, близок к ткани здоровых доноров, а второй класс по этим характеристикам близок к неизменной ткани при патологии. В предыдущем исследовании средних значений уровня экспрессии для групп неизмененных тканей по T-критерию Стьюдента было показано достоверное отличие 3 маркеров *IL6*, *MMP8*, *CD56* в паре «норма» - «МНТ при полипах». Уровень экспрессии 59 маркеров от «нормы» не отличался. Т.о молекулярно-генетические характеристики неизменной ткани при полипах могут, по-видимому, быть разделены на прогностически



благоприятную группу, с низким уровнем пролиферации и группу с менее благоприятным прогнозом – с высоким уровнем пролиферации клеток и началом нарушения контроля апоптоза. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят более точно ответить на этот вопрос. Стоит отметить, что ни один образец неизменной ткани при полипах не был распределен в злокачественную и воспалительную патологию.

Анализ ошибок распределения образцов неизменной ткани при полипах в группу «норма» показал, что во всех случаях диаметр образования не превышал 0,5 см. В 3 случаях гиперпластические полиповидные утолщения и участки очаговой гиперплазии были расположены в слепой кишке (гиперпластические полипы, лимфофолликулярная аденома). В 1 случае в поперечной ободочной кишке диагностирована тубулярная аденома до 0,5 см с дисплазией низкой степени, в 1 случае – выявлен формирующийся полип до 0,2 см (гиперпластический полип). В 1 случае в нисходящей кишке диагностирована тубулярная аденома с умеренной дисплазией кишечного эпителия. В прямой кишке в 2 случаях выявлена очаговая гиперплазия слизистой оболочки (гиперпластические полипы) и в 1 случае полип на широком основании villous структуры размерами 0,2 x 0,4 x 0,3 см (тубулярная аденома).

Анализ верно распределившихся в группу «МНТ при полипах» 8 образцов показал, что в 4 случаях у пациентов также диагностированы органические изменения ТК: дивертикулез, геморрой, дискинезия. В 1 случае у пациента диагностирована тубулярно-ворсинчатая аденома villous структуры 5,0 x 5,0 x 3,0 см с умеренной и тяжелой дисплазией кишечного эпителия, которая располагалась на баугиниевой заслонке. В 2 случаях у пациентов диагностирована тубулярная аденома прямой кишки со слабой дисплазией. В 4 случаях – гиперпластические полипы.

Исследование ошибок для группы «неспецифический колит», к сожалению, не представляется возможным из-за отсутствия данных о ремиссии или активном воспалительном процессе на момент обследования этих пациентов. В то же время, данная группа образцов определяется с точностью 92%, что указывает на

характерный фенотип, связанный с воспалительным процессом. Согласно литературным источникам, развитие дисплазии при язвенном колите и спорадической аденоме может идти разными генетическими путями [120,141].

Стоит отметить, что при проведении цитологического исследования соскоба из нижеампулярного отдела прямой кишки у здоровых доноров, пациентов с полипами ТК и КРР не обнаружены интраэпителиальные изменения и злокачественные процессы (NILM).

Согласно цитограмме, исследуемый материал, полученный от здоровых доноров, представлен цилиндрическим эпителием, плоскоэпителиальными клетками преимущественно поверхностных, промежуточных слоев. У ряда пациентов с полипозом в материале соскоба также присутствуют отдельные клетки метаплазированного эпителия и эритроциты. У пациентов с колоректальным раком в исследуемых образцах обнаружены нейтрофильные лейкоциты в умеренном и значительном количестве, единичные плоскоэпителиальные клетки преимущественно поверхностных слоев с признаками гиперкератоза.

У одного из пациентов с раком с/а отдела прямой кишки, получившим предоперационный курс 3D конформной дистанционной лучевой терапии, при проведении цитологического исследования в соскобе обнаружены нейтрофильные лейкоциты, цилиндрический эпителий, метаплазированный эпителий, плоскоэпителиальные клетки преимущественно поверхностных слоев, отдельные с признаками гиперкератоза, плоскоэпителиальные клетки с выраженными дискариозом, в том числе многоядерные, что может соответствовать послелучевым изменениям. Обнаружены единичные клетки железистого эпителия с выраженным дискариозом – AGC (атипичные клетки железистого эпителия).

Таким образом, изменения уровня экспрессии в морфологически неизмененных тканях при патологии в толстой кишке могут быть связаны не только с изменениями доминирующей составляющей эпителия, а также с миграцией нейтрофилов и лимфоцитов в эпителиальные ткани. Эти клетки

врожденной иммунной защиты играют важную роль в развитии раковых опухолей, что отражено в ряде современных обзоров [50,140]. Использование современных молекулярно-генетических технологий позволило получить новые данные об участии нейтрофилов на всех стадиях процесса канцерогенеза: от инициации опухолевого генотипа до инвазивного роста и метастазирования злокачественной опухоли. По результатам этих исследований установлена ведущая роль нейтрофилов в канцерогенезе, связанная с их способностью изменять поведение других иммунокомпетентных клеток в развитии опухолевого процесса [123].

### 3.2.2.1 Анализ экспрессии генов в морфологически неизменном эпителии прямой кишки пациентов с диагнозом КРР

При решении задачи классификации на меньшее количество групп, процент правильности классификации в модели увеличивается. Если ставить задачу дифференциальной диагностики, то ее можно разбить на несколько этапов. На следующем этапе работы с помощью дискриминантного анализа мы анализировали возможность дифференцировать соскобы неизменной слизистой из прямой кишки пациентов с КРР от соскобов условно здоровых доноров (Таблица 26).

**Таблица 26** – Классификационная матрица фенотипических отличий тканей прямой кишки в группах «норма» и «КРР»

Наблюдаемые группы	Частота совпадения классификации %	Распределение по группам ткани согласно дискриминантной модели (n)	
		МНТ при КРР	Норма
МНТ при КРР	86,36	38	6
Норма	100,00	0	61
Точность модели	94,28	38	67

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

При классификации двух групп, образцы нормальной слизистой здоровых доноров распределились с точностью 100%, т.е. с отсутствием ложноположительных результатов, что важно с точки зрения возможного применения метода в качестве скрининга. Образцы неизменной ткани из прямой кишки пациентов с КРР были правильно распределены в свою группу в 86,36% случаев (чувствительность). В модель были включены 16 генов – кандидатов из функциональных групп пролиферации, межклеточных взаимодействий, немедленного воспалительного ответа, врожденного иммунного ответа, дифференцировки, рецепторного статуса (Таблица 27).

**Таблица 27** – 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 пациентов колоректальным раком

Наименование гена	Уилкса - Лямбда	Частная - Лямбда	Значение p
<i>MYC</i>	0,32	0,94	0,02*
<i>CD56</i>	0,38	0,79	0,00*
<i>COX-2</i>	0,35	0,85	0,00*
<i>P16INK4A</i>	0,31	0,98	0,14
<i>PTEN</i>	0,36	0,84	0,00*
<i>GREM1</i>	0,37	0,81	0,00*
<i>IL7</i>	0,36	0,82	0,00*
<i>TLR2</i>	0,36	0,82	0,00*
<i>IL8</i>	0,40	0,76	0,00*
<i>GNLY</i>	0,31	0,96	0,05*
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	0,32	0,94	0,02*
<i>HER2</i>	0,32	0,93	0,01*
<i>MMP9</i>	0,32	0,95	0,03*
<i>P14ARF (P19ARF)</i>	0,31	0,96	0,06
<i>CCNB1</i>	0,31	0,95	0,04*
<i>TPA</i>	0,31	0,98	0,15
Примечание: «*» отличия достоверны (p<0,05)			

Анализ корректности классификации образцов показал, что в группу «норма» распределились те же 5 образцов «МНТ при КРР», как в случае

классификации на 4 группы тканей (Таблица 25). На основании полученных данных маркеры *MYC*, *CD56*, *COX-2*, *P16INK4A*, *PTEN*, *GREM1*, *IL7*, *TLR2*, *IL8*, *GPLY*, *TNF $\alpha$* , *HER2*, *MMP9*, *P14ARF* (*P19ARF*), *CCNB1*, *TPA* можно рассматривать в качестве потенциальных диагностических маркеров для скрининга КРР. Чувствительность теста составляет 86,3% при уровне специфичности 100%.

Как известно, гистологическое заключение о наличии или об отсутствии дисплазии в качестве предшественника карциномы дается на основании исследования материала биопсии из участка патологического очага. В то же время в ряде случаев провести дифференцирование дисплазии от неопластических изменений слизистой оболочки ЖКТ достаточно трудно. Диагноз дисплазии сложен при редких, плоских формах поражений слизистой оболочки, при воспалительных заболеваниях. Нередко постановка диагноза возможна только при полном удалении патологического очага с последующим морфологическим изучением полученного материала. Таким образом, возрастает риск ошибочной диагностики рака у конкретных больных. Мы оценили возможность модели дискриминантного анализа дифференцировать доброкачественную гиперпролиферативную патологию (полипы ТК) от злокачественной патологии (КРР). С использованием пошагового метода в модель включали разное количество переменных. Включение в модель 23 маркеров показало высокую точность в 98,4% (Таблица 28).

