

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Т. Т. Штабинская, В. А. Басинский, С. А. Ляликов

**АНГИОГЕНЕЗ
В АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ**

Монография

Гродно
ГрГМУ
2018

УДК 616.345-006.66-097.1
ББК 55.694.133.3
Ш87

Рекомендовано Редакционно-издательским советом ГрГМУ
(протокол № 9 от 18.05.2018 г.).

Авторы: доц. каф. патологической анатомии ГрГМУ,
канд. мед. наук Т. Т. Штабинская;
зав. каф. патологической анатомии ГрГМУ, д-р мед. наук,
проф. В. А. Басинский;
зав. каф. клинической лабораторной диагностики
и иммунологии ГрГМУ, д-р мед. наук, проф. С. А. Ляликов.

Рецензенты: проф. каф. онкологии ГрГМУ, д-р мед. наук, проф. К. Н. Угляница;
нач. ГУЗ «Гродненское областное клиническое
патологоанатомическое бюро», канд. мед. наук,
доц. М. Г. Зубрицкий.

Штабинская, Т. Т.

Ш87 Ангиогенез в аденокарциноме толстой кишки : монография / Т. Т. Штабин-
ская, В. А. Басинский, С. А. Ляликов. – Гродно : ГрГМУ, 2018. – 132 с.
ISBN 978-985-558-977-9.

В монографии обобщены современные данные о механизмах ангиогенеза в колоректальном раке, а также роли ангиогенных факторов в прогрессировании новообразования. Представлены результаты собственных исследований по использованию комплекса иммуногистохимических маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки для прогноза течения заболевания, а также эффективности химиотерапии в послеоперационном периоде. Показано, что при разной степени дифференцировки и инвазивных свойствах аденокарцином изменялась экспрессия VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- β и CD105. Разработана модель, позволяющая на основании экспрессии VEGF-A, CD105, Erk2, MMP-9 с высокой чувствительностью и специфичностью прогнозировать трех- и пятилетнюю скорректированную безрецидивную выживаемость пациентов, которым показана химиотерапия в послеоперационном периоде. Приведенные данные могут быть использованы для определения режима наблюдения за пациентом после удаления опухоли и выделения группы риска проявления химиорезистентности, требующей более углубленного обследования и корректировки схемы химиотерапии.

Рекомендуется для врачей-патологоанатомов, онкологов и врачей других специальностей, научных работников, а также для студентов медицинских факультетов.

УДК 616.345-006.66-097.1
ББК 55.694.133.3

ISBN 978-985-558-977-9

© Штабинская Т. Т., Басинский В. А.,
Ляликов С. А., 2018
© ГрГМУ, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1 КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК: ЭТИОПАТОГЕНЕЗ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ	8
1.1 Эпидемиология колоректального рака в Республике Беларусь.....	8
1.2 Этиология и канцерогенез колоректального рака	10
1.3 Классификация и гистопатология колоректального рака	14
1.4 Прогностические факторы колоректального рака.....	17
Глава 2 ОПУХОЛЕВЫЙ АНГИОГЕНЕЗ	23
2.1 Механизмы ангиогенеза	24
2.2 Метастазирование и ангиогенез	37
Глава 3 АНГИОГЕНЕЗ В АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ: ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА	39
3.1 Экспрессия маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки и краях операционных разрезов	48
3.2 Особенности экспрессии маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки в зависимости от клинико-морфологических параметров	56
Глава 4 ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АНГИОГЕНЕЗА В АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ.....	73
4.1 Оценка значимости клинических и морфологических факторов для прогноза скорректированной безрецидивной выживаемости пациентов с аденокарциномой толстой кишки	73
4.2 Значение экспрессии маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки для прогноза развития неблагоприятного исхода	82
Глава 5 МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИСХОДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИЕЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	105

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТК	– аденокарцинома толстой кишки
ВКМ	– внеклеточный матрикс
ДИ	– доверительный интервал
ИГХ	– иммуногистохимический
KPP	– колоректальный рак
МА	– маркеры ангиогенеза
ОР	– относительный риск
ПОХТ	– послеоперационная химиотерапия
СБВ	– скорректированная безрецидивная выживаемость
ЭК	– эндотелиальные клетки
ЭМП	– эпителиально-мезенхимальный переход
CD105	– эндоглин
Erk	– внеклеточная регулируемая киназа
iNOS	– индуцибельная NO-синтаза
MMP	– матриксные металлопротеиназы
NRP	– нейропинин
PBS	– фосфатно-солевой буфер
TGF- β	– трансформирующий фактор роста
VEGF	– фактор роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) занимает особое место в структуре онкологических заболеваний. Несмотря на современные возможности ранней диагностики и лечения, количество заболевших КРР и умерших от него постоянно растет. По данным Международного агентства исследования рака, в 2012 г. в мире зарегистрировано более 1,3 млн случаев КРР и 700 тысяч умерших, что составляет до 15% от общего числа первично диагностированных злокачественных новообразований всех локализаций [1-5]. Согласно прогнозам большинства ученых, заболеваемость раком толстой кишки и смертность от него будет постоянно расти и в течение ближайших 20 лет увеличится практически в 1,5-2 раза [6-8].

В настоящее время КРР находится на втором месте после рака легкого [9], но прогнозируется, что в первой половине XXI века он займет первое место в структуре онкологических заболеваний [10, 11]. У мужчин это новообразование занимает третье место по частоте (663 000 случаев в 2012 г., 10,0% от всех случаев злокачественных новообразований) и второе место (571 000 случаев, 9,4% от общего числа) у женщин [1, 2, 12]. Риск развития КРР составляет 5-6%, т. е. у каждого 20-го человека в течение жизни развивается рак данной локализации [4].

КРР характеризуется колоссальными географическими и этническими колебаниями частоты [3]. Он более характерен для индустриализованных государств (США, ЕС (46,3-51,7 случаев на 100 000 населения)), не характерен для стран африканского континента (1,6-5,9 случаев на 100 000 населения) [3, 12]. В Северной Европе показатель заболеваемости составляет 23,6-33,8 на 100 000 населения [11, 12]. Среди стран СНГ наибольшая заболеваемость отмечается в Украине (32,9 случаев на 100 000 населения), а наименьшая – в Туркменистан (1,9 случаев на 100 000 населения) и Таджикистане (1,75 случаев на 100 000 населения) [13]. Однако в последние годы отмечается тенденция к росту заболеваемости КРР в регионах с некогда низким уровнем заболеваемости,

таких как Азия в целом и Япония в частности [5]. В регионах в недалеком прошлом с высоким уровнем заболеваемости тренды разнонаправленны: показатели заболеваемости стабилизировались в Северной и Западной Европе и снизились в Северной Америке, вероятнее всего, это связано с широким внедрением скрининговых программ по выявлению полипов толстой кишки [4, 9, 12].

По данным ряда авторов, ежегодно в мире умирают от 100 до 700 тысяч человек с КРР [1, 10, 11, 13]. Наибольший уровень смертности зафиксирован в Чехии, Венгрии (34,3 случаев на 100 000 населения), Украине (32,9 случаев на 100 000 населения) и Новой Зеландии (26,4 случаев на 100 000 населения), в то время как низкие показатели – в США (15,2 случаев на 100 000 населения), Израиле (17,9 случаев на 100 000 населения), Нидерландах (17,7 случаев на 100 000 населения) и Болгарии (17,2 случаев на 100 000 населения) [10, 13]. Соотношение умерших от КРР к вновь выявленным пациентам с данным заболеванием составляет 7 к 10. При этом у 3 из 7 умерших выживаемость составляет менее 1 года [13]. Несмотря на современные методы диагностики и широкое использование комбинированного лечения, пятилетняя выживаемость в Северной Америке составляет 65%, в Западной Европе варьирует от 50% (в Швейцарии, Финляндии, Нидерландах, Испании) до 30-39% (в Италии, Дании, Великобритании, Германии и Франции), в Восточной Европе – 34%, Индии – 30% [9-11]. Таким образом, социальная значимость данного исследования обусловлена высоким уровнем заболеваемости КРР и смертности от него, что во многом связано с поздней диагностикой и в результате определяет низкую эффективность лечения.

Множество работ посвящено изучению молекулярных маркеров для диагностики и прогнозирования течения опухолей. Доказано, что наиболее агрессивные опухоли генерируют свою собственную сосудистую сеть не только для устранения метаболического дефицита, но и для метастазирования [14-18]. В работах М. Chistofalli и соавт. представлена молекулярная концепция ангиогенеза, согласно которой данный процесс контролируется молекулярно-биологическими ангиогенными маркерами [19]. Их экспрессия во многом обуславливает скорость роста опухоли и развитие метастазов при разных типах рака [15, 20, 21].

Поэтому не удивительно, что количественные методы оценки ангиогенеза рассматриваются в аспекте прогноза клинического течения и исходов заболевания [22-25].

Определению роли ангиогенеза в прогнозе КРР также уделено значительное внимание. Так, на базе данных Pub Med, на 02.02.2017 имелось 998 публикаций, соответствующих ключевым поисковым терминам «angiogenesis and prognosis and colorectal cancer». Однако опубликованные результаты в большинстве своем носят противоречивый характер. Так, в работе W. Wang и соавт. экспрессия фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в КРР достоверно коррелировала с грейдом и стадией рака [26], а S. F. Martins и соавт. отмечают гиперэкспрессию VEGF в высокодифференцированной аденокарциноме толстой кишки (АТК) [27]. Несмотря на это, авторы единодушно признали, что сведения о путях управления ангиогенезом помогут раскрыть широкие возможности для изменения взглядов на стратегию лечения злокачественных опухолей. Тем не менее, выявление того или иного прогностического маркера само по себе не позволяет предсказывать ответ опухоли на лечение [28, 29]. Таким образом, научная и медицинская значимость данного исследования состоит в определении роли маркеров ангиогенеза (МА) в совокупности с клинико-морфологическими параметрами для прогноза течения рака толстой кишки и возможном использовании полученных результатов при разработке оптимальной тактики лечения заболевания.

ГЛАВА 1

КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК: ЭТИОПАТОГЕНЕЗ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

1.1 Эпидемиология колоректального рака в Республике Беларусь

По данным канцер-регистра Республики Беларусь, в течение последних пятнадцати лет число ежегодно выявляемых лиц, страдающих раком ободочной кишки, в Беларуси увеличилось в 2 раза и в 2015 г. составило 30,8 на 100 000 населения, а число заболевших раком прямой кишки незначительно колебалось – от 13,9 до 15,7 на 100 000 населения в год.

Распределение вновь выявленных случаев заболеваний КРР в 2015 г. в Республике Беларусь по стадиям представлено на рисунке 1.1.

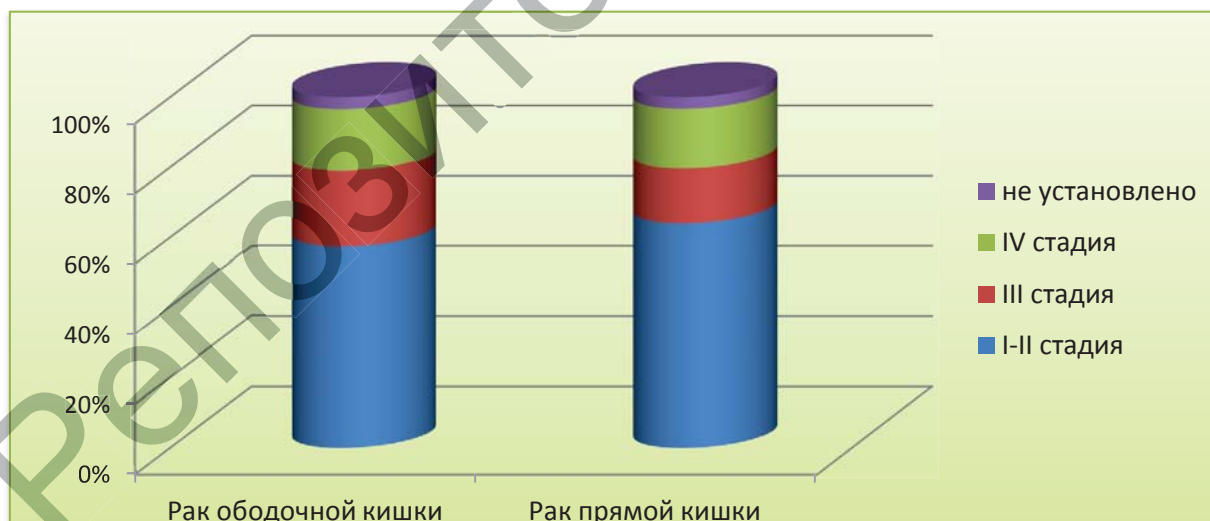


Рисунок 1.1. – Распределение заболеваний КРР по стадиям
(данные канцер-регистра Республики Беларусь, 2016)

Несмотря на современные методы раннего выявления и методы лечения КРР, смертность от него постоянно растет.

Среди новых причин смерти от злокачественных новообразований в Республике Беларусь КРР вышел на второе место у мужчин (после рака легкого), и на первое место у женщин (также как и рак молочной железы). И если количество умерших от рака легких, молочной железы и желудка снижается, то число умерших от КРР растет: за последние 15 лет – с 22,5 до 25,6 на 100 000 мужчин (рисунок 1.2), и с 19,8 до 23,0 на 100 000 женщин (рисунок 1.3).

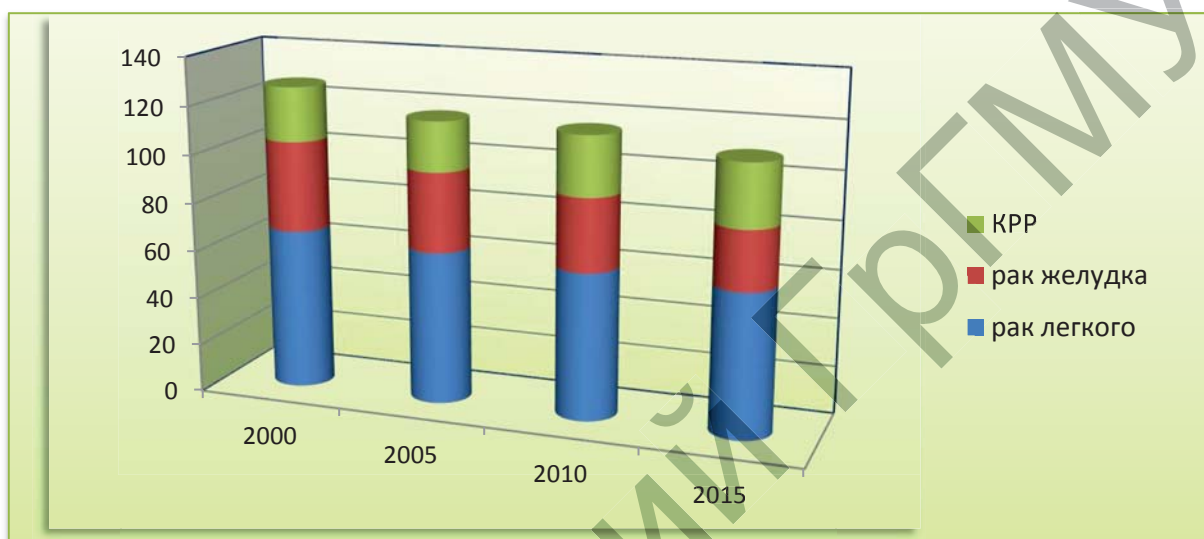


Рисунок 1.2. – Основные причины смерти от новообразований у мужчин и их динамика (на 100 000 населения)
(данные канцер-регистра Республики Беларусь, 2016)

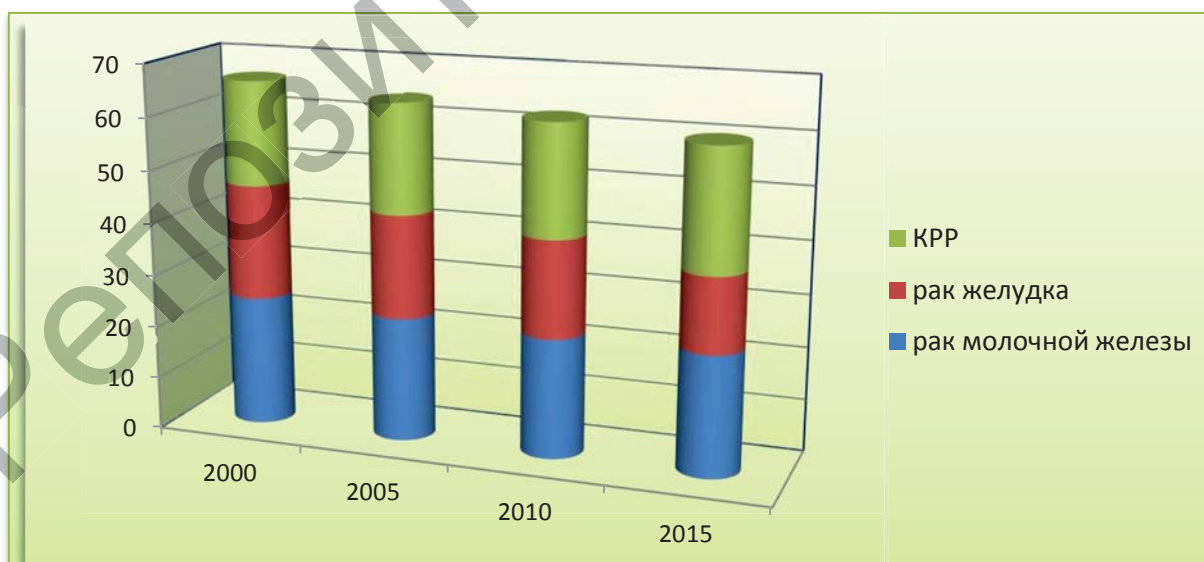


Рисунок 1.3. – Основные причины смерти от новообразований у женщин и их динамика (на 100 000 населения)
(данные канцер-регистра Республики Беларусь, 2016)

Одногодичная летальность среди пациентов с КРР за последние 20 лет уменьшилась с 44,4 до 25,2% при поражении ободочной кишки и с 37,6 до 24,5% – прямой кишки [30-31]. По данным Globocan, соотношение смертности и заболеваемости раком ободочной кишки для всех категорий населения было одинаковым и составило 0,49 при раке прямой кишки: 0,56 – среди всего населения, 0,57 – у мужчин, 0,54 – у женщин [1].

Таким образом, в начале XXI века темп прироста заболеваемости КРР и летальности от него в Республике Беларусь увеличился и, по мнению ряда авторов, в связи со сложной демографической ситуацией прогнозируется дальнейший рост заболеваемости [30].

1.2 Этиология и канцерогенез колоректального рака

«Колоректальный рак – многоступенчатый процесс, ключевым звеном в развитии которого являются генетические нарушения, ведущие к изменениям в клеточной пролиферации с последующей потерей контроля над клеточным ростом и дальнейшим развитием предмалигнантных трансформаций» [9]. Этиология КРР до сих пор не изучена.

Многие ученые делят все факторы риска развития рака данной локализации на 2 большие группы [32-34]:

- 1) внешние факторы риска (факторы окружающей среды);
- 2) внутренние факторы риска (генетические, предраковые состояния).

К факторам риска первой группы относятся возраст пациента, малоподвижный образ жизни, тучность, гипотония и атония кишечника в пожилом возрасте (хронические запоры), тип питания, хроническая травматизация слизистой оболочки толстой кишки в местах физиологических изгибов, курение [4, 5, 35].

Более 90% случаев КРР приходится на людей старше 50 лет. Заболеваемость у лиц в возрасте от 60 до 79 лет в 50 раз выше, чем у тех, кто моложе 40 лет [36]. В РБ пик заболеваемости раком ободочной кишки приходится на возраст 70-79 лет и за последние 20 лет заболеваемость в данной возрастной группе выросла с 69,8 до 119,5 на 100 тыс. населения [30]. Тем не менее, в последнее

время этот показатель стал расти и среди лиц молодого возраста [37, 38]. В США колоректальный рак входит в десятку самых частых диагнозов среди мужчин и женщин в возрасте от 20 до 49 лет [39].

Тип питания также является важным фактором риска развития КРР, так как слизистая оболочка толстой кишки находится в прямом и постоянном контакте с пищевыми компонентами [40-43]. Высококалорийный режим питания, наличие эндогенных канцерогенов в кишечном содержимом, очищенные углеводы и злоупотребление алкоголем повышают риск развития КРР, в то время как овощи, фрукты, зерна и клетчатка в некоторой степени такой риск снижают [43-46]. Возможно, это связано с тем, что западная диета, содержащая большое количество жиров, способствует развитию бактериальной флоры, способной разлагать соли потенциально канцерогенных N-нитрозо компонентов; а красное мясо, приготовленное при высокой температуре, содержит гетероциклические амины и полициклические ароматические углеводороды, которые обладают канцерогенными свойствами [47-50].

Такие факторы риска, как гиподинамия, избыточная масса тела, выявлены у трети пациентов с КРР [3, 51, 52]. Постоянная умеренная физическая активность повышает скорость обмена веществ, увеличивает эффективность метаболизма в организме, снижает давление крови и инсулиновую резистентность [53, 54]. Имеются данные о том, что риск развития аденомы толстой кишки на 16% выше при гиподинамии [55]. Отсутствие физической активности в повседневной жизни часто сопутствует ожирению, которое также является фактором риска КРР [56, 57]. С избыточной массой тела связано увеличение циркулирующих эстрогенов в крови и снижение чувствительности к инсулину [52, 58].

Связь между курением сигарет и раком легких хорошо известна, но курение также является фактором риска развития КРР [59]. Наблюдения показывают, что 12% смертей от КРР связаны с курением [60]. Курение играет большую роль в формировании и росте аденоматозных полипов, признанных предраковыми заболеваниями толстого кишечника [61]. Установлено, что у курящих мужчин и женщин полипы достигают больших размеров, а рак диагностируется в более молодом возрасте [59, 62].

Как и курение, регулярное потребление алкоголя может быть связано с повышенным риском развития КРР, особенно в молодом возрасте [62]. Проведенные исследования в Великобритании показали, что более чем 11% случаев рака кишечника, выявленных в 2010 г., связаны с потреблением алкоголя [63]. Канцерогенными свойствами обладают продукты метаболизма алкоголя, такие как ацетальдегид [64]. Курение табака нередко вызывает специфические мутации в ДНК, которые не поддаются репарации в присутствии алкоголя [60, 64]. Алкоголь способен выполнять функцию растворителя, способствующего проникновению других канцерогенных молекул в слизистую оболочку. Кроме того, воздействие алкоголя может быть опосредовано через выработку простагландинов, перекисное окисление липидов и генерацию свободных радикалов кислорода [64].

В то время как роль внешних факторов в формировании риска развития КРР продолжает обсуждаться, представления о наследственном компоненте в патогенезе опухолей толстой кишки стали носить вполне оформленный характер [65].

Известным фактором риска развития КРР являются хронические иммуноопосредованные заболевания. По данным А. С. Портянко и соавт., пациенты с язвенным колитом и болезнью Крона составляют группу наибольшего риска развития КРР [66, 67]. При этом риск развития новообразования увеличивается с распространенностью процесса и длительностью заболевания [68, 69]. Язвенный колит и болезнь Крона имеют общую генетическую предрасположенность, а воспаление при них поддерживается за счет повышенной проницаемости эпителия для бактериальных и пищевых антигенов, приводящей к активации натуральных киллеров, Т-лимфоцитов и нейтрофилов.

По данным ряда авторов, от 75 до 90% опухолей ободочной и прямой кишки развиваются в результате соматических мутаций генов, которые приводят к пролиферации железистого эпителия и трансформации аденомы в злокачественную опухоль [9, 52, 70-72]. Чаще всего малигнизируются тубулярные и ворсинчатые аденомы. На процесс злокачественной трансформации иногда требуется от 5 до 10 лет [52, 73]. Предполагается, что риск спорадического КРР может модифицироваться нормальными вариациями генома – генными полиморфизмами. Однако многочисленные попытки

установить взаимосвязь между риском развития КРР и генетическим полиморфизмом систем метаболизма канцерогенов, репарации ДНК, контроля клеточного цикла и т. д. не привели к значимым результатам [74].

В канцерогенезе остальных опухолей значительную роль играют наследственные синдромы, такие как семейный аденоматозный полипоз толстой кишки (САП) и наследственный неполипозный КРР (ННКРР) [71, 72, 75, 76].

САП-синдром диагностирован менее чем у 1% пациентов с КРР [77]. Он наследуется по аутосомно-доминантному типу и, как правило, диагностируется в молодом возрасте. Для него характерно развитие сотен полипов в толстом кишечнике, некоторые из аденом могут подвергаться злокачественной трансформации уже в возрасте 20 лет. Чаще всего САП-синдром сопряжён с мутацией в гене аденоматозного полипоза кишечника (АПК). Обнаружение делеций в длинном плече 5 хромосомы при САП позволило описать их как «5q-синдромы». Мутации АПК-гена ассоциированы как с наследственными, так и со спорадическими случаями рака кишечника. Функциональная значимость мутаций АПК-гена связана с ключевой ролью данного гена в регуляции клеточного деления эпителия толстой кишки и других тканей. Структурные перестройки в АПК-гене выявляют в 95% случаев классического САП [78].

ННКРР диагностируется у 2-6% пациентов с КРР [79]. Риск развития КРР у людей с диагностированным ННКРР составляет 70-80% [80, 81]. Средний возраст на момент постановки диагноза – в среднем 40 лет. ННКРР-индуцированные колоректальные опухоли, как правило, не развиваются по последовательности аденома – карцинома, обычной для развития других подобных новообразований, а связаны с мутациями в генах мисматчевой репарации ДНК, инактивация которых проявляется картиной, так называемой, «микросателлитной нестабильности» [70, 75, 82].

1.3 Классификация и гистопатология колоректального рака

Согласно Международной гистологической классификации опухолей кишечника [83], наиболее распространенной гистологической формой КРР является аденокарцинома. На втором месте стоит слизистая аденокарцинома (более 50% всей опухоли состоит из «озер» внеклеточной слизи). Аденокарциномы, содержащие менее 50% внеклеточной слизи, классифицируются как «аденокарциномы со слизистым компонентом».

В перстневидно-клеточном раке более 50% раковых клеток расположены изолированно и содержат значительное количество внутрицитоплазматической слизи. Аденокарциномы, содержащие менее 50% перстневидных клеток, классифицируются как «аденокарциномы с перстневидноклеточным компонентом».

К редким вариантам аденокарциномы относят крибриформную комедо-карциному, напоминающую аналогичный рак молочной железы с наличием больших крибриформных желез с некротическими массами в центре; медуллярный рак, характеризующийся полями злокачественных клеток с везикулярным ядром, выраженным ядрышком и обильной эозинофильной цитоплазмой; микропапиллярный рак, построенный из мелких кластеров раковых клеток, отделенных от стромы пространством; зубчатую аденокарциному, напоминающую зубчатостью желез и низким ядерно-цитоплазматическим отношением зубчатую аденому.

Степень дифференцировки АТК определяется по сохранной способности опухоли формировать железы: более 95% опухоли состоит из желез – высокодифференцированная аденокарцинома, 50-95% – умеренно дифференцированная, менее 50% – низкодифференцированная.

Согласно Рекомендациям Всемирной организации здравоохранения в колоректальных аденокарциномах для морфологической характеристики опухоли в зависимости от степени ее дифференцировки предпочтительно использовать термины «низкий грейд» («low-grade») и «высокий грейд» («high-grade»). Согласно критериям для гистологического грейдирования колоректальных аденокарцином, высокодифференцированные и умеренно дифференцированные аденокарциномы отнесены к группе низкогрейдных, низкодифференцированные – к высокогрейдным [83].

При микроскопическом описании рака толстой кишки необходимо отмечать помимо гистологической формы также глубину инвазии опухоли в стенку кишки, наличие или отсутствие метастазов в регионарных лимфатических узлах, митотическую активность, наличие или отсутствие раковых клеток по линии операционных разрезов, характер роста опухоли по отношению к окружающим тканям (т. н. инвазивный фронт), согласно классификации pTNM [84].

Символ pT содержит следующие градации:

pT_x – недостаточно данных для оценки первичной опухоли.

pTis – преинвазивная карцинома (интраэпителиальная инвазия, или инвазия собственной пластинки слизистой оболочки).

pT1 – опухоль распространяется в подслизистый слой стенки кишки.

pT2 – опухоль распространяется на мышечный слой, без прорастания стенки кишки.

pT3 – опухоль прорастает все слои стенки кишки с распространением в жировую клетчатку, без поражения соседних органов.

Для опухолей, расположенных в верхнеампулярном отделе прямой кишки и ректосигмоидном отделе ободочной кишки (покрытых брюшиной), символ T3 характеризует распространение опухоли до субсерозы (не прорастают серозную оболочку).

pT4 – опухоль прорастает в окружающие органы и ткани или серозную оболочку при локализации в верхнеампулярном отделе прямой кишки и ректосигмоидном отделе ободочной кишки (покрытых брюшиной).

pT4a – прорастание висцеральной брюшины.

pT4b – прорастание в другие органы и структуры.

Символ N указывает на наличие или отсутствие метастазов в регионарных лимфатических узлах:

pN_x – недостаточно данных для оценки регионарных лимфатических узлов.

pN0 – поражения регионарных лимфатических узлов нет.

pN1 – метастазы в 1-3 (включительно) регионарных лимфатических узлах.

pN1a – метастазы в 1 регионарном лимфатическом узле.

pN1b – 2-3 лимфатических узла.

pN1c – диссемины в брыжейке без поражения регионарных лимфатических узлов.

pN2 – метастазы более чем в 3-х регионарных лимфатических узлах.

pN2a – поражено 4-6 лимфатических узлов.

pN2b – поражено 7 и более лимфатических узлов.

Символ M характеризует наличие или отсутствие отдаленных метастазов:

pM0 – отдаленных метастазов нет.

pM1 – наличие отдаленных метастазов.

pM1a – наличие отдаленных метастазов в одном органе.

pM1b – наличие отдаленных метастазов более чем в одном органе или по брюшине.

Группировка по стадиям представлена в таблице 1.1 [84].

Таблица 1.1. – Классификация рака толстой кишки по стадиям

Стадия	pT	pN	pM
0	is	0	0
I	1, 2	0	0
II	3, 4	0	0
IIA	3	0	0
IIB	4a	0	0
IIC	4b	0	0
III	любая	1, 2	0
IIIA	1, 2	1	0
	1	2a	0
	3, 4a	1	0
IIIB	2, 3	2a	0
	1, 2	2b	0
	4a	2a	0
IIIC	3, 4a	2b	0
	4b	1, 2	0
IVA	любая	любой	1a
IVB	любая	любой	1b

1.4 Прогностические факторы колоректального рака

Убедительно доказано, что такие факторы прогноза течения, как возраст, пол пациента, характер местного распространения, степень поражения лимфоузлов, инвазия в кровеносные сосуды и гематогенное распространение, степень дифференцировки и выраженность десмопластической реакции вокруг опухоли важны для выбора и планирования лечения в пред- и послеоперационном периодах.

В крупнейших сериях клинических наблюдений показано, что большинство из этих факторов оказывает влияние на выживаемость пациентов. Некоторые из факторов положены в основу современной системы стадирования рака толстой кишки. Впрочем, оценить наличие того или иного из перечисленных факторов до операции бывает непросто.

Многие авторы обращают внимание на тот факт, что значительное влияние на структуру пятилетней выживаемости пациентов имеет возраст, который непосредственно определяет эффективность терапии [85, 86]. И у мужчин, и у женщин более молодых возрастных групп (14-44, 45-54) больше шансов прожить 5 лет, чем в старших возрастных группах (65-74, 75-99 лет) [85]. В течение жизни клетки накапливают определенное количество соматических мутаций, после чего репликация останавливается, но метаболизм сохраняется. Возможно, с возрастом снижается сопротивляемость клетки воздействию внешних факторов (гипоксия, онкогенные стимулы) [87]. В ответ срабатывает «ангиогенная активация» [88]. Для большинства видов рака, в том числе КРР, выживаемость у женщин на 2-14 процентов выше по сравнению с мужчинами [85].

Одним из наиболее отрицательных прогностических факторов являются большие размеры опухоли. Протяженность опухоли почти всегда коррелирует с глубиной инвазии кишечной стенки и потому редко имеет самостоятельное прогностическое значение [89]. Более 5 лет живут 88,4% пациентов, у которых опухолевая инфильтрация не вышла за пределы слизисто-подслизистого слоя (pT1), 67% – при распространении опухоли на мышечный слой (pT2-3), 49,6% – при прорастании серозной оболочки (pT4). Однако распространение новообразования вглубь кишечной

стенки обычно сопровождается лимфо- и гематогенной диссеминацией, поэтому данный показатель нельзя использовать в качестве самостоятельного прогностического фактора [90].

Метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов и других органов – определяющий фактор прогноза КРР, роль которого не дискутируется учеными. При выявлении заболевания на ранних стадиях (I-II стадии) уровень пятилетней выживаемости достаточно высок: 93,2% и 72,2%, соответственно, однако по мере роста опухоли и вовлечения в процесс регионарных лимфатических узлов наблюдается резкое снижение данного показателя до 44,3% (III стадия). При наличии отдаленных метастазов (IV стадия) показатель пятилетней выживаемости не превышает 8,1% [91-94].

Основным критерием степени злокачественности в патоморфологической диагностике АТК, согласно «Международной Гистологической Классификации опухолей кишечника», является степень дифференцировки опухолевых клеток. Сравнительно более благоприятная клиническая форма с относительно удовлетворительными отдаленными результатами характерна для высокодифференцированной и умеренно дифференцированной аденокарциномы, а для низкодифференцированной, отличающейся выраженной структурной и клеточной анаплазией, характерны более агрессивное течение и худший прогноз.