**Таблица 28** – Классификационная матрица фенотипических отличий тканей прямой кишки в группах «МНТ при полипах» и «МНТ при КРР»

Наблюдаемые группы	Частота совпадения классификация %	Распределение по группам ткани согласно дискриминантной модели (n)	
		МНТ при КРР	МНТ при полипах
МНТ при КРР	100	44	0
МНТ при полипах	94,4444	1	17
Точность модели	98,3871	45	17

Молекулярный фенотип морфологически неизменной ткани прямой кишки при КРР отличался от МНТ при полипах. При этом опухоль и полип располагались как в проксимальных, так и дистальных отделах ТК. У пациента, образец ткани которого ошибочно классифицирован как рак, согласно анамнезу, на видеокOLONоскопии в прямой кишке выявлено более 10 полиповидных утолщения (участки гиперплазии). Переменные (гены) включенные в модель классификации: *MYC*, *CCNB1*, *CCND1*, *P14ARF (P19ARF)*, *STK15*, *BAX*, *IL2Ra*, *COX-2*, *IL2*, *IL7*, *IL8*, *IL12a*, *GREM*, *LGALS1*, *IGF2*, *TGFb*, *VEGFA165*, *VEGFA189*, *CD56*, *TLR2*, *MMP8*, *MMP9*, *TPA*.

### 3.2.2.2 Анализ экспрессии генов в морфологически неизменном эпителии прямой кишки пациентов с доброкачественными гиперпролиферативными процессами в толстой кишке

Дискриминантный анализ для групп «норма» и «МНТ полипа» в парном сравнении провести не удалось из-за отсутствия дисперсии между этими группами. С целью возможности дифференцировки образцов МНТ при доброкачественной патологии была построена дискриминантная модель для трех групп: «норма», «МНТ полипа» и «МНТ при КРР» (Таблица 29).

**Таблица 29** – Классификационная матрица фенотипических отличий тканей прямой кишки в группах «норма» «МНТ при полипах» и «МНТ при КРР»

Наблюдаемые группы	Правильная Классификация %	Распределение по группам согласно модели (n)		
		Норма	МНТ при полипах	МНТ при КРР
Норма	96,72	59	1	1
МНТ при полипах	72,22	5	13	0
МНТ при КРР	90,91	4	0	40
Точность модели	91,06	68	14	41

Точность дифференцировки соскобов неизменной слизистой из прямой кишки пациентов с полипами ТК от соскобов условно здоровых доноров составила 72%. Мы провели анализ ошибок распределения 5 образцов

неизменной ткани при полипах в группу «норма». В 3 случаях у пациентов при исследовании были определены участки очаговой гиперплазии и полиповидные утолщения менее 0,3 см в диаметре, классифицированные как гиперпластические полипы. В 1 случае была диагностирована тубулярная аденома нисходящего отдела. Еще в 1 случае была диагностирована тубулярная аденома менее 0,4 см в диаметре в сигмовидном отделе. Анализ ошибок классификации образцов МНТ при КРР показал, что это те же образцы из проксимальных отделов ТК (Таблица 26), которые ошибочно распределились в группу «норма» в дискриминантной модели, построенной для групп «норма» и «МНТ при КРР». При включении в дискриминантный анализ 3 групп и большего числа генов возросла точность классификации группы «МНТ при КРР» с 86,3% до 90,9%. Гены в модели: *COX-2, MYC, NDRG1, CTSL2, GREM1, TLR2, P14ARF (P19ARF), IL12a, IGF2, MMP9, IL7, IL8, IL1b, CCND1, GRB7, HER2, TNF $\alpha$ , LIF, CD56, BCL2, STK15, BIRC5, LIFR, CD68, TERT, MMP11, MMP8, ESR1*.

### 3.2.2.3 Анализ экспрессии генов в морфологически неизменном эпителии прямой кишки пациентов с неспецифическим язвенным колитом

Анализ дифференциации молекулярных фенотипов неизменной слизистой прямой кишки при сравнении групп здоровых доноров и воспалительной патологии в ТК показал, что с достоверностью 90% можно выделить группу пациентов с колитами разной этиологии. Группа здоровых доноров классифицируется с точностью 100%. Общая точность модели классификации составила 95,76% (Таблица 30).

**Таблица 30** – Классификационная матрица фенотипических отличий тканей прямой кишки в группах «норма» и «неспецифический колит»

Наблюдаемые группы	Правильная классификация %	Распределение по группам согласно модели (n)	
		Неспецифический колит	Норма
Неспецифический колит	90,91	50	5
Норма	100	0	63
Точность модели	95,76	50	68

Гены, вошедшие в модель дифференциальной диагностики воспалительной патологии ТК: ингибитор апоптоза *BCL2*, маркеры пролиферации *MYC*, *P16INK4A*, провоспалительные цитокины *IL7*, *IL8*, фактор некроза опухоли *TNF $\alpha$* .

### **3.3 Определение оптимальной панели биомаркеров для диагностики патологического процесса в толстой кишке. Алгоритм применения полученной панели генов в обследовании пациентов с патологией в толстой кишке**

В нашей работе на первом этапе мы определили, что уровень экспрессии генов зависит от отдела ТК, клинико-морфологических характеристик злокачественного и доброкачественного опухолевого процесса. Изменения начинаются еще при возникновении доброкачественного новообразования. Мы осуществили поиск маркеров, комплексное исследование которых позволило бы отличить здоровую слизистую оболочку доноров от слизистой оболочки ТК пациентов с морфологически подтвержденным КРР и предраком толстой кишки (хронические воспалительные заболевания, полипы толстой кишки) на основе изменения экспрессии мРНК в клеточном материале соскобов из прямой кишки.

В основе разработанной модели дифференциальной диагностики лежит исследование экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР). В главе «Материалы и методы» представлено краткое описание 65 генов (62 функциональных и 3 контрольных), включенных в общую панель. Для удобства интерпретации результатов гены сформированы в кластеры в зависимости от доминирующей функциональной активности. Уровень экспрессии функциональных генов рассчитывается относительно референсных генов. Мы посчитали наиболее целесообразным использовать нормировку на несколько генов для нивелирования их возможных колебаний уровня экспрессии. В качестве контрольных были выбраны гены *GUSB*, *B2M* и *HPRT*. Выбор был сделан на основании результатов ряда исследований [56,59,97]. Далее, значения, полученные в результате расчета (условные единицы – у.е.), были логарифмированы по основанию 2, что позволило использовать



параметрические критерии для нормального распределения входных данных. Полученные значения являются основой для включения в алгоритм решения диагностической задачи определения патологии в толстой кишке в модуле дискриминантного анализа. Уровень экспрессии каждого гена является переменной в дискриминантной модели. Комплексная оценка уровня экспрессии, определяющего активность процессов пролиферации, транскрипции, апоптоза, врожденного и воспалительного иммунного ответа, взаимодействия с внеклеточным матриксом, факторов роста и других, позволяет с большой точностью определить вероятность принадлежности исследуемого образца к определенной группе (типу патологии в толстой кишке). Задачу диагностики патологии в ТК можно разделить на несколько этапов. Например, на первом этапе можно классифицировать образцы на 3 группы: практически здоровые, КРР и воспалительные заболевания, при этом общая правильность классификации составляет 93%. При решении задачи классификации на меньшее количество групп, процент правильности классификации увеличивается. Так модель, включающая 16 маркеров: *MYC*, *CD56*, *COX-2*, *P16INK4A*, *PTEN*, *GREM1*, *IL7*, *TLR2*, *IL8*, *GPLY*, *TNF $\alpha$* , *HER2*, *MMP9*, *P14ARF (P19ARF)*, *CCNB1*, *TPA* позволяет по материалу соскоба из прямой кишки дифференцировать «норму» от колоректального рака. На основании полученных данных эти маркеры можно рассматривать в качестве потенциальных кандидатов для скрининга КРР. Чувствительность теста составляет 86,3% при уровне специфичности 100%. Модель дифференциальной диагностики воспалительной патологии включает 6 генов: ингибитор апоптоза *BCL2*, маркеры пролиферации *MYC*, *P16INK4A*, провоспалительные цитокины *IL7*, *IL8*, фактор некроза опухоли *TNF $\alpha$* . Группа здоровых тканей толстой кишки в этой модели определялась со 100% точностью, неспецифический язвенный колит – с точностью 90%.

В ряде случаев провести дифференцирование дисплазии от неопластических изменений слизистой оболочки толстой кишки достаточно трудно. Включение в модель 23 маркеров показало ее высокую точность в 98,4%. Молекулярный фенотип неизменной ткани прямой кишки при колоректальном

раке классифицирован верно в 100% случаев, при полипах - в 94% случаев. При этом опухоль и полип располагались как в проксимальных, так и дистальных отделах ТК.

С целью возможности дифференцировки доброкачественной патологии была построена дискриминантная модель для трех групп: «норма», «неизменная ткань при полипах и колоректальном раке». В этом случае точность дифференцировки клеточного материала соскобов пациентов с полипами увеличилась и составила 72%. Анализ включает 28 генов.

Анализ дифференциации молекулярных фенотипов 2 групп: «здоровые доноры» и «воспалительная патология в ТК» показал, что группа здоровых доноров классифицируется правильно в 100% случаев, а группа пациентов с колитами – в 90% случаев. Панель включает 6 генов.

Из 62 функциональных генов мы определили 45, которые, в зависимости от поставленной диагностической задачи, позволили дифференцировать молекулярные фенотипы неизменных тканей в «норме» и при патологических процессах в толстой кишке. Гены представлены в таблице 31.