Однако ни один из перечисленных факторов не позволяет объяснить, почему даже при сходных клинических и морфологических параметрах, а также характере терапии выживаемость разная. Этот факт послужил посылком для поиска предикторов, основанных не только на клинической картине и данных стандартного морфологического исследования, но и на исследовании молекулярно-биологических свойств опухоли [95, 96].

Прогноз течения заболевания тесно связан с вероятностью появления метастазов. Самое главное требование для новых прогностических маркеров, по мнению М. К. McGuire, – их «ясная биологическая роль, тесно связанная с агрессивностью опухоли» [97]. Плотность микрососудов в опухоли полностью отвечает этому требованию и давно изучена. Так, J. Folkman и соавт. в 1989 г. и А. J. Guidi и соавт. в 1996 г. отметили, что ангиогенез необходим для перехода от преинвазивной к инвазивной стадии первичной

опухоли и индуцируется ангиогенными факторами, секретируемыми не только неопластическими клетками [98, 99]. G. Gasparini и соавт. в 1994 г. показал на опухолях молочной железы одного гистологического типа, что в инвазивных опухолях ангиогенная активность различается [100]. E. Horak и соавт. и N. Weidner и соавт. в 1992 г. в нескольких исследованиях показали, что плотность микрососудов в опухоли не связана с экспрессией p53, c-erbB-2, EGFR [101, 102]. Увеличение количества лимфатических сосудов внутри карциномы щитовидной железы существенно повышает риск лимфогенного метастазирования [103, 104].

Большинство исследований конца XX века продемонстрировали обратную связь между опухолевой васкуляризацией и выживаемостью пациентов. Это показано для рака молочной железы [101, 102, 105], рака шейки матки [106], рака легкого [107], рака простаты [108], рака пищевода [109], опухоли мозга [110], рака мочевого пузыря [111], рака яичка [112], рака прямой кишки [113], мягкотканых сарком [114], плоскоклеточных карцином головы и шеи [115-117] и т. д.

Однако в публикациях последних лет появляются противоречивые данные, которые сложно интерпретировать. Так, W. Q. Wang и соавт. установили, что определение плотности микрососудов неэффективно для прогноза гепатоцеллюлярного рака [118]. Многие авторы приходят к мнению, что «ангиогенез – процесс настолько сложно регулируемый и глубоко вплетенный в онкогенез, что предпринимаемые сегодня эксперименты по его изучению и попытки таргетного влияния выглядят неуклюжими» [87, 119].

Имеются исследования, в которых показано, что измерение уровня МА (VEGF) в сыворотке крови позволяет прогнозировать выживаемость и эффективность терапии пациентов с КРР [120]; рост и прогрессирование рака мочевого пузыря сопровождается выраженным увеличением содержания факторов роста и ангиогенеза в сыворотке крови [121]; увеличение сывороточного VEGF-C характерно для папиллярного рака щитовидной железы [122]. Уровень циркулирующего растворимого CD105 повышен у пациентов в различных опухолях, в том числе и КРР [123].

В то же время М. В. Фридман и соавт. [87] считают, что «измерение уровня маркеров ангиогенеза в сыворотке крови пока нельзя отнести к высокоспецифичным, т. к. в масштабах организма

определение ангиогенной активности не имеет предсказательной ценности ввиду действия ряда молекул, которые, с одной стороны стимулируют, а с другой – блокируют ангиогенез на уровне опухоль-микроокружение».

Одним из современных путей совершенствования прогнозирования течения рака и выработки лечебной тактики является изучение молекулярно-биологических маркеров в ткани опухоли.

Увеличение экспрессии МА в ткани опухоли, по мнению многих авторов, ассоциируется с низкой степенью дифференцировки опухоли, поздней стадией и тем самым является неблагоприятным прогностическим признаком. Так, соотношение экспрессии MMR/TIMP-1, по мнению И. В. Булычевой и соавт., является прогностическим критерием, определяющим местный инвазивный рост и метастазирование хрящобразующих опухолей с разным биологическим потенциалом [124]. В инфильтрирующей протоковой карциноме молочной железы была установлена связь гиперэкспрессии индуцируемого гипоксией фактора 2 (HIF-2 α) с высоким метастатическим потенциалом опухоли [125]. Активность ангиогенеза в молочной железе прогрессивно повышается по ходу перестройки от нормальной ткани к внутрипротоковому раку, что подтверждалось либо диффузным распределением антител в межпротоковой строме, либо формированием «муфт» из сосудов микроциркуляторного русла, тесно связанных с базальной мембраной протоков молочной железы [126].

Многие авторы считают, что увеличение плотности сосудов опухоли и усиление экспрессии VEGF-A в КРР коррелирует с неблагоприятным прогнозом [127-129]. Его уровень в низкодифференцированных формах опухоли в 10 раз превышает таковой в более дифференцированных формах опухоли [130, 131]. В опытах, проведенных на крысах, установлено, что в группе животных с изолированным введением канцерогена положительную реакцию VEGF дают до 9% клеток опухоли с грейдом 1 и до 21% клеток – с грейдом 2, при этом в зоне инвазивного роста экспрессия VEGF была выше, чем в слоях опухоли, лежащих поверхностно [132].

Высокий уровень экспрессии iNOS был отмечен в опухолях репродуктивных органов человека, повышение его активности положительно коррелировало со стадией заболевания и степенью

инвазии опухолей. Имеются данные об активации этого маркера в опухолях прямой кишки, что сопровождается активацией ангиогенеза, а также при дисплазиях и раке верхних отделов желудочно-кишечного тракта [133]. Опубликовано значительное количество работ, в которых рассматриваются вопросы влияния оксида азота (NO), а также ферментов его синтеза на развитие и прогрессирование КРР [134-137]. Экспрессия iNOS отмечается у 20-50% пациентов с КРР [138], однако имеющиеся данные о возможном влиянии экспрессии iNOS на прогноз страдающих КРР весьма противоречивы. Согласно результатам ряда исследований, при экспрессии iNOS в первичной опухоли метастазы в лимфатические узлы выявляют у 63% пациентов с КРР, а при отсутствии таковой – у 30% [136, 138, 139]. Другие же исследователи не установили прогностического значения iNOS [140, 141].

Имеются данные, что CD105 в опухолевых элементах обеспечивает мобильность, повышает протеазную активность и поднимает инвазивный потенциал [142]. При многих опухолях с преимущественно лимфогенным метастазированием, в том числе и КРР, экспрессия CD105 обнаружена и в лимфатических эндотелиальных клетках (ЭК) и выявлена зависимость риска развития метастазов в лимфатических узлах от количества CD105-положительных сосудов [143, 144].

Однако исследования последних лет показывают, что при прогрессировании заболевания в опухоли накапливаются клоны клеток, негативные по экспрессии МА, в том числе и главного ангиогенного фактора – VEGF [145]. По данным В. Л. Карапетян и соавт., степень экспрессии VEGF в ткани рака яичника снижается при прогрессировании заболевания (увеличении стадии) [146]. Результаты исследований ангиогенеза О. И. Кит и соавт. в ткани рака яичников на разных стадиях его развития не позволили выявить возможность использования VEGF-С и VEGFR-3 для определения распространенности процесса [147]. У пациентов с VEGF-отрицательными серозными раками яичников прогнозируется «высокий риск низкой выживаемости» [148]. По результатам исследования N. G. de la Torre и соавт. [149], высокая плотность лимфатических сосудов и повышенная активность VEGF-A и VEGF-С никак не связаны с размером, мультифокальным ростом и способностью рака щитовидной железы к локорегионарному или

отдаленному метастазированию. Антиангиогенная терапия (анти-VEGF) не приводит к ремиссии и выздоровлению пациентов с низкодифференцированными глиомами [150]. В карциномах желудка кишечного типа не выявлено статистически значимых различий экспрессии VEGF в зависимости от наличия лимфогенных метастазов [151].

В последнее время растет интерес к проблеме микроокружения опухоли, обеспечивающего не только поддерживающую функцию, но и функции, отвечающие за индивидуальные особенности опухоли (зависимость размеров от локализации, закономерности метастазирования, рецидивирования) [87]. У лиц пожилого возраста микроокружение опухоли способствует менее агрессивному течению заболевания: уменьшается капиллярный кровоток, появляется абберантная экспрессия ламининов, уменьшается пролиферация под действием тромбоспадина, усиливается апоптоз и тормозится миграция ЭК [88]. В раке толстой кишки гиперэкспрессия тромбоспадина ассоциируется с отсутствием лимфогенных метастазов [152]. По мнению С. С. Sprenger и соавт. [88], в тех случаях, когда рак в пожилом возрасте протекает агрессивно, именно микроокружение продуцирует проангиогенные факторы, поддерживающие рост опухоли.

Степень васкуляризации опухолей с учетом выявления диссеминированных опухолевых клеток в строме является высокоинформативным показателем наличия сосудистой инвазии [153]. Относительно недавно появилась возможность дифференцировать зрелые сосуды, содержащие перициты, а также гладкомышечные клетки и вновь образованные, которые маркируются экспрессией CD105 [142, 144, 151].

ГЛАВА 2

ОПУХОЛЕВЫЙ АНГИОГЕНЕЗ

Неоангиогенез является наиболее значимой стадией опухолевой прогрессии. На начальном этапе опухолевые узелки представляют собой кластеры, состоящие из около 1 миллиона клеток, объемом не более 1-2 мм³ [154]. Данный период может занять несколько месяцев и даже лет [155]. В этой фазе развитие опухоли не зависит от строения сосудистой сети. Кислород, питательные вещества и факторы роста поступают в опухолевые клетки в основном за счет диффузии из сосудов, проходящих в непосредственной близости [156-158].

С увеличением размеров опухоли происходит некроз в центральной ее области и без дополнительного кровоснабжения рост невозможен [157, 159]. Поэтому на следующем этапе раковые клетки приобретают ангиогенный фенотип [154], т. е. состояние постоянных генетических модификаций, ведущих к неконтролируемой продукции проангиогенных факторов [160]. Эта фраза цитируется во многих сотнях статей и в книжных главах.

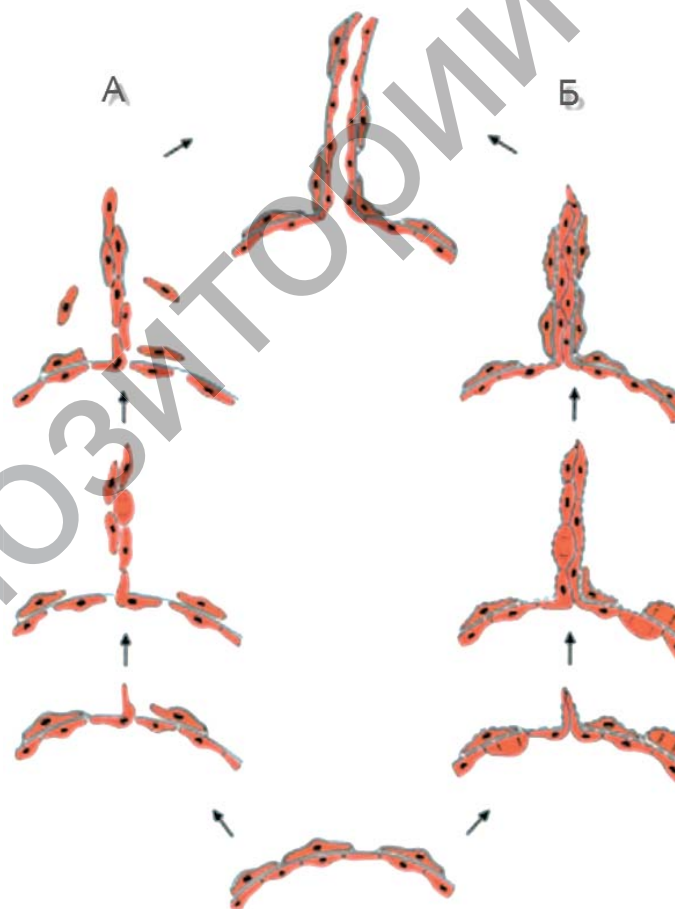
L. E. Vismanson и соавт. в 1976 г. предположили, что переход от бессосудистой стадии развития опухоли к сосудистой связан с аноксическими условиями, создающимися в центре опухолевого зачатка [161]. Применяв теорию диффузии кислорода в сферическую массу, авторы рассчитали, что такие условия возникают при достижении опухолью диаметра 2-3 мм. Совпадение расчетных данных авторов с максимальными реальными размерами аваскулярных опухолей позволило сделать заключение о том, что аноксия в центре опухоли может стать стимулом для повышения выработки факторов роста сосудов [162]. Капиллярная сеть сначала развивается в прилежащих тканях, которые впоследствии замещаются клетками опухоли [163, 164]. Плотная сеть капилляров снабжает развивающуюся опухоль кислородом, необходимыми питательными веществами, позволяет выводить токсичные продукты

жизнедеятельности опухолевых клеток. Наличие капиллярной сети облегчает также внедрение и распространение клеток метастазирующих опухолей. Микроскопически сосуды выглядят расширенными, извитыми, выявляется наличие слепых петель и выростов, шунтов и немногочисленных анастомозов [162].

2.1 Механизмы ангиогенеза

2.1.1 Механизм «прорастания» эндотелиальных клеток

Механизм «прорастания» ЭК впервые был описан в конце XVIII века и в настоящее время является наиболее изученным механизмом ангиогенеза, основанным на росте и ветвлении («branching») существующих сосудов в сторону аваскулярной зоны [165, 166]. Его первоначальную модель в 1977 г. предложили D. H. Ausprunk и соавт. [167] (рисунок 2.1 А).



А – модель D. H. Ausprunk и соавт.; Б – модель S. Raku и соавт.

Рисунок 2.1. – Схема прорастания ЭК [168]

На первом этапе происходит деградация базальной мембраны со стороны расширенной вены, которая окружает опухоль и располагается вблизи проангиогенного фактора, что способствует ослаблению связей между ЭК и их перемещению в сторону этого фактора. Затем клетки соединяются в биполярный шнур, который, закручиваясь, образует просвет сосуда. На заключительном этапе происходит синтез новой базальной мембраны и оплетение сосуда перипитами. К сожалению, данная модель имеет недостатки. Во-первых, не определены факторы, ответственные за образование просвета сосуда, во-вторых, не предусмотрена дедифференцировка и повторная дифференцировка клеток во время утраты и восстановления полярности между просветом сосуда и базальной мембраной [168].

В 90-х годах XX века S. Раки и соавт. предложили модифицированную версию вышеописанной модели [169] (рисунок 2.1 Б). На первом этапе происходит дилатация материнского сосуда, что снижает плотность базальной мембраны. Это приводит к ее частичной деградации в месте связи с ЭК и выпячиванию клеток к соединительной ткани, которые мигрируют параллельно с сохранением поляризации базальная мембрана – просвет сосуда. Новообразованная щель является продолжением просвета материнского сосуда и очень узкая в связи с сохранением межклеточных соединений. В то же время ЭК выделяют белки, которые строят новую базальную мембрану. Последним этапом процесса является стабилизация вновь образованных сосудов, возникающих в результате движения пролиферирующих клеток адвентиции материнского сосуда.

Факторы, инициирующие процесс ангиогенеза, могут иметь эндокринное происхождение (из системы кровообращения), паракринное (из прилежащих опухолевых клеток, стромы, внеклеточного матрикса или макрофагов) и аутокринное (из ЭК) [170]. После их соединения со специфическими рецепторами, расположенными на поверхности ЭК, происходит локальное ремоделирование внеклеточного матрикса, развиваются структурные изменения в базальной мембране с участием протеаз.

ПРОАНГИОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ

Способность опухолевых клеток стимулировать пролиферацию и миграцию ЭК связана с прекращением секреции ингибиторов ангиогенеза и увеличением продукции его стимуляторов [171, 172]. Когда действие проангиогенных факторов превышает действие антиангиогенных, ЭК переходят из обычного дремлющего состояния в активное [162, 173]. Этот момент называется «включением ангиогенеза», чему способствуют хроническое воспаление и гипоксия.

Эксперименты, проведенные в клеточных монослоях, показали, что ангиогенез может быть индуцирован гипоксией или гипогликемией [162]. Метаболический стресс, сопровождающий развитие опухолевой ткани, вызывает гиперэкспрессию в клетках опухоли HIF-1 α , что ведет к увеличению экспрессии проангиогенных факторов: тромбоцитарного фактора роста В (PDGF-B), фактора роста гепатоцитов (HGF) [174], ангиопоэтина 2 (Ang-2), эпидермального фактора роста (EGF), плацентарного фактора роста (PlGF) и VEGF, который является основным стимулятором неоваскуляризации.

VEGF – гомодимерный, сильно гликолизированный белок, митогенный только для ЭК. Его уровень повышается в тканях, где активно идет ангиогенез. Рецепторы VEGF экспрессируются на ЭК. В 1989 г. ученые получили данные в пользу индукции VEGF гипоксией или гипогликемией, но при двойном стрессе синтеза белка не происходит [175].

Семейство VEGF включает прототипную молекулу VEGF-A, а также VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, вирусный гомолог VEGF-E и плацентарный ростовой фактор (PLGF). Функции VEGF-A заключаются в стимулировании размножения эндотелиоцитов разных органов, антиапоптотическом влиянии на клетки вновь образованных элементов, регуляции тонуса и проницаемости сосудов посредством повышения уровня вазоактивных молекул и стимуляции хемотаксиса моноцитов, что в свою очередь открывает новый раунд ангиогенеза. VEGF-B, как полагают, играет роль в регуляции деградации внеклеточного матрикса, клеточной адгезии и миграции. Действие VEGF-C и VEGF-D отражается на развитии лимфатических сосудов [176]. Так, по мнению V. Hanrahan и соавт. [177],

на этапах малигнизации аденомы толстой кишки ключевую роль играет VEGF-A. Затем, на стадии локорегионарного метастазирования, на первое место выдвигается VEGF-C, а экспрессия VEGF-A снижается, причем рост уровня экспрессии обеих изоформ отмечается и на участках, не вовлеченных в патологический процесс.

Рецепторы VEGF локализованы на поверхности клеток эндотелия, однако могут присутствовать также и внутриклеточные («интракринные») VEGF-сигнальные рецепторы. Они вовлекаются в процессы обеспечения выживания ЭК. VEGF может присоединяться к рецепторам NRP, которые могут действовать как ко-рецепторы с VEGF и осуществлять регуляцию ангиогенеза.

NRP 1 был впервые идентифицирован как трансмембранный гликопротеин типа I, экспрессируемый на конусах роста растущих аксонов. Генетические исследования дали строгие доказательства того, что NRP1 необходим для сосудистого морфогенеза, главным образом он экспрессируется на опухолевых клетках и ЭК [178]. Хотя NRP1 и обладают способностью к взаимодействию с VEGF, данные о том, что после связывания с VEGF он передают какой-либо сигнал, отсутствуют [179].

HIF-1 α стимулирует также экспрессию NO-синтазы, которая, участвуя в метаболизме аргинина, освобождает NO, обладающий сосудоуспокаивающим свойством, а также способный увеличить выработку VEGF. Это дополнительно увеличивает проницаемость сосудов, что способствует перераспределению межклеточных белков адгезии и экстравазации белков плазмы, в том числе фибриногена [180].

В последние годы увеличилось число работ, посвященных роли NO, а также ферментов его синтеза в разнообразных физиологических и патологических процессах [136, 138, 181]. Двойственная природа NO проявляется в том, что он является существенным звеном в противовоспалительной реакции, а также способен усиливать канцерогенные эффекты [182]. Иными словами, высокие концентрации NO вызывают противоопухолевое действие, однако длительное генерирование повышенных (но не токсических) концентраций NO становится промотором роста опухоли. Токсичность гиперпродукции NO определяется его способностью взаимодействовать с белками, ДНК, влиять на активацию

(NMDA)-рецепторов. Взаимодействие NO-радикала с супероксидом приводит к образованию пероксинитрита, который может вызывать разрывы ДНК и тем самым способствовать малигнизации.

Синтазы оксида азота существуют в трех изоформах: нейрональная NO-синтаза (nNOS или NOS-1), индуцируемая NO-синтаза (индуцибельная NO-синтаза, iNOS или NOS-2) и эндотелиальная NO-синтаза (eNOS или NOS-3). Все три формы катализируют образование NO и L-цитруллина из L-аргинина и O₂ и NADPH-электронов. Названия изоформ отражают лишь историю их открытия, а в действительности все три изоформы представлены в разных тканях и типах клеток. nNOS и eNOS активируются в результате ассоциации с кальмодулином при возрастании внутриклеточной концентрации кальция и участвуют в нейротрансмиссии и дилатации сосудов, iNOS при физиологических условиях не экспрессирована. iNOS кодируется геном NOS2, впервые она была выделена из макрофагов при активации их цитокинами или эндотоксином. Хотя уже известно множество тканей, продуцирующих iNOS, в большинстве случаев она синтезируется индуцибельно при воспалительной реакции. По сравнению с другими изоформами активность iNOS в наименьшей степени зависит от концентрации кальция [183].

Чрезмерная проницаемость может привести к повреждению тканей, поэтому данный процесс контролируется Ang-1. Кроме того, Ang-1 стимулирует высвобождение MMP-2 и сериновых протеаз, участвующих в превращении плазминогена в плазмин. MMP-2, взаимодействуя с интегрином $\alpha 1 \beta 1$, путем запуска митоген-активированной киназы (MAPK) способствует пролиферации и миграции ЭК [174].

Ферменты, растворяющие белки базальной мембраны и внеклеточного матрикса, обеспечивают не только миграцию ЭК, но и освобождают проангиогенные факторы, например, фактор роста фибробластов (FGF), VEGF, а также инсулиноподобный фактор роста (IGF-1). Под влиянием VEGF, FGF происходит пролиферация, миграция и группировка эндотелиоцитов, в результате чего организуется новая капиллярная сеть [184].

Растворение базальных мембран и внеклеточного матрикса происходит в результате повышения активности MMP и активаторов плазминогена (tPA и uPA). Доказано, что супрессия Ang-1 и

TIMP-2, а также повышенная экспрессия MMP-2, MMP-3 и MMP-9 стимулирует «прорастание» ЭК [185]. В этом процессе участвует также MMP-7, который увеличивает экспрессию VEGF в фибробластах.

Семейство MMP включает около 28 представителей нескольких классов (коллагеназы, желатиназы и стромелизины), однако только желатиназы (MMP-2 и MMP-9) способны гидролизировать основной структурный белок базальной мембраны – коллаген IV типа – и участвовать в реализации инвазивного и метастатического потенциала опухолей [186-188]. MMP вовлечены и в другой механизм неоангиогенеза – сосудистую мимикрию, в ходе которой опухолевые клетки способны формировать сообщающиеся каналы между островками неопластических клеток [189]. Значение MMP в процессе ангиогенеза основано не только на деградации базальной мембраны и перестройке внеклеточного матрикса (ВКМ), но и на регуляции активности, дифференцировки и апоптоза проангиогенных факторов, участвующих в процессе роста клеток эндотелия [190, 191]. Доказано, что MMP могут влиять на рост опухоли путем освобождения IGF, одновременно они способны тормозить рост опухоли, синтезируя TGF- β . Установлено, что MMP повреждают рецепторы интерлейкина-2 на Т-лимфоцитах, тем самым тормозя иммунологическую реакцию организма против новообразования [192].

ФАКТОРЫ, АКТИВИРУЮЩИЕ МИГРАЦИЮ ЭК

Рост опухоли сопровождается воспалением, в процессе которого как лейкоциты, так и сами опухолевые клетки синтезируют фактор некроза опухоли (TNF- α), TGF, ряд цитокинов и их рецепторов. Считается, что цитокины семейства CXC (ELR, ELR + (глутаминовая кислота, лейцин, аргинин)) индуцируют миграцию и пролиферацию ЭК. Эта группа включает интерлейкин-8 (IL-8), эндотелиальный белок 78, активирующий нейтрофилы (ENA-78), белки a, b и g, связанные с ростом (GRO-a, -b, -g), гранулоцитарный хемотаксический белок-2 (GCP-2), и белок-2, стимулирующий нейтрофилы (NAP-2) [193, 194].

В настоящее время роль TGF- β в процессах злокачественной трансформации и опухолевой прогрессии неоднозначна. Непосредственно и опосредованно активируя несколько сигнальных

путей, он может быть как опухолевым промотором, так и опухолевым супрессором. Проонкогенная активность реализуется посредством его участия в процессах эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), а также в процессе формирования иммунной супрессии [195-198].

ЭМП, или трансдифференциация, во многом способствует стимуляции роста опухолей, содействуя приобретению инвазивных качеств и усилению метастазирования [199-201]. ЭМП индуцируется сигналами, поступающими извне клетки (ростовые факторы и компоненты матрикса) [202]. Во время ЭМП наблюдается подавление экспрессии гена E-кадгерина, участвующего в образовании плотных контактов между эпителиоцитами. Адгезивная способность клеток теряется, внеклеточный матрикс разрушается [201]. Этот эффект опосредуется не только Smad белками путем связывания и активации рецепторов TGF- β , но и с участием Smad-независимых путей передачи сигнала через Erk [203-205]. Erk1 и Erk2 – это многофункциональные киназы, которые участвуют в процессах пролиферации и дифференцировки как нормальных, так и патологических типов клеток [206-211].

В то же время TGF- β отвечает за усиление клеточной подвижности вследствие активации сигнальных путей, приводящих к реорганизации актинового цитоскелета; повышает экспрессию генов, кодирующих MMP, которые участвуют в деградации внеклеточного матрикса и базальной мембраны [212].

Факторы роста TGF- β также обладают иммуносупрессивным действием [34, 213]. Они подавляют интерлейкин-2-зависимую пролиферацию и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов, NK клеток и тем самым создают иммунологическую толерантность, предотвращают отторжение опухоли [34, 190]. Таким образом, TGF- β 1 способен помогать опухолевым клеткам избежать надзора со стороны иммунной системы.

На поздних этапах канцерогенеза факторы роста TGF- β , наоборот, подавляют рост опухоли, в основе же этого эффекта могут лежать разные механизмы. В первую очередь это способность TGF- β регулировать клеточный цикл путем индукции синтеза ингибиторов циклинзависимых киназ семейств Ink4 и Cip/Kip [214-217]. В конечном итоге индукция синтеза киназ приводит к остановке клеточного цикла в G1 фазе [216, 217].

TGF- β способен также индуцировать апоптоз эпителиальных, эндотелиальных, гематopoэтических клеток независимо от R-Smad или с участием ингибиторных Smad белков [192, 218-220].

Благодаря активации теломеразы, опухолевые клетки не стареют. Ее активность зависит от уровня транскрипции гена hTERT. TGF- β подавляет экспрессию hTERT, при участии трех сигнальных путей: Mad1, Menin, SIP1/ZEB-28, что в конечном итоге приводит к снижению активности теломеразы [221].

К факторам, стимулирующим миграцию, необходимо также отнести VEGF, который ускоряет пролиферацию клеток и защищает их от апоптоза, вызванного внеклеточными факторами, такими как TNF- α и интерферон- γ (IFN- γ) [193].

Под действием факторов роста ЭК начинают мигрировать, в то время как белки базальной мембраны и внеклеточного матрикса, окружающие эндотелий, локально деградируют под действием протеаз. Некоторые ЭК, так называемые «пиковые» клетки (tip cells), устанавливают направление роста ветви сосуда. В них обнаружены ингибирование сигнального пути рецептора Notch и усиленная экспрессия его лиганда Dll4. Повышение синтеза Dll4 вызвано формированием комплекса VEGF-A с его рецептором VEGFR-2. Установлено, что пиковые клетки в ответ на VEGF-A165 формируют и удлиняют филоподии (при этом его градиент определяет направление миграции), в то время как наличие VEGF-121 стимулирует пролиферацию остальных ЭК в новообразованном выступе сосуда. Формирование филоподий также может быть стимулировано путем связывания с VEGF-A165 трансмембранных рецепторов Семафорин-Нейропилин [222].

ФАКТОРЫ, СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ СОСУД

Последний этап опухолевого ангиогенеза включает созревание новообразованных сосудов. Механический стресс, сопровождающий движущиеся ЭК, активирует PDGF-B, который участвует в стабилизации сосуда. Он стимулирует клеточную миграцию клеток адвентиции и гладкомышечных клеток сосуда, а те в свою очередь тормозят пролиферацию и движение ЭК [223]. Снижение проницаемости сосудов и стимуляция взаимодействий между ЭК и перицитами происходит благодаря Ang1 и TGF- β [174, 185, 224].

В свою очередь в образование просвета вовлечены коннексин и кадгерин, которые поддерживают связь между ЭК [222, 225].

ИНГИБИТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА

В микроокружении опухоли секретируются факторы, которые могут не только стимулировать развитие кровеносных сосудов, но и ингибировать их. В высвобождении эндогенных ингибиторов ангиогенеза принимают участие ММР. Например, ММР-7 и ММР-9 генерируют ангиостатин, ММР-2 и ММР-9 активируют тромбоспондин 1, а ММР-1 и ММР-3, нарушая взаимодействие ММР-2 с интегрином $\alpha V\beta 3$, ингибируют образование новых сосудов [185, 193, 194].

1.1.2 Инвагинационный ангиогенез

Существует также механизм образования новых кровеносных сосудов путем инвагинации соединительной ткани к внутренней части существующих сосудов, впервые установленный в 80-х годах прошлого века в процессах перестройки сосудистой сети легких в постнатальном периоде. Эксперименты, проведенные в ксенографтах рака толстой кишки, меланомы или рака молочной железы, показали, что ангиогенез путем инвагинации протекает быстрее (до нескольких часов) и требует меньше энергии, т. к. не зависит от деградации базальной мембраны и деления эндотелиальных клеток [226]. Инвагинация начинается с увеличения размера материнского сосуда, что приводит к удлинению и истончению ЭК (рисунок 2.2 А). Впоследствии ЭК, расположенные симметрично на противоположных сторонах сосуда, образуют выпячивания (рисунок 2.2 Б), которые контактируют с мембранами («целующиеся контакты») (рисунок 2.2 В).

На следующем этапе ЭК соединяются с клетками противоположной стороны сосуда. Возникающая перфорация клеточной мембраны и перестройка межклеточных соединений способствует отложению интерстициальной ткани между бислом ЭК. Разрастание интерстициального столбца сопровождается перемещением перицитов и миофибробластов, синтезирующих коллагеновые волокна (рисунок 2.2 Г) [168].

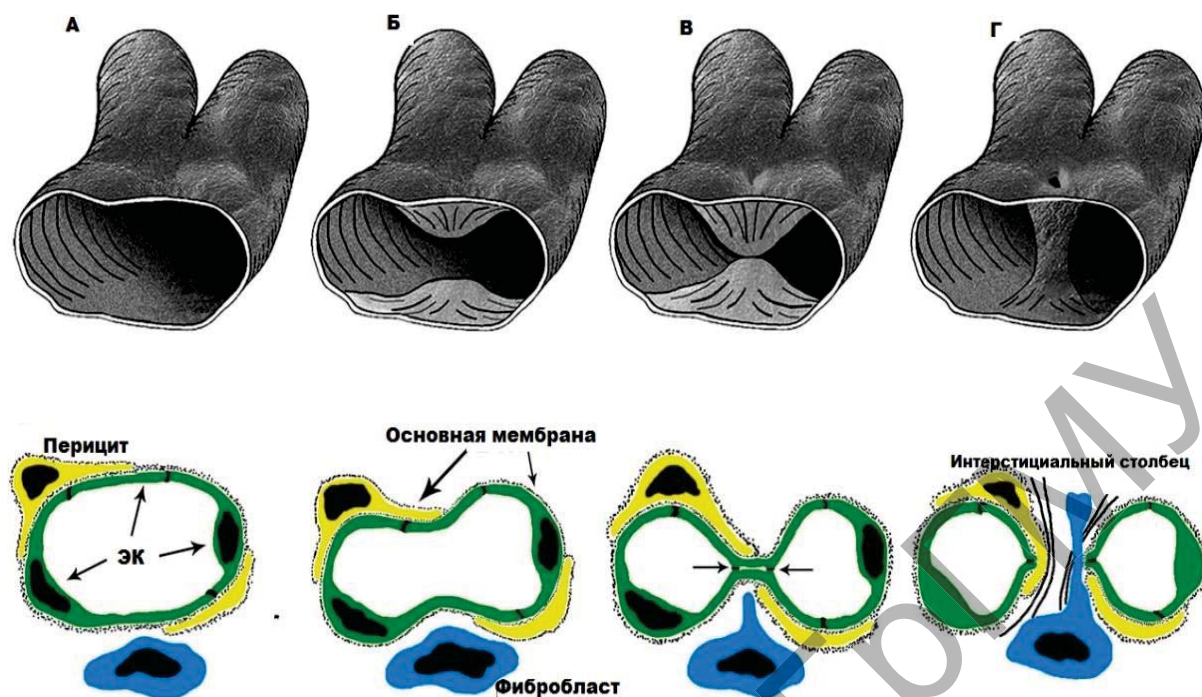


Рисунок 2.2. – Инвагинационный ангиогенез [227]

Механизм, инициирующий инвагинационный ангиогенез, до конца не изучен. Возможно, повышение внутрисосудистого давления запускает каскад физиологических и патологических реакций в ЭК, способствующих образованию интерстициальных столбцов. В этом, безусловно, участвуют цитокины, которые опосредуют передачу информации между ЭК и неэндотелиальными клетками, такие как PDGF-В, TGF- β , хемотаксический белок-1 моноцитов, эфрины и их рецепторы. Перенос сигнала с поверхности ЭК внутрь клетки опосредуется, вероятно, CD31, в результате чего увеличивается экспрессия ангиогенных факторов, белков адгезии и NOS [184].

2.1.3 Гломерулоидный ангиогенез

Суть гломерулоидного ангиогенеза заключается в образовании сосудистых каналов, напоминающих почечные клубочки, выстланных ЭК, окруженных базальной мембраной разной толщины и прерывистым слоем адвентиции [226, 228]. Эти так называемые гломерулоидные тельца встречаются чаще в плеоморфной глиобластоме, и реже – в раке желудка, толстой кишки и кожи [229], их наличие является неблагоприятным прогностическим фактором [226].