**Таблица 31** – Гены – кандидаты для дифференциальной диагностики заболеваний толстой кишки

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГРУППА	НАИМЕНОВАНИЕ ГЕНА
ПРОЛИФЕРАЦИЯ	<i>CCNB1, CCND1, STK15, PTEN, P16INK4A, P14ARF (P19ARF), KI67,</i>
ТРАНСКРИПЦИЯ	<i>MYC</i>
АПОПТОЗ	<i>BAX, BAG1, TERT, BCL2, NDRG1, BIRC5,</i>
ФАКТОРЫ РОСТА	<i>VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, TGFb, IGF2,</i>
ДИФФЕРЕНЦИРОВКА/РЕЦЕПТОРЫ	<i>CD56, CD68, HER2, GRB7, ESRI, LIFR, LIF,</i>
МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ	<i>MMP2, MMP8, MMP9, MMP11, CTSL2, TPA</i>
ЦИТОКИНЫ И ФАКТОРЫ ИММУННОГО ОТВЕТА	<i>IL1b, IL2, IL2Ra, IL7, IL8, IL12a, IL15, LGALS1, TLR2, COX-2, GNLY, TNFa, GREM1</i>

В зависимости от профиля лечебного учреждения и цели можно использовать разные панели.

Нами предлагается алгоритм, использования модели дифференциальной диагностики патологического процесса в ТК и скрининга КРР (Рисунок 9).



**Рисунок 9** – Алгоритм использования модели дифференциальной диагностики патологического процесса в ТК и скрининга КРР

Панель, включающая 16 маркеров, позволяет дифференцировать «норму» от рака. Чувствительность теста составляет 86,3% при уровне специфичности 100%. При распределении в группу «патология в толстой кишке» или группу «рак» пациент направляется на колоноскопию.

Для разработки диагностической модели малоинвазивного скрининга предраковых поражений и ранних стадий КРР (с потенциальным уменьшением количества необходимых генов без снижения чувствительности и

специфичности), требуется продолжение исследования, увеличение количества наблюдений и оценка воспроизводимости данного метода.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Колоректальный рак в настоящее время стал одной из самых распространенных злокачественных патологий во многих странах мира, в том числе и в России, занимая 3 место в структуре онкологических заболеваний. За период с 2008 – 2018 год у мужчин заболеваемость колоректальным раком выросла на 39%, у женщин на 28,5% [8]. Пятилетняя выживаемость у пациентов с метастазами не превышает 10 % [99,139]. Несмотря на разные скрининговые программы колоректальный рак более чем в половине случаев выявляется только на 3-4стадии. Таким образом, проблема своевременной диагностики данного заболевания остается нерешенной.

На сегодняшний день, по данным литературы, основные молекулярно-генетические исследования в области онкологии основаны на изучении изменений в ткани опухоли [122,156]. При этом в качестве контрольной ткани используют неизмененные ткани из резецированных участков без морфологических признаков опухолевого роста, полученных от того же пациента. Однако в части публикаций последних лет подчеркивается важность исследования неизмененных тканей пораженного органа, которые, по данным литературы, отличаются по молекулярному фенотипу от молекулярного фенотипа аналогичной ткани здорового органа. Рядом авторов подтверждается связь прогрессирования КРР с влиянием опухолевого окружения, установлено, что опухолевые клетки могут инициировать изменения в окружающей ткани, способствующие злокачественному росту [34,44,57,64]. Ранее в наших исследованиях, также было показано, что морфологически нормальная ткань края резекции опухоли при колоректальном раке достоверно отличается по фенотипическим свойствам от нормальной ткани здоровых добровольцев [17]. На основании литературных данных и полученных ранее результатов, нами сделано предположение о наличии молекулярно-генетических изменений, происходящих в морфологически нормальных тканях всего пораженного органа при злокачественной, доброкачественной гиперпролиферативной патологии, а также

хронических воспалительных процессах. До настоящего момента механизмы таких изменений практически не изучены. Также не изучены их закономерности в зависимости от локализации опухоли. Последние достижения в патогенезе рака помогают идентифицировать ферментативные и молекулярные биомаркеры, которые участвуют в онкогенезе толстой кишки и отражают как воздействие, так и риск от этиологических факторов. Обнаружение и исследование этих биомаркеров необходимо для разработки стратегий профилактики рака, решения задач диагностики, открытия новых химиопрофилактических средств, определения терапевтических мишеней, оценки риска прогрессирования заболевания. Все вышеизложенное определило направление нашей работы, посвященное исследованию неизмененных тканей толстой кишки в норме и при патологии в толстой кишке.

Целью нашего исследования являлась оптимизация алгоритма диагностики патологии в толстой кишке на основе определения молекулярного фенотипа тканей толстой кишки. Для достижения цели мы поставили задачи: 1) исследовать молекулярно-генетические характеристики нормальной слизистой здоровых доноров, неизмененного эпителия толстой кишки при полипах в толстой кишке и при колоректальном раке в зависимости от отдела толстой кишки, 2) проанализировать взаимосвязь молекулярно-генетических характеристик неизмененного эпителия толстой кишки при полипах в толстой кишке и при колоректальном раке с основными клинико-морфологическими показателями, в группе условно здоровых доноров исследовать взаимосвязь с возрастом пациента, 3) изучить возможность дифференцировать патологию в толстой кишке по молекулярному фенотипу соскоба из неизмененной слизистой оболочки прямой кишки, 4) определить молекулярно-генетические маркеры для дифференциальной диагностики доброкачественных, злокачественных новообразований и воспалительных процессов в толстой кишке.

В исследование вошли 519 пациентов, проходивших плановое обследование и лечение в ФГБУ «РНЦ РР» Минздрава России и Научном центре Колопроктологии. В контрольной группе по данным колоноскопии у всех

обследованных доноров отсутствовала патология в толстой кишке. Выделение мРНК и анализ ПЦР выполнен для 926 образцов неизмененных тканей ТК, в которых определен уровень экспрессии мРНК 62 генов. При анализе базы данных использовали статистические методы: t-критерий Стьюдента, критерий Манна–Уитни. Для классификации групп тканей применяли многофакторный дискриминантный анализ. Этот метод позволил построить модель, которая относит изучаемые образцы ткани к одной из нескольких групп, выбирая наиболее близкую по экспрессионному фенотипу группу.

Исследование было разделено на два этапа. На первом этапе мы исследовали закономерности изменения уровня экспрессии мРНК в биоптатах из толстой кишки, взятых в объеме 1,5 – 2 мм<sup>2</sup> в трех группах образцов (контрольная группа, МНТ при полипах, МНТ при КРР). Нами была установлена четкая дифференциация отделов ТК по молекулярному фенотипу для каждой из этих групп.

В группе здоровых доноров из 62 исследованных генов для прямой кишки определены достоверные отличия значений экспрессии 34 генов разных функциональных групп. Отделы ободочной кишки при парном сравнении достоверно отличались по 10 генам. В модели дискриминантного анализа получены отличия экспрессионных фенотипов в 5 отделах толстой кишки. Самыми значимыми были гены, регулирующие апоптоз и пролиферацию, а также гены, участвующие в регуляции функционирования кишечных стволовых клеток, регенерации кишечного эпителия, факторы роста и маркеры иммунного ответа.

В модуле дискриминантного анализа эпителиальные ткани прямой кишки были классифицированы по молекулярному фенотипу с точностью 100%, ткани правой ободочной кишки - с точностью 86,4%, левой ободочной - 93,5%. Ошибки классификации возникали, как правило, из-за распределения образцов в соседние отделы, что логично, так как смежные отделы похожи по выполняемым физиологическим функциям и анатомическому строению.

Мы выявили более высокие и более низкие значения среднего уровня экспрессии исследуемых генов в зависимости от отдела ТК что, свидетельствует о

разных молекулярных процессах, обусловленных анатомо-физиологическими особенностями органа, и определяющими молекулярный фенотип данных отделов в норме. Таким образом, разные биологические характеристики определяют разную реакцию на общие факторы окружающей среды и проканцерогенные факторы в проксимальном и дистальном отделах толстой кишки, воздействующие на слизистую оболочку здорового человека. Такой результат дает обоснование считать, что опухоли разных отделов требуют дифференциального подхода в диагностике и лечении патологии ободочной и прямой кишки.

Учитывая важность фактора риска «возраст пациента», мы исследовали экспрессию генов разных функциональных групп у здоровых доноров в трех возрастных группах: менее 45 лет, от 45 до 60 лет и старше 60 лет. Расчет коэффициента ранговой корреляции  $r$ -Спирмена для 62 генов показал, что в неизменной слизистой оболочке проксимальных и дистальных отделов толстой кишки здорового человека в зависимости от возраста отмечаются разная частота, сила корреляционных зависимостей и участие разных генов. При этом, в каждом отделе ТК определена статистически значимая положительная умеренная корреляция между экспрессией мРНК маркера *HLA-G5* и увеличением возраста у здоровых доноров. В злокачественных клетках следствием увеличения экспрессии *HLA-G5* является уклонение опухолей от иммунологического надзора. В сигмовидной кишке отмечена также положительная корреляция цистеиновой протеиназы катепсина *L* (*CTSL2*). Увеличение экспрессии этого маркера усиливает инвазивную активность и неоваскуляризацию [149]. Нами показано изменение уровня экспрессии 11 маркеров функциональных групп пролиферации, и иммунного ответа в группе 45-60 лет в сравнении с группой доноров младше 45 лет. Уровень экспрессии 4 генов *GRB7*, *TNF $\alpha$* , *HLA-G5*, *GATA3*, являлся фактором, выделяющим группу доноров старше 60 лет. Три из этих маркеров участвуют в иммунном и воспалительном ответе, а один (*GRB7*) регулирует пролиферацию и клеточную миграцию. Общая точность в модели классификации по возрасту составила 89%.



Парное сравнение молекулярных фенотипов неизмененных тканей при полипах в 5 отделах толстой кишки показало статистически достоверные отличия экспрессии 22 генов. Можно отметить, что неизмененные ткани при полипозе в отделах толстой кишки имеют сходство с тканью здоровых людей по уровню экспрессии 14 маркеров и достоверные отличия экспрессии 7 маркеров функционально связанных с активацией пролиферации, ингибированием апоптоза, индуцированием провоспалительного иммунного ответа и ремоделированием ткани. Появление отличий, которые отсутствовали в тканях здоровых доноров, предполагает наличие молекулярных изменений в нормальной ткани при полипах.

Дискриминантный анализ классификации неизмененных тканей при полипах в зависимости от отдела толстой кишки определил 100% отличие экспрессионного фенотипа сигмовидной кишки от других отделов. Классификация тканей прямой кишки совпадала для 96% образцов, восходящего отдела - для 90% образцов. Для поперечного и нисходящего отдела - 81 и 83 процента, соответственно. Ошибки возникали из-за распределения образцов в соседние отделы. Сравнение неизмененных тканей в зависимости от гистологического типа полипа показало достоверные отличия 6 генов, включающих маркеры митохондриального апоптоза. Уровень экспрессии провоспалительных интерлейкинов *IL6*, *IL8* и гена межклеточной адгезии *MMP7* в группе табулярная аденома был выше, чем в образцах, взятых рядом с гиперплазией. Сравнение неизмененных тканей в зависимости от степени дисплазии аденомы показало достоверные отличия средних значений экспрессии 26 генов, включающих функциональные группы: пролиферации, апоптоза, иммунного ответа, факторы роста и рецепторного статуса, перестройки межклеточного матрикса. В группе «умеренная дисплазия», мы определили более низкий уровень экспрессии 25 маркеров, чем в группе «слабая дисплазия».

Далее мы исследовали неизмененные ткани при колоректальном раке. В большинстве случаев получить образцы из 5 отделов было невозможно в связи с особенностями забора ткани края резекции на исследование, зависящей от объема

операции, и небольшим количеством образцов, полученных во время прохождения пациентом профилактической колоноскопии. Поэтому мы провели сравнительный анализ для отделов: правая, левая ободочная и прямая кишка, учитывая клиническую важность этих отделов. Общая точность модели молекулярного фенотипирования 3 отделов толстой кишки составила 89%. Статистически достоверные отличия экспрессии получены для 37 генов. Прямая кишка отличалась от левой ободочной по 30 генам, от правой ободочной по 27 генам, левая ободочная кишка отличалась от правой по 8 генам.

Анализ взаимосвязи уровня экспрессии генов и морфологических характеристик опухоли показал достоверное изменение уровня экспрессии 18 генов в зависимости от глубины прорастания опухоли, 5 генов при наличии лимфогенных метастазов, 11 генов при отдаленном метастазировании, 10 генов при изменении степени злокачественности.

В образцах больных с последующим прогрессированием заболевания обнаружены отличия 5 генов, входящих в функциональную группу регуляции пролиферации, клеточной дифференцировки, ингибирования апоптоза. В образцах пациентов с первично-множественным раком определены более высокие значения экспрессии маркера пролиферации *TERT*. Таким образом, мы показали, что молекулярные изменения МНТ при КРР, зависят от отдела, в котором локализуется опухоль. Кроме этого, мы определили наличие молекулярных отличий и их корреляцию с распространенностью злокачественного процесса (TNM), степенью злокачественности опухоли, и прогрессированием заболевания.

Интересным представляется тот факт, что увеличение размеров и/или степени распространенности первичной опухоли, увеличение степени вовлеченности регионарных лимфатических узлов и наличие отдаленного метастазирования в неизмененных тканях толстой кишки пациентов с КРР отрицательно коррелирует с уровнем экспрессии ряда маркеров из кластеров межклеточной адгезии (ММР) и факторов воспалительного ответа.

Интересно, что в группе МНТ при колоректальном раке мы наблюдали большую вариабельность значений уровня экспрессии ряда генов, регулирующих

пролиферацию и апоптоз, и особенно генов регуляции иммунного ответа, в сравнении с группами тканей здоровых доноров и МНТ при полипах.

Суммируя полученные результаты первого этапа исследования, мы выяснили что: во-первых – молекулярные фенотипы нормальной слизистой оболочки толстой кишки, МНТ при полипозе и МНТ при колоректальном раке в разных отделах толстой кишки отличаются. Во-вторых – уровень экспрессии генов коррелирует с типом патологического процесса и клинико-морфологическими показателями.

Ключевой задачей нашего исследования являлась оценка возможности использования экспрессионного фенотипа для диагностики патологического процесса в толстой кишке. С практической точки зрения наибольший интерес представляют молекулярные изменения в прямой кишке, так как она является наиболее доступным отделом для забора биологического материала. На втором этапе мы оценивали возможность дифференцировать патологию в толстой кишке по материалу мазка из прямой кишки, учитывая, что при возникновении патологии, может быть затронут весь пораженный орган. Были сформированы 4 группы по типу патологии в толстой кишке – они включали клеточный материал соскобов при КРР, полипозе, неспецифическом язвенном колите и контрольную группу условно здоровых доноров. Важно, что участки воспаления, доброкачественная и злокачественная опухоль располагались в разных отделах толстой кишки.

Проведенный анализ классификации молекулярных фенотипов клеточного материала соскобов из прямой кишки для групп (контрольная группа условно здоровых доноров, МНТ при КРР, МНТ при полипах и воспалительные заболевания) показал, что с высокой достоверностью мы можем классифицировать каждую из этих групп. В зависимости от количества групп, включенных в модель дискриминантного анализа, с достоверностью 90% - 93% можно выделить группу пациентов с колитом. Точность классификации группы «МНТ при КРР» составила 87 - 100% случаев. Во время острой фазы воспаления при язвенном колите, а также при быстром росте и некрозе злокачественной

опухоли макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы проникают в собственную пластинку слизистой оболочки толстой кишки. Возле крипт происходит агрегация нейтрофилов. Активированные дендритные клетки и макрофаги секретируют цитокины, которые запускают и дифференцируют Т-клетки и активируют адаптивный иммунный ответ. Следовательно, мы можем наблюдать увеличение или снижение экспрессии факторов иммунного ответа, маркеров пролиферации и апоптоза в неизмененных тканях рядом с пораженным участком органа.

Группа здоровых доноров классифицировалась с точностью 95% - 100% случаев. Исключение составила группа МНТ при полипах с точностью классификации 72%, что возможно объяснить начальным небольшим количеством молекулярных изменений при доброкачественном опухолевом процессе и постепенным их увеличением, приводящим к возникновению злокачественной колоректальной опухоли. В то же время, при постановке задачи дифференцирования дисплазии от неопластических изменений в слизистой оболочке толстой кишки, модель показала высокую точность в 98,4%. Включение в модель 23 генов разных функциональных групп (*MYC*, *CCNB1*, *CCND1*, *P14ARF* (*P19ARF*), *STK15*, *BAX*, *IL2Ra*, *COX-2*, *IL2*, *IL7*, *IL8*, *IL12a*, *GREM*, *LGALS1*, *IGF2*, *TGFb*, *VEGFA165*, *VEGFA189*, *CD56*, *TLR2*, *MMP8*, *MMP9*, *TPA*) позволило классифицировать молекулярный фенотип неизмененной ткани прямой кишки при колоректальном раке верно в 100% случаев, при полипах - в 94% случаев. При этом опухоль и полип располагались как в проксимальных, так и дистальных отделах ТК.

Алгоритм применения модели на основе изменения экспрессии мРНК в клеточном материале соскобов из прямой кишки представлен в главе 3.3. Он предполагает определение уровня экспрессии 45 генов, которые в разных комбинациях, в зависимости от поставленной диагностической задачи, позволяют дифференцировать молекулярные фенотипы неизмененных тканей в «норме» и при патологии.

В зависимости от профиля лечебного учреждения и цели можно использовать разные панели. Например, модель, включающая 16 маркеров (*MYC*, *CD56*, *COX-2*, *P16INK4A*, *PTEN*, *GREM1*, *IL7*, *TLR2*, *IL8*, *GPLY*, *TNF $\alpha$* , *HER2*, *MMP9*, *P14ARF* (*P19ARF*), *CCNB1*, *TPA*) позволяет дифференцировать «норму» от рака. Чувствительность теста составляет 86,3% при уровне специфичности 100%. При распределении в группу «патология в толстой кишке» или группу «рак» пациент направляется на колоноскопию.