Гломерулоидные тельца образуются из материнской артериолы, которая под действием VEGF увеличивается в размере. Ее стенка становится тонкой и скудно окруженной неделящимися клетками адвентиции (рисунок 2.3) [180]. В экспериментальных условиях *in vivo* гломерулоидные тельца появляются в просвете материнского сосуда, вблизи клеток опухоли, продуцирующих VEGF, в течение 3 дней. Они образуют кластер быстро размножающихся ЭК, направленных в соединительную ткань, окружающую сосуд. Перициты в этих образованиях встречаются только на периферии. ЭК, врастающие в просвет сосуда, делят его на более мелкие, многочисленные каналы, что иногда даже затрудняет кровоток.

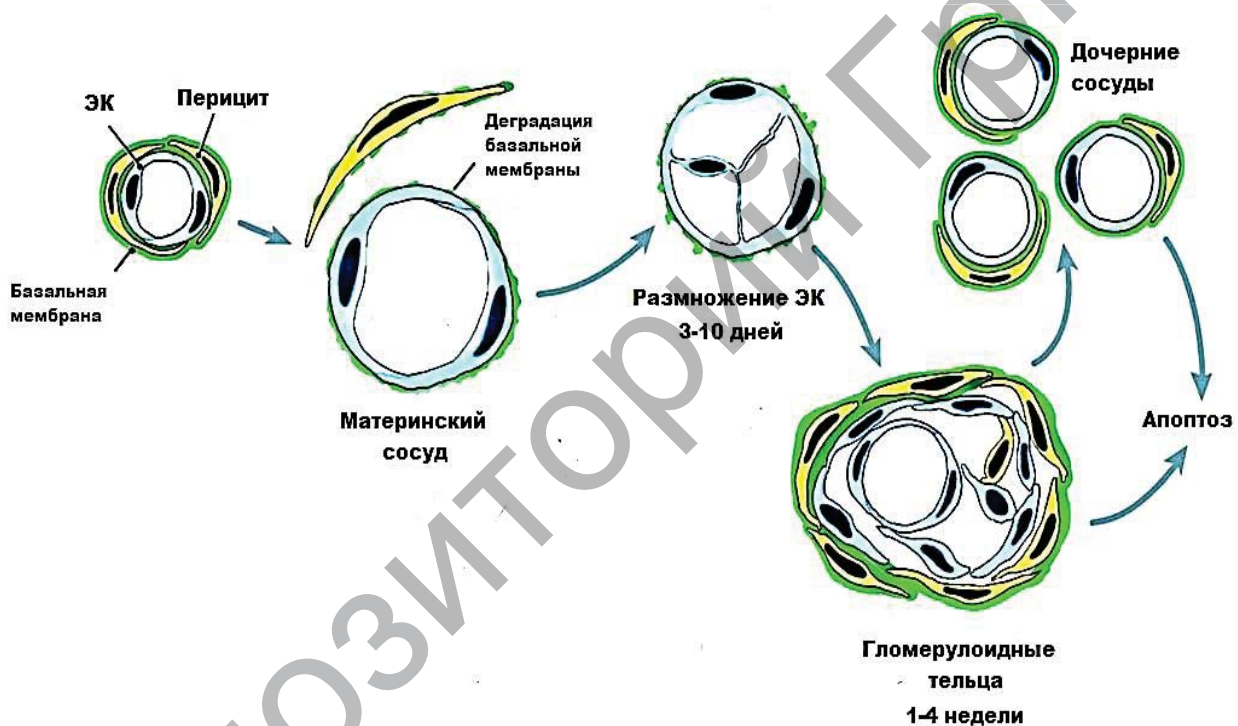


Рисунок 2.3. – Формирование гломерулоидных телец [230]

Примерно через 7 дней на краях гломерулоидных структур появляются макрофаги, чья роль пока неизвестна. По мере снижения уровня VEGF начинается перестройка структуры: клетки адвентиции делятся на более мелкие кластеры, а часть ЭК, макрофагов и перицитов в результате паракринной взаимосвязи между ними подвергается апоптозу, при этом апоптоз ЭК вызван отсутствием клеток адвентиции [228].

На заключительном этапе под влиянием клеток адвентиции сократительного типа происходит разделение и увеличение расстояния между потомственными сосудами, восстановление базальной мембраны. Формирование экстрацеллюлярного матрикса за счет миграции перицитов, по мнению С. Sundberg, провоцирует VEGF в условиях гипоксии [229].

Однако В. Döme и соавт. полагают, что гломерулоидные тельца формируются в опухоли путем нагромождения существующих капилляров и прилежащих к ним ветвей с последующим ремоделированием и формированием потомственных сосудов [226]. Кроме упомянутого VEGF, на представленный выше механизм ангиогенеза влияют Ang-1 и его рецептор Tie-2, а в стабилизации и последующей дифференцировке сосудов – эфрин-B2 [228].

2.1.4 Встраивание кровеносных сосудов хозяина

Механизм встраивания кровеносных сосудов хозяина, описанный в 90-х годах прошлого века, выявлен в хорошо перфузируемых органах, таких как мозг, легкие и печень, где опухоли не формируют собственную сосудистую сеть, а используют уже существующую [168]. Этот процесс в раке легкого, метастазах рака толстой кишки в печени и в глиоме предвещает плохой прогноз для пациентов [226]. Было показано, что в метастатических очагах ЭК делятся в меньшей степени, чем в первичном узле, и, следовательно, рост опухоли происходит не по классической модели ангиогенеза [231].

Несмотря на отсутствие увеличения экспрессии факторов роста, уже на второй неделе развития глиобластома небольшого размера хорошо васкуляризована. На четвертой неделе происходит регрессия сосудов и гибель окружающих их клеток, что является защитным механизмом организма [184]. На данном этапе апоптоз запускается аутокринным действием Ang-2, что при отсутствии VEGF дестабилизирует сосуды и предотвращает их созревание (отмечено на рисунке 2.4 под цифрой 1). Поэтому опухоль в состоянии гипоксии начинает синтезировать VEGF, который инициирует прорастание новых кровеносных сосудов и предотвращает отмирание опухоли [228, 232] (рисунок 2.4, цифра 2).

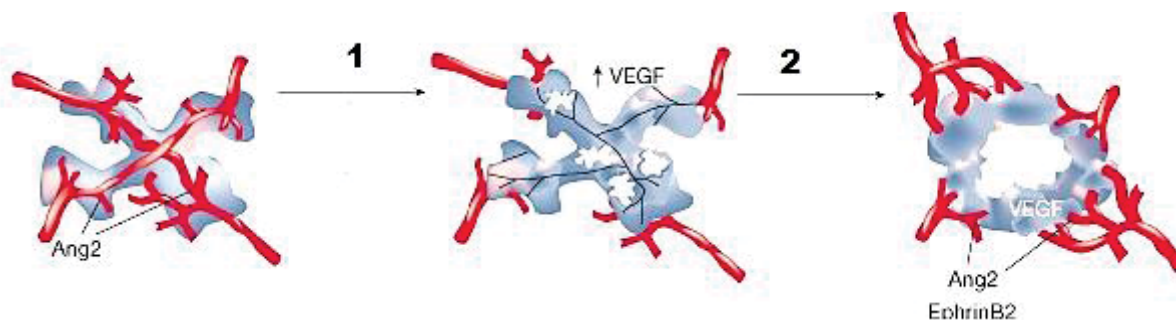


Рисунок 2.4. – Механизм встраивания кровеносных сосудов хозяина [232]

2.1.5 Сосудистая мимикрия

Сосудистая мимикрия – уникальная способность клеток злокачественных опухолей экспрессировать фенотип ЭК и формировать сосудисто-подобные структуры. Этот механизм выявлен и опубликован А. J. Maniotis и соавт. в меланоме в 1999 г. для того, чтобы подчеркнуть, что создание сосудистоподобных структур происходит без участия ЭК, и что жидкости могут быть транспортированы без неоваскуляризации [233].

Сосудистая мимикрия при злокачественных опухолях коррелирует с высоким уровнем смертности среди пациентов, так как, обеспечивая постоянный обмен питательных веществ, предотвращает некроз клеток опухоли. Это имеет место в опухолях кожи и полости рта, молочной железы, предстательной железы, яичников, мочевого пузыря, гепатоцеллюлярной остеосаркоме и астроцитоме. Анализ КРР показал, что 15% существующих сосудов также могут быть образованы из других клеток, так как не окрашиваются маркерами ЭК: CD31 и CD105 [231].

Считается, что гипоксия ткани опухоли способна вызвать явление мимикрии. Так как bFGF, VEGF, TGF- β , PDGF, TNF- α и эндостатин не влияют на рассматриваемый процесс, предполагается, что он не зависит от путей, обсуждаемых в классических моделях ангиогенеза [184, 231].

Этиология данного явления неизвестна. Возможно, причина заключается в сильном разрегулировании белкового профиля раковых клеток. Выявлена повышенная экспрессия протеиназ MMP-1, MMP-2, MMP-9 и MT1-MMP мембраны, циклооксигеназы-2 (COX-2), эфрина А, (VE)-кадгерина, CD34, NRP1, CD105

и фибронектина, коллагена I и IV и цепи 5G2 ламинина. К тому же отмечена гиперэкспрессия генов ингибиторов коагуляции (TEPI-1, -2). Показано также, что активация Erk пути повышает экспрессию uPA и активность MMP-2/MT1-MMP [168].

Все процессы, рассмотренные выше, не исключают друг друга, более того, во многих случаях связаны друг с другом, сосуществуя как в физиологической, так и в патологической неоваскуляризации.

2.2 Метастазирование и ангиогенез

По мнению многих ученых, метастазирование зависит от ангиогенеза [234]. Гематогенное метастазирование сопровождается прикреплением опухолевых клеток к ЭК, проникновением их в просвет сосуда, циркуляцией в крови, образованием колонии в отдаленной ткани [235].

Проблема покоящихся метастазов – одна из трудноразрешимых в онкологии. В течение 5 лет после удаления опухоли можно с большой вероятностью ожидать рецидив. В литературе описаны случаи раннего метастазирования после операции, которые объясняются учеными повышением содержания факторов роста в организме, как результат процессов заживления операционной раны.

Однако некоторые ученые полагают, что клетки опухоли выделяют ингибиторы ангиогенеза, которые накапливаются на периферии первичной опухоли и задерживают развитие метастазов [236]. Размер покоящегося метастаза остается неизменным, т. к. отсутствие собственной капиллярной сети во вторичной опухоли поддерживает равновесие между апоптозом и пролиферацией ее клеток [237].

До недавнего времени лимфогенное метастазирование рассматривалось как пассивное проникновение опухолевых комплексов через стенки существовавших в органе сосудов под действием отрицательного давления. Современное представление о лимфогенном метастазировании сводится к лимфангиогенезу и его подобию с ангиогенезом.

Регуляторами этих двух процессов могут выступать одни и те же молекулы. Долгое время главным медиатором образования

новых лимфатических капилляров считался рецептор VEGFR-3, но не VEGFR-2. Однако теперь установлено, что VEGFR-2 и VEGFR-3 принимают участие в регуляции как ангиогенеза, так и лимфангиогенеза. Оба фактора – VEGF-C и VEGF-D – способны инициировать лимфангиогенез *in vivo* [238-240].

Возникновение метастазов – основная причина смертности пациентов, страдающих раком, поэтому идентификация маркеров, тесно связанных с метастатическим потенциалом каждой отдельной опухоли, клинически необходима для планирования терапии и разработки новых противоопухолевых препаратов [241]. Пока в клинической практике не принято ориентироваться на МА при назначении антиангиогенной терапии и контроле ее результатов. Но подобные проблемы не останавливают ни разработчиков, ни пользователей [87].

Таким образом, многочисленные и противоречивые результаты исследований указывают на то, что определение экспрессии МА в злокачественной опухоли может стать независимым прогностическим фактором прогрессии рака. Однако выявление того или иного прогностического маркера само по себе и без учета клинкоморфологических данных не позволяет предсказывать течение заболевания и ответ опухоли на лечение [28, 29]. Изложенные выше проблемные вопросы послужили предпосылкой для проведения настоящего исследования и определили его цель и задачи.

ГЛАВА 3

АНГИОГЕНЕЗ В АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ: ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Для изучения ангиогенеза в АТК проведено проспективное поперечное (одномоментное) аналитическое, продольное (динамическое), и сравнительное исследования (рисунок 3.1).



Рисунок 3.1. – Схема исследования

Критерии включения в исследование: опухоли, имеющие гистологическое строение аденокарциномы разной степени дифференцировки.

Критерии исключения из исследования: первично-множественные раки и новообразования, имеющие гистологическое строение слизистой, микропапиллярной аденокарциномы, крибриформной комедо-карциномы, перстневидноклеточного, плоскоклеточного и недифференцированного рака.

Характеристика экспрессии МА в АТК была дана на основе проспективного поперечного сравнительного исследования 72 аденокарцином от 72 пациентов и 20 фрагментов слизистой толстой кишки краев операционных разрезов от 20 пациентов с АТК – группы контроля, прооперированных в областном онкологическом диспансере учреждения здравоохранения «Гродненская областная клиническая больница» в период с января 2001 г. по декабрь 2011 г. Значение экспрессии МА в АТК для прогноза СБВ пациентов было установлено при помощи проспективного продольного исследования 71 АТК.

Прогностическое значение МА при АТК с химиотерапией в послеоперационном периоде (ПОХТ) было установлено путем проспективного продольного сравнительного исследования 27 пациентов, прооперированных и прошедших курс химиотерапии в период с января 2001 г. по декабрь 2005 г. и 45 пациентов без ПОХТ (группы сравнения).

Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет».

Парафиновые блоки с тканью опухоли толстой кишки были собраны в архиве Гродненского областного патологоанатомического бюро. Для исследования выбирали блок с сохраненной структурой ткани, без некроза и геморрагий. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 4 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином для того, чтобы убедиться, что блок содержит опухоль, т. к. с выбранных блоков уже делались срезы в диагностических целях. Препараты использовали для обзорной микроскопии с последующей реклассификацией на основании критериев Международной гистологической классификации по патологии пищеварительной системы [83].

Для исследования тканей АТК и контроля изготавливали опухолевые и тканевые парафиновые мультиблоки по методу W. H. Wan и соавт. [242] в собственной модификации (рационализаторское предложение «Способ изготовления парафиновых блоков для иммуногистохимических исследований», регистрационный № 1689 от 17.11.2014 г.) [243]. После пересмотра микропрепаратов на стеклах с опухолью и тканью краев резекции отмечали наиболее информативные и подходящие для исследования

участки размером 5×5 мм. Из соответствующих стеклам парафиновых блоков вручную вырезали отмеченные участки тканей и помещали их в специальных кассетах в виде асимметричной матрицы в определенной, четко маркированной последовательности. В одной кассете располагалось 5 кусков. Кассеты помещали в термостат (60°C) до расплавления парафина. Далее куски переносили в металлическую формочку и наливали свежую порцию разогретого до 58-65°C парафина. Ориентацию кусочков ткани в формочке сохраняли с помощью подогретых препаровальной иглы и глазного пинцета.

Парафиновые срезы из приготовленных мультиблоков, полученные с помощью ручного ротационного микротом (Accu-Cut® SRM™200, Sakura), толщиной 3-4 мкм помещали на предметные стекла с высокой адгезивной способностью FLEXHIS. Характеристика изучаемых генов приведена в таблице 3.1.

Таблица 3.1. – Характеристика изучаемых генов

Ген	Название	Локализация	Функции
VEGF-A	Фактор роста эндотелия сосудов, фактор проницаемости сосудов	цитоплазматическая	миграция и митоз ЭК, создание просветов в кровеносных сосудах, ингибирование апоптоза, вазодилатация, хемотаксис для макрофагов и гранулоцитов
NRP1	CD304, рецептор для VEGF-165, VEGF-A, VEGF-B, PlGF, Sema 3A	цитоплазматическая, мембранно-ассоциируемая	VEGF2 ко-рецептор, может выступать в качестве регулятора VEGF-индуцированного пути
MMP-2	Желатиназа-A	цитоплазматическая	местный протеолиз ВКМ и миграция лейкоцитов
MMP-9	Желатиназа-B	цитоплазматическая	
TGF-β	Трансформирующий ростовой фактор бета	цитоплазматическая	ЭМП, формирование иммунной супрессии, усиление клеточной подвижности, снижение активности теломеразы; индукция апоптоза и остановка клеточного цикла в G1 фазе

Ген	Название	Локализация	Функции
CD105	Эндоглин	мембранно-ассоциируемая	TGF- β ко-рецептор, может выступать в качестве регулятора не VEGF-пути ангиогенеза
ERK-2	Внеклеточная сигнал-регулируемая киназа 2, митоген активированная протеинкиназа	ядерная	пролиферация, миграция и выживание ЭК
iNOS	Индукцибельная (индуцируемая) синтаза оксида азота	цитоплазматическая, ядерная	пролиферация клеток, вазодилатация

Демаскировку антигенов осуществляли в DakoPTLink при температуре 97°C в течение 40 минут по стандартному протоколу [244]. Кассеты со стеклами извлекали из резервуаров с раствором и немедленно помещали на промывочную станцию PTLink, содержащую разведенный при комнатной температуре промывочный буфер.

Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывали 3% водным раствором перекиси водорода в течение 10 минут. Перекись смывали дистиллированной водой. Срезы помещали в 0,01М фосфатно-солевой буфер pH 7,4 (PBS) на 5-10 минут. Стекло вокруг срезов промокали фильтровальной бумагой и рисовали гидрофобный круг специальным фломастером (Dako Pen).

Для неспецифического связывания реагентов с тканевыми компонентами наносили на срезы 5% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma Aldrich) на фосфатном буфере на 10 минут при комнатной температуре. Удаляли блокировочный раствор.

Инкубацию с первичными антителами к CD105, VEGF-A, Erk2, iNOS, TGF- β , MMP-2, MMP-9 осуществляли во влажной камере при температуре +4°C в течение 16 часов, к NRP1 – при +37°C в течение 30 минут (таблица 3.2). Для исследований применялись коммерческие антитела фирм Abcam (Великобритания), Novocastra (Германия) и Dako Cytomation (Дания).

Таблица 3.2. – Характеристика использованных первичных антител

Анти-тело	Каталож-ный но-мер	Клон, источник	Разве-дение	Время инку-бации (ч)	Темпе-ратура инку-бации, (°C)	Положи-тельный контроль
VEGF-A	Ab1316	VG-1, мышинные	1:100	16	4	ткань почки
NRP 1	Ab81321	EPR3113, кроличьи	1:100	0,5	37	ткань почки
MMP2	NCL-MMP2-507	17B11, мышинные	1:40	16	4	ткань плаценты
MMP9	Dako A0150	поликло-нальные, кроличьи	1:50	16	4	ткань минда-лины
TGF- β	Ab66043	поликло-нальные, кроличьи	1:500	16	4	ткань плаценты
CD105	Ab114052	3A9, мышинные	1:100	16	4	ткань рака почки
Erk2	Ab72096	поликло-нальные, кроличьи	1:100	16	4	ткань рака молочной железы
iNOS	Ab15323	поликло-нальные, кроличьи	1:100	16	4	ткань плаценты

Контрольный срез оставляли без первой инкубации (для отрицательного контроля антител).

Срезы тщательно отмывали в PBS и оставляли в нем на 5 минут. В качестве визуализирующей системы использовали стандартный набор EnVision (Dako). Инкубацию со вторыми анти-телами проводили во влажной камере при температуре 37°C в те-чение 20 минут. Затем препараты тщательно промывали в PBS два раза по 5 минут.

Непосредственно перед применением готовили рабочий раствор хромогена согласно инструкции фирмы-производителя (Dako). Стекло вокруг срезов промокали фильтровальной бумагой, наносили необходимое количество приготовленного раствора диаминобензидина, что позволило получить специфическую коричневую окраску, появление которой контролировали под микроскопом. По достижении оптимальной окраски стекла промывали в дистиллированной воде (2-3 порции воды (10-15 мин)).

Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера (2-5 мин). Краситель смывали дистиллированной водой и стекла помещали в проточную воду на 3 минуты. После приобретения срезами голубого оттенка стекла извлекали, дегидратировали (в батарее спиртов), просветляли (в батарее ксилолов), заключали в канадский бальзам [245].

Для контроля активности первичных антител в каждой серии проводили положительное контрольное окрашивание. Для положительного контроля CD105 использовали ткань рака почки, для VEGF-A и NRP1 – ткань почки, для MMP-9 – ткань миндалин, для MMP-2, iNOS и TGF- β – ткань плаценты, для Erk2 – ткань рака молочной железы.

Для количественной оценки результатов ИГХ окрашивания микропрепараты сфотографировали в максимально возможном количестве неперекрывающихся полей зрения, полученных с использованием объектива $\times 10$ с разрешением 1600×1200 пикселей, при помощи микроскопа Leica и цифровой камеры Leica 425 C. Экспрессию маркеров оценивали количественно при помощи компьютерной программы для обработки цифровых изображений Aperio Image Scope v9.1.19.1567, находящейся в свободном доступе сети Интернет. Данная методика была апробирована ранее для количественной оценки ИГХ-реакций [246]. Программа калибровалась, после чего площадь экспрессии каждого маркера оценивали, исходя из показателя «позитивность» (в интерфейсе программы «positivity»), определяемого компьютерной программой, по стандартному алгоритму подсчёта позитивных пикселей «Positive Pixel Count v9». Данный показатель представляет собой отношение количества позитивно окрашенных пикселей к общему количеству пикселей на оцениваемых участках.

Современные представления о биологии рака во многом основываются на экспериментальных данных, свидетельствующих о тесной связи трансформированного эпителия с эволюционными процессами мезенхимы [247]. Более сложной, но и более перспективной является точка зрения относительно существования феномена эволюции эпителиальных клеток и стромальных компонентов как единого целого в процессе канцерогенеза и прогрессии опухоли [248]. В связи с этим производили расчет общей, паренхиматозной и стромальной позитивности в аденокарциноме и общей позитивности в краях послеоперационных разрезов для VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- β , Erk2, iNOS.

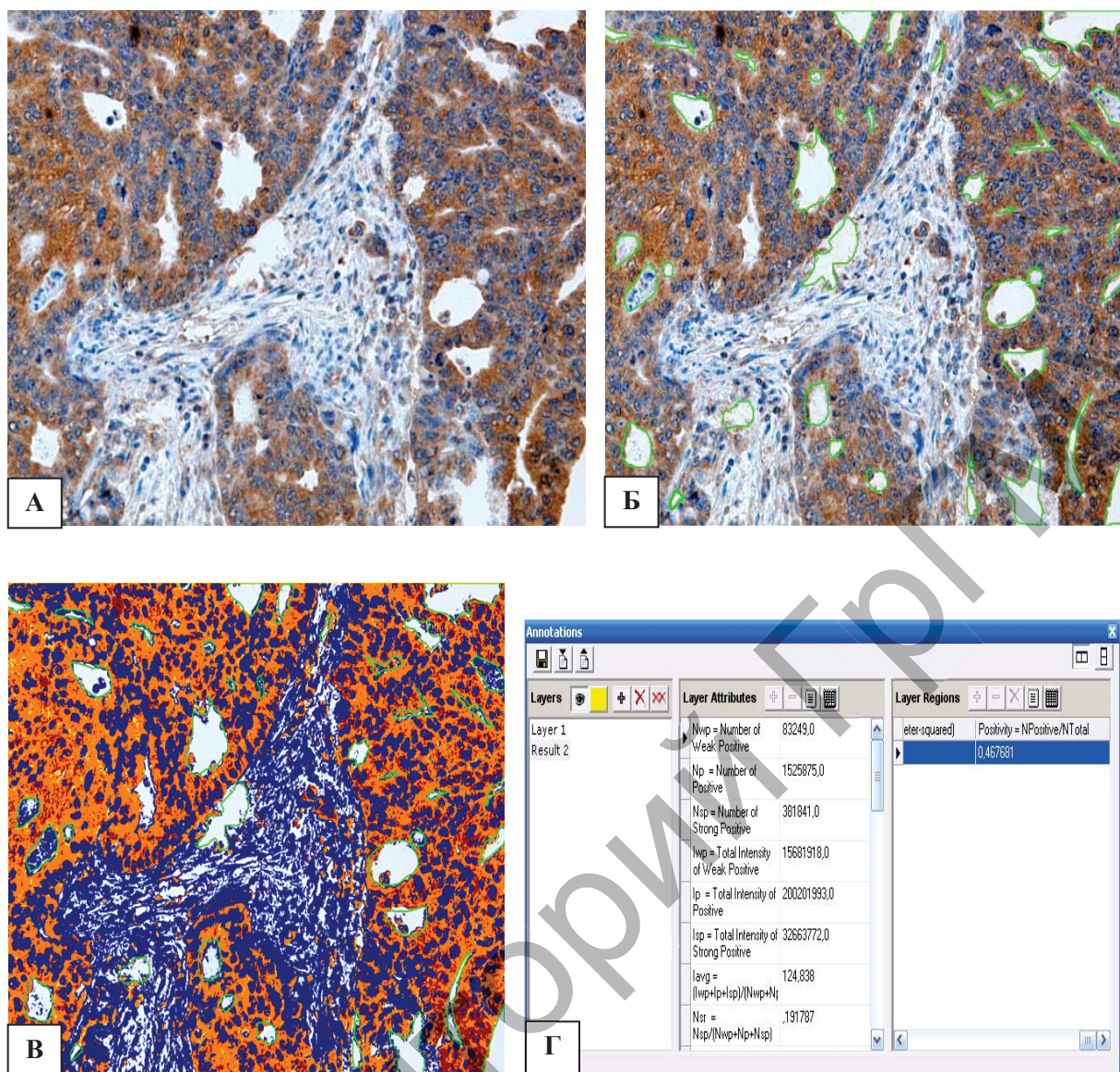
Анализу подвергались все участки опухоли и послеоперационных краев резекции. Для получения показателя «общая позитивность» в опухоли или послеоперационных краях резекции из анализа исключили гистологические артефакты и просветы сосудов при помощи инструмента «negative pen tool» (рисунок 3.2).

Для получения показателя «позитивность» в опухолевой паренхиме анализу подвергли опухолевые пролифераты при помощи инструмента «pen tool» (рисунок 3.3 А). После получения показателя «позитивность» для каждого изображения, значение для каждого случая рассчитывалось как среднее значение позитивности всех изображений по правилам нахождения среднего.

Для оценки экспрессии МА в строме опухоли анализу подвергали стромальные прослойки между опухолевыми пролифератами. Опухолевую паренхиму и просветы сосудов, а также гистологические артефакты исключили из анализа при помощи инструмента «negative pen tool» (рисунок 3.3 Б). После получения показателя «позитивность» для каждого изображения значение для каждого случая рассчитывалось как среднее значение позитивности всех изображений по правилам нахождения среднего.

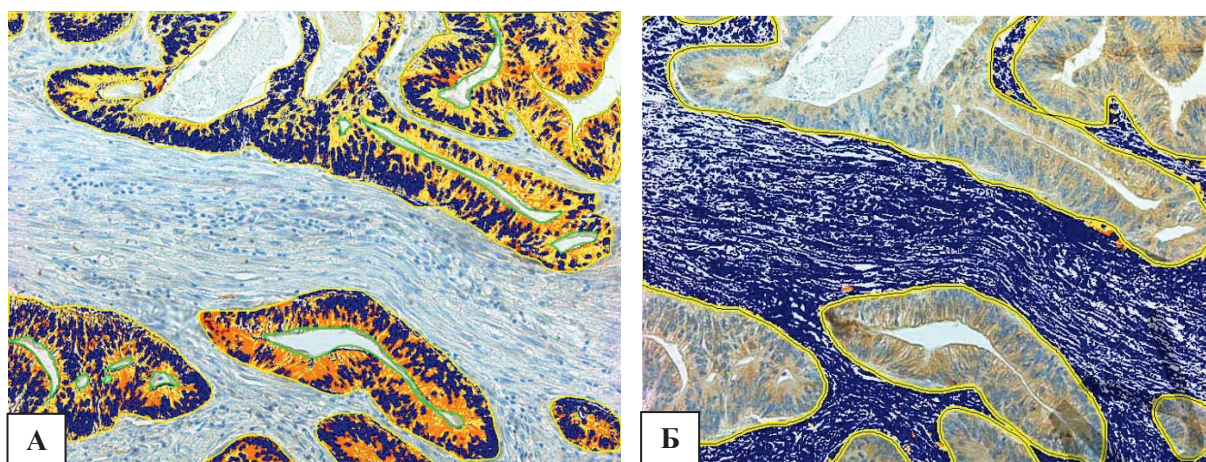
Статистический анализ полученных данных проводился с использованием STATISTICA 10.0 (SNAXAR207F394425FA-Q).

В связи с тем, что распределение количественных параметров отличалось от нормального ($p < 0,05$) (таблица 3.3), сравнительный анализ провели с использованием методов непараметрической статистики.



- А – исходный ИГХ микропрепарат. Ув. $\times 100$;
 Б – исключение из анализа неинформативных участков;
 В – результат работы алгоритма (красные поля – выраженная экспрессия, оранжевые – умеренно выраженная, желтые – слабовыраженная, синяя окраска – отсутствие экспрессии);
 Г – генерирование отчёта о результатах анализа изображения

Рисунок 3.2. – Алгоритм оценки экспрессии ИГХ маркеров при помощи компьютерной программы Aperio Image Scope



**Рисунок 3.3. – Результат работы алгоритма оценки
паренхиматозной (А) и стромальной (Б) экспрессии ИГХ маркеров
Ув. $\times 200$**

Таблица 3.3. – Показатели нормальности распределения количественных параметров у пациентов с АТК для всех групп, входивших в исследование

Показатель	Тест на нормальность распределения		
	N	Критерий Шапиро-Уилка	p
Возраст	72	0,962	0,029
VEGF-A	72	0,655	<0,001
NRP1	72	0,965	0,09
MMP-2	72	0,733	<0,001
MMP-9	72	0,976	0,05
TGF- β	72	0,943	0,004
CD 105	72	0,935	0,001
Erk2	72	0,720	<0,001
iNOS	72	0,961	0,037

При оценке достоверности воздействия одного из факторов с учетом одновременного влияния на изучаемые показатели еще ряда других факторов применялся многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) – метод, позволяющий вычлнить и оценить вклад каждого конкретного фактора, а также их композиций в величину дисперсии изучаемого показателя. Для оценки различий

между группами при множественных (попарных) сравнениях использовался тест Дункана.

При представлении числовых значений использована медиана, 25-й и 75-й перцентили: Me (Q25%-Q75%).

3.1 Экспрессия маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки и краях операционных разрезов

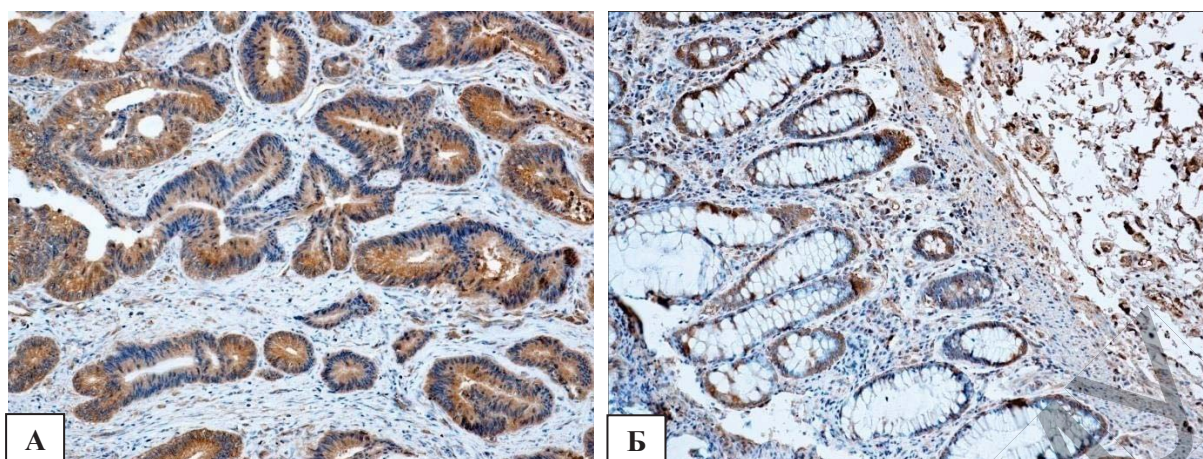
Проведено ИГХ исследование 72 АТК и 20 краев операционных разрезов. Уровни общей позитивности экспрессии изучаемых антигенов в опухоли и краях операционных разрезов представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4. – Общая позитивность экспрессии VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- β , Erk2, iNOS в опухоли и краях операционных разрезов

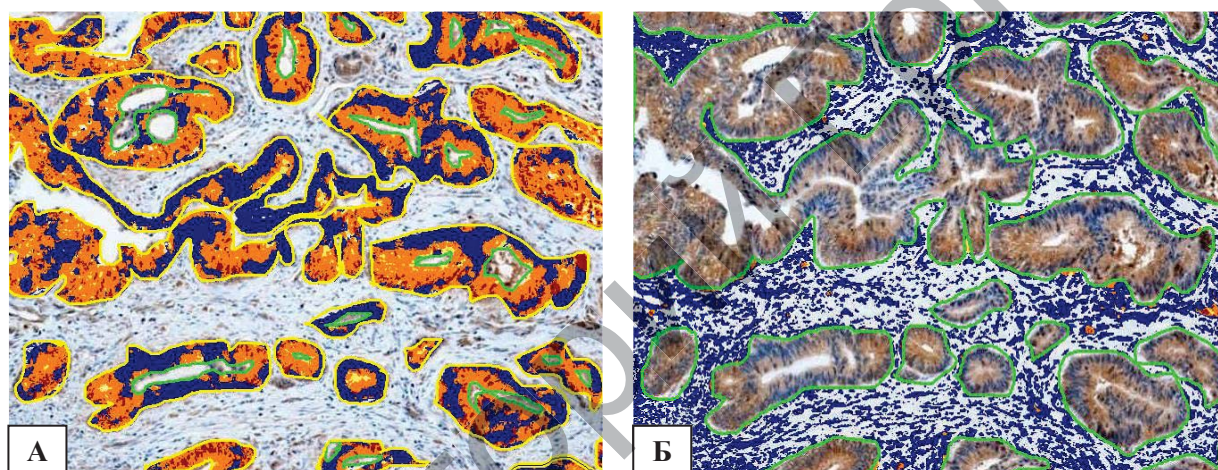
Антиген	Уровень общей позитивности		p
	опухоль	края резекции	
VEGF-A	0,978 (0,941-0,989)	0,911 (0,861-0,952)	0,004
NRP1	0,728 (0,611-0,801)	0,424 (0,297-0,583)	0,001
MMP-2	0,040 (0,022-0,075)	0,045 (0,019-0,127)	0,357
MMP-9	0,526 (0,381-0,651)	0,422 (0,363-0,532)	0,013
TGF- β	0,540 (0,279-0,738)	0,535 (0,132-0,820)	0,840
Erk2	0,017 (0,004-0,034)	0,026 (0,022-0,030)	0,793
iNOS	0,735 (0,660-0,880)	0,960 (0,910-0,980)	<0,001

Как видно из таблицы 3.1, статистически значимыми оказались различия в экспрессии VEGF-A, NRP1, MMP-9, iNOS в опухоли и краях резекции.