Таким образом, результаты наших исследований предполагают возможность включения анализа экспрессии генов в обследование категории больных с полипами толстой кишки, неспецифическим язвенным колитом и колоректальным раком с целью выявления пациентов с высоким риском развития рака, а также повышения эффективности наблюдения и ведения каждой группы пациентов. Использование анализа экспрессии мРНК для создания карт фенотипического профиля толстой кишки в норме и при патологических процессах в толстой кишке может выявить потенциальные биомаркеры и определить механизмы, лежащие в основе прогрессирования заболевания, а также улучшить наше понимание биологии КРР, развивающегося из спорадических аденом и на фоне воспалительных заболеваний кишечника.

## ВЫВОДЫ

1. Молекулярный фенотип слизистой толстой кишки, определяемый на основании профиля экспрессии мРНК отличается в различных анатомических отделах толстой кишки. Профиль экспрессии достоверно меняется с возрастом.
2. Уровень экспрессии в морфологически неизменной ткани при полипозе достоверно различается в отделах толстой кишки и коррелирует со степенью дисплазии и гистологическим типом полипа.
3. Уровень экспрессии в морфологически неизменных тканях при колоректальном раке достоверно различается в отделах толстой кишки и коррелирует с глубиной прорастания опухоли, наличием лимфогенного и гематогенного метастазирования, степенью злокачественности.
4. Морфологически неизменная ткань слизистой толстой кишки при различной патологии (полипоз, колоректальный рак, неспецифический язвенный колит) достоверно отличается по профилю экспрессии, как от нормальной ткани здоровых доноров, так и между собой.
5. Исследование экспрессионного профиля клеточного материала соскобов прямой кишки позволяет дифференцировать наличие патологического процесса (полипоз, колоректальный рак, неспецифический язвенный колит) в толстой кишке. Отличия, могут быть использованы для скрининга и дифференциальной диагностики патологии толстой кишки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**ВЗК** – воспалительные заболевания кишечника

**КРР** – колоректальный рак

**МНТ** - морфологически неизменная ткань

**мРНК** - матричная РНК

**ННКРР** - Наследственный не полипозный рак толстой кишки

**НЯК** – неспецифический язвенный колит

**ОТ-ПЦР** - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

**сКРР** – спорадический колоректальный рак

**ТК** – толстая кишка

**ФКС** – фиброколоноскопии

**APC** (Adenomatous Polyposis Coli) –ген аденоматозного полипа

**CIN** – хромосомная нестабильность

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

**gFOBТ** – (guaiac fecal occult-blood test) Гемоккульт-тест

**HLA** – молекулы главного комплекса гистосовместимости I и II

**HP** – гиперпластический полип

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

**Ig** –молекулы полииммуноглобулина

**IL** – интерлейкины

**LPS** – липополисахариды

**МАРК** (mitogen activated protein kinase) – митоген-активируемые протеинкиназы

**MMP** – матриксные металлопротеазы

**MMR** – гены, отвечающие за репарацию ДНК

**MSI** – микросателлитная нестабильность

**NF-κB** – ядерный фактор-каппа В

**NLR** – NOD-подобные рецепторы, семейство мембраносвязанных рецепторов

полииммуноглобулина молекулы Ig

**PAMP** (Pathogen-associated molecular pattern) – патоген-ассоциированные молекулярные структуры

**PI3K** – Фосфоиндол-3-киназа

**SSA/P** – зубчатая аденома/полип на широком основании

**TLR** – Toll-подобные рецепторы

**TSA** – традиционная зубчатая аденома



**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. Александер-Вильямс, Дж. Гастроэнтерология: Пер. с англ./ Под ред. Дж. Александера-Вильямса, Х. Жд. Биндера.- М.: Медицина, 1985. — 320 с.
3. Алтыбаев, С.Р. Клинико-морфологические особенности аденокарциномы прямой кишки, связанные с лимфогенным метастазированием: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.12, 14.03.02 / Алтыбаев Сельвер Рафаэлевич. — М., — 2018. — 121 с.
4. Давыдов, М.И. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ/ М.И. Давыдов, О. А. Харлова, Е.М. Аксель // Москва: Вестник РОНЦ им. Блохина Н.Н. РАМН. — 2019. — Т. 22 — №. 3 (прил. 1) — С. 34.
5. Дильман, В.М. Эндокринологическая онкология. — Ленинград: Медицина. 1983. — 312 с.
6. Заридзе, Д.Г. Канцерогенез. / Д. Г. Заридзе // Москва. Медицина. — 2004. — 576 с.
7. Казубская, Т.П. Редкие наследственные синдромы, ассоциированные с полипозом и развитием злокачественных опухолей / Т.П. Казубская // Архив патологии. — 2016. — Т. 78 — №2. — С. 10–18.
8. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. — Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, — 2019. — 250 с.
9. Кит, О.И. Взаимодействие трипсиновых протеиназ и кининовой системы в перифокальной ткани полипов и злокачественных опухолей толстого кишечника / Е.М. Франциянц, Л.С. Козлова, А.Л.Терпугов // Российский онкологический журнал. — 2013 — Т. 3. — С. 14–17.

10. Копнин, Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения / Б.П. Копнин // Практическая онкология. – 2002. – Vol. 3. – №4. – P. 229 –235.
11. Краевский, Н.А. Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. / А. В. Смольникова, Д. С. Саркисова. // Москва : Медицина. – 1993. – 560 с.
12. Музафаррова, Т.А. Особенности мутаций в гене APC / Т.А. Музафаррова, А.В. Карпучин // Universum: Медицина и фармакология. Клиническая медицина. Онкология. – 2016. – Т. 11 – №33. – P.4 –10.
13. Найяр, Р. Цервикальная цитология по системе Бетесда: Терминология, критерии и пояснения. / Р. Найяр, Д. Уилбура; перевод с англ. под ред. Н.Ю.Полонской. // Издательский дом "Практическая медицина". – 2017. – Т. 304 с.
14. Норматов, Р.А. Лимфоидная ткань кишечника как основа иммунной системы пищеварительного тракта / Р. А. Норматов, Ю. В. Марьяновская // Молодой ученый. — 2017 — Т. 20 — №154. — С. 201 –203.
15. Пиманов, С.И. Иммунохимический тест на скрытую кровь в кале в скрининговой диагностике КРР / Е. И. Михайлова, В. М. Бондаренко // Новости хирургии. — 2006. — Т. 14. — №3. — С. 66 –73.
16. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. / О. Ю. Реброва. // Москва. «МедиаСфера» – 2000. – 312 с.
17. Станоевич, У. Клиническое значение результатов молекулярно-генетических исследований толстой кишки при колоректальном раке: дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.12 / Станоевич Углеша. — М., — 2017. — 235 с.
18. Струков, А.И. Общая патология человека: руководство для врачей. А. И. Струков, В. В. Серов, Д. С. Саркисова. // Москва: Медицина. – 1990. – 448 с.
19. Ткачева, Г.А., Пророков В.В. и соавт. Использование тестов на скрытую кровь и РЭА при профилактическом обследовании населения. /

- Г.А. Ткачева, В.В. Пророков и соавт. // Хирургия. –1987. – №9. – С. 16 – 20.
20. Харлова, О.А. Новые подходы к классификации зубчатых образований толстой кишки / О. А. Харлова, Н. А. Олейникова, П. Г. Мальков, и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 2.
21. Чеснокова, Н.П. Современные концепции канцерогенеза: значение недостаточности механизмов элиминации малигнизированных клеток в прогрессирующем развитии неоплазий различных локализаций / Н.П. Чеснокова, В.В. Моррисон, В.Ю. Барсуков, и др. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2016. – Т.12– №1. – С.32– 35.
22. Шапот, В.С. Биохимические аспекты опухолевого роста. — Москва: Медицина, 1975. — 304 с.
23. Addisson, A.F. Microarray Technology and Cancer Gene Profiling / A.F. Addisson // Springer Science+Business Media. – 2007. – P. 25 –37.
24. Ahlquist, D.A. Fecal blood levels in health and disease. A study using HemoQuant / D. A. Ahlquist, D. B. McGill, S. Schwartz, et al. // N Engl J Med. – 1985. – Vol.312. – P.1422–1428.
25. Albasri, A.M. Impact of cyclooxygenase-2 over-expression on the prognosis of colorectal cancer patients. An experience from Western Saudi Arabia / A.M. Albasri, M.A. Elkablawy, A.S. Hussainy, et al. // Saudi Med J. – 2018. – Aug. Vol 39. – №8 – P. 773 –780.
26. Aran, D. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes / D. Aran, R. Camarda, J. Odegaard, et al. // Nat Commun. – 2017. – Oct. – Vol 8. – №.1. – P. 1077.
27. Armaghany, T. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. Gastrointest Cancer Res / T. Armaghany, J. D. Wilson, Q. Chu , G. Mills// – 2012 – Vol. 5. – №1. – P. 19–27.
28. Atkin, W.S. Long term effects of once-only flexible sigmoidoscopy screening after 17 years of follow-up: the UK Flexible Sigmoidoscopy Screening