Уровень экспрессии VEGF-A в опухоли достоверно выше, чем в краях резекции (рисунок 3.4). Уровень позитивности VEGF-A в цитоплазме клеток опухоли на нашем материале был достоверно выше, чем в ее микроокружении – (0,990 (0,968-0,994) и 0,958 (0,925-0,986), соответственно; $p=0,003$) (рисунок 3.5).



**Рисунок 3.4. – Экспрессия VEGF-A в опухоли (А) и краях резекции (Б).
Окраска с использованием антител к VEGF-A. Ув. $\times 100$**

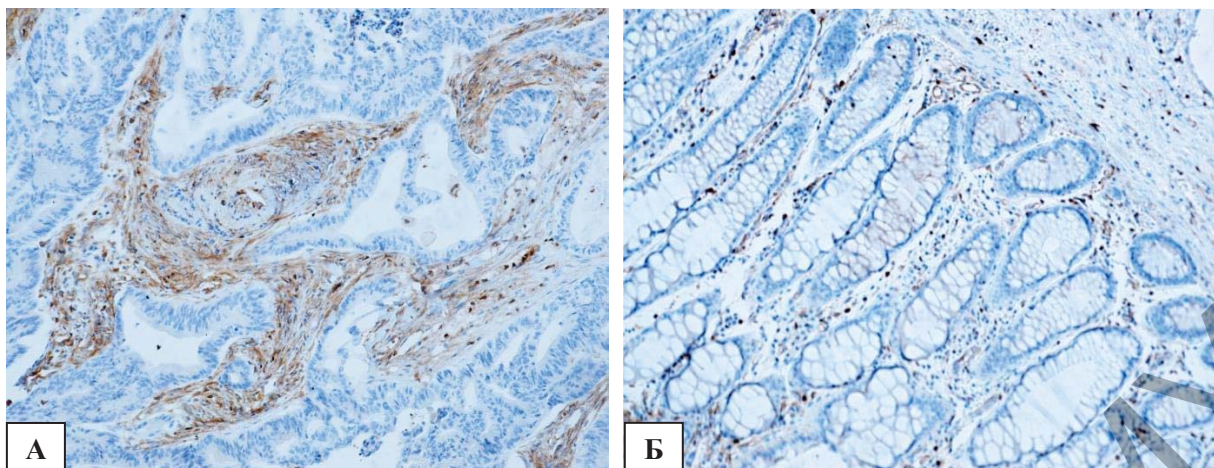


**Рисунок 3.5. – Экспрессия VEGF-A в паренхиме (А)
и строме (Б) опухоли.**

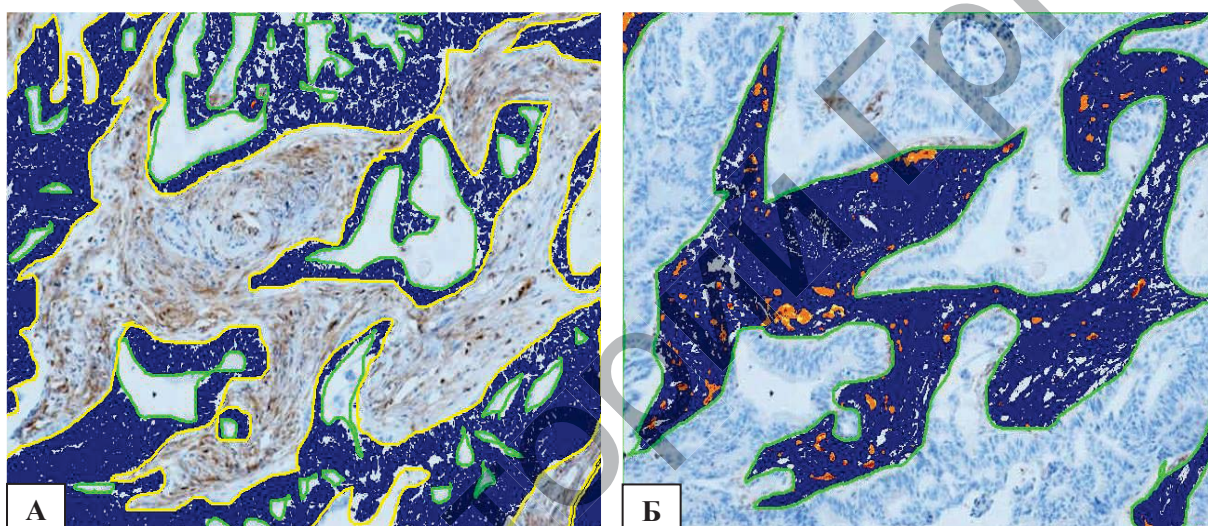
Результат работы программы AperioImage Score. Ув. $\times 100$

Медиана общей экспрессии NRP1 значимо выше в опухоли (рисунок 3.6). При этом уровень экспрессии NRP1 в строме опухоли (на мембране и в цитоплазме фибробластов, ЭК) достоверно выше, чем в опухолевых пролифератах – (0,811 (0,736-0,888) и 0,561 (0,520-0,674), соответственно; $p < 0,001$) (рисунок 3.7).

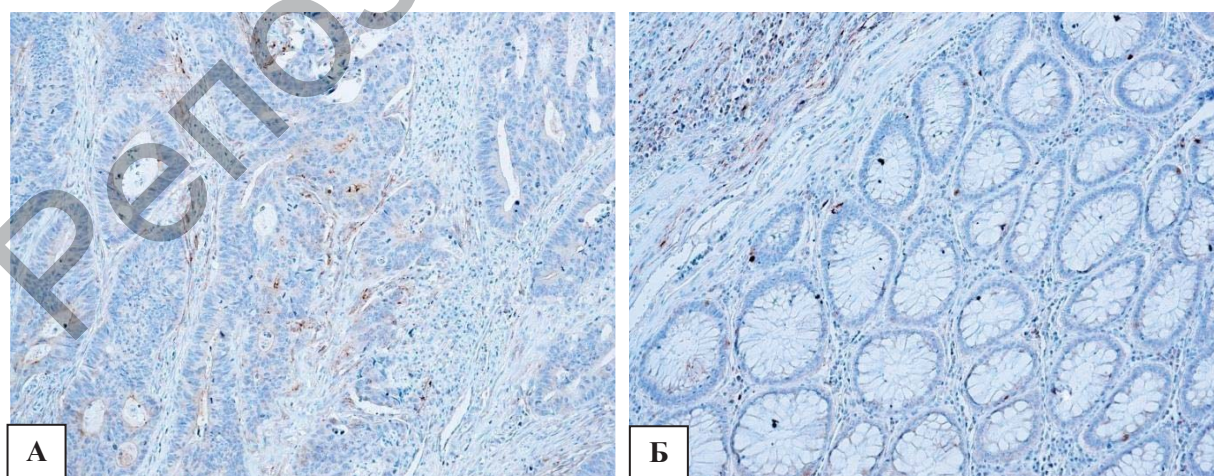
Нами установлено, что уровни позитивности MMP-2 в опухоли и в краях операционных разрезов статистически значимо не различаются (рисунок 3.8). Вместе с тем уровень его экспрессии в стромальном компоненте опухоли (в цитоплазме лейкоцитов, фибробластов и ЭК) существенно выше, чем в паренхиматозном – 0,042 (0,018-0,087) и 0,025 (0,006-0,0516) соответственно; $p < 0,001$ (рисунок 3.9).



**Рисунок 3.6. – Экспрессия NRP1 в опухоли (А) и краях резекции (Б).
Окраска с использованием антител к NRP1. Ув. ×100**



**Рисунок 3.7. – Экспрессия NRP1 в паренхиме (А) и строме (Б) опухоли.
Результат работы программы Aperio Image Score. Ув. ×100**



**Рисунок 3.8. – Экспрессия MMP-2 в опухоли (А) и краях резекции (Б).
Окраска с использованием антител к MMP-2. Ув. ×100**

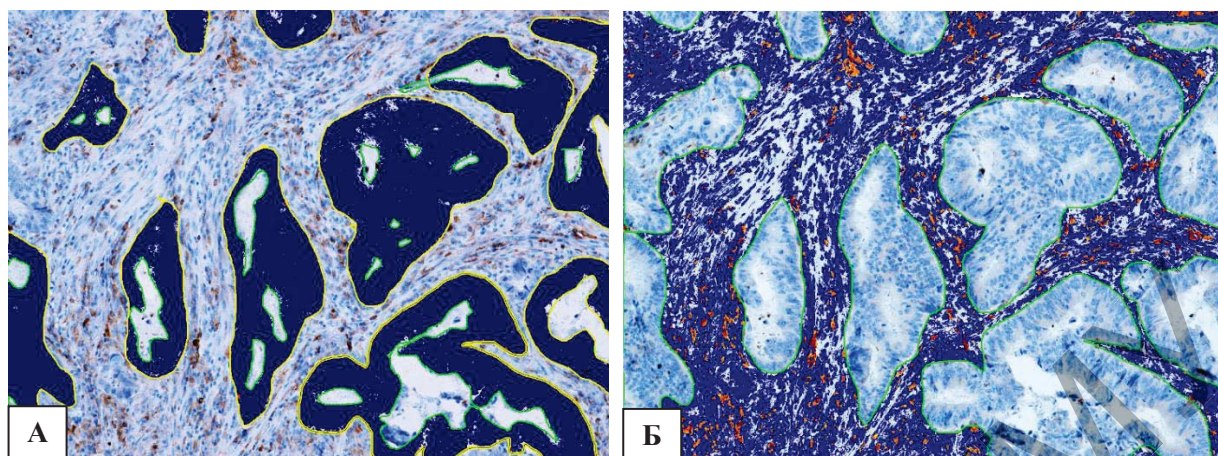


Рисунок 3.9. – Экспрессия MMP-2 в паренхиме (А) и строме (Б) опухоли.

Результат работы программы Aperio Image Score. Ув. $\times 100$

Экспрессия MMP-9 выше в опухоли, чем в краях резекции (рисунок 3.10). Уровень цитоплазматической экспрессии MMP-9 в цитоплазме опухолевых клеток достоверно выше, чем в ее строме (0,665 (0,481-0,803), и 0,385 (0,258-0,492), соответственно; $p < 0,001$) (рисунок 3.11).

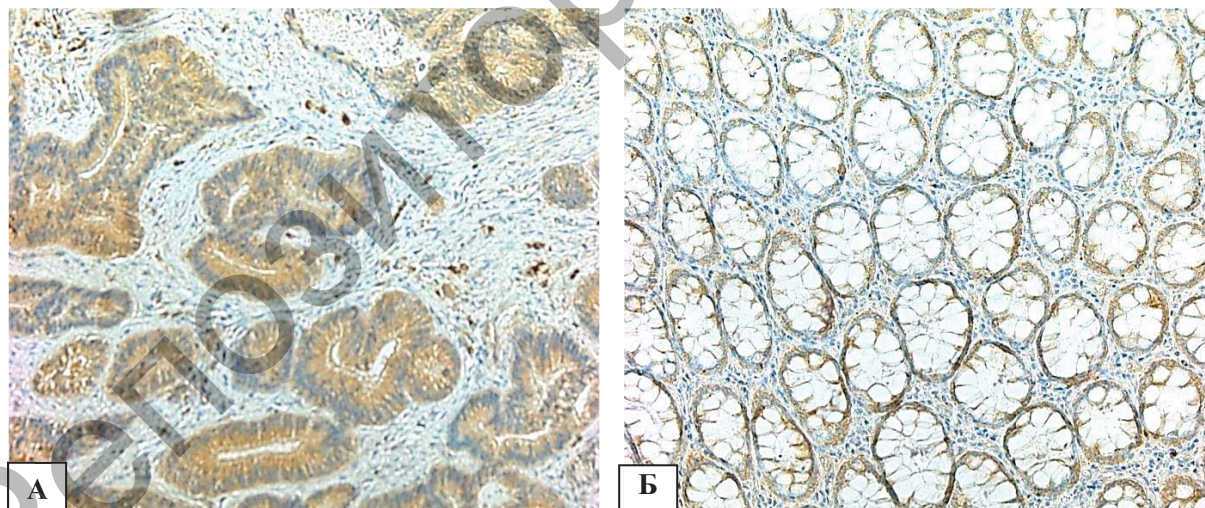


Рисунок 3.10. – Экспрессия MMP-9 в опухоли (А) и краях резекции (Б).

Окраска с использованием антител к MMP-9. Ув. $\times 100$

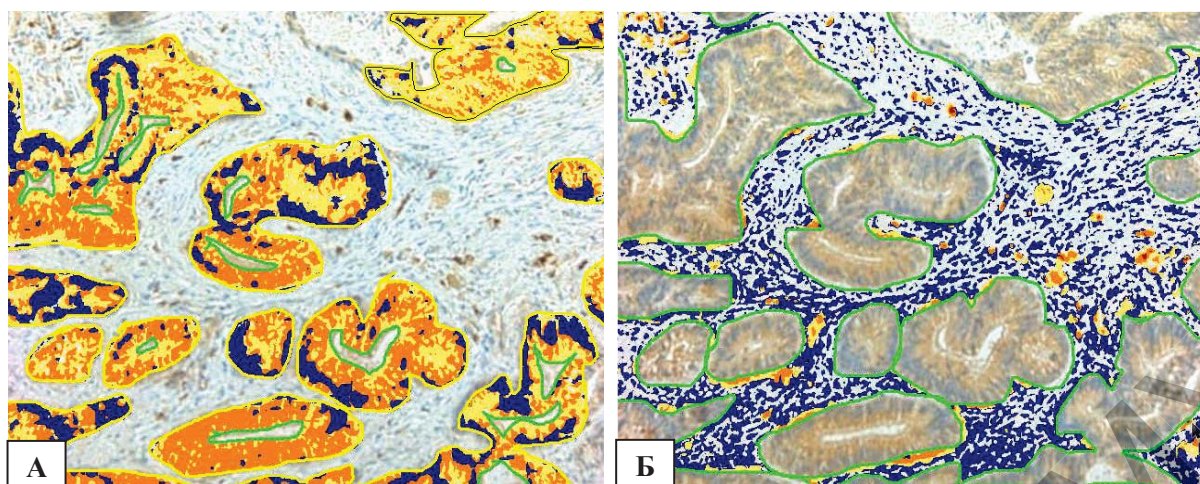


Рисунок 3.11. – Экспрессия MMP-9 в паренхиме (А) и строме (Б) опухоли.

Результат работы программы Aperio Image Score. Ув. $\times 100$

Результаты нашего исследования показали, что уровни позитивности TGF- β в опухоли и в краях резекции достоверно не различались (рисунок 3.12). В опухоли он экспрессируется преимущественно в цитоплазме клеток опухоли (0,732 (0,426-0,930)) и в меньшей степени – в клетках стромы (0,376 (0,145-0,657)), $p < 0,001$ (рисунок 3.13).

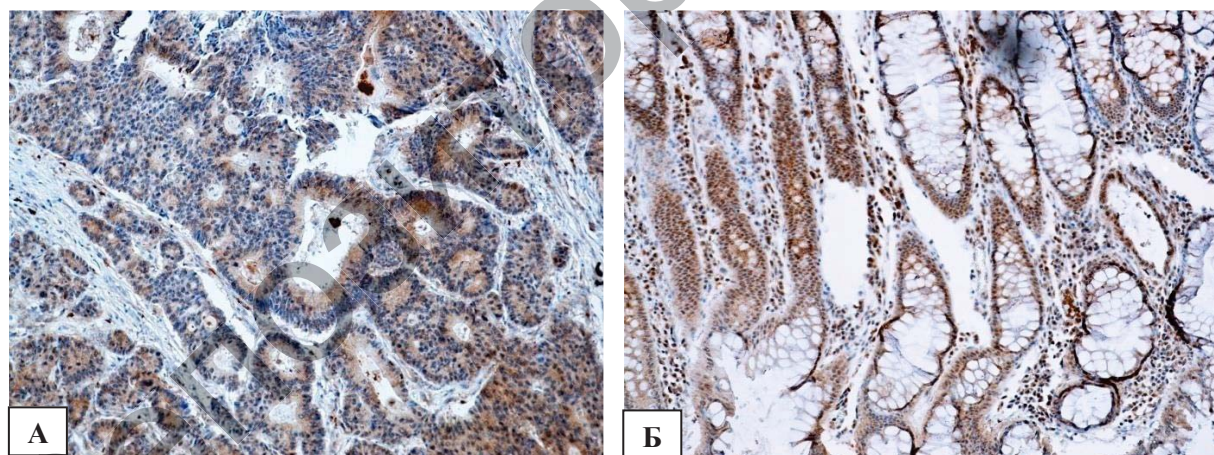


Рисунок 3.12. – Экспрессия TGF- β в опухоли (А) и краях резекции (Б).

Окраска с использованием антител к TGF- β . Ув. $\times 100$

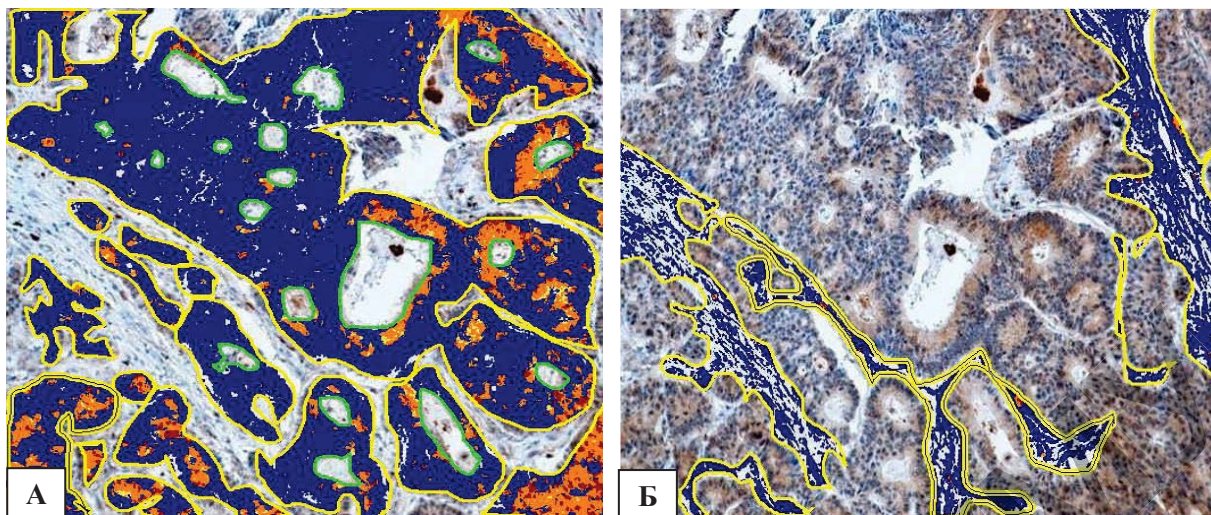


Рисунок 3.13. – Экспрессия TGF- β в паренхиме (А) и строме (Б) опухоли.

Результат работы программы Aperio Image Scope. Ув. $\times 100$

В АТК CD105 экспрессируется преимущественно на мембране ЭК. Уровень позитивности в строме опухоли достоверно выше, чем в краях резекции (0,713 (0,486-0,815) и 0,00086 (0,00048-0,0049), соответственно; $p < 0,001$) (рисунки 3.14, 3.15).

Медианы общей позитивности Erk2 в краях резекции и в опухоли значимо не различались (рисунок 3.16). Вместе с тем уровень его интрацеллюлярной паренхиматозной экспрессии существенно выше, чем в ядрах клеток микроокружения, – 0,016 (0,004-0,038) и 0,003 (0,002-0,011) соответственно; $p < 0,001$ (рисунок 3.17).

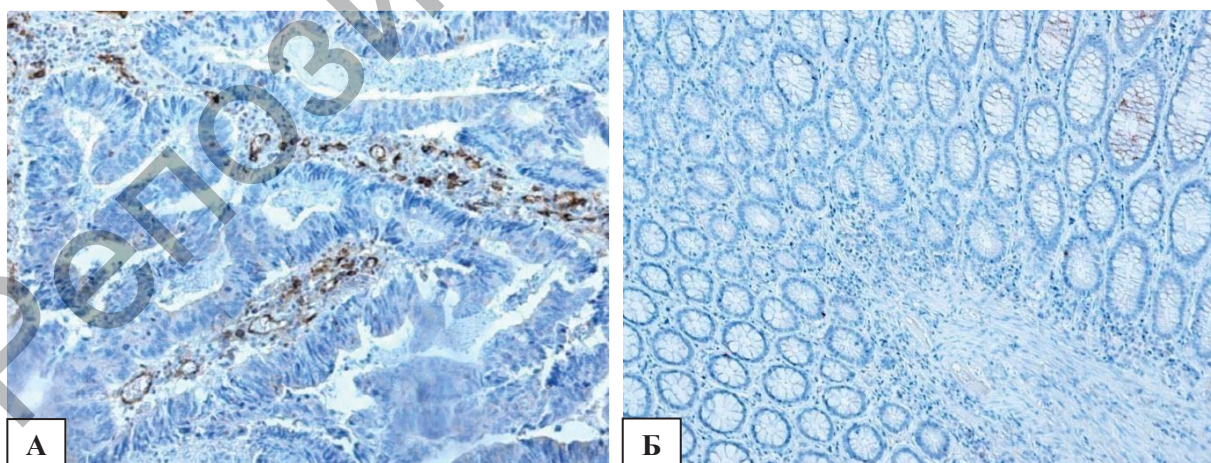
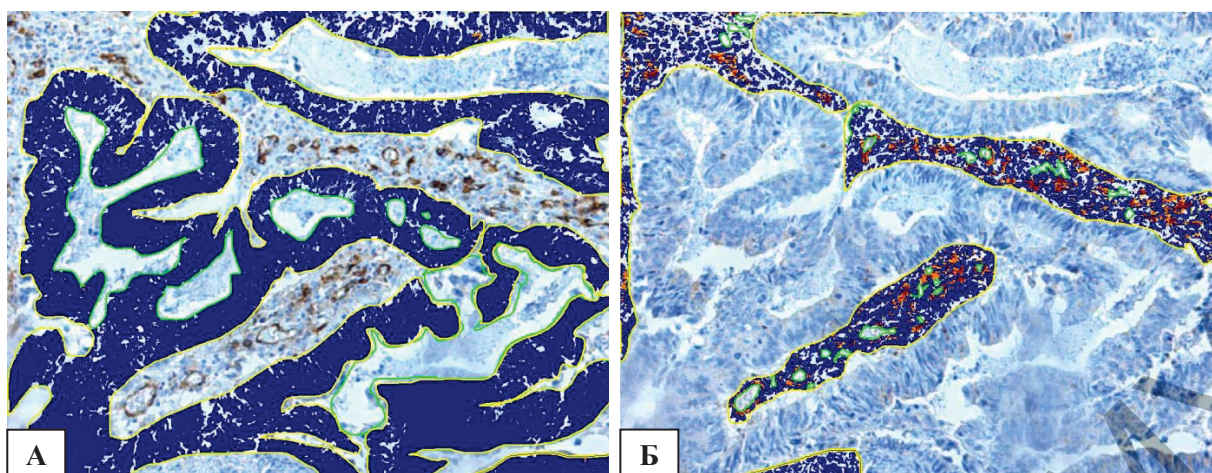
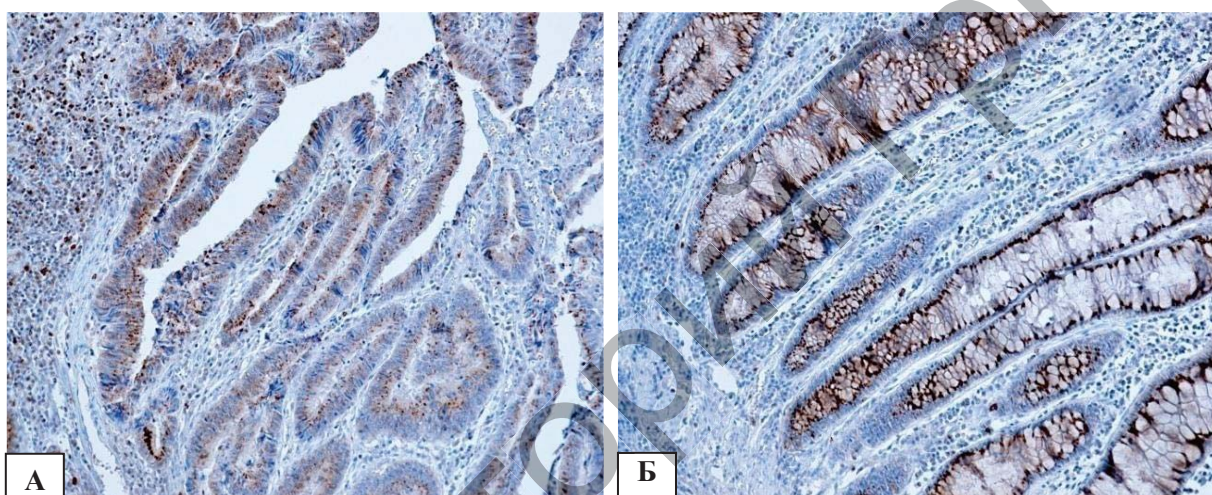


Рисунок 3.14. – Экспрессия CD105 в опухоли (А) и краях резекции (Б).

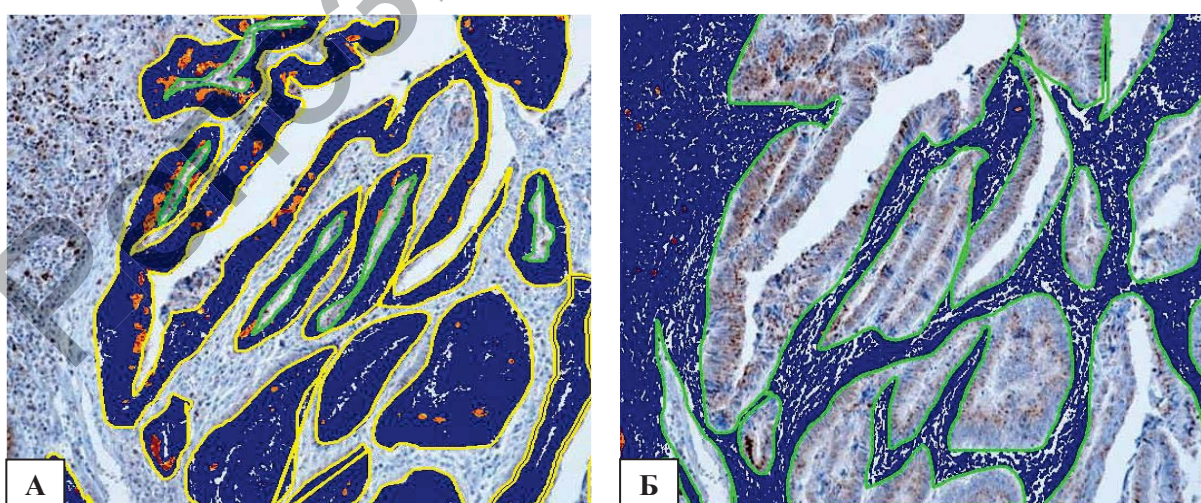
Окраска с использованием антител к CD105. Ув. $\times 100$



**Рисунок 3.15. – Экспрессия CD105 в паренхиме (А) и строме (Б) опухоли.
Результат работы программы Aperio Image Scope. Ув. ×100**

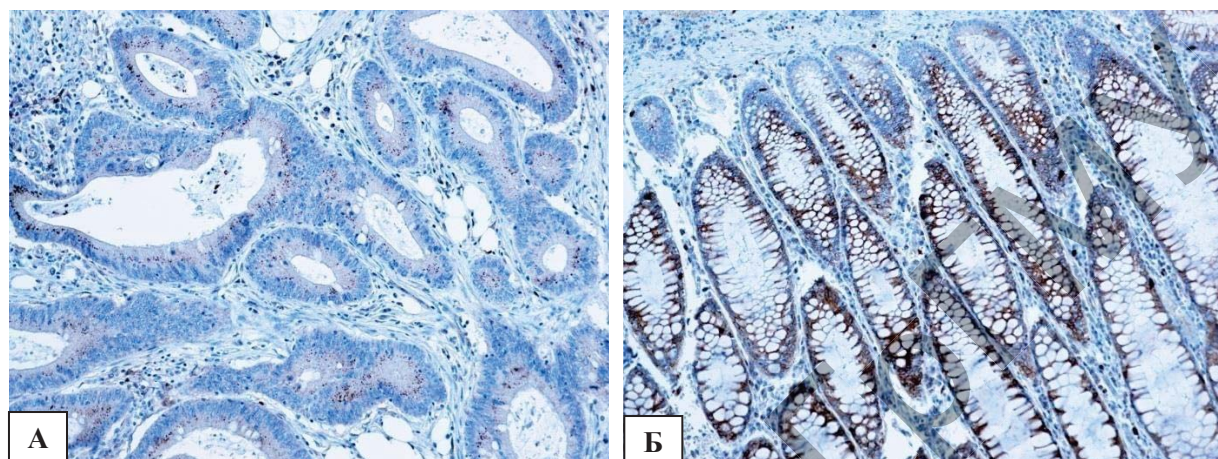


**Рисунок 3.16. – Экспрессия Erk2 в опухоли (А) и краях резекции (Б).
Окраска с использованием антител к Erk2. Ув. ×100**

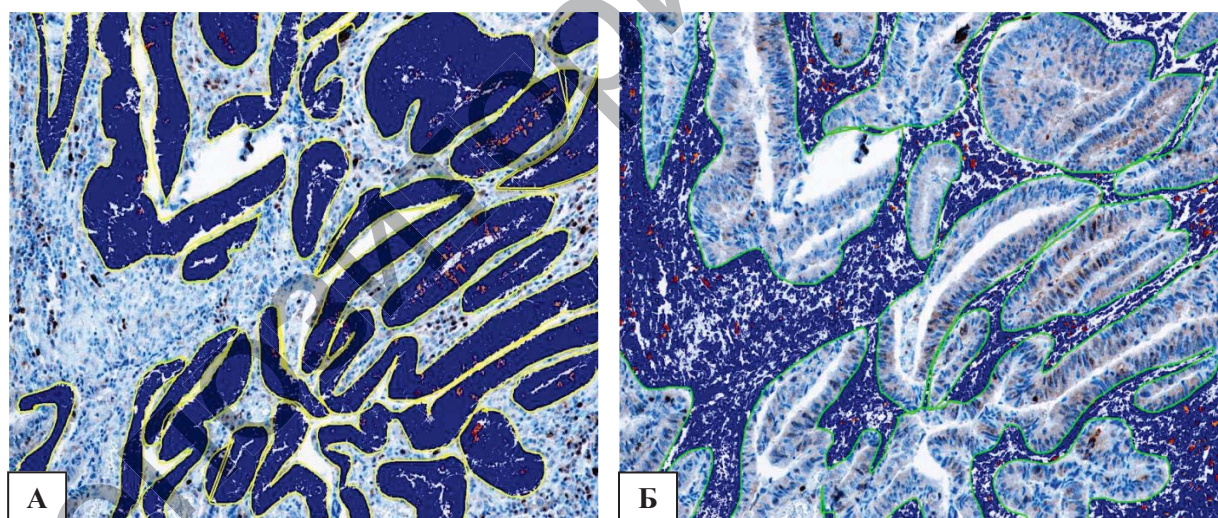


**Рисунок 3.17. – Экспрессия Erk2 в паренхиме (А) и строме (Б) опухоли.
Результат работы программы Aperio Image Scope. Ув. ×100**

Показано, что экспрессия iNOS выше в краях резекции, чем в опухоли (рисунок 3.18). iNOS экспрессируется преимущественно опухолевыми клетками (0,795 (0,660-0,890)) и в меньшей степени – клетками стромы (0,755 (0,670-0,850)), однако эти различия недостоверны ($p=0,275$) (рисунок 3.19).



**Рисунок 3.18. – Экспрессия iNOS в опухоли (А) и краях резекции (Б).
Окраска с использованием антител к iNOS. Ув. $\times 100$**



**Рисунок 3.19. – Экспрессия iNOS в паренхиме (А) и строме (Б) опухоли.
Результат работы программы Aperio Image Scope. Ув. $\times 100$**

3.2 Особенности экспрессии маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки в зависимости от клинико-морфологических параметров

Возраст пациентов с АТК в 17 случаях (23,9%) был менее 60 лет (группа 1), в 45 случаях (63,4%) – от 60 до 74 лет (группа 2), в 9 случаях (12,7%) – 75 лет и старше (группа 3). Статистически значимым оказался высокий уровень стромальной экспрессии TGF- β у пациентов группы 3 по сравнению с 1 и 2 – 0,775 (0,565-0,825); 0,282 (0,102-0,480) и 0,327 (0,144-0,610) соответственно ($p=0,013$).

Экспрессия VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- β , CD105, Erk2, iNOS в опухоли у пациентов мужского и женского пола статистически значимо не различалась (во всех случаях сравнений $p>0,05$).

Уровни позитивности изучаемых антигенов в паренхиматозном и стромальном компонентах аденокарциномы в зависимости от ее локализации представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5. – Экспрессия VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- β , CD105, Erk2, iNOS в зависимости от локализации опухоли

Экспрессия антигена в опухоли		Локализация		p
		проксимальная (n=13)	дистальная (n=59)	
VEGF-A	паренхиматозная	0,906 (0,686-0,990)	0,992 (0,974-0,995)	0,008
	стромальная	0,927 (0,816-0,954)	0,966 (0,946-0,988)	0,004
NRP1	паренхиматозная	0,543 (0,505-0,550)	0,604 (0,538-0,689)	0,021
	стромальная	0,739 (0,694-0,792)	0,836 (0,758-0,898)	0,015
MMP-2	паренхиматозная	0,006 (0,004-0,015)	0,027 (0,010-0,053)	0,009
	стромальная	0,018 (0,012-0,033)	0,048 (0,029-0,108)	0,001

Экспрессия антигена в опухоли		Локализация		p
		проксимальная (n=13)	дистальная (n=59)	
MMP-9	паренхиматозная	0,720 (0,481-0,809)	0,655 (0,462-0,780)	0,599
	стромальная	0,457 (0,311-0,629)	0,362 (0,243-0,481)	0,093
TGF- β	паренхиматозная	0,730 (0,381-0,930)	0,701 (0,426-0,925)	0,886
	стромальная	0,554 (0,282-0,820)	0,290 (0,144-0,600)	0,212
CD105	стромальная	0,779 (0,699-0,841)	0,698 (0,477-0,776)	0,074
Erk2	паренхиматозная	0,005 (0,003-0,030)	0,018 (0,005-0,038)	0,232
	стромальная	0,002 (0,001-0,008)	0,004 (0,002-0,011)	0,173
iNOS	паренхиматозная	0,890 (0,810-0,975)	0,760 (0,650-0,860)	0,053
	стромальная	0,790 (0,730-0,885)	0,750 (0,670-0,840)	0,343

Как отмечено в таблице 3.5, паренхиматозная и стромальная экспрессия VEGF-A, NRP1 и MMP-2 значимо выше в опухоли дистального отдела толстой кишки (во всех случаях сравнений $p < 0,021$). Выявлена также тенденция к достоверности при сравнении позитивности MMP-9 и iNOS: экспрессия MMP-9 в строме аденокарциномы и iNOS в ее паренхиме несколько больше при проксимальной локализации ($p = 0,093$ и $p = 0,053$, соответственно). Достоверных различий в экспрессии TGF- β и Erk2 в зависимости от локализации опухоли не выявлено.

Уровни позитивности VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- β , CD105, Erk2, iNOS в низко- и высокогрейдных аденокарциномах представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6. – Экспрессия VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- β , CD105, Erk2, iNOS в зависимости от степени дифференцировки опухоли

Экспрессия антигена в опухоли		Грейд		z	p
		G1-2 (n=55)	G3 (n=17)		
VEGF-A	паренхиматозная	0,992 (0,976-0,995)	0,719 (0,679-0,990)	3,216	<0,001
	стромальная	0,964 (0,946-0,988)	0,924 (0,809-0,986)	2,242	0,013
NRP1	паренхиматозная	0,622 (0,547-0,700)	0,532 (0,510-0,544)	3,454	<0,001
	стромальная	0,854 (0,758-0,920)	0,755 (0,699-0,791)	3,357	<0,001
MMP-2	паренхиматозная	0,029 (0,013-0,068)	0,007 (0,004-0,011)	3,294	<0,001
	стромальная	0,048 (0,029-0,093)	0,019 (0,012-0,051)	0,518	0,012
MMP-9	паренхиматозная	0,651 (0,462-0,762)	0,789 (0,520-0,899)	-1,542	0,122
	стромальная	0,360 (0,245-0,466)	0,532 (0,371-0,651)	-2,257	0,023
TGF- β	паренхиматозная	0,590 (0,412-0,847)	0,930 (0,748-0,960)	-2,915	0,004
	стромальная	0,257 (0,106-0,406)	0,815 (0,590-0,850)	-4,048	<0,001
CD105	стромальная	0,698 (0,477-0,774)	0,826 (0,654-0,893)	-1,830	0,067
Erk2	паренхиматозная	0,021 (0,004-0,040)	0,007 (0,003-0,029)	1,031	0,303
	стромальная	0,003 (0,002-0,011)	0,003 (0,001-0,023)	0,463	0,644
iNOS	паренхиматозная	0,770 (0,620-0,860)	0,820 (0,680-0,970)	-1,373	0,169
	стромальная	0,750 (0,670-0,850)	0,790 (0,660-0,840)	-0,464	0,643

Как видно из таблицы 3.6, в высокогрейдных аденокарциномах уровень позитивности MMP-9 в стромальном компоненте опухоли и экспрессии TGF- β в обоих ее компонентах значительно выше (во всех случаях сравнений $p < 0,023$), чем в аденокарциномах с низким грейдом (рисунки 3.20-3.23).

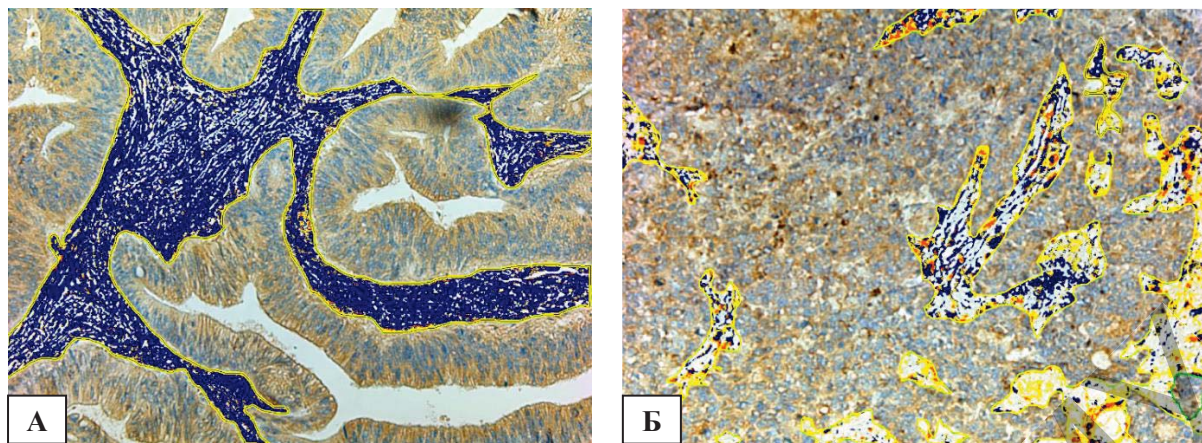


Рисунок 3.20. – Стромальная экспрессия MMP-9 в низко- (А) и высокогредной (Б) аденокарциноме. Результат работы программы Aperio Image Score. Ув. $\times 200$

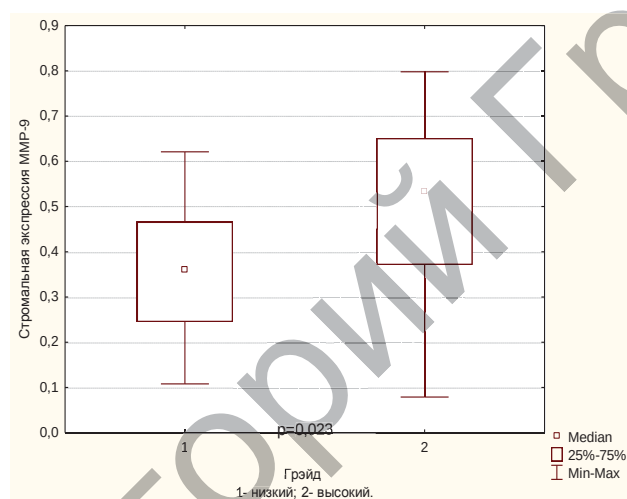


Рисунок 3.21. – Уровни стромальной позитивности MMP-9 в зависимости от степени дифференцировки аденокарциномы

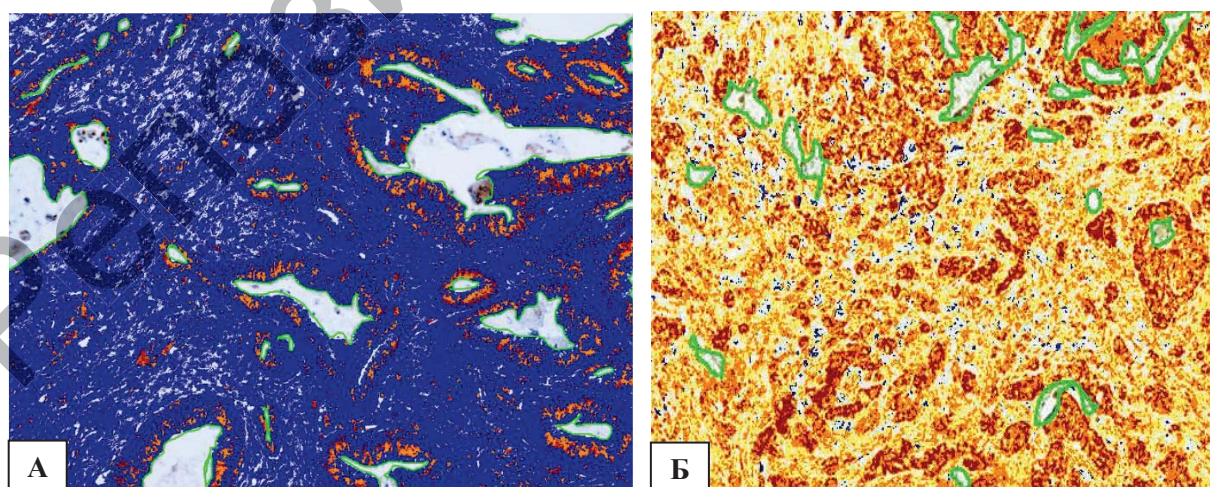


Рисунок 3.22. –Экспрессия TGF- β в обоих компонентах низко- (А) и высокогредной (Б) аденокарциномы. Результат работы программы Aperio Image Score. Ув. $\times 100$

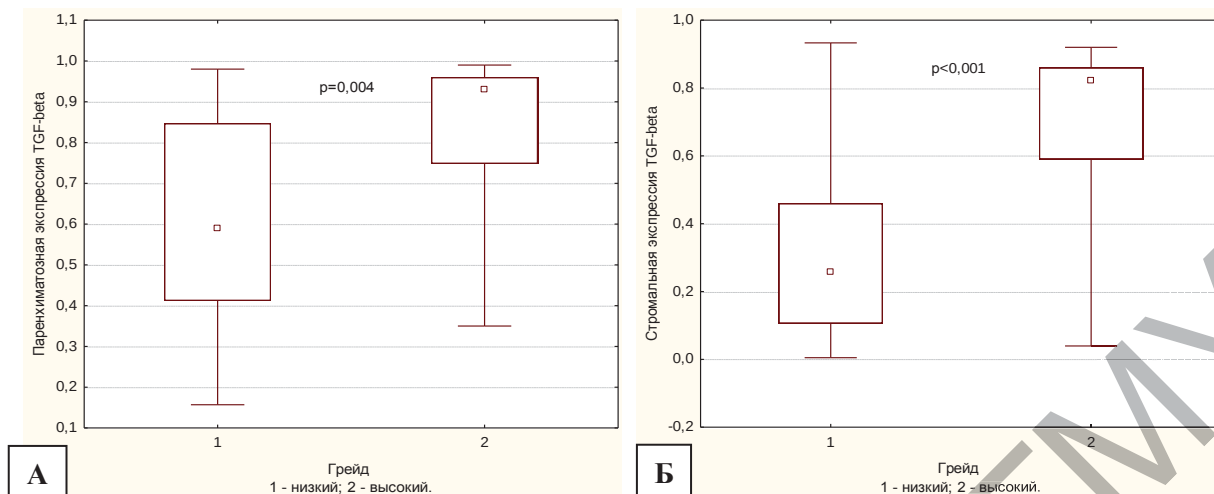


Рисунок 3.23. – Уровни паренхиматозной (А) и стромальной (Б) позитивности TGF- β в зависимости от степени дифференцировки аденокарциномы

В низкогрейдных аденокарциномах паренхиматозная и стромальная экспрессия VEGF-A, NRP1 и MMP-2 значимо выше (во всех случаях сравнений $p<0,013$), чем в аденокарциномах с высоким Грейдом (рисунки 3.24-3.29).

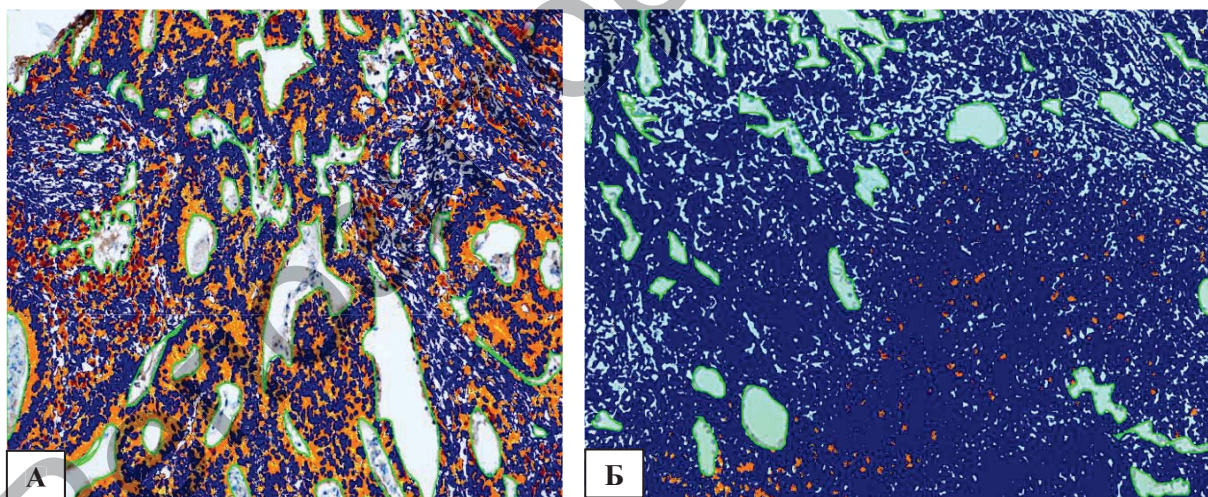


Рисунок 3.24. – Экспрессия VEGF-A в обоих компонентах низко- (А) и высокогрейдной (Б) аденокарциномы. Результат работы программы Aperio Image Scope. Ув. $\times 100$

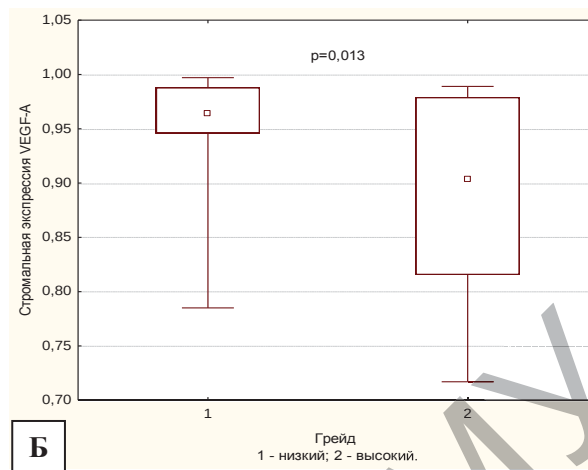
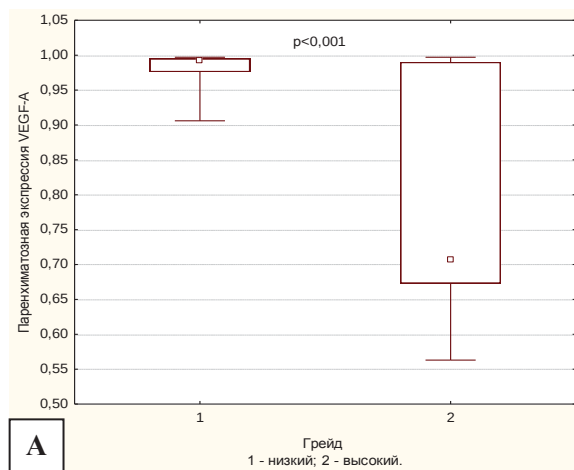


Рисунок 3.25. – Уровни паренхиматозной (А) и стромальной (Б) позитивности VEGF-A в зависимости от степени дифференцировки аденокарциномы

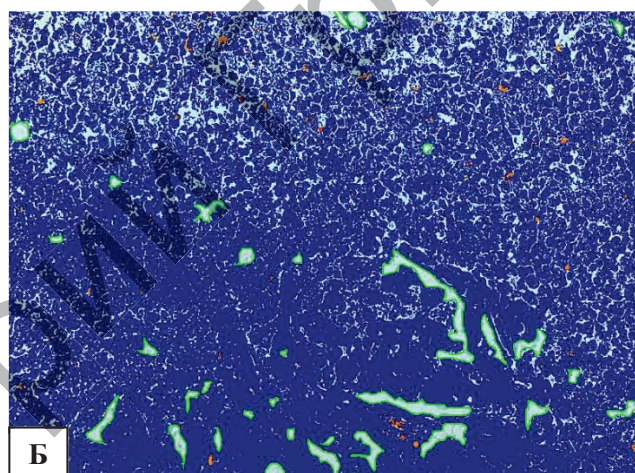
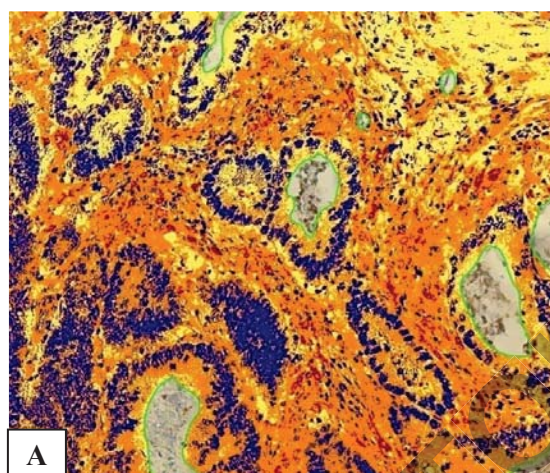


Рисунок 3.26. – Экспрессия NRP1 в обоих компонентах низко- (А) и высокогредной (Б) аденокарциномы. Результат работы программы Aperio Image Score. Ув. $\times 100$

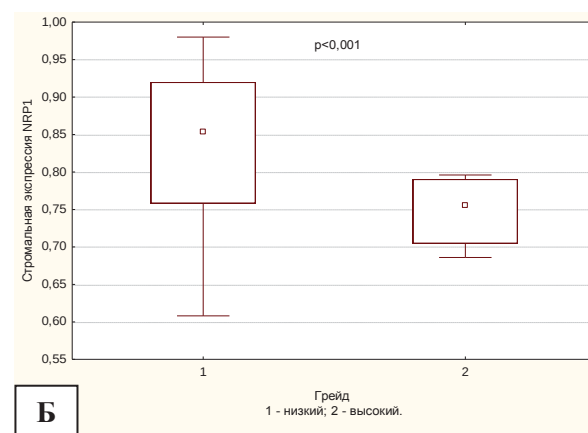
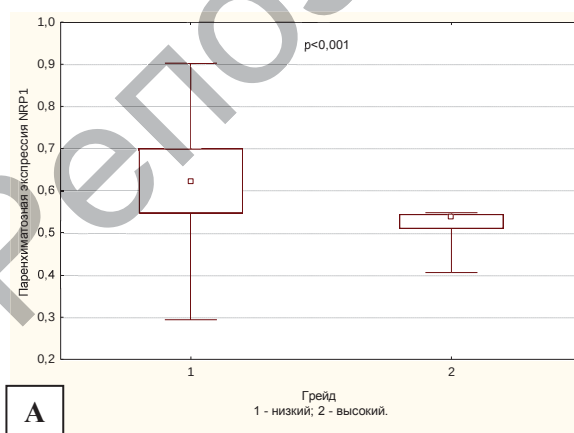


Рисунок 3.27. – Уровни паренхиматозной (А) и стромальной (Б) позитивности NRP1 в зависимости от степени дифференцировки аденокарциномы

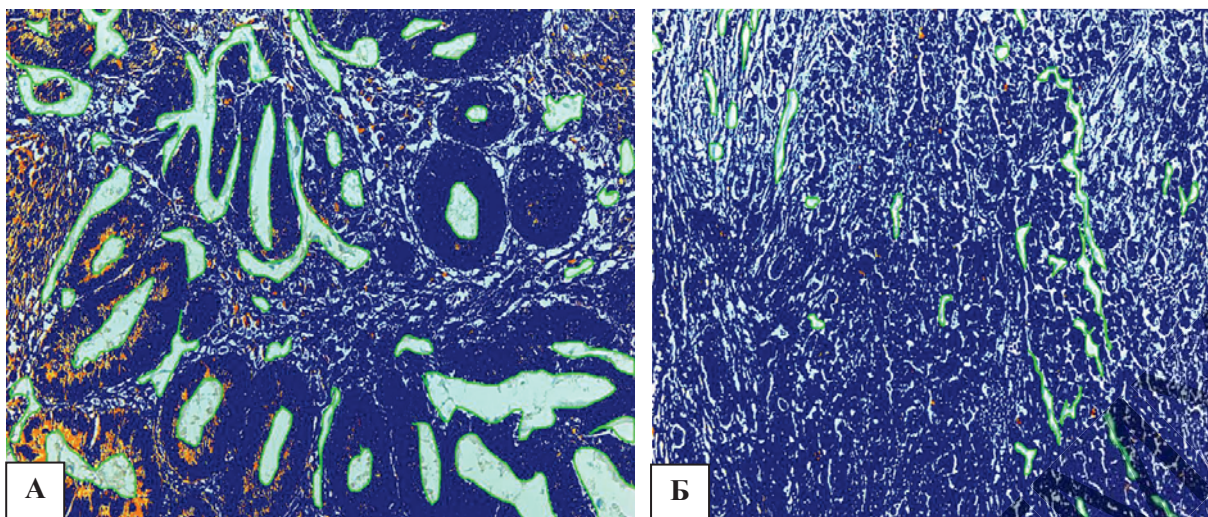


Рисунок 3.28. – Экспрессия MMP-2 в обоих компонентах низко- (А) и высокогрейдной (Б) аденокарциномы. Результат работы программы Aperio Image Score. Ув. $\times 100$

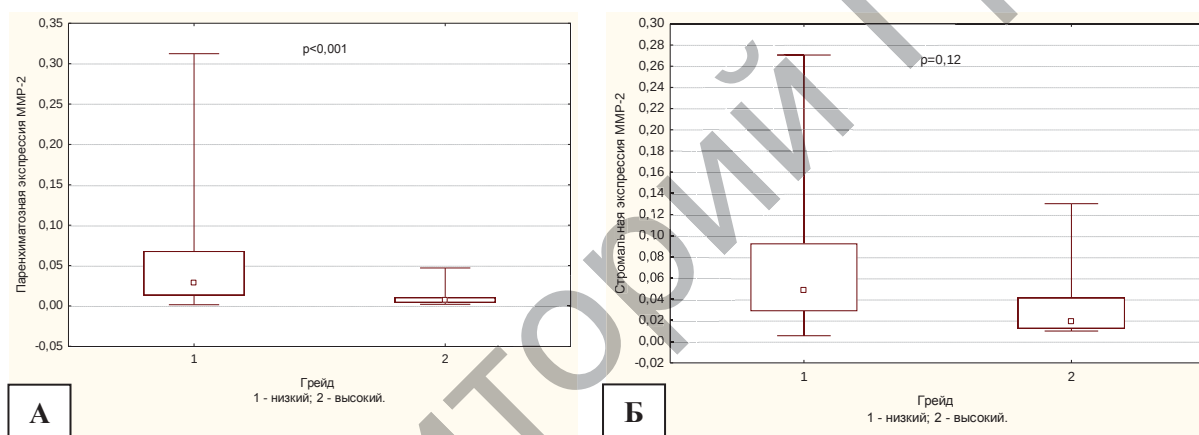


Рисунок 3.29. – Уровни паренхиматозной (А) и стромальной (Б) позитивности MMP-2 в зависимости от степени дифференцировки аденокарциномы

Установлена также тенденция к достоверности при сравнении позитивности CD105: в аденокарциномах с высоким Грейдом она несколько больше ($p=0,067$).

Статистически значимых различий экспрессии iNOS и Erk2 в зависимости от грейда опухоли не выявлено.

С увеличением категории глубина инвазии опухоли в стенку толстой кишки уровень позитивности CD105 в ее сосудах также возрастал ($r=0,383$, $p < 0,001$) (рисунок 3.30). Статистически значимо показатели позитивности различались между pT2 и pT3 (0,502 (0,439-0,716) и 0,722 (0,549-0,826), $p=0,014$), pT2 и pT4

(0,502 (0,439-0,716) и 0,933 (0,727-0,976), $p=0,019$), а также pT3 и pT4 (0,722 (0,549-0,826) и 0,933 (0,727-0,976), $p=0,039$).

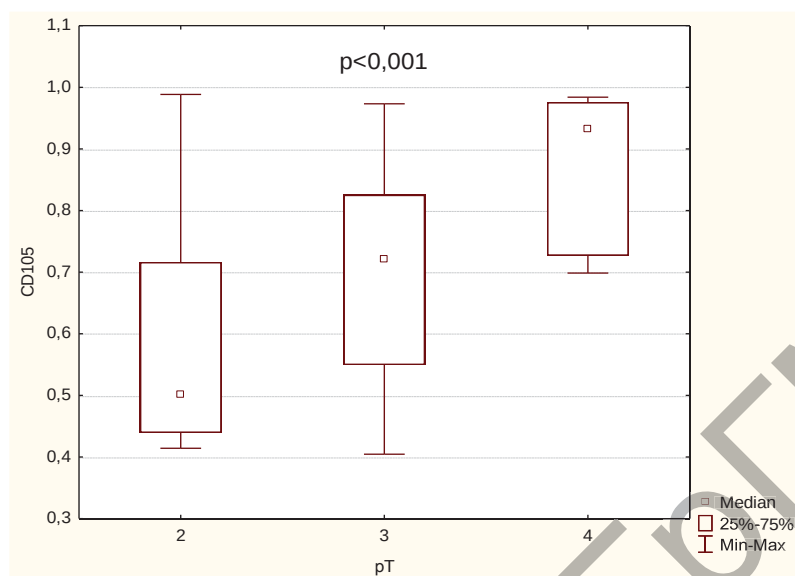


Рисунок 3.30. – Уровни позитивности CD105 в опухоли в зависимости от глубины ее инвазии в стенку кишки (pT)

Уровень стромальной экспрессии MMP-2 отрицательно коррелировал с категорией pT ($r=-0,284$, $p=0,017$) (рисунок 3.31): уровень стромальной позитивности значительно выше в опухоли с глубиной инвазии, соответствующей категории pT2, по сравнению с pT4 (0,075 (0,035-0,130) и 0,029 (0,012-0,038) соответственно) ($p=0,042$).

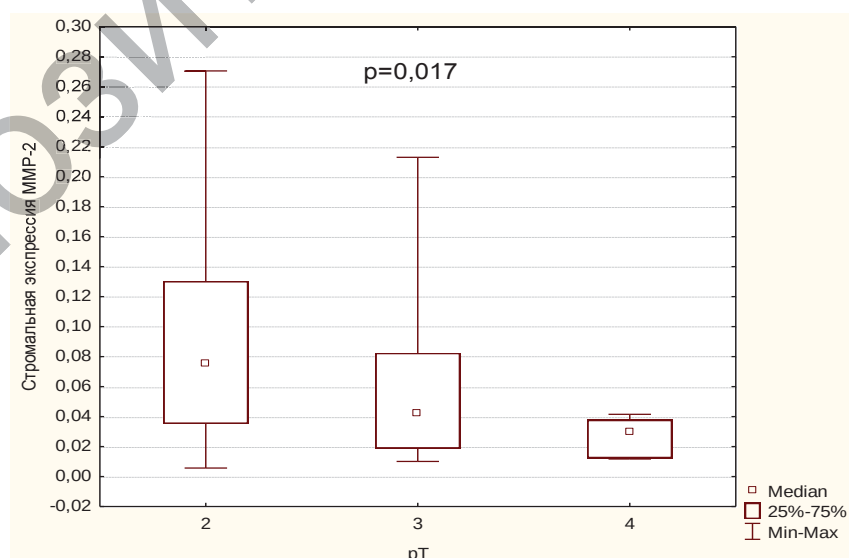


Рисунок 3.31. – Уровни стромальной позитивности MMP-2 в опухоли в зависимости от глубины ее инвазии в стенку кишки (pT)

Выявлена также тенденция к достоверной отрицательной связи уровня паренхиматозной позитивности VEGF-A с глубиной инвазии опухоли ($r=-0,220$, $p=0,083$). Статистически значимо уровни позитивности различались между pT2 и pT4 (0,980 (0,955-0,991) и 0,807 (0,771-0,905), $p=0,036$), pT3 и pT4 (0,978 (0,951-0,989) и 0,807 (0,771-0,905), $p=0,016$).

Статистически значимых различий экспрессии NRP1, MMP-9, TGF- β , Erk2, iNOS в зависимости от глубины инвазии опухоли в стенку не установлено.

Экспрессия CD105, VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- β , Erk2, iNOS в опухоли в зависимости от метастатического поражения лимфатических узлов представлена в таблице 3.7.

Таблица 3.7. – Экспрессия CD105, VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- β , Erk2, iNOS в зависимости от метастатического поражения лимфатических узлов

Экспрессия антигена в опухоли		pN		p
		pN0 (n=28)	pN1-2 (n=44)	
VEGF-A	паренхиматозная	0,993 (0,981-0,995)	0,980 (0,961-0,993)	0,079
	стромальная	0,979 (0,925-0,988)	0,953 (0,931-0,978)	0,174
NRP1	паренхиматозная	0,580 (0,500-0,674)	0,559 (0,520-0,687)	0,675
	стромальная	0,804 (0,747-0,886)	0,817 (0,730-0,893)	0,885
MMP-2	паренхиматозная	0,029 (0,010-0,064)	0,020 (0,005-0,039)	0,247
	стромальная	0,061 (0,029-0,130)	0,038 (0,018-0,075)	0,065
MMP-9	паренхиматозная	0,686 (0,555-0,825)	0,563 (0,351-0,798)	0,103
	стромальная	0,386 (0,301-0,536)	0,371 (0,218-0,481)	0,433
TGF- β	паренхиматозная	0,820 (0,580-0,947)	0,690 (0,380-0,880)	0,053
	стромальная	0,460 (0,171-0,680)	0,269 (0,105-0,577)	0,175
CD105	стромальная	0,462 (0,444-0,542)	0,769 (0,699-0,856)	<0,001

Экспрессия антигена в опухоли		pN		p
		pN0 (n=28)	pN1-2 (n=44)	
Erk2	паренхиматозная	0,017 (0,003-0,038)	0,014 (0,005-0,040)	0,620
	стромальная	0,003 (0,002-0,009)	0,003 (0,001-0,011)	
iNOS	паренхиматозная	0,795 (0,700-0,840)	0,770 (0,550-0,930)	0,469
	стромальная	0,780 (0,670-0,870)	0,740 (0,680-0,840)	

Как видно из таблицы 3.7, уровень позитивности CD105 значимо выше в опухоли с метастазами в регионарных лимфатических узлах на момент выявления заболевания ($p < 0,001$) (рисунок 3.32).

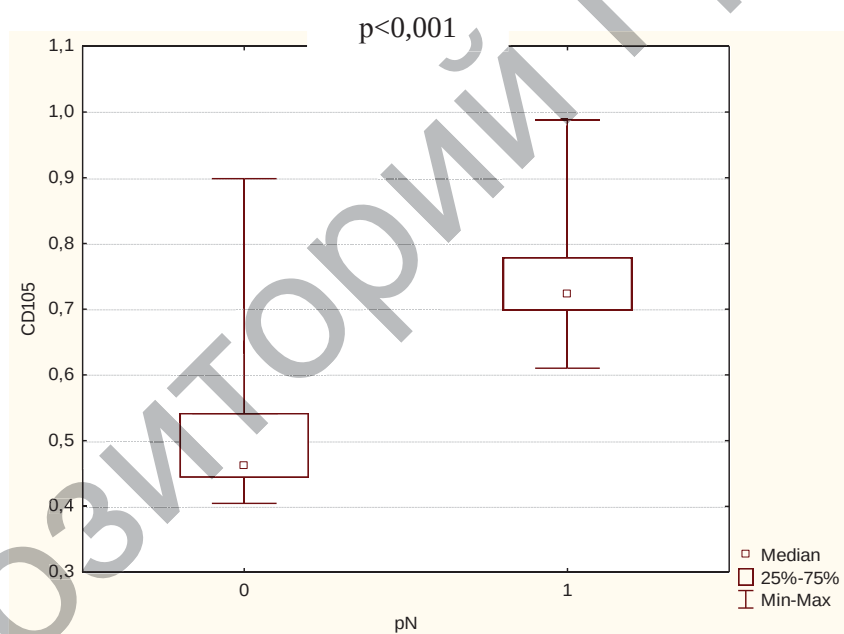


Рисунок 3.32. – Уровни позитивности CD105 в опухоли в зависимости от наличия лимфогенных метастазов (pN)

Отмечена тенденция к достоверности при сравнении экспрессии VEGF-A, TGF- β в клетках опухоли и MMP-2 в ее строме: у пациентов с категорией pN0 позитивность этих факторов была несколько выше ($p = 0,079$, $p = 0,053$ и $p = 0,065$ соответственно).