- randomised controlled trial / W. S. Atkin, K. Wooldrage, D.M. Parkin, I. Kralj-Hans, et al. // *Lancet*. – 2017. – Vol. 389. – №10076. – P. 1299–1311.
29. Atkin, W.S. UK Flexible Sigmoidoscopy Trial Investigators. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial / W.S. Atkin, R. Edwards, I. Kralj-Hans, et al. // *Lancet*. – 2010. – May. – Vol 375. – №9726. – P. 1624–1633.
30. Aust, D.E. Catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis. The APC / D.E. Aust, J.P. Terdiman, R.F. Willenbacher, et al. // *Cancer* – 2002. – Vol. 94. – P. 1421–1427.
31. Bărbălan, A. Interleukin-8 mRNA Expression in Locally Advanced Colorectal Cancer Patients / A. Bărbălan, I. Streața, E.T. Ivan et al. // *Curr Health Sci J*. – 2017. – Jul-Sep. – Vol. 43. – №3. – P. 209–213.
32. Barrier, A. Gene expression profiling of nonneoplastic mucosa may predict clinical outcome of colon cancer patients / A. Barrier, P.Y. Boelle, A. Lemoine, et al. // *Dis Colon Rectum*. – 2005 – Dec. – Vol. 48. – №12. – P. 2238–2248.
33. Barrier, A. Prognosis of stage II colon cancer by non-neoplastic mucosa gene expression profiling / A. Barrier, F. Roser, P.Y. Boëlle, et al. // *Oncogene*. – 2007. – Apr. – Vol. 19 – 26. – №18. – P. 2642–2648.
34. Berdiel-Acer, M. Hepatic carcinoma-associated fibroblasts promote an adaptative response in colorectal cancer cells that inhibit proliferation and apoptosis: nonresistant cells die by nonapoptotic cell death / M. Berdiel-Acer, M.E. Bohem, A. Lopez-Doriga, et al. // *Neoplasia*. – 2011. – Vol. 13. – P. 931–946.
35. Bos, J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review / J.L. Bos // *Cancer Res*. – 1989. - Sept. – Vol. 49. – №17. – P. 4682–4689.
36. Bozic, I. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. / I. Bozic, T. Antal, H. Ohtsuki, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2010. – Oct 26. – Vol. 107. – №43. – P. 18545–18550.
37. Bradham, C. p38 MAPK in development and cancer / C. Bradham, D.R. McClay // *Cell Cycle*. – 2006. – Vol. 5. – P. 824–828.

38. 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. 82–87.
39. Brentnall, T.A. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis / T.A. Brentnall, D.A. Crispin, P.S. Rabinovitch, et al. // *Gastroenterology*. – 1994. – Vol. 107. – P. 369–378.
40. Breynaert, C. Dysplasia and colorectal cancer in inflammatory bowel disease: a result of inflammation or an intrinsic risk. / C. Breynaert, S. Vermeire, P. Rutgeerts, et al. // *Acta Gastroenterol Belg*. – 2008. – Oct-Dec. – Vol. 71. – №4. – P. 367–372.
41. Bryan, G. ACG Clinical Guidelines: Colorectal Cancer Screening 2021. / G. Bryan, A. Shaikat, C.J. Kahi, C.A. Burke, L. Rabeneck, B.G. Sauer, D.K. Rex // *The American Journal of Gastroenterology*. – 2021. – March. – Vol. 116. – №3. – P. 458–479.
42. Burner, G.C. Neoplastic progression in ulcerative colitis: histology, DNA content, and loss of a p53 allele / G.C. Burner, P.S. Rabinovitch, R.C. Haggitt, et al. // *Gastroenterology*. – 1992. – Vol. 103. – P. 1602–1610.
43. 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.
44. Calon, A. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-Driven program in stromal cells for metastasis initiation / A. Calon, E. Espinet, S. Palomo-Ponce, et al. // *Cancer Cell*. – 2012. – Vol. 22. – P. 571–584.
45. Cario, E. Commensal associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium / E. Cario, D. Brown, M. McKee, K. Lynch-Devaney, et al. // *Am. J. Pathol*. – 2002. – Vol. 160. – P. 165–173.
46. Cerutti, A. The biology of intestinal immunoglobulin A responses / A. Cerutti, M. Rescigno // *Immunity*. – 2008. – Vol. 28. – P. 740–750.

47. Chan, T.L. Cancer Genome Project. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. / TL. Chan, W. Zhao, SY. Leung, et al. // *Cancer Res.* – 2003. – Aug 15. – Vol. 63. – №16. – P. 4878 – 4881.
48. Chandran, U.R. Differences in gene expression in prostate cancer, normal appearing prostate tissue adjacent to cancer and prostate tissue from cancer free organ donors / U.R. Chandran, R. Dhir, C. Ma, G. Michalopoulos, et al. // *BMC Cancer.* – 2005. – May. – № 5 – P.45.
49. Cheroutre, H. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells / H. Cheroutre // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 217–246.
50. 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.
51. Colliver, D.W. Molecular profiling of ulcerative colitis-associated neoplastic progression. / DW. Colliver, NP. Crawford, MR. Eichenberger, et al. // *Exp Mol Pathol.* – 2006. – Feb. – Vol. 80. – №1. – P. 1 –10.
52. Cuenda, A. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases / A. Cuenda, S. Rousseau // *Biochim Biophys Acta.* – 2007. – Vol. 1773. – P. 1358–1375.
53. 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.
54. Dawson, P.A. An ultrastructural and histochemical study of the mucous membrane adjacent to and remote from carcinoma of the colon / P. A. Dawson, M.I. Filipe // *Cancer.* – 1976. – Vol. 37. – № 5. – P. 2388 –2398.
55. De Barrios, O. ZEB1 promotes inflammation and progression towards inflammation-driven carcinoma through repression of the DNA repair glycosylase MPG in epithelial cells. / O. de Barrios, L. Sanchez-Moral, M. Cortés, et al. // *Gut.* – 2019. – Dec. – Vol. 68. – №12. – P. 2129 –2141.
56. 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.
57. De la Cruz-Merino, L. Immune microenvironment in colorectal cancer: a new hallmark to change old paradigms/ L. de la Cruz-Merino, F. Henao Carrasco, et al. // *Clin Dev Immunol.* – 2011. – Vol 2011. – P.1 – 9.
58. Dimberg, J. Genetic Variants of the IL2 Gene Related to Risk and Survival in Patients With Colorectal Cancer. / J. Dimberg, L. Shamoun, K. Landerholm, et al. // *Anticancer Res.* –2019. – Sep. – Vol. 39. – №9. – P. 4933 – 4940.
59. Dowling, S.M. The importance of choosing the appropriate referencegenes for quantitative real-time PCR, as shown using colon cancer cells and tissues / S. M. Dowling, D. Walsh, D.S. Coffey, et al. // *F1000 Res* – 2016. – Vol. 5. – P. 99.
60. Drewes, J.L. High-resolution bacterial 16S rRNA gene profile meta-analysis and biofilm status reveal common colorectal cancer consortia / J. L. Drewes, J.R. White, C.M. Dejea, et al. // *Sears.NPJ Biofilms Microbiomes.* – 2017. – Nov. – Vol. 29. – №3. – P. 34.
61. Duraturo, F. Genetics, diagnosis and treatment of Lynch syndrome: Old lessons and current challenges. / F. Duraturo, R. Liccardo, M. De Rosa, et al. // *Oncology letters.* 2019. – Vol. 17. – №. 3. – P. 3048 – 3054.
62. Eaden, J.A. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis / J. A. Eaden, K.R. Abrams, J.F. Mayberry // *Gut.* – 2001. – Apr. – Vol. 48. – №4. – P.526– 535.
63. Egeblad, M. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism / M. Egeblad, E.S. Nakasone, Z. Werb. // *Dev Cell.* – 2010. – Jun – №18 – P.884–901.
64. Elrasheid, A.H. Clinical applications of gene expression in colorectal cancer / A. H. Elrasheid, Kheirelseid, N. Miller, et al. // *Gastrointest Oncol.* – 2013. – Vol. 4. – №2. – P. 144 –157.
65. Fearnhead, N.S. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis / N. S. Fearnhead, J.L. Wilding, W.F. Bodmer // *Br Med Bull* – 2002. – Vol. 64. – P. 27.

66. Fearon, E.R. A genetic model for colorectal tumorigenesis / E. R. Fearon, B. Vogelstein // *Cell*. – 1990. – Vol. 61. – P. 759–767.
67. Feinberg, AP. The history of cancer epigenetics. / AP. Feinberg, B. Tycko. // *Nat Rev Cancer*. – 2004. – Feb. – Vol. 4. – №2. – P. 143 –153.
68. Feng, Q. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence / Q. Feng, S. Liang, H. Jia, et al. // *Nat Commun*. – 2015. – Mar. – Vol. 11. – №6. – P. 6528.
69. Filipe, M.I. Changes in composition of mucin in the mucosa adjacent to carcinoma of the colon as compared with the normal: a biochemical investigation. *Journal of clinical Pathology* / M. I. Filipe, K.B. Cooke // – 1974. – Vol. 27. – №4. – P. 315 –318.
70. Fodde, R. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability / R. Fodde, J. Kuipers, C. Rosenberg, et al. // *Nat Cell Biol*. – 2001. – Vol. 3. – P. 433–438.
71. Forchielli, M.L. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. / M. L. Forchielli, W. A. Walker. // *Br. J. Nutr*. – 2005. – Vol. 93. – P. 41–48.
72. Fujiwara, N. Macrophages in inflammation / N. Fujiwara, K. Kobayashi // *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*. – 2005. – Vol. 4. – P. 281–286.
73. Girardin, S.E. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri* / S. E. Girardin, R. Tournebise, M. Mavris, et al. // *EMBO Rep*. – 2001. – Vol. 2. – P. 736–742.
74. Goel, G. Evolving role of gene expression signatures as biomarkers in early-stage colon cancer / G. Goel // *Journal of Gastrointestinal Cancer*. – 2014. – Vol. 45. – №4. – P. 399 –404.
75. Gordon, S. Alternative activation of macrophages / S. Gordon // *Nat. Rev*. – 2003. – Vol. 3. – P. 23–35.
76. Grady, W.M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis / W. M. Grady, J.M. Carethers // *Gastroenterology*. – 2008. – Vol 135. – P. 1079–1099.