Статистически значимых различий экспрессии NRP1, MMP-9, Erk2, iNOS в зависимости от наличия лимфогенных метастазов нами не установлено.

При изучении экспрессии CD105, VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- β , Erk2, iNOS в опухоли в зависимости от гематогенного метастатического поражения отдаленных органов, соответствующего категории pM, выявлено, что уровень стромальной экспрессии CD105 значимо выше в аденокарциноме с синхронными гематогенными метастазами (M0 – 0,696 (0,469-0,754) и M1 – 0,933 (0,856-0,976); $p < 0,001$) (рисунки 3.33, 3.34).

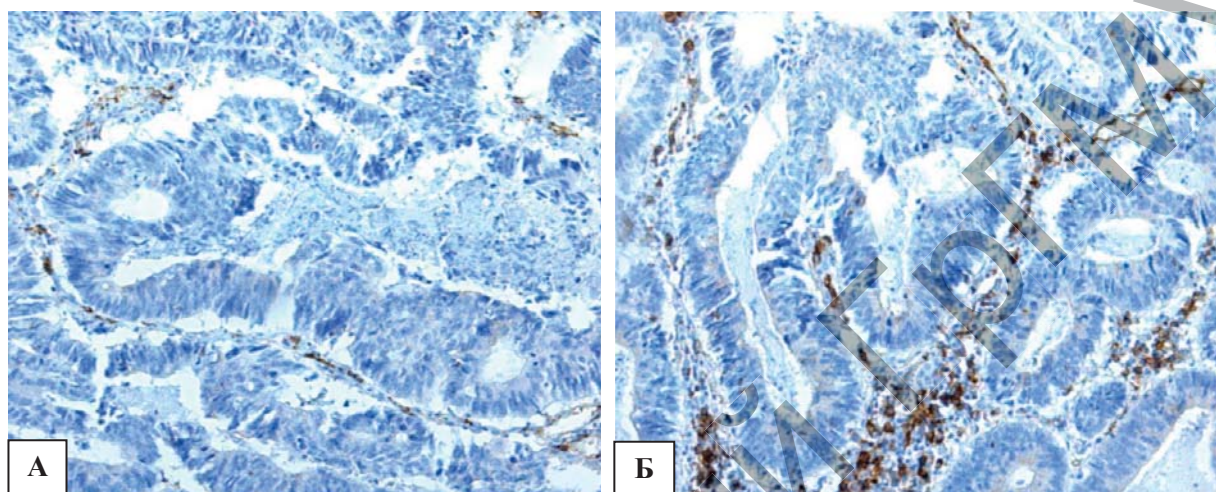


Рисунок 3.33. – Экспрессия CD105 в аденокарциноме без отдаленных метастазов (А) и с метастазами (Б). Ув. $\times 100$

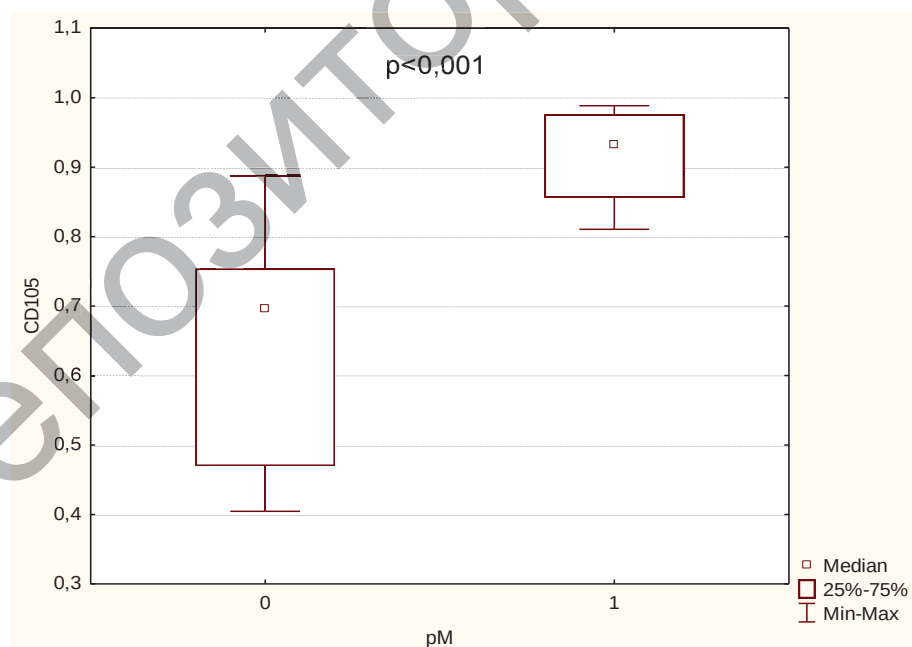


Рисунок 3.34. – Уровни позитивности CD105 в опухоли в зависимости от наличия отдаленных метастазов

Результаты проведенного исследования показали, что экспрессия CD105 достоверно выше в группе пациентов, у которых появились новые отдаленные метастазы (рисунок 3.35), однако значимых различий в зависимости от времени их появления не установлено ($p>0,05$).

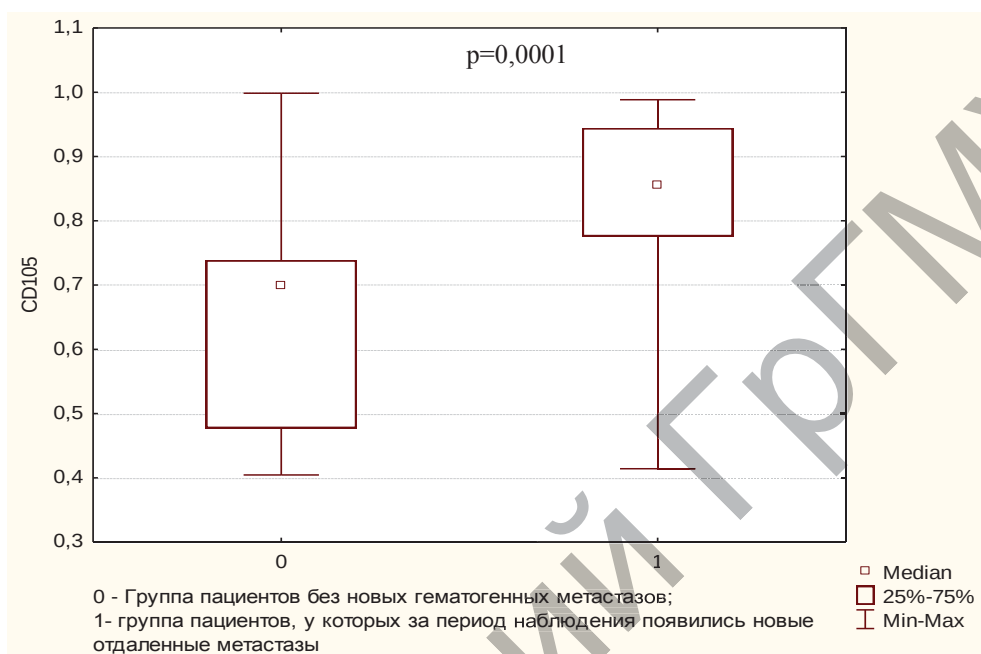


Рисунок 3.35. – Уровни экспрессии CD105 в опухоли в зависимости от наличия вновь выявленных отдаленных метастазов

Статистически значимых различий экспрессии остальных МА также не имеется.

Анализ экспрессии изучаемых МА в зависимости от стадии заболевания показал, что значимо различаются уровни позитивности CD105 и MMP-2 в строме опухоли (рисунки 3.36, 3.37).

С увеличением стадии заболевания площадь экспрессии CD105 в опухоли возрастает ($r=0,826$, $p<0,001$). При этом различия оказались значимыми между каждой из стадий: I и II – 0,444 (0,421-0,477) и 0,538 (0,457-0,710); $p=0,009$, I и III – 0,444 (0,421-0,477) и 0,727 (0,699-0,789); $p<0,001$, I и IV – 0,444 (0,421-0,477) и 0,933 (0,856-0,976); $p<0,001$, II и III – 0,538 (0,457-0,710) и 0,727 (0,699-0,789; $p<0,001$), II и IV – 0,538 (0,457-0,710) и 0,933 (0,856-0,976); $p<0,001$, III и IV – 0,727 (0,699-0,789) и 0,933 (0,856-0,976); $p<0,001$.

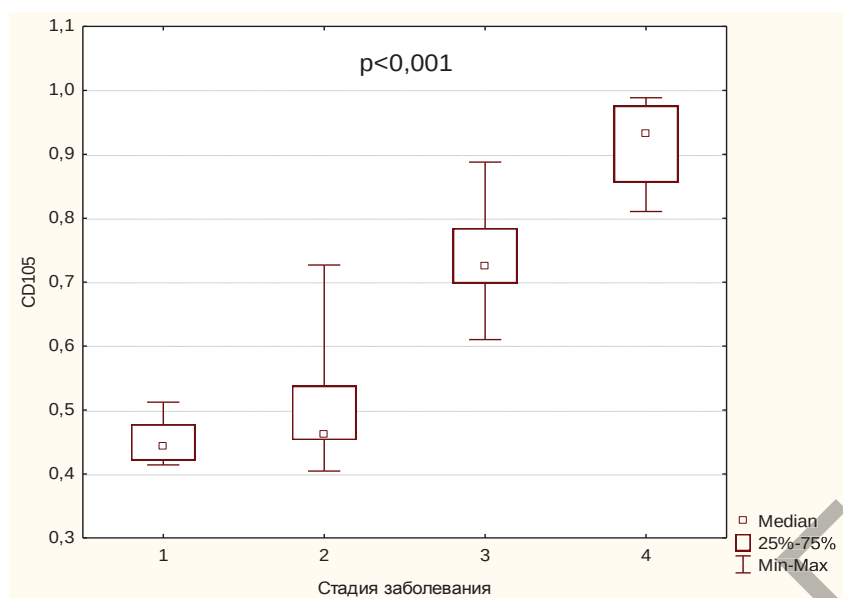


Рисунок 3.36. – Уровни позитивности CD105 в строме опухоли в зависимости от стадии заболевания

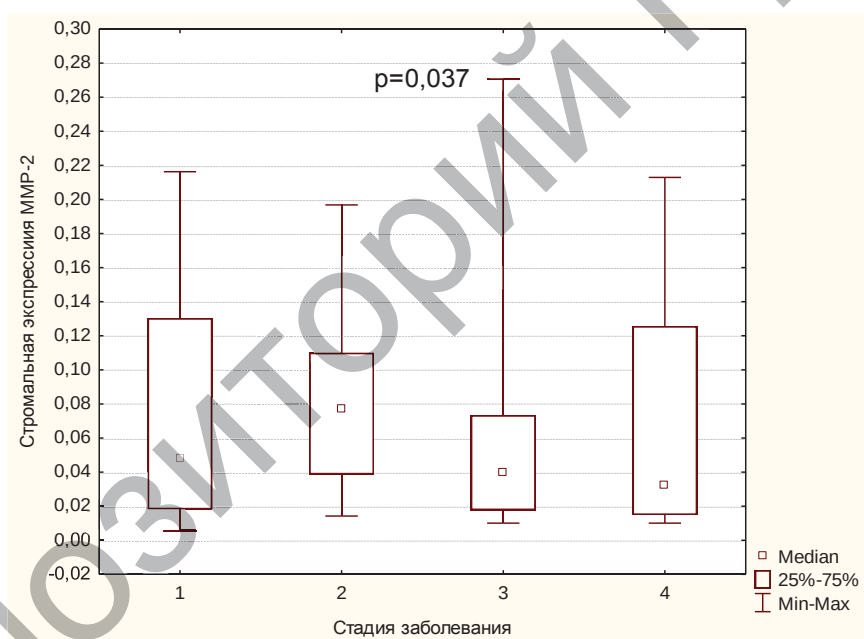


Рисунок 3.37. – Уровни стромальной позитивности MMP-2 в опухоли в зависимости от стадии заболевания

Уровень экспрессии MMP-2 в строме опухоли достоверно отрицательно коррелирует со стадией заболевания ($r=-0,249$; $p=0,037$). Статистически значимые различия установлены между II и III стадиями (0,077 (0,042-0,093) и 0,029 (0,016-0,053); $p=0,002$).

Выявлена также тенденция к достоверной связи стадии процесса и уровня паренхиматозной экспрессии VEGF-A ($r=-0,226$; $p=0,075$), при II стадии уровень позитивности VEGF-A был

незначительно выше, чем при IV (0,984 (0,965-0,991) и 0,966 (0,781-0,983); $p=0,056$).

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что ангиогенез в АТК сопровождается увеличением уровня экспрессии МА в опухолевой ткани по сравнению с нормальной слизистой оболочкой краев операционных разрезов [249-251]. Это не противоречит экспериментальным данным, полученным другими учеными. Так, N. Ilhan и соавт. выявили гиперэкспрессию CD105 в индуцированном 1,2-диметилгидразин дигидрохлоридом KPP [252]; M. L. George и соавт. отметили, что уровень экспрессии VEGF-A в опухоли достоверно выше, чем в краях резекции [253]; M. G. Tutton и соавт. обнаружили надэкспрессию MMP-9 в KPP [191]. Нами установлено, что медиана NRP1, экспрессируемого на опухолевых и эндотелиальных клетках, обладающего способностью к взаимодействию с VEGF [179], значимо выше в АТК [254].

Изучаемые нами антигены представляют собой полифункциональные цитокины, участвующие в ряде метаболических реакций не только в опухолевых, но и в нормальных клетках, поэтому экспрессия некоторых из них в опухоли и нормальной слизистой значимо не различаются. Такие результаты получены при изучении TGF- β [255], что не противоречит данным других исследователей [195-198]. Позитивность Erk2 в краях резекции и в опухоли значимо не различалась ни в нашем исследовании [256], ни в исследованиях других авторов, полагающих, что Erk2 участвует в процессах пролиферации и дифференцировки как нормальных, так и патологических типов клеток [208-210]. Нами установлено, что уровни позитивности MMP-2 в опухоли и в краях операционных разрезов статистически значимо не различаются [257].

Единственным антигеном, экспрессия которого в нормальной слизистой достоверно выше, чем в опухоли, оказался iNOS [250]. Некоторые исследователи полагают, что увеличение содержания NO в краях резекции опухоли может быть связано с оксидантным стрессом ткани и перитуморозной воспалительной реакцией [258].

Немаловажными представляются данные об изменениях экспрессии МА в паренхиме и строме опухоли. Можно согласиться с мнением H. Miletic и соавт. [259], которые считают, что VEGF-A экспрессируется преимущественно опухолевыми клетками и в

меньшей степени – клетками окружающих тканей: мигрирующими макрофагами, фибробластами и эндотелием [249]. Нами установлено, что экспрессии NRP1 и MMP-2 в строме опухоли достоверно выше, чем в паренхиме [257, 260]. Уровень паренхиматозной экспрессии TGF- β , Erk2 и MMP-9 в опухоли достоверно выше, чем в стромальной [251, 255, 261, 262]. Как и в исследованиях многих авторов [136, 148, 181], экспрессия iNOS нами выявлена в опухолевых клетках, но значимо от стромы она не отличалась [250].

Согласно проведенному исследованию, экспрессия практически всех МА в АТК не зависит от возраста и пола пациента. Выявленная стромальная гиперэкспрессия TGF- β у пациентов пожилого возраста может быть связана с ослаблением иммунного ответа либо с большей частотой колитов у пожилых пациентов, так как латентный комплекс TGF- β связан с макрофагами, которые активируются воспалительными стимулами [263].

Существенные различия, касающиеся эмбрионального происхождения, морфологических, биохимических и функциональных характеристик проксимальных и дистальных отделов толстой кишки (относительно точки Кэннона), позволяют предположить, что раки этих локализаций различаются по своему молекулярному патогенезу [264-267]. Правосторонние опухоли зачастую демонстрируют относительно сохраненный кариотип и развиваются на фоне ННКРР и хронического воспаления, в то время как левосторонним локализациям присущи комплексные хромосомные аномалии и предшествующий САП [268]. Результаты нашего исследования показали, что VEGF-A, NRP1 и MMP-2 экспрессируются преимущественно в аденокарциноме левых отделов толстой кишки [249, 257, 269]. Гиперэкспрессию VEGF в дистально локализованных раках также выявили G. E. Theodoropoulos и соавт. [270]. Различия в экспрессии, по мнению некоторых ученых, могут быть связаны с протекающими одновременно несколькими механизмами ангиогенеза в одном органе, опосредованными не только VEGF [168, 271].

Из литературных источников известно, что выраженность экспрессии CD105 в раке толстой кишки положительно коррелирует с глубиной инвазии опухоли, степенью поражения лимфатических узлов, появлением отдаленных гематогенных метастазов,

стадией заболевания [272-274], что также подтверждается результатами нашего исследования [275].

По данным ряда авторов, уровень экспрессии VEGF в низкодифференцированных формах опухоли в 10 раз превышает таковой в более дифференцированных формах опухоли [130, 131]. Однако К. Dassoulas и соавт. не выявили зависимости экспрессии VEGF от клинико-морфологических показателей [274], а S. F. Martins и соавт. обнаружили связь VEGF-A с высокой степенью дифференцировки АТК [27].

Исследования последних лет показывают, что процесс ангиогенеза в высоко- и низкодифференцированных опухолях разных органов различается: «Механизм неоваскуляризации по типу «порочного круга» (пролиферация – гипоксия – ангиогенез, затем вновь пролиферация и опять гипоксия) существует только в высокодифференцированных глиобластомах. В глиобластомах (Грейд IV) он больше напоминает процесс васкуляризации плаценты у беременных или формирование кардиогенных сосудов у эмбриона» [276]. При прогрессировании заболевания в опухоли накапливаются клоны клеток, негативные по экспрессии VEGF [145].

В нашем исследовании установлено, что медиана паренхиматозной и стромальной экспрессии VEGF-A и NRP1 значимо выше в низкогрейдных опухолях ($p < 0,05$) [249]. Выявленная нами тенденция к достоверной обратной связи между уровнем позитивности VEGF-A в опухолевой паренхиме и категориями pT, pN, стадией заболевания не противоречит данным некоторых других авторов, полагающих, что исследуемый маркер необходим на стадии максимального местного роста опухоли и постепенной утрате его значения на стадии метастазирования [277, 278].

По сведениям, приводимым в литературе, TGF- β обладает иммуносупрессивным действием, создает иммунологическую толерантность и предотвращает отторжение опухоли, тем самым способствуя ее анаплазии [279, 280]; повышает экспрессию генов, кодирующих MMP, которые участвуют в деградации внеклеточного матрикса и базальной мембраны [281]. Результаты нашего исследования показали, что в высокогрейдных аденокарциномах экспрессия TGF- β и MMP-9 значимо выше, чем в низкогрейдных, а медиана позитивности MMP-2, экспрессия которой, по некоторым литературным данным [282, 283], не имеет связи со степенью

дифференцировки опухоли, ниже [257, 284]. Выявлен значимо высокий уровень позитивности TGF- β в клетках опухоли без лимфогенных метастазов.

Некоторые авторы считают, что MMP-2, участвуя в деградации внеклеточного матрикса, способствует инвазии опухоли в стенку кишки, играя критическую роль в процессе неоангиогенеза в начальной стадии заболевания [285]. В результате наших исследований установлено, что максимальный уровень экспрессии MMP-2 в строме опухоли определяется на II стадии заболевания, и он значимо выше, чем на III. Выявлена тенденция к достоверной отрицательной связи экспрессии MMP-2 в опухоли с глубиной инвазии pT2. Установлено, что при отсутствии лимфогенных метастазов (pN0) позитивность MMP-2 несколько выше, чем при их наличии [257].

ГЛАВА 4

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АНГИОГЕНЕЗА В АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Прогностическая значимость переменных и критические значения (точки разделения) оценивалась нами с помощью анализа характеристических (receiver operating characteristic, ROC) кривых. Для признаков, которые статистически достоверно ассоциировались с прогнозом исхода, рассчитывали площадь под ROC-кривой с 95% ДИ.

Построение многофакторной модели прогнозирования трех- и пятилетнего исхода проводилось с использованием дискриминантного анализа и регрессии Кокса (прямым пошаговым методом). Нулевая гипотеза (об отсутствии различий между переменными, отсутствии влияния группирующей переменной) отвергалась на уровне значимости $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) для каждого из использованных тестов.

Выживаемость пациентов оценивалась путем применения метода Каплана-Майера [286].

4.1 Оценка значимости клинических и морфологических факторов для прогноза скорректированной безрецидивной выживаемости пациентов с аденокарциномой толстой кишки

За период наблюдения от прогрессирования заболевания умерли 37 пациентов (51,4%).

Медиана СБВ составила 2,5 (1,6-4,2) года. СБВ от начала лечения была прослежена во всех наблюдениях (рисунок 4.1).

Данные кумулятивной пропорциональной выживаемости всех пациентов, включенных в исследование, представлены в таблице 4.1.

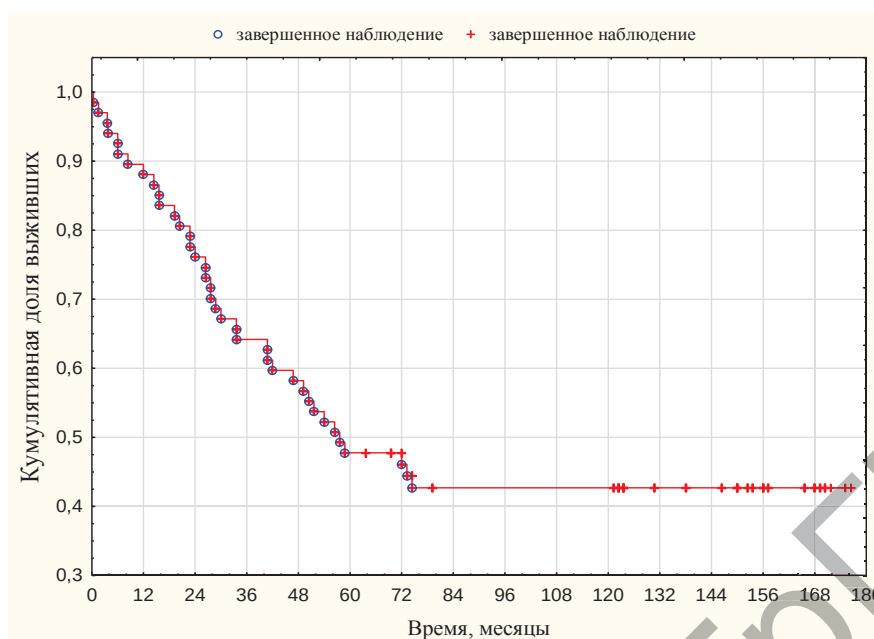


Рисунок 4.1. – СБВ для всех пациентов, включенных в исследование

Таблица 4.1. – Кумулятивная пропорциональная выживаемость пациентов

Временной интервал	Кумулятивная доля выживших, средняя [95% ДИ]	Стандартная ошибка
1 год	0,881 [0,803-0,958]	0,039
3 года	0,642 [0,527-0,757]	0,059
5 лет	0,478 [0,358-0,597]	0,061

Показатель СБВ пациентов для однолетнего временного интервала составил 88,1%, трехлетнего – 64,2% и пятилетнего – 47,8%. Принимая во внимание, что в первые пять лет наблюдения у большей половины пациентов наступили рецидив заболевания или смерть от него, именно этот срок был принят для разделения пациентов на группы исследования – с низкой (39 пациентов) и высокой (32 пациента) выживаемостью. Один случай посчитали пропавшим (смерть пациента наступила спустя 3 месяца после операции от причин, не связанных с рецидивом заболевания).

Пациенты с АТК в возрасте до 59 лет включительно определялись в 17 случаях (23,9%), от 60 до 74 – в 45 случаях (63,4%),

75 лет и старше – 9 (12,7%). На рисунке 4.2 представлена СБВ пациентов с АТК в зависимости от возраста на момент выявления заболевания.

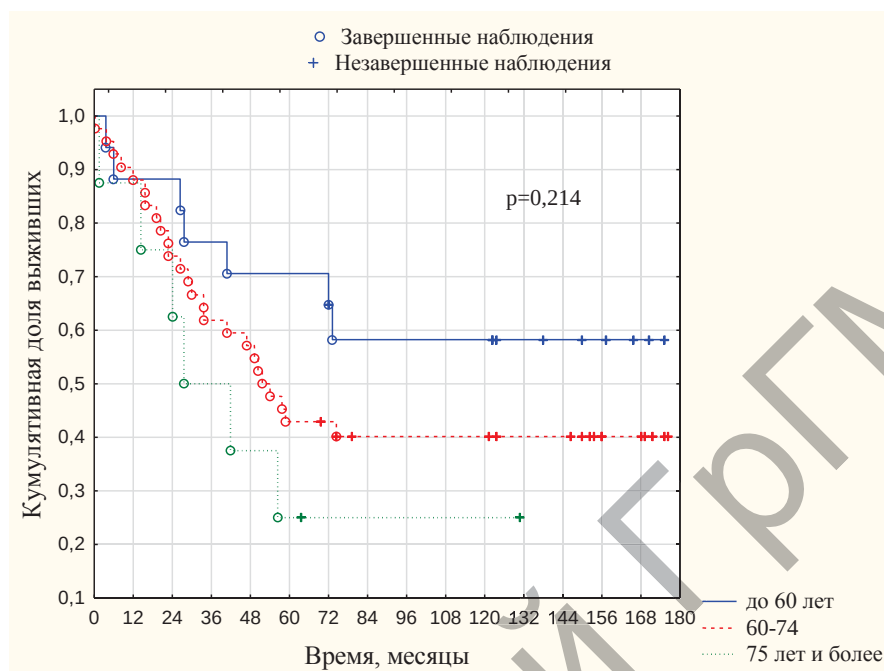


Рисунок 4.2. – Выживаемость пациентов в зависимости от возраста

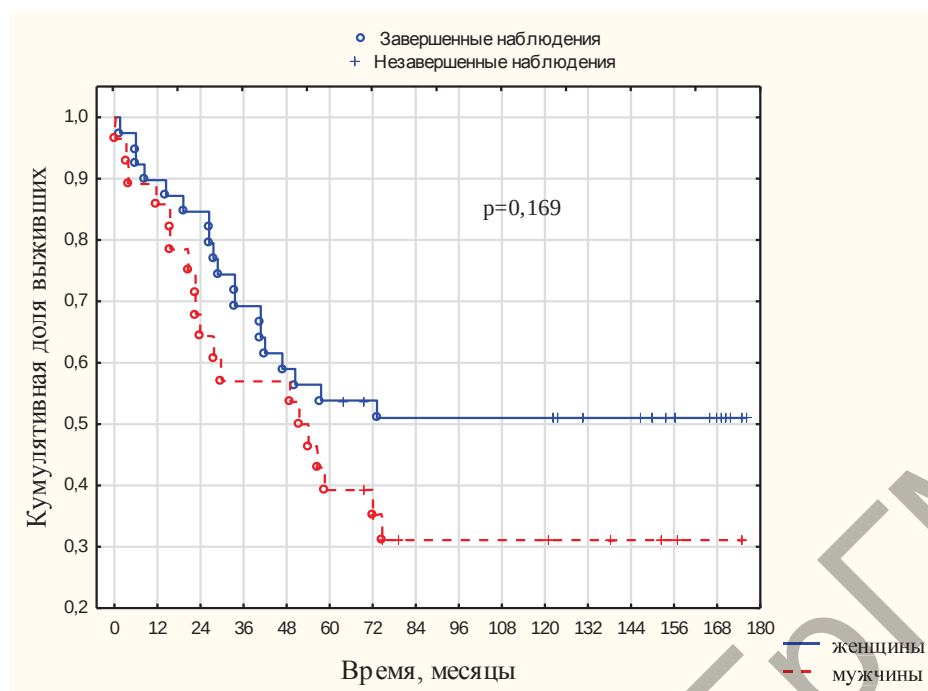
Как видно из рисунка 4.2, возраст пациента не оказывал влияния на показатель выживаемости ($p=0,214$), так как в обеих группах преобладали пациенты пожилого возраста (60-74 года).

Из 29 пациентов мужского пола, включенных в исследование, более половины (62%) были отнесены в группу с низкой выживаемостью. Среди пациентов женского пола (42) соотношение в зависимости от выживаемости было 1 к 1.

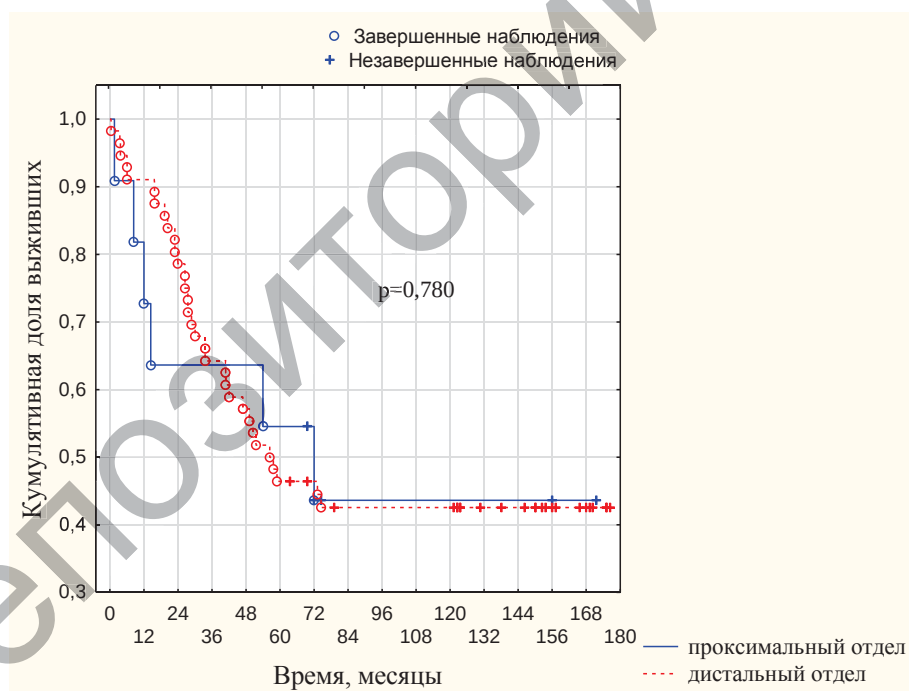
Пол пациента не оказывал значимого влияния на выживаемость ($p=0,169$) (рисунок 4.3).

Локализация опухоли в толстой кишке также не оказывает влияния на выживаемость ($p=0,780$) (рисунок 4.4).

Низкая степень дифференцировки АТК значительно снижает СБВ ($p=0,020$) (рисунок 4.5).



**Рисунок 4.3. – Выживаемость пациентов
в зависимости от пола**



**Рисунок 4.4. – Выживаемость пациентов
в зависимости от локализации опухоли**

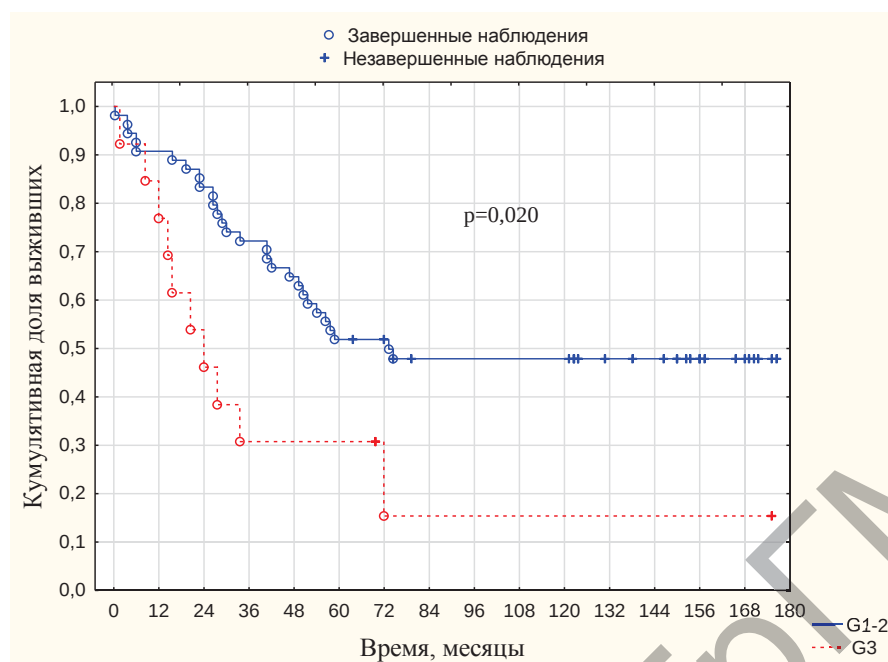


Рисунок 4.5. – Выживаемость пациентов в зависимости от степени дифференцировки аденокарциномы

Увеличение глубины инвазии опухоли в стенку толстой кишки значительно снижает кумулятивную долю выживших ($p=0,029$) (рисунок 4.6).

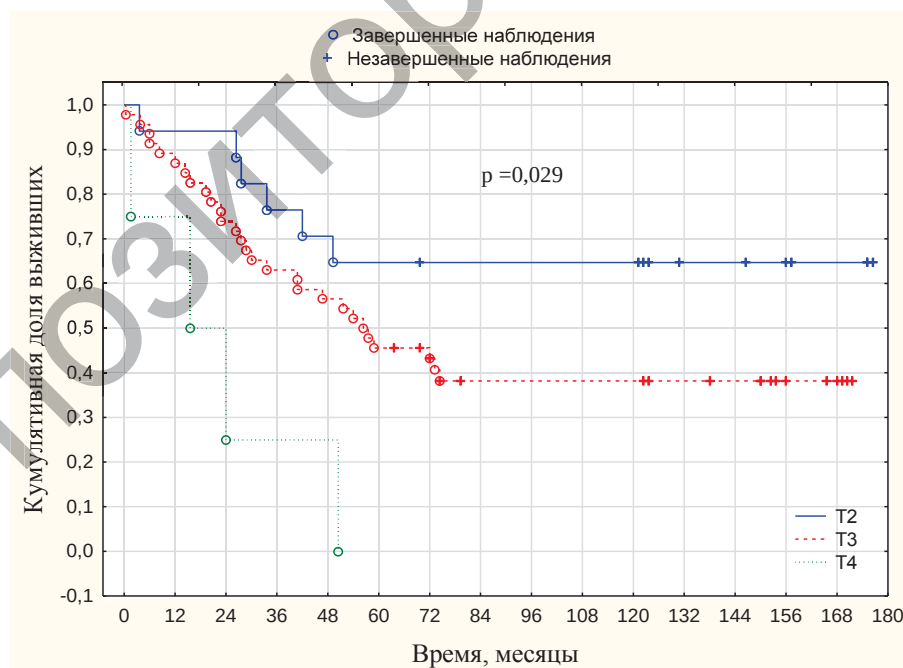


Рисунок 4.6. – Выживаемость пациентов в зависимости от глубины инвазии опухоли в стенку кишки

Наличие регионарного лимфогенного метастазирования не оказывает влияния на СБВ пациентов ($p=0,413$) (рисунок 4.7).

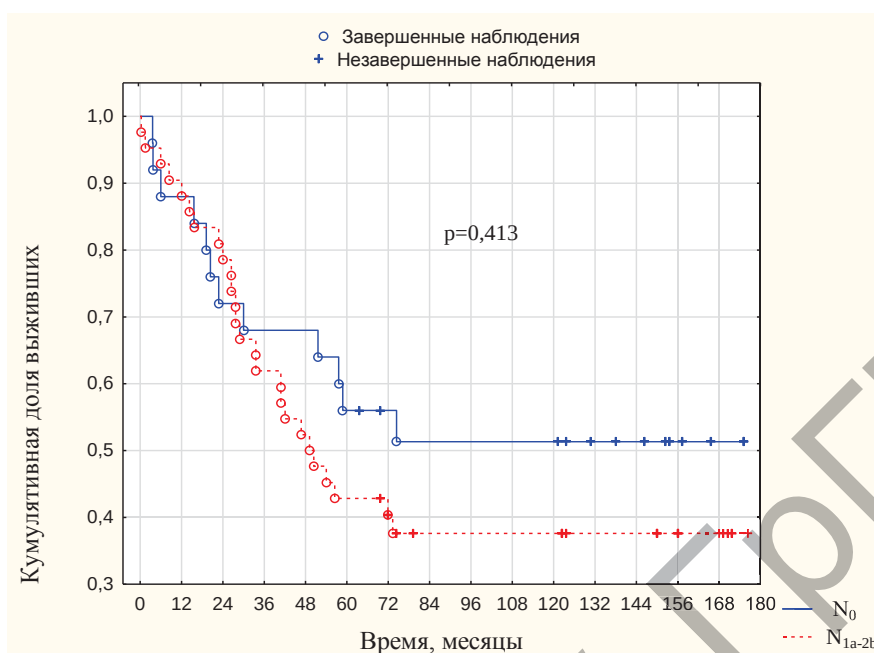


Рисунок 4.7. – Выживаемость пациентов в зависимости от наличия регионарного лимфогенного метастазирования

Наличие отдаленных метастазов на момент выявления заболевания значительно снижает выживаемость пациентов ($p=0,0007$) (рисунок 4.8).

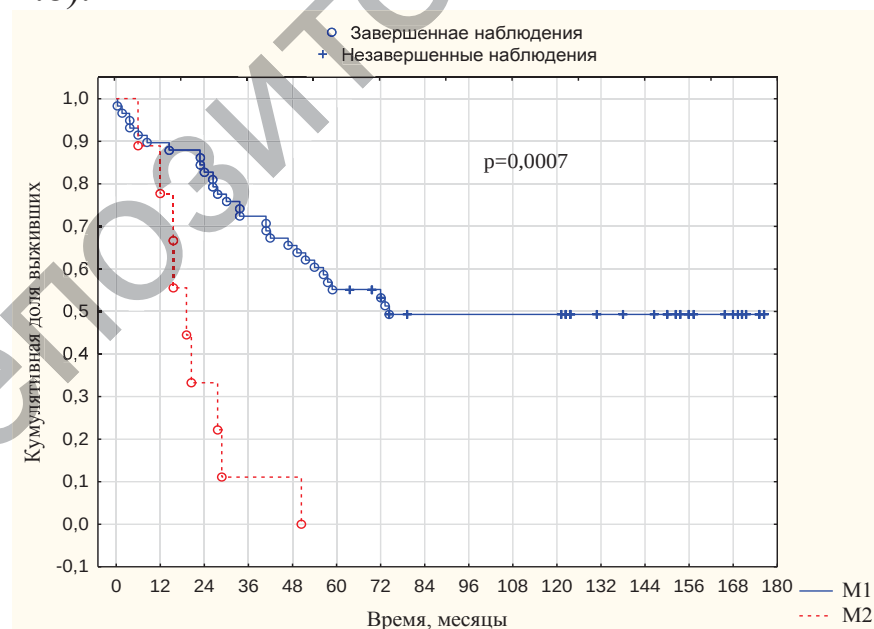


Рисунок 4.8. – Выживаемость пациентов в зависимости от наличия отдаленных метастазов

Увеличение стадии заболевания также значительно снижает кумулятивную долю выживших ($p=0,0001$) (рисунок 4.9).

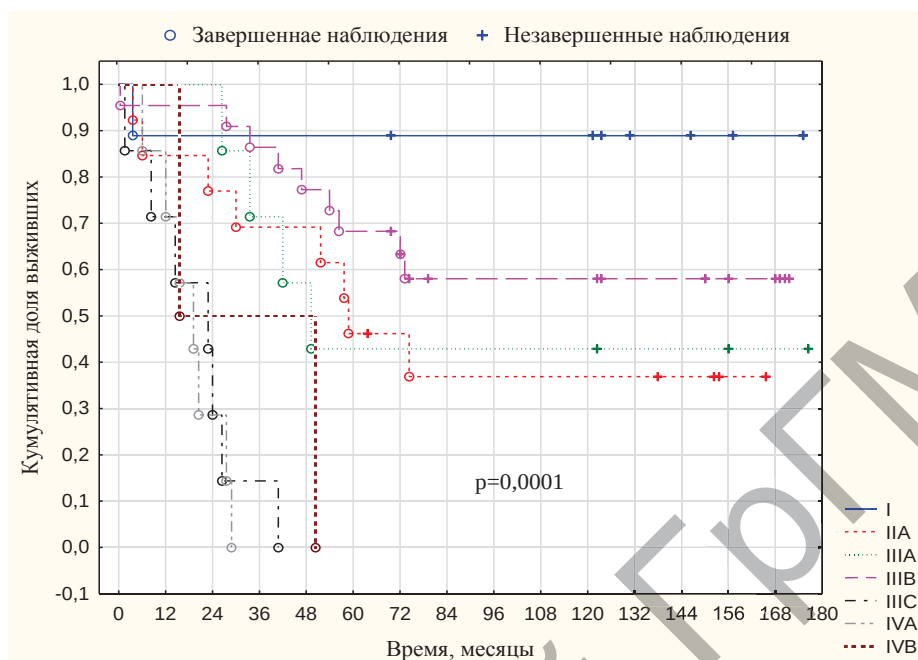


Рисунок 4.9. – Выживаемость пациентов в зависимости от стадии АТК

Вид лечения пациентов (хирургическое или комбинированное) не влияет на СБВ пациентов ($p=0,160$) (рисунок 4.10).

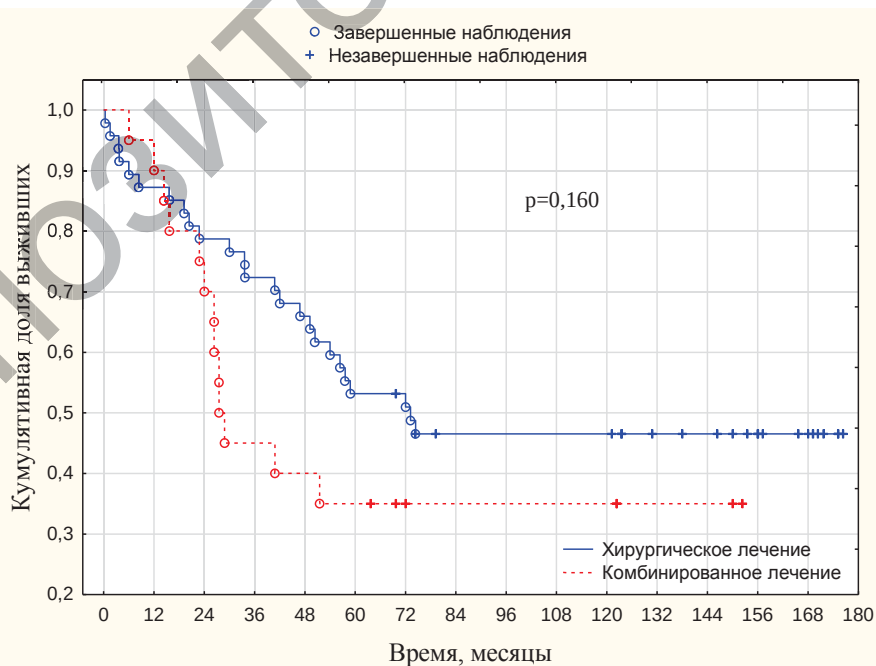


Рисунок 4.10. – Выживаемость пациентов с хирургическим и комбинированным лечением

Построение многофакторной модели прогнозирования пятилетнего исхода в зависимости от клинико-морфологических параметров проводилось с использованием регрессии Кокса прямым пошаговым методом. Группирующим признаком был выбран исход рака через 5 лет от момента оперативного вмешательства, оцениваемый по СБВ. В связи с тем, что распределение отличалось от нормального ($p < 0,05$), для проверки переменных на взаимную коррелированность рассчитали ранговую корреляцию Спирмена. Результат корреляционного анализа представлен в таблице 4.2.

Таблица 4.2. – Корреляции клинико-морфологических показателей

		Возраст	Пол	Локализация	Грейд	Стадия	Химиотерапия
Возраст	r	1,000	0,074	-0,245	0,284	0,130	-0,044
	p	-	0,539	0,039	0,016	0,278	0,712
Пол	r	0,074	1,000	0,042	0,153	-0,177	0,001
	p	0,539	-	0,725	0,201	0,141	0,994
Локализация	r	-0,245	0,042	1,000	0,265	0,357	0,203
	p	0,039	0,725	-	0,026	0,002	0,089
Грейд	r	0,284	0,153	0,265	1,000	0,328	0,232
	p	0,016	0,201	0,026	-	0,005	0,051
Стадия	r	0,130	-0,177	0,357	0,328	1,000	0,305
	p	0,278	0,141	0,002	0,005	-	0,009

Как отражено в таблице 4.2, независимые клинико-морфологические переменные слабо коррелированы и, следовательно, могут быть использованы в качестве независимых переменных в регрессии.

Установлено, что достоверно влияют на пятилетнюю СБВ только 2 показателя. Значения функции правдоподобия и статистические критерии модели для каждого из шагов регрессии представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3. – Пошаговая оценка критериев регрессионной модели

Шаг	-2 Log Likelihood	Актуальное значение			Отличие от предыдущего шага		
		Chi-square	df	Sig.	Chi-square	Df	Sig.
1 ^a	295,655	26,223	3	,000	17,774	3	,000
2 ^b	288,211	34,978	4	,000	7,445	1	,006

Как видно из таблицы 4.3, коэффициенты модели значимы, их численные значения позволят проинтерпретировать полученный результат.

Численные значения коэффициентов независимых переменных и их характеристики представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4. – Характеристика коэффициентов независимых переменных, включенных в модель прогнозирования пятилетней СБВ

		B	SE	Wald	df	Sig.	Exp (B)
Шаг 2	Грейд	-1,079	,378	8,131	1	,004	,340
	Стадия			17,924	3	,000	
	Стадия (1)	-2,384	,685	12,121	1	,000	,092
	Стадия (2)	-1,157	,528	4,809	1	,028	,314
	Стадия (3)	-1,557	,424	13,473	1	,000	,211

Таким образом, значимыми морфологическими факторами риска развития неблагоприятного исхода заболевания в течение пяти лет после хирургического удаления опухоли являются: высокий грейд и поздняя стадия TNM заболевания, что и подтверждают данные таблицы 4.4. Увеличение градуса на 1 снижает выживаемость пациента в 0,340 раза, стадии – в 0,092, 0,314 и 0,211 раза соответственно.

Результаты нашего исследования показали, что у 21 пациента с I-IIА стадией низкоккачественного (G1-2) рака СБВ для трехлетнего временного интервала составила 80,6%, для пятилетнего – 57,1%, для десятилетнего – 47,6%. Таким образом, в течение трех лет наблюдения умерли или имели рецидив заболевания

19,4% пациентов, пяти лет – 42,9% и 10-ти лет – 52,4%. Принимая во внимание эти данные, нами был проведен анализ экспрессии МА в опухоли для выявления иммуногистохимических факторов, влияющих на исход заболевания в течение пяти лет после удаления опухоли.

4.2 Значение экспрессии маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки для прогноза развития неблагоприятного исхода

Для сравнения вероятности исхода в зависимости от наличия фактора риска рассчитывали относительный риск (ОР), представляющий собой отношение риска возникновения определенного события в группе с СБВ менее пяти лет ($a/(a+b)$) по отношению к группе пациентов с СБВ более пяти лет ($c/(c+d)$).

$$OP = ((a/(a+b))/(c/(c+d))) = a(c+d)/c(a+b), \quad (4.1)$$

где a – количество человек, подвергшихся воздействию фактора, с СБВ до пяти лет;

b – количество человек, подвергшихся воздействию фактора, с СБВ пять лет и более;

c – количество человек, не подвергавшихся воздействию фактора, с СБВ до пяти лет;

d – количество человек, не подвергавшихся воздействию фактора, с СБВ пять лет и более.

Показатель ОР сравнивается с 1 для того, чтобы определить характер связи фактора и исхода:

- Если ОР равен 1, правомерен вывод, что исследуемый фактор не влияет на вероятность исхода (отсутствие связи между фактором и исходом).
- При значениях более 1 делается вывод о том, что фактор повышает частоту исходов (прямая связь).
- При значениях менее 1 можно говорить о снижении вероятности исхода при воздействии фактора (обратная связь).

Для расчета границ 95% доверительного интервала (ДИ) нами использована формула:

$$ДИ = \ln(OP \pm 1,96 \sqrt{b/(a(a+b)) + d/(c(c+d))}) \quad (4.2)$$

Если оба значения – и нижней, и верхней границы – находятся по одну сторону от 1, или, другими словами, доверительный интервал не включает 1, делается вывод о статистической значимости выявленной связи между фактором и исходом с вероятностью ошибки $p < 0,05$.

Если нижняя граница 95% ДИ меньше 1, а верхняя – больше, делается вывод об отсутствии статистической значимости влияния фактора на частоту исхода, независимо от величины показателя ОР ($p > 0,05$).

Для расчета ОР возникновения неблагоприятного исхода нами проведен сравнительный анализ влияния МА в низко- и высоко- злокачественной аденокарциноме (относительно точки разделения, определенной с помощью ROC-анализа), на исход заболевания. Пациенты были разделены на 3 группы. В группу 1 включен 21 пациент с I-IIA стадиями, во группу 2 – 28 пациентов с III стадией рака, в группу 3 – 6 пациентов с IV стадией рака. Показатели ОР изучаемых МА в высоко- злокачественной аденокарциноме I-IIA стадии в зависимости от СБВ представлены в таблице 4.5.

Таблица 4.5. – Показатели ОР для VEGF-A, NRP1, MMP-2, MMP-9, TGF- β , CD 105, Erk2, iNOS в высоко- злокачественной аденокарциноме I-IIA стадии в зависимости от СБВ

Показатель			СБВ			ОР (95% ДИ)
ген	компонент опухоли	точка разделения	<5 (n=9)	≥ 5 (n=12)	p	
VEGF-A	паренхиматозный	$\leq 0,995$	7 (77,8%)	8 (66,7%)	0,633	1,4 (0,39-4,91)
		$> 0,995$	2 (22,2%)	4 (33,3%)	0,779	0,7 (0,20-2,50)
	стромальный	$\leq 0,980$	1 (11,1%)	10 (83,3%)	0,039	0,1 (0,02-0,76)
		$> 0,980$	8 (88,9%)	2 (16,7%)	0,036	4,8 (1,31-17,66)
NRP1	паренхиматозный	$\leq 0,566$	8 (88,9%)	2 (16,7%)	0,036	4,8 (1,31-17,66)
		$> 0,566$	1 (11,1%)	10 (83,3%)	0,039	0,1 (0,02-0,76)

Показатель			СБВ			ОР (95% ДИ)
ген	компо- нент опу- холи	точка разделе- ния	<5 (n=9)	≥5 (n=12)	p	
	стро- мальный	≤0,747	5 (55,6%)	1 (8,3%)	0,252	3,1 (1,26-7,78)
		>0,747	4 (44,4%)	11 (91,7%)	0,046	0,3 (0,13-0,79)
MMP-2	паренхи- матоз- ный	≤0,068	5 (55,6%)	11 (91,7)	0,092	0,4 (0,17-0,91)
		>0,068	4 (44,4%)	1 (8,3%)	0,143	2,6 (1,09-5,98)
	стро- мальный	≤0,048	3 (33,3%)	7 (58,3%)	0,469	0,6 (0,19-1,64)
		>0,048	6 (66,7%)	5 (41,7%)	0,406	1,8 (0,61-5,41)
MMP-9	паренхи- матоз- ный	≤0,686	2 (22,2%)	10 (83,3%)	0,075	0,2 (0,06-0,79)
		>0,686	7 (77,8%)	2 (16,7%)	0,112	4,7 (1,26-17,34)
	стро- мальный	≤0,385	3 (33,3%)	8 (66,7%)	0,318	0,5 (0,15-1,35)
		>0,385	6 (66,7%)	4 (33,3%)	0,602	2,2 (0,74-6,54)
TGF-β	паренхи- матоз- ный	≤0,830	1 (11,1%)	8 (66,7%)	0,029	0,2 (0,03-1,10)
		>0,830	8 (88,9%)	4 (33,3%)	0,047	6,0 (1,01-39,75)
	стро- мальный	≤0,292	2 (22,2%)	6 (50%)	0,492	0,5 (0,13-1,71)
		>0,292	7 (77,8%)	6(50%)	0,295	2,2 (0,59-7,92)
CD105	стро- мальный	≤0,462	7 (77,8%)	5 (41,7%)	0,202	2,6 (0,71-9,75)
		>0,462	2 (22,2%)	7 (58,3%)	0,368	0,4 (0,10-1,42)
Erk2	паренхи- матоз- ный	≤0,003	4 (44,4%)	3 (25%)	0,597	1,6 (0,62-4,14)
		>0,003	5 (55,6%)	9 (75%)	0,456	0,6 (0,24-1,62)

Показатель			СБВ			ОР (95% ДИ)
ген	компо- нент опу- холи	точка разделе- ния	<5 (n=9)	≥5 (n=12)	p	
	стро- мальный	≤0,003	6 (66,7%)	5 (41,7%)	0,406	1,8 (0,61-5,41)
		>0,003	3 (33,3%)	7 (58,3%)	0,469	0,6 (0,19-1,64)
iNOS	паренхи- матоз- ный	≤0,79	3 (33,3%)	8 (66,7%)	0,318	0,5 (0,15-1,35)
		>0,79	6 (66,7%)	4 (33,3%)	0,602	2,2 (0,74-6,54)
	стро- мальный	≤0,72	1 (11,1%)	5 (41,7%)	0,362	0,3 (0,05-1,99)
		>0,72	8 (88,9%)	7 (58,3%)	0,174	3,2 (0,50-20,37)

Как видно из таблицы 4.5, факторами риска неблагоприятного исхода у пациентов группы 1 являются: уровень стромальной экспрессии VEGF-A выше 0,980 (ОР (95% ДИ) = 4,8 (1,31-17,66); $p=0,036$), уровень позитивности NRP1 в опухолевых клетках равный или ниже 0,566 (ОР (95% ДИ) = 4,8 (1,31-17,66); $p=0,036$), уровень TGF- β в паренхиматозном компоненте опухоли выше 0,830 (ОР (95% ДИ) = 6,0 (1,01-39,75); $p=0,047$).

ОР возникновения неблагоприятного исхода в течение пяти лет у пациентов с III стадией рака прогнозируется при уровне общей экспрессии MMP-2 в опухоли выше 0,034 (ОР (95% ДИ) = 6,1 (1,02-40,68); $p=0,025$).

В связи с небольшим количеством пациентов с IV стадией рака (6 случаев), расчет ОР неблагоприятного исхода не представляется возможным.

Учитывая тот факт, что медиана СБВ у пациентов с высоким грейдом составляет 1,5 (1,0-2,3) года, расчет ОР неблагоприятного исхода заболевания проводили для 2-летнего временного интервала. Фактором риска неблагоприятного исхода у пациентов с высокогредной опухолью является гиперэкспрессия TGF- β ($>0,940$) в паренхиматозном компоненте опухоли (ОР (95% ДИ) = 3,7 (1,39-9,63); $p=0,045$). В связи с небольшим количеством пациентов с высокогредной аденокарциномой (16 случаев) расчет ОР

неблагоприятного исхода в зависимости от стадии заболевания не представляется возможным.

По литературным данным, низкая степень дифференцировки опухоли, соответствующая грейд 3, ассоциируется с низкой выживаемостью [76, 87], а наличие отдаленных метастазов и стадия заболевания являются основными параметрами, определяющими прогноз при КРР [77], что также отмечено в результатах нашего исследования [287]. Однако у пациентов с относительно благоприятными факторами риска АТК (низкий грейд и отсутствие гематогенных метастазов на момент выявления заболевания) даже при сходном объеме и характере оперативного вмешательства СБВ разная. Практически в половине изучаемых случаев при сочетании таких параметров, как низкий грейд АТК и I-II стадия заболевания, СБВ составила менее пяти лет. В связи с этим нами установлены новые факторы риска неблагоприятного исхода с учетом степени дифференцировки аденокарциномы и стадии заболевания [288], получено решение на выдачу патента на изобретение «Способ прогнозирования выживаемости пациентов с низкоквалифицированным раком толстой кишки» (№ а 20160263 от 20 октября 2016) [289].

ГЛАВА 5

МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИСХОДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИЕЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Для разработки метода прогнозирования клинических исходов у пациентов, получавших химиотерапию после удаления АТК, из 27 наблюдений случайным образом было отобрано 5 случаев (контрольная выборка). Оставшиеся 22 наблюдения АТК с ПОХТ составили обучающую выборку (группа 1). В группу сравнения включены 45 пациентов без ПОХТ (группа 0). Группирующим признаком выбран исход рака через 3 и 5 лет от момента оперативного вмешательства, оцениваемый по СБВ.

Анализ экспрессии изучаемых МА в зависимости от выживаемости пациентов с ПОХТ и без таковой показал, что статистически значимо различаются уровни позитивности CD105 и VEGF-A.

Установлена статистическая значимость вкладов переменной СБВ ($F=8,05$; $p=0,006$), а также сочетания двух независимых переменных ($F=4,29$; $p=0,04$) в дисперсию уровня стромальной экспрессии CD105 (рисунок 5.1). В группе пациентов без ПОХТ позитивность CD105 составила 0,70 (0,50-0,83) при СБВ менее трех лет и 0,69 (0,46-0,76) – если выживаемость была больше трех лет. Однако эти различия не являются статистически значимыми ($p=0,88$). В группе пациентов с ПОХТ, не перешагнувших рубеж трехлетней СБВ, уровень CD105 достоверно выше (0,86 (0,80-0,96)), чем у пациентов, проживших более трех лет без рецидива и новых гематогенных метастазов (0,69 (0,48-0,70)), $p=0,003$.

С помощью ROC-анализа нами определялась точка разделения для прогнозирования трехлетней выживаемости у пациентов с ПОХТ в зависимости от уровня CD105 (рисунок 5.2).

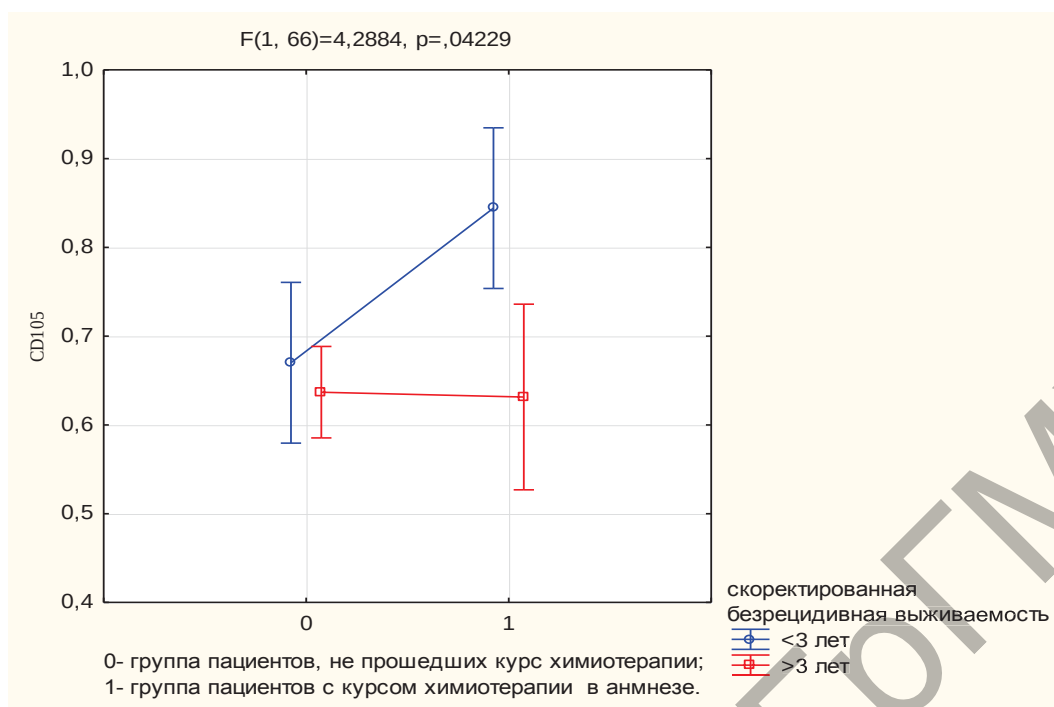


Рисунок 5.1. – Экспрессия CD105 в зависимости от трехлетней СБВ пациентов с ПОХТ и без ее проведения

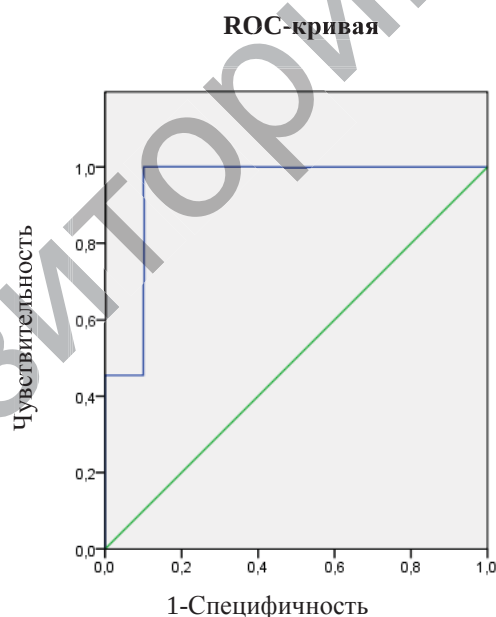


Рисунок 5.2. – Соотношение чувствительности и специфичности (ROC-кривая) при прогнозировании трехлетней СБВ в зависимости от уровня экспрессии CD105 у пациентов с ПОХТ

Площадь под ROC-кривой, построенной в ходе анализа, равняется $0,95 \pm 0,06$ (достоверность различия с площадью под диагональю равна 0,001). Наиболее удаленная от диагонали точка

на ROC-кривой соответствует уровню экспрессии CD105, равному 0,725 (чувствительность – 100%, специфичность – 90%).

Дисперсионный анализ не выявил статистически значимого влияния группирующих факторов и их сочетания на степень экспрессии VEGF-A в опухолевой паренхиме.

В таблице 5.1 представлены уровни экспрессии VEGF-A в группе пациентов с ПОХТ и без таковой в анамнезе в зависимости от СБВ.

Таблица 5.1. – Уровень экспрессии VEGF-A в группе пациентов с ПОХТ и при ее отсутствии в зависимости от СБВ

СБВ		Опухолевая паренхима			Опухолевая строма		
		группа 1	группа 0	p	группа 1	группа 0	p
3 года	<3	0,97 (0,7-0,97)	0,993 (0,99-0,99)	0,02	0,93 (0,79-0,95)	0,98 (0,95-0,99)	0,005
	≥3	0,99 (0,74-0,99)	0,987 (0,96-0,99)	0,2	0,97 (0,96-0,99)	0,95 (0,93-0,98)	0,13
P		0,14	0,058		0,006	0,012	
5 лет	<5	0,97 (0,83-0,98)	0,99 (0,99-0,99)	0,02	0,93 (0,79-0,96)	0,97 (0,95-0,99)	0,013
	≥5	0,99 (0,74-0,99)	0,98 (0,96-0,99)	0,25	0,98 (0,95-0,99)	0,95 (0,93-0,98)	0,21
P		0,27	0,014		0,031	0,015	

В группе пациентов с ПОХТ различия в уровне экспрессии VEGF-A в опухолевых клетках в зависимости от выживаемости статистически не значимы ($p>0,05$).

В нулевой группе пациентов (без ПОХТ) степень экспрессии VEGF-A в паренхиме опухоли существенно выше в случаях, завершенных до 3-х и 5-ти лет, чем в наблюдаемых или завершенных случаях после 3-х и 5-ти лет соответственно.

При оценке влияния группирующих переменных на уровень экспрессии VEGF-A в стромальном компоненте опухоли с помощью ANOVA установлено, что достоверен вклад как каждой из независимых переменных (для трехлетней СБВ – $F=5,89$; $p=0,02$,

для ПОХТ – $F=6,24$; $p=0,015$), так и их сочетания $F=15,68$; $p=0,0002$) (рисунок 5.3). В группе пациентов с ПОХТ, не перешагнувших рубеж трехлетней СБВ, уровень экспрессии VEGF-A в строме достоверно ниже, чем у проживших более трех лет. В нулевой группе экспрессия изучаемого маркера достоверно выше в случаях, завершающихся в течение трех лет, по сравнению со случаями, наблюдаемыми дольше этого периода.

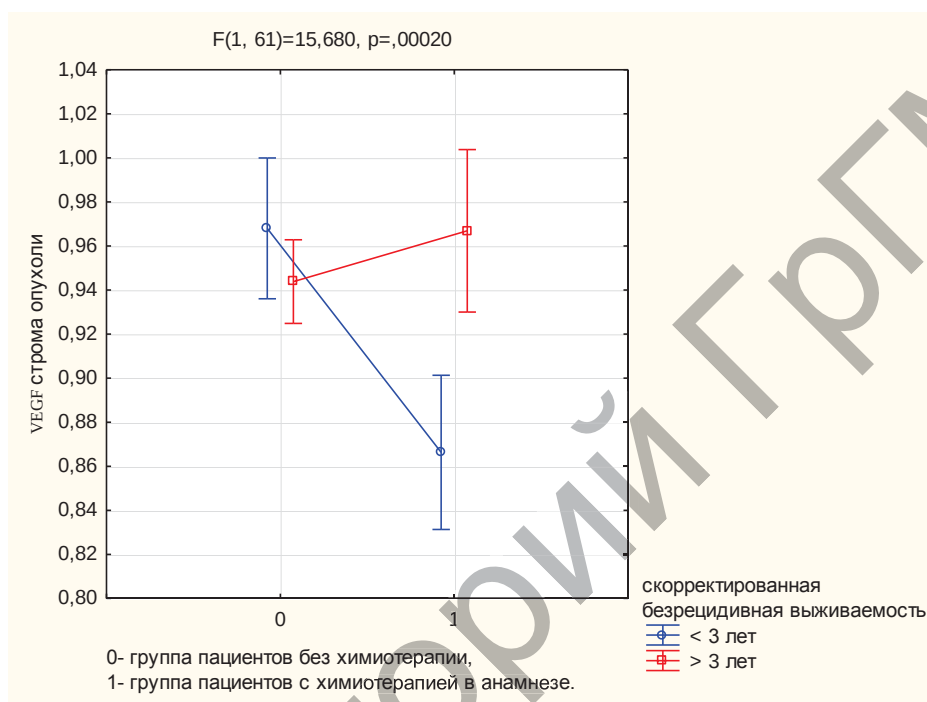


Рисунок 5.3. – Экспрессия VEGF-A в опухолевой строме в зависимости от скорректированной безрецидивной трехлетней выживаемости у пациентов, прошедших и не прошедших курс химиотерапии

ROC-анализ позволил определить точку разделения для прогнозирования трехлетней выживаемости у пациентов с ПОХТ в зависимости от уровня экспрессии VEGF-A в опухолевой строме (рисунок 5.4). Площадь под ROC-кривой равняется $0,84 \pm 0,09$ (достоверность различия с площадью под диагональю равна 0,01). Наиболее оптимальное соотношение чувствительности и специфичности на ROC-кривой соответствует уровню экспрессии VEGF-A, равному 0,95 (чувствительность – 80%, специфичность – 78%).

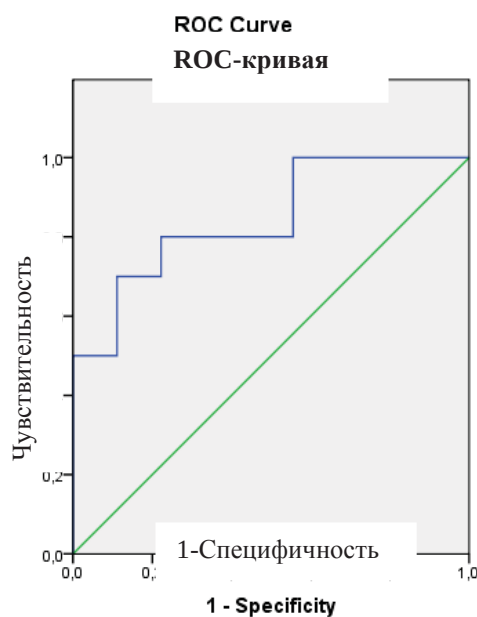


Рисунок 5.4. – Соотношение чувствительности и специфичности (ROC-кривая) при прогнозировании трехлетней выживаемости в зависимости от уровня экспрессии VEGF-A в опухолевой строме у пациентов с ПОХТ

При построении математической модели прогнозирования исхода заболевания (дискриминантной функции) прямым пошаговым методом у пациентов с ПОХТ АТК были использованы 59 клинико-анамнестических и морфологических показателей. Однако установлено, что достоверно влияют на трехлетнюю СБВ только 3 из них.

Характеристика переменных, включенных в модель прогнозирования трехлетней СБВ, представлена в таблице 5.2.

Таблица 5.2. – Характеристика переменных, включенных в модель прогнозирования трехлетней СБВ

Переменные	Лямбда Уилкса	F-исключить	p
VEGF-A в стромальном компоненте опухоли	0,440	4,67	0,05
CD105 в стромальном компоненте опухоли	0,587	11,23	0,004
Erk2 в паренхиматозном компоненте опухоли	0,439	4,64	0,05

Классификационная функция, полученная с использованием указанных переменных, представлена в таблице 5.3, классификационная матрица – в таблице 5.4.

Таблица 5.3. – Функция классификации для прогнозирования трехлетней СБВ

Переменные	Коэффициенты Y
VEGF-A в стромальном компоненте опухоли	-23,0247
CD105 в стромальном компоненте опухоли	14,9021
Erk2 в паренхиматозном компоненте опухоли	33,2538
Константа	8,7808

Таблица 5.4. – Классификационная матрица, полученная в результате применения классификационной функции для прогноза трехлетней СБВ

	Доля правильных прогнозов	Неблагоприятный исход (прогнозируемое состояние) (случаев)	Благоприятный исход (прогнозируемое состояние) (случаев)
Неблагоприятный исход (наблюдаемое состояние)	100%	10	0
Благоприятный исход (наблюдаемое состояние)	88,9%	1	8
Всего	94,7%	11	8

Анализ классификационной матрицы, значение лямбды Уилкса, равное 0,33, значение F-критерия, равного 9,90 при $p < 0,0008$, позволяет сделать вывод, что данная классификация является корректной.

Чувствительность предлагаемой дискриминантной модели составляет 100%, специфичность – 88,9%. Прогностическая значимость положительного результата (неблагоприятный прогноз трехлетней СБВ) – 100%. Прогностическая значимость отрицательного

результата (благоприятный прогноз) – 90,9%. Общая прогностическая значимость – 94,7%.

Указанная классификационная функция – основа способа прогнозирования трехлетней СБВ при наличии химиотерапии в анамнезе. Для ее осуществления необходимо определить уровни позитивности VEGF-A и CD105 в строме опухоли, Erk2 – в ее клетках. Затем, используя полученные значения этих показателей, необходимо посчитать дискриминантное уравнение:

$$y_1 = 8,7808 - 23,0247m_1 + 14,9021m_2 + 33,2538m_3, \quad (5.1)$$

где m_1 – уровень стромальной позитивности VEGF-A;
 m_2 – уровень стромальной позитивности CD105;
 m_3 – уровень паренхиматозной позитивности Erk2.

СБВ у пациентов с ПОХТ прогнозируют больше трех лет, если $y_1 \leq 0$. Если $y_1 > 0$, прогнозируют высокий риск неблагоприятного исхода в течение трех лет (смерть от основного заболевания, выявление отдаленных метастазов или локорегионарного рецидива).

Учитывая знаки перед коэффициентами дискриминантного уравнения, можно сделать вывод, что при исходно высоком уровне экспрессии VEGF-A в строме опухоли, низкой экспрессии Erk2 в клетках опухоли, а также низкой экспрессии CD105 вероятен хороший эффект от применения химиотерапии – СБВ составит более трех лет.

При использовании в качестве группирующих переменных информации о пятилетней СБВ и наличии ПОХТ в анамнезе установлено, что на дисперсию показателя экспрессии CD105 статистически значимо влияют обе независимые переменные по отдельности ($F=8,87$; $p=0,004$ и $F=5,58$; $p=0,02$, соответственно), но не их композиция ($F=1,64$; $p=0,25$) (рисунок 5.5).

Статистически значимые различия уровня экспрессии CD105 в группе пациентов без ПОХТ в зависимости от пятилетней СБВ отсутствуют (выживаемость менее 5-ти лет – 0,69 (0,46-0,82), выживаемость более 5-ти лет – 0,63 (0,46-0,72), $p=0,93$). В группе наблюдений с ПОХТ, завершенных в течение первых пяти лет после операции, уровень CD105 достоверно выше (0,86 (0,77-0,94)), чем у живущих более пяти лет (0,70 (0,48-0,72); $p=0,023$).

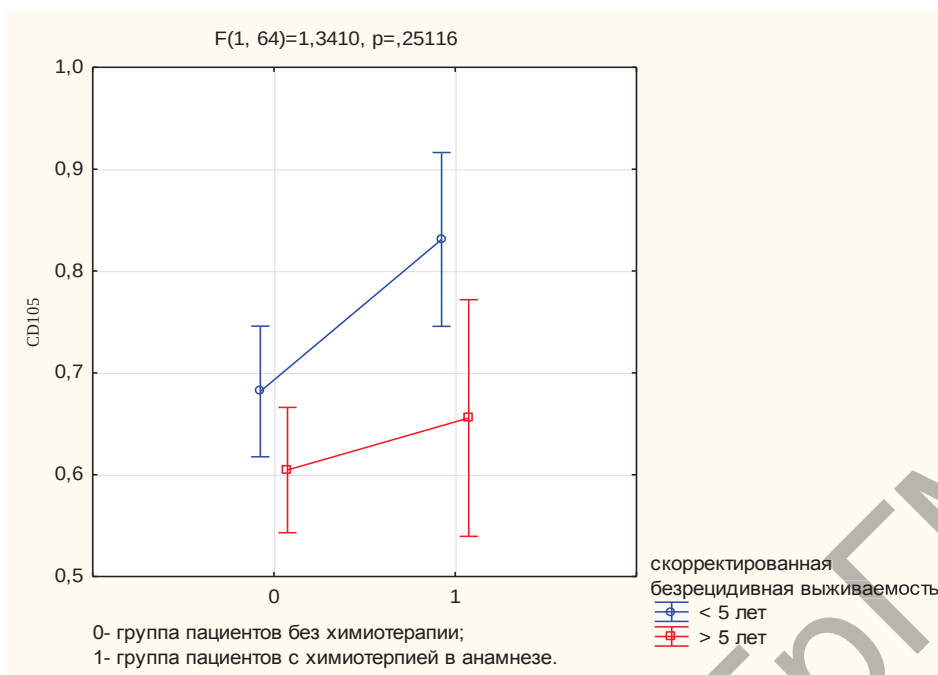


Рисунок 5.5. – Экспрессия CD105 в зависимости от пятилетней СБВ у пациентов, прошедших и не прошедших курс химиотерапии

Статистические характеристики ROC-кривой, построенной для оценки значимости уровня экспрессии CD105 при прогнозировании пятилетней выживаемости, были несколько хуже, чем для трехлетней (площадь под кривой $0,81 \pm 0,11$; $p=0,02$) (рисунок 5.6). Тем не менее, результаты ROC-анализа свидетельствуют, что с чувствительностью 85% и специфичностью 86% при уровне экспрессии CD105 в стромально-сосудистом компоненте опухоли, равном или превышающем 0,725, можно прогнозировать, что продолжительность жизни у пациентов, получающих химиотерапию, будет менее пяти лет.

При анализе вклада пятилетней СБВ пациентов и факта прохождения курса химиотерапии в дисперсию уровня экспрессии VEGF-A в опухолевой строме были получены результаты, аналогичные результатам, полученным при анализе трехлетней выживаемости (рисунок 5.7). Влияние группирующих переменных по отдельности было недостоверным (в обоих случаях $p>0,05$), а вклад их композиции – статистически значимым ($F=9,33$; $p=0,003$). У пациентов с ПОХТ СБВ составляет больше пяти лет, если исходный уровень экспрессии VEGF-A в строме высокий. В тех случаях, когда химиотерапия не проводится, хорошим прогностическим признаком является низкая экспрессия данного антигена.

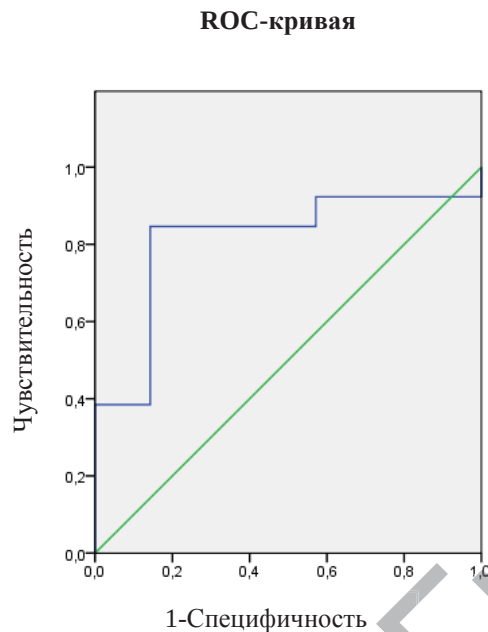


Рисунок 5.6. – Соотношение чувствительности и специфичности (ROC-кривая) при прогнозировании пятилетней СБВ в зависимости от уровня экспрессии CD105 у пациентов с ПОХТ

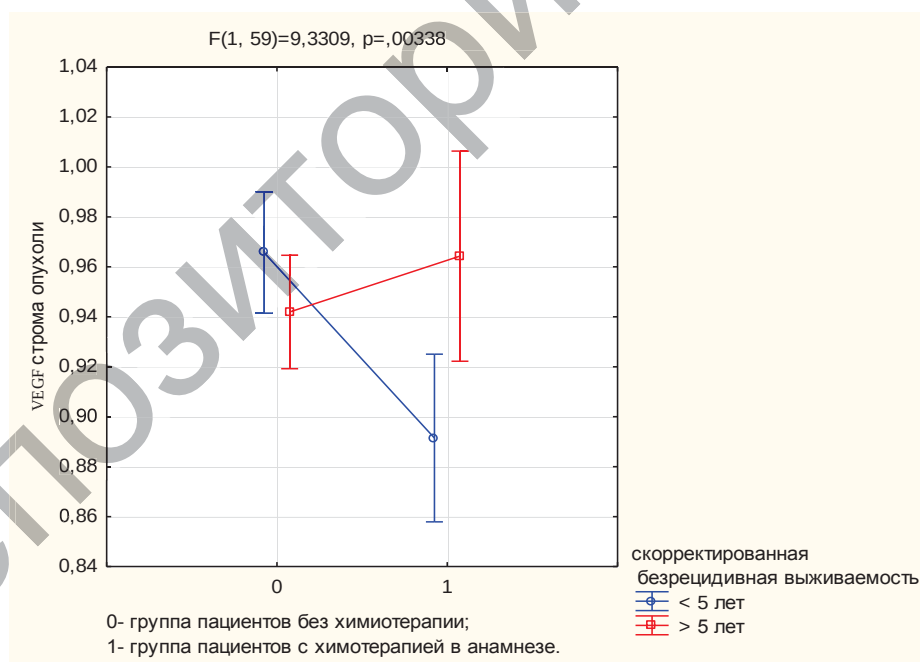


Рисунок 5.7. – Экспрессия VEGF-A в опухолевой строме в зависимости от скорректированной безрецидивной пятилетней выживаемости у пациентов, прошедших и не прошедших курс химиотерапии

ROC-кривая, построенная для оценки значимости уровня экспрессии VEGF-A в опухолевой строме при прогнозировании пятилетней выживаемости, ограничивала площадь $0,82 \pm 0,10$ (достоверность различия с площадью под диагональю $=0,03$) (рисунок 5.8).

Результаты ROC-анализа показывают, что при величине экспрессии VEGF-A в строме, равной или большей 0,965, с чувствительностью 71% и специфичностью 82% можно прогнозировать, что продолжительность жизни у пациентов, получающих химиотерапию, будет превышать пять лет.

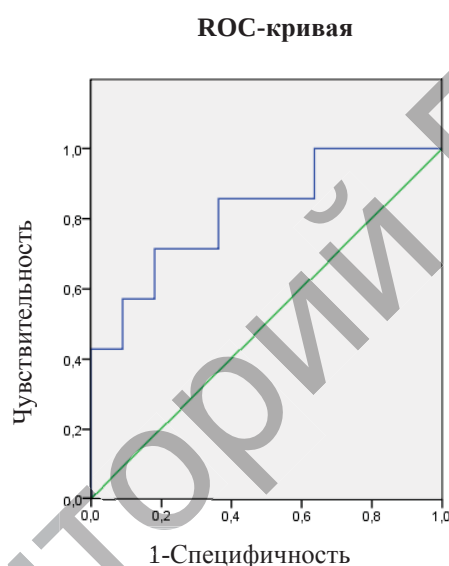


Рисунок 5.8. – Соотношение чувствительности и специфичности (ROC-кривая) при прогнозировании пятилетней СБВ в зависимости от уровня экспрессии VEGF-A в опухолевой строме у пациентов с ПОХТ

С помощью дискриминантного анализа установлено, что на пятилетнюю СБВ также влияют 3 ИГХ маркера. Характеристика переменных, включенных в модель прогнозирования пятилетней СБВ, представлена в таблице 5.5. Классификационная функция, полученная с использованием указанных переменных, представлена в таблице 5.6, классификационная матрица – в таблице 5.7.

Таблица 5.5. – Характеристика переменных, включенных в модель прогнозирования пятилетней СБВ

Переменные	Лямбда Уилкса	F-исключить	p
CD105 в стромальном компоненте опухоли	0,566	8,00	0,02
Erk2 в паренхиматозном компоненте опухоли	0,635	10,31	0,008
MMP-9 в стромальном компоненте опухоли	0,615	9,65	0,01

Таблица 5.6. – Функция классификации для прогнозирования пятилетней СБВ

Переменные	Коэффициенты Y
CD105 в стромальном компоненте опухоли	15,0461
Erk2 в паренхиматозном компоненте опухоли	75,3570
MMP-9 в стромальном компоненте опухоли	31,5051
Константа	-25,7033

Таблица 5.7. – Классификационная матрица, полученная в результате применения классификационной функции для прогноза пятилетней СБВ

	Доля правильных прогнозов	Неблагоприятный исход (прогнозируемое состояние) (случаев)	Благоприятный исход (прогнозируемое состояние) (случаев)
Неблагоприятный исход (наблюдаемое состояние)	83,3%	10	2
Благоприятный исход (наблюдаемое состояние)	100%	0	5
Всего	88,2%	10	7

Анализ классификационной матрицы, значение лямбды Уилкса, равное 0,33, значение F-критерия, равного 7,53 при $p < 0,005$, позволяют сделать вывод о том, что данная классификация является корректной. Чувствительность предлагаемой дискриминантной модели составляет 83,3%, специфичность – 100%. Прогностическая значимость положительного результата (неблагоприятный прогноз пятилетней СБВ) – 71,4%. Прогностическая значимость отрицательного результата (благоприятный прогноз) – 100,0%. Общая прогностическая значимость 88,2%.

Для прогнозирования пятилетней СБВ при наличии химиотерапии в анамнезе необходимо определить уровень позитивности CD105, уровень позитивности Erk2 в клетках опухоли и уровень позитивности MMP-9 в строме опухоли. Затем необходимо подставить полученные значения в дискриминантное уравнение:

$$y_2 = -25,7033 + 15,0461m_2 + 75,3570m_3 + 31,5051m_4, \quad (5.2)$$

где m_2 – уровень стромальной позитивности CD105;

m_3 – уровень паренхиматозной позитивности Erk2;

m_4 – уровень стромальной позитивности MMP-9.

СБВ у пациентов с ПОХТ прогнозируют больше пяти лет, если $y_2 \leq 0$. Если $y_2 > 0$, прогнозируют высокий риск неблагоприятного исхода в течение пяти лет (смерть от основного заболевания, выявление отдаленных метастазов или локорегионарного рецидива).

Положительные коэффициенты перед переменными в дискриминантном уравнении являются свидетельством того, что при исходно низких уровнях экспрессии CD105 (в сосудах опухоли), Erk2 (в клетках опухоли) и MMP-9 (в строме опухоли) можно прогнозировать, что СБВ у пациентов, получающих химиотерапию, превысит 5 лет.

Для оценки качества предложенных прогностических моделей, с их использованием был произведен расчет ожидаемой скорректированной безрецидивной выживаемости у 3 пациентов, из контрольной выборки.

Пример 1. Пациент Д. Возраст 62 года, пол женский. Уровень позитивности VEGF в строме опухоли 0,989, уровень стромальной позитивности CD105 0,933, уровень позитивности Erk2 в паренхиме опухоли 0,009, уровень позитивности MMP-9 в строме опухоли 0,349. Принимала стандартную химиотерапию.

Поскольку уровень позитивности VEGF-A, и экспрессия CD105 в опухолевой строме выше пороговых значений (VEGF-A в опухолевой строме больше 0,965, CD105, больше 0,725) – производится расчет дискриминантных уравнений:

$$y_1=8,7808-23,0247\times0,989+14,9021\times0,933+33,2538\times0,009=0,2123152,$$

$$y_2=-25,7033+15,0461\times0,933+75,3570\times0,009+31,5051\times0,349=0,0081929,$$

$y_1>0$ и $y_2>0$, поэтому прогнозируется высокий риск неблагоприятного исхода в течение 3 лет.

По данным наблюдения, СБВ составила 2,2 года. Отмечается совпадение прогнозируемого и наблюдаемого состояния.

Пример 2. Пациент Д. Возраст 37 лет, пол женский. Уровень позитивности VEGF в строме опухоли 0,964, общий уровень позитивности CD105 0,689, уровень позитивности Erk2 в паренхиме опухоли 0,0032, уровень позитивности MMP-9 в строме опухоли 0,518. Принимала стандартную химиотерапию.

Поскольку уровень позитивности VEGF-A ниже 0,965, но больше 0,95, и при этом экспрессия CD105 в опухолевой строме ниже 0,725 – производится расчет дискриминантных уравнений:

$$y_1=8,7808-23,0247\times0,964+14,9021\times0,689+33,2538\times0,0032=\\=-3,04105174,$$

$$y_2=-25,7033+15,0461\times0,689+75,3570\times0,0032+31,5051\times0,518=\\=1,2242471,$$

$y_1<0$, $y_2>0$, поэтому прогнозируется высокий риск неблагоприятного исхода в период от трех до пяти лет.

По данным наблюдения СБВ составила 3,4 года. Отмечается совпадение прогнозируемого и наблюдаемого состояния.

Пример 3. Пациент Ж. Возраст 62 года. Пол мужской. Уровень позитивности VEGF в строме опухоли 0,99, общий уровень позитивности CD105 0,461, уровень позитивности Erk2 в паренхиме опухоли 0,034, уровень позитивности MMP-9 в строме опухоли 0,234. Принимал стандартную химиотерапию.

Поскольку уровень позитивности VEGF-A выше 0,965, а экспрессия CD105 в опухолевой строме ниже 0,725 – можно прогнозировать, что СБВ после стандартной химиотерапии превысит 5 лет. По данным наблюдения СБВ составила 6,2 года. Отмечается совпадение прогнозируемого и наблюдаемого состояния.

В расчете дискриминантных уравнений в этом случае нет необходимости, они приведены только для того, чтобы продемонстрировать отсутствие противоречий в алгоритме.

$$y_1 = 8,7808 - 3,0247 \times 0,99 + 14,9021 \times 0,461 + 33,2538 \times 0,034 = 6,0131557,$$

$$y_2 = -25,7033 + 15,0461 \times 0,461 + 75,3570 \times 0,034 + 31,5051 \times 0,234 = -8,8327159,$$

$y_2 < 0$, поэтому прогнозируется высокий риск благоприятного исхода в течение 5 лет.

Таким образом, апробирован прогностический алгоритм, позволяющий на основании ИГХ параметров четырех МА (VEGF-A, CD105, Erk2, MMP-9) определить исход АТК у пациентов, которым планируется проведение химиотерапии [290-292].

Получен патент на изобретение «Способ прогнозирования выживаемости пациентов с послеоперационной химиотерапией колоректального рака» (№ а 21882 от 29 января 2018 года) [293].

Чувствительность дискриминантной модели для прогнозирования трехлетней СБВ (y_1) составляет 100%, специфичность – 88,9%. Прогностическая значимость положительного результата (неблагоприятный прогноз трехлетней выживаемости) – 100%. Прогностическая значимость отрицательного результата (благоприятный прогноз) – 90,9%. Общая прогностическая значимость 94,7%.

Чувствительность дискриминантной модели для прогнозирования пятилетней СБВ (y_2) составляет 83,3%, специфичность – 100%. Прогностическая значимость положительного результата (неблагоприятный прогноз пятилетней выживаемости) – 71,4%. Прогностическая значимость отрицательного результата (благоприятный прогноз) – 100,0%. Общая прогностическая значимость 88,2%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак толстой кишки в течение многих десятилетий остается актуальной проблемой медицины. Это связано увеличением частоты возникновения и смертности от него, сложным и дорогостоящим лечением, недостаточно удовлетворительными непосредственными и отделенными результатами. В то же время изучение опухолевого ангиогенеза, является одним из наиболее перспективных направлений онкоморфологии, открывающего возможности влияния на тактику ведения пациентов в послеоперационном периоде.

Выполненное нами исследование показывает, что

1. В аденокарциноме толстой кишки экспрессия CD105, VEGF-A, NRP1 и MMP-9 значимо выше, чем в ткани краев операционных разрезов ($p < 0,001$, $p = 0,004$, $p = 0,001$, $p = 0,013$, соответственно), в то время как экспрессия iNOS достоверно выше в краях резекции ($< 0,001$). При этом уровни VEGF-A, MMP-9, Erk2, TGF- β в опухолевой паренхиме выше, чем в строме ($p < 0,01$), а стромальная экспрессия NRP1 и MMP-2 достоверно выше, чем паренхиматозная ($p < 0,001$) [249, 254, 257, 259, 261, 269, 275, 278].

2. В высокогрейдной аденокарциноме уровни MMP-9 в строме ($p = 0,023$) и TGF- β в обоих ее компонентах ($p < 0,004$) выше, чем в низкогрейдной, а уровни VEGF-A, NRP1 и MMP-2 значимо выше в паренхиме и строме низкогрейдной аденокарциномы (во всех случаях сравнений $p < 0,025$). Установлены статистически значимые различия экспрессии изучаемых маркеров в зависимости от клинической стадии заболевания. Прямая корреляционная связь выявлена между стадией заболевания и уровнем CD105 в опухоли ($r = 0,826$, $p < 0,001$). Стромальная экспрессия MMP-2 максимально выражена у пациентов со II стадией заболевания ($p = 0,037$) при глубине инвазии, соответствующей категории pT2 ($p < 0,02$) [249, 255-257].

3. Иммуногистохимическими факторами риска неблагоприятного (в отношении пятилетней скорректированной безрецидивной выживаемости) исхода у пациентов с низкогрейдной аденокарциномой толстой кишки I-IIA стадий являются: уровень VEGF-A в строме выше 0,980 (ОР (95% ДИ) = 4,8 (1,31-17,66); $p = 0,036$),

уровень NRP1 в опухолевых клетках, равный или ниже 0,566 (ОР (95% ДИ)=4,8 (1,31-17,66); $p=0,036$), уровень TGF- β в паренхиматозном компоненте опухоли выше 0,830 (ОР (95% ДИ)=6,0 (1,01-39,75); $p=0,047$). У пациентов с низкогрейдной аденокарциномой толстой кишки IIIA-C стадии низкая скорректированная безрецидивная выживаемость наблюдается при уровне общей позитивности MMP-2 выше 0,034 (ОР (95% ДИ)=6,1 (1,02-40,68); $p=0,025$). Фактором риска неблагоприятного исхода в течение двух лет у пациентов с высокогрейдной опухолью является гиперэкспрессия TGF- β ($>0,940$) в паренхиматозном компоненте опухоли (ОР (95% ДИ)=3,7 (1,39-9,63); $p=0,045$) [260, 284, 287, 288].

4. Скорректированную безрецидивную выживаемость пациентов с аденокарциномой толстой кишки и послеоперационной химиотерапией с высокой степенью надежности можно прогнозировать по уровням VEGF-A, CD105, Erk2, MMP-9, согласно следующему алгоритму:

- Скорректированную безрецидивную выживаемость менее трех лет можно ожидать при уровнях VEGF-A $<0,95$ (чувствительность 80%, специфичность 78%) и CD105 $\geq 0,725$ (чувствительность 100%, специфичность 90%) в строме опухоли.
- Продолжительность жизни пациента от трех до пяти лет прогнозируется, если VEGF-A в строме опухоли будет $<0,965$, но $\geq 0,95$ (чувствительность 71%, специфичность 82%), а CD105 $\geq 0,725$ (чувствительность 85%, специфичность 86%).
- Скорректированную безрецидивную выживаемость более пяти лет можно прогнозировать при уровнях VEGF-A в опухолевой строме $\geq 0,965$ (чувствительность 71%, специфичность 82%), а CD105 $<0,725$ (чувствительность 85%, специфичность 86%).
- В случае, когда ни одно из указанных выше условий не выполняется, для прогнозирования эффективности послеоперационной терапии следует использовать дискриминантные уравнения:

$$y_1 = 8,7808 - 23,0247m_1 + 14,9021m_2 + 33,2538m_3,$$

$$y_2 = -25,7033 + 15,0461m_2 + 75,3570m_3 + 31,5051m_4,$$

где m_1 – уровень стромальной позитивности VEGF-A;
 m_2 – уровень стромальной позитивности CD105;
 m_3 – уровень паренхиматозной позитивности Erk2;
 m_4 – уровень стромальной позитивности MMP-9 в опухоли.

Если $y_1 > 0$ и $y_2 > 0$, прогнозируют высокий риск неблагоприятного исхода в течение трех лет: смерть от основного заболевания, выявление отдаленных метастазов или локорегионарного рецидива. Если $y_1 \leq 0$, а $y_2 > 0$, прогнозируют высокий риск неблагоприятного исхода в период от трех до пяти лет. Если $y_2 \leq 0$ (независимо от величины y_1), скорректированную безрецидивную выживаемость прогнозируют больше пяти лет. Чувствительность дискриминантной модели для прогнозирования трехлетней скорректированной безрецидивной выживаемости (y_1) составляет 100%, специфичность – 88,9%, для пятилетней (y_2) – 83,3% и 100%, соответственно [290-292].

Полученные в ходе выполненного исследования результаты имеют и определенное практическое применение:

1. Изменение экспрессии маркеров ангиогенеза в аденокарциноме толстой кишки необходимо учитывать при определении режима наблюдения за пациентом после удаления опухоли. Неблагоприятным прогностическим фактором у пациентов с верифицированной низкогредной аденокарциномой толстой кишки является увеличение экспрессии VEGF-A в строме опухоли, TGF- β в ее паренхиме, а также уменьшение показателя паренхиматозной экспрессии NRP1 на I-IIA стадиях заболевания и общая гиперэкспрессия MMP-2 в опухоли на IIIA-C стадии. Неблагоприятный прогностический фактор у пациентов с верифицированной высокогредной аденокарциномой толстой кишки – паренхиматозная гиперэкспрессия TGF- β .

2. Уровни VEGF-A, CD105, Erk2, MMP-9 в опухоли рекомендуется учитывать при определении химиотерапевтической тактики у пациентов с аденокарциномой толстой кишки. С помощью предложенного алгоритма можно прогнозировать эффективность послеоперационной химиотерапии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. GLOBOCAN 2012 v1.0, Estimated Cancer Incidence and Mortality Prevalence Worldwide : IARC Cancer Base No. 11 [Electronic resource] / WHO ; eds.: J. Ferlay [et al.]. – Mode of access: <http://globocan.iarc.fr>. – Date of access: 13.01.2017.
2. Базин, И. С. Рак толстой кишки – состояние проблемы / И. С. Базин // Рус. мед. журн. – 2003. – № 11. – С. 674-679.
3. Boyle, P. ABC of colorectal cancer: Epidemiology / P. Boyle, J. S. Langman // BMJ. – 2000. – № 321. – P. 805-808.
4. Boyle, P. Epidemiology of colorectal cancer / P. Boyle, M. E. Leon // Br. Med. Bull. – 2002. – № 64. – P. 1-25.
5. Boyle, P. Cancer incidence and mortality in Europe / P. Boyle, J. Ferlay // Ann. Oncol. – 2005. – Vol. 16. – P. 481-488.
6. Potter, J. D. Colon cancer: a review of the epidemiology / J. D. Potter, M. L. Slattery, R. M. Bostic // Epidemiol. Rev. – 1993. – № 15. – P. 499-545.
7. Zespoły polipowatości rodzinnych jelita grubego / M. Drews [i wsp.] // Współcz. Onkol. – 2006. – № 10. – S. 395-400.
8. Ignatowicz, A. Epidemiologia nowotworów złośliwych wczoraj i dziś / A. Ignatowicz, J. Kornafel // Fam. Med. Prim. Care Rev. – 2008. – № 10. – P. 848-852.
9. Брусина, Е. Б. Эпидемиология рака : учеб. пособие для последиплом. подгот. специалистов / Е. Б. Брусина, Ю. А. Магарилл, А. Г. Кутихин. – Кемерово : КемГМА, 2011. – С. 89-93.
10. Колоректальный рак. Выбор хирургического лечения при толсто-кишечной непроходимости / М. Д. Ханевич [и др.]. – СПб. : Аграф+, 2008. – 136 с.
11. Global cancer statistics 2002 / D. M. Parkin [et al.] // CA: Cancer J. Clin. – 2005. – № 55. – P. 74-108.
12. Global cancer statistics / A. Jemal [et al.] // CA: Cancer J. Clin. – 2011. – P. 61-69.
13. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. / под ред. М. И. Давыдова, Е. М. Аксель. –

М. : Издат. группа РОНЦ, 2014. – 226 с. – Режим доступа: <http://demoscope.ru/weekly/2014/0607/biblio04.php>. – Дата доступа: 17.02.2017.

14. Владимирская, Е. Б. Биологические основы противоопухолевой терапии / Е. Б. Владимирская. – М., 2001. – 110 с.

15. Bouck, N. How tumors become angiogenic / N. Bouck, V. Stellmach, S. C. Hsu // *Adv. Cancer Res.* – 1996. – Vol. 69. – P. 135-174.

16. Brem, S. S. Angiogenesis: a marker for neoplastic transformation of mammary papillary hyperplasia / S. S. Brem, P. M. Gullino, D. Medina // *Science.* – 1997. – Vol. 195. – P. 880-881.

17. Folkman, J. Angiogenesis in breast cancer / J. Folkman // *J. Clin. Oncol.* – 1994. – Vol. 12, № 1. – P. 441-443.

18. Chan, E. Angiogenesis in Colorectal cancer: Antibodies / E. Chan // *Cancer J.* – 2016. – Vol. 22, № 3. – P. 179-181.

19. Chistofalli, M. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches / M. Chistofalli, C. Charnsangavej, G. N. Hortobagyi // *Nat. Rev.* – 2002. – Vol. 1. – P. 415-426.

20. Foss, A. J. Microvessel count survival in uveal melanoma / A. J. Foss, R. A. Alexander, L. W. Jafferries // *Cancer Res.* – 1996. – Vol. 56, № 13. – P. 2900-2903.

21. Hanahan, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance D. Hanahan // *Science.* Washington DC. – 1997. – Vol. 277. – P. 48-50.

22. Степанова, Е. В. Молекулярно-биологические маркеры рака яичников / Е. В. Степанова, А. Ю. Барышников // *Европейская школа по онкологии : сб. тр.* – М., 2001. – С. 24.

23. Apte, R. S. Angiostatin produced by certain primary uveal melanoma cell lines impedes the development of liver metastases / R. S. Apte, J. Y. Niederkorn, E. Mayhew // *Arch. Ophthalmol.* – 2001. – Vol. 19, № 12. – P. 1805-1809.

24. Hanahan, D. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis / D. Hanahan, J. Folkman // *Cell.* – 1996. – Vol. 86. – P. 353-364.

25. Kerbel, R. Clinical translation of angiogenesis inhibitors / R. Kerbel, J. Folkman // *Nat. Rev.* – 2002. – Vol. 2. – P. 727-739.

26. Wang, W. Expression and clinical significance of kisspeptin-1, matrix metalloproteinase-2 and vascular endothelial growth factor in

tissue of colon cancer / W. Wang , Y. Qi , Q. Xu , H. Ren // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. – 2016. – Vol. 37, № 3. – P. 415-417.

27. Clinicopathological correlation and prognostic significance of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in colorectal cancer / S. F. Martins [et al.] // Cancer