77. Graham, K. Gene expression in histologically normal epithelium from breast cancer patients and from cancer-free prophylactic mastectomy patients shares a similar profile / K. Graham, A. de las Morenas, A. Tripathi, C. King, et al. // *Br J Cancer*. – 2010. – Apr. Vol. 13; 102. – №8. – P. 1284–1293.
78. Graham, K. Gene expression profiles of estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancers are detectable in histologically normal breast epithelium / K. Graham, X. Ge, A. De Las Morenas, et al. // *Clin. Cancer Res*. – 2011. – Vol. 17. – P. 236–246.
79. Guarinos, C. Clinical subtypes and molecular characteristics of serrated polyposis syndrome. / C. Guarinos, C. Sanchez-Fortun, M. Rodriguez-Soler, et al. // *Clin Gastroenterol Hepatol*. – 2013. – Vol. 11. – P. 705–711.
80. Hakansson, A. Gut microbiota and inflammation / A. Hakansson, G. Molin // *Nutrients*. – 2011. – Vol. 3. – P. 637–682.
81. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – Vol. 144. – P. 646–674.
82. Harada, N. Biochemical and molecular genetic analyses on placental aromatase (P-450AROM) deficiency. / N Harada, H Ogawa, M Shozu, et al // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – Vol. 267. – №7. – P. 4781–4785.
83. Haug, U. Tumour M2-PK as a stool marker for colorectal cancer: comparative analysis in a large sample of unselected older adults vs colorectal cancer patients / U. Haug, D. Rothenbacher, M. N. Wentz et al. // *Br J Cancer*. – 2007. – Vol.7. –№96. – P. 1329–1334.
84. Hawthorn, L. Evidence for field effect cancerization in colorectal cancer / L. Hawthorn, L. Lan, W. Mojica // *Genomics*. – 2014. – Feb-Mar. – Vol. 103. – № 2-3. – P. 211–221.
85. Hegde, M. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). / M. Hegde, Ferber M., Mao R., et al. // *Genet Med*. – 2014. – Vol. 16. – №1. – P.101–116.

86. Hershberg, R.M. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells —polarity and complexity / R. M. Hershberg, L.F. Mayer // *Immunol. Today.* – 2000. – Vol. 21. – P. 123–128.
87. Hoadley, K.A., Yau C., Wolf D.M., et al. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. / K.A. Hoadley, C. Yau, D.M. Wolf, et al. *Cell.* // 2014 – Vol.158 – №4 –P. 929 – 944.
88. Huang, R. TIMP1 Is A Potential Key Gene Associated With The Pathogenesis And Prognosis Of Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer. / R. Huang, K. Wang, L. Gao, et al. // *Onco Targets Ther.* – 2019. – Oct. – Vol. 12. – P. 8895 –8904.
89. Hyuna Sung. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, et al. // *CA CANCER J CLIN.* – 2021. – Vol. 71. – P. 209–249.
90. Itzkowitz, S.H. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation / S. H. Itzkowitz, X.Yio // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2004. – Jul. – Vol. 287. – №1. – P.7 – 17.
91. Jones, P.A. The epigenomics of cancer. / PA. Jones, SB. Baylin. // *Cell.* – 2007. – Feb 23. – Vol. 128. – №4. – P. 683 –692.
92. Jones, S. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. / S. Jones, X. Zhang, DW. Parsons, et al. // *Science.* – 2008. – Vol. 321. – №5897. – P. 1801 –1806.
93. Kapiani, V.A. Possible ways of paraneoplastic apoptosis / V.A. Kapiani, M.L. Topuridze, V. Niva, et al. // *Allergology and Immunology* – 2010. – Vol. 11. – №2. – P. 102–104.
94. Kinzler, K.W. Lessons from hereditary colorectal cancer / K. W. Kinzler, B. Vogelgelstein // *Cell.* – 1996. – Vol. 87. – № 2. – P.159 –170.

95. Ko, C.W. Screening flexible sigmoidoscopy versus colonoscopy for reduction of colorectal cancer mortality / C.W. Ko, V.P. Doria-Rose, M.J. Barrett, et al. // *Int. J. Colorectal Dis.* – 2019. – Vol. 34. – №7. – P. 1273–1281.
96. Kopetz, S. Genomic classifier ColoPrint predicts recurrence in stage II colorectal cancer patients more accurately than clinical factors / S. Kopetz, J. Taberner, R. Rosenberg, et al. // *The oncologist.* – 2015. – Vol. 20. – №2. – P. 127–133.
97. Krzystek-Korpacka, M. Expression stability of common housekeeping genes is differently affected by bowel inflammation and cancer: implications for finding suitable normalizers for inflammatory bowel disease studies / M. Krzystek-Korpacka, D. Diakowska, J. Bania, et al. // *Inflamm Bowel Dis.* – 2014. – Vol. 20. – №7. – P. 1147–1156.
98. Laetitia Marisa. Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. / Laetitia Marisa, Aurelien de Reynie, Alex Duval. // *PLOS Medicine.* – 2013. – Vol. 10. – №5. – P. e1001453.
99. Levin, B. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology / B. Levin, D.A. Lieberman, B. McFarland, R.A., et al. // *CA Cancer J Clin.* – 2008. – May-Jun. – Vol. 58. – №3. – P. 130–160.
100. 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.
101. Lu, P. Anatomic Distribution of Colorectal Adenocarcinoma in Young Patients. / P. Lu, A. C. Fields, A. S. Vise, et al. // *Dis Colon Rectum.* – 2019. – Vol. 62. – №8. – P. 920–924.
102. Lurje, G. EGFR Signaling and Drug Discovery. / G. Lurje, H. J. Lenz. // *Oncology.* – 2009. – Vol. 77. – P. 400–410.

103. 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.
104. Madlensky, L. Accuracy of colorectal polyp self-reports: findings from the colon cancer family registry. / L. Madlensky, D. Daftary, T. Burnett, et al. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. – 2007. – Sep. – Vol. 16. – №9. – P. 1898–1901.
105. Meguro, T. Measurement of fecal hemoglobin-haptoglobin complex as a new diagnostic tool of lower GIT diseases/ T. Meguro // *Hokkaido Igaku Zasshi*. – 1994. – Vol. 69. – №4. – P. 995–1009.
106. Mosser, D.M. The many faces of macrophage activation / D.M. Mosser // *J. Leukoc. Biol*. – 2003. – Vol. 73. – P. 209–212.
107. Noble, C.L. Regional variation in gene expression in the healthy colon is dysregulated in ulcerative colitis / Noble C.L., A.R. Abbas, J. Cornelius, et al. // *Gut*. – 2008. – Oct. – Vol. 57. – №10. – P.1398–1405.
108. Northover, J. Carcinoembryogenic antigen and recurrent colorectal cancer // *Gut*. – 1986. – Vol.27. – P. 117–122.
109. Olmeda, D. Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis / D. Olmeda, S. Castel, S. Vilavo., A., et al. // *Mol. Biol., Cell*. – 2003. – Vol. 14. – P. 2844–2860.
110. Oremek, C.M. The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (Tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma / C. M. Oremek, S. Teigelkamp, W. Kramer et al. // *Anticancer Research*. – 1999. – Vol. 19. – P. 2599–2602.
111. Park, J.G. Hereditary colorectal cancer / J. G. Park, I. J. Kim // *Korean J Gastroenterol*. – 2005. – Vol. 45. – P. 78–87.
112. Parkin, D.M. Global cancer statistics, 2002 / D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, et al. // *CA Cancer J Clin*. – 2005. – Mar-Apr. – Vol.55. – №2. – P.74–108.
113. 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. 4510–4515.

114. Pekow, J. Gene signature distinguishes patients with chronic ulcerative colitis harboring remote neoplastic lesions. / J. Pekow, U. Dougherty, Y. Huang, et al. // *Inflamm Bowel Dis.* – 2013. – Mar. – Vol. 19. – №3. – P. 461 – 470.
115. Pickard, K.M. Microbial gut interactions in health and disease. Immune responses. / K. M. Pickard, A. R. Bremner, J. N. Gordon, // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 18. – P. 271–285.
116. Pohl, H. Incomplete polyp resection during colonoscopy-results of the complete adenoma resection (CARE) study / H. Pohl, A. Srivastava, S. P. Bensen, et al // *Gastroenterology.* – 2013. – Vol.144. – №1. – P. 74 –80.
117. Poltorak, A. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene / A. Poltorak, X. He, I. Smirnova, et al. // *Science.* – 1998. – Vol. 282. – P. 2085–2088.
118. Popkov, V.M. Carcinogenesis: pathophysiological and clinical aspects. / V.M. Popkov, Chesnokova N.P, Barsukova V.Y, et al. // *Saratov: SSMU* – 2011. – 600 p. Russian (Канцерогенез: патофизиологические и клинические аспекты. Под общ.ред. В. М. Попкова, Н. П. Чесноковой, В. Ю. Барсукова. Саратов: СГМУ, 2011. – 600 с.
119. Rankin, C.R. Identification of novel mRNAs and lncRNAs associated with mouse experimental colitis and human inflammatory bowel disease / C. R. Rankin, E. Theodorou, I.K. Man Law, L. Rowe, et al. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2018. – Nov. 1 – Vol. 315. – №5. – P. G722 – G733.
120. Redston, M.S. Common occurrence of APC and K-ras gene mutations in the spectrum of colitis-associated neoplasias / M. S. Redston, N. Papadopoulos, C. Caldas, et al. // *Gastroenterology.* – 1995. – Vol. 108. – P. 383 –392.
121. Renehan, A.G. What is apoptosis, and why is it important? / A.G. Renehan, C. Booth, C.S. Potten. // *BMJ.* – 2001. – Jun. 23. – Vol. 322. – №7301. – P. 1536 –1538.

122. Roelands, J. Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications. / J. Roelands, PJK. Kuppen, L. Vermeulen, et al. // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol. 18. – №10. – P. 2229.
123. Rosales, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types. / C. Rosales // *Front Physiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 113.
124. 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.
125. Saini, S.D. Incidence of advanced adenomas at surveillance colonoscopy in patients with a personal history of colon adenomas: a meta-analysis and systematic review. / SD. Saini, HM. Kim, P. Schoenfeld. // *Gastrointest Endosc.* – 2006. – Oct. – Vol. 64. – №4. – P. 614 – 626.
126. Sanz-Pamplona, R. Aberrant gene expression in mucosa adjacent to tumor reveals a molecular crosstalk in colon cancer / R. Sanz-Pamplona, A. Berenguer, D. Cordero // *Molecular Cancer.* – 2014. – Vol. 13. – P. 46.
127. Schadt, E.E. Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man / E. E. Schadt, S.A. Monks, T.A. Drake, et al. // *Nature.* – 2003. – Mar. – Vol. 422. – № 6929. – P. 297– 302.
128. Schwandner, R. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2 / R. Schwandner, R. Dziarski, H. Wesche, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 17406 –17409.
129. Segnan, N. SCORE Working Group. Once-only sigmoidoscopy in colorectal cancer screening: follow-up findings of the Italian Randomized Controlled Trial—SCORE / N. Segnan, P. Armaroli, L. Bonelli, et al. // *Natl Cancer Inst.* – 2011. – Sep. – Vol. 103. – №17. – P. 1310 –1322.
130. Shah, M.S. Leveraging sequence-based faecal microbial community survey data to identify a composite biomarker for colorectal cancer / M.S. Shah, T.Z. De Santis, T. Weinmaier, et al. // *Gut.* – 2018. – May. – Vol. 67. – №5. – P. 882 – 891.

131. Shanmugathasan, M. Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer. / M. Shanmugathasan, S. Jothy. // *Pathol Int.* – 2000. – Apr. – Vol. 50. – №4. – P. 273–279.
132. Sharan, R.N. Consensus reference gene(s) for gene expression studies in human cancers: end of the tunnel visible. / R. N. Sharan, S.T. Vaiphei, S. Nongrum, et al. // *Cell Oncol.* – 2015. – Vol. 38. – P. 419–431.
133. Shaukat, A. ACG Clinical Guidelines: Colorectal Cancer Screening 2021 / A. Shaukat, C.J. Kahi, C.A. Burke, L. Rabeneck, B.G. Sauer, D.K. Rex // *The American Journal of Gastroenterology.* – 2021– Vol. 116. – №3 – P. 458–479.
134. Slaughter, D.P. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin / D. P. Slaughter, H. W. Southwick, W. Smejkal // *Cancer.* – 1953. – Vol. 6. – P. 963–968.
135. Snover, D.A.D., Burt R.W., Odze R.D. et al. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated (“hyperplastic”) polyposis // *WHO Classification of Tumours Pathology and genetics Tumours of the digestive system* / Bozman F.T. C. F., Hruban R.H. et al. – Lyon: IARC Press, – 2010. – P. 160–165.
136. Sonnenberg, A. Is virtual colonoscopy a cost effective option to screen for colorectal cancer? / A. Sonnenberg, F. Delco, P. Bauerfeind. // *Am. J. Gastroenterol.* –1999. – Vol. 94. – P. 2268–2274.
137. Srivastava, N. Dropout: a simple way to prevent neural networks from overfitting. / N Srivastava, G Hinton, A Krizhevsky, et al. // *The journal of machine learning research.* – 2014. – Vol. 15. – №1. – P. 1929–1958.
138. Stratton, M.R. The cancer genome. / MR. Stratton, PJ. Campbell, PA. Futreal. // *Nature.* – 2009. – Vol. 458. – №7239. – P. 719-724.
139. Sung, H., Ferlay J., Rebecca L. Siege R.L. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siege et al. // *CA Cancer J Clin* –2021– Vol. 71 – P. 209–249.

140. 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.
141. Tarmin, L. Adenomatous polyposis coli gene mutations in ulcerative colitis-associated dysplasias and cancers versus sporadic colon neoplasms / L. Tarmin, J. Yin, N. Harpaz, et al. // *Cancer Res.* – 1995. – Vol. 55. – P. 2035–2038.
142. Terrin, L. Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease / L. Terrin, E. Rampazzo, S. Pucciarelli, et al. // *Clin Cancer Res.* – 2008. – Nov. – Vol. 14. – №22. – P. 7444 –7451.
143. Testro, A.G. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease / A. G. Testro, K.J. Visvanathan // *Gastroenterol. Hepatol.* – 2009. – Vol. 24. – P. 943 –954.
144. Thiagalingam, S. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers / S. Thiagalingam, C. Lengauer, F.S. Leach, et al. // *Nat Genet.* – 1996. – Jul. – Vol. 13. – №3. – P 343 –346.
145. Tomasetti, C. Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. / C. Tomasetti, B. Vogelstein, G. Parmigiani. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – Vol. 110. – №6. – P. 1999 – 2004.
146. Toss, M. Prognostic significance of cathepsin V (CTSV/CTSL2) in breast ductal carcinoma in situ. / M.Toss, I.Miligy, K. Gorringer, et al. // *J Clin Pathol.* – 2020 – Feb. –73 –№ 2 –P.76 –82.
147. Tsujii, M. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. / M. Tsujii, RN. DuBois. // *Cell.* –1995. – Nov 3. – Vol. 83. – №3. – P. 493 – 501.
148. Umetani, N. Genetic alterations in ulcerative colitisassociated neoplasia focusing on APC, K-ras gene and microsatellite instability / N. Umetani, S.



- Sasaki, T. Watanabe, et al. // *Jpn J Cancer Res.* – 1999. – Vol. 90. – P. 1081–1087.
149. Urbich, C. Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. / C. Urbich, C. Heeschen, A. Aicher, et al. // *Nat Med.* – 2005. – Vol. 11. – P. 206–213.
150. Van der Flier, L.G. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. / LG. Van der Flier, H. Clevers // *Annu Rev Physiol.* – 2009. – Vol. 71. – P. 241–260.
151. Van Ginderachter, J.A. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion / J. A. Van Ginderachter, K. Movahedi, G.H. Ghassabeh, et al. // *Immunobiology.* – 2006. – Vol. 211. – P. 487–501.
152. Vandesompele, J. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes / J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, et al. // *Genome Biol.* – 2002. – b, 3: RESEARCH0034.
153. 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.
154. Watanabe, T. Predicting ulcerative colitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. / T. Watanabe, T. Kobunai, Y. Yamamoto, et al. // *Clin Colorectal Cancer.* – 2011. – Jun. – Vol. 10. – №2. – P. 134–141.
155. Wijner, J. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH 6 germline mutation / J. Wijner, W. de Leuw, H. F. Vasen, et al. // *Nat Genet.* – 1999. – Vol.23. – P.142–144.
156. Willauer, A.N. Clinical and molecular characterization of early-onset colorectal cancer. / AN. Willauer, Y. Liu, AAL. Pereira, et al. // *Cancer.* – 2019. – Jun 15. – Vol. 125. – №12. – P. 2002–2010.

157. Willenbacher, R.F. Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia / Willenbacher R.F., D.E. Aust, C.G. Chang, et al. // *Am J Pathol.* – 1999. – Vol. 154. – P. 1825–1830.
158. Wong, S.H. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. / S. H. Wong, J. Yu. // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2019. – Vol. 16. – P. 690–704.
159. Yalchin, M. Predicting Colorectal Cancer Occurrence in IBD. / M. Yalchin, AM Baker, TA Graham, et al. // *Cancers (Basel).* – 2021. – Jun. – Vol. 10; 13. – № 12. – P. 2908.
160. 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.
161. Yin, J. p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions / J. Yin, N. Harpaz, Y. Tong, et al. // *Gastroenterology* – 1993. – Vol. 104. – P. 1633–1639.
162. 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.
163. Zarembek, K.A. Tissue expression of human Tolllike receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines / K. A. Zarembek, P.J. Godowski // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – P. 554–561.
164. Zhang, L. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents / L. Zhang, J. Yu, B. H. Park, et al. // *Science.* – 2000. – Vol. 290, № 5493 – P. 989 – 992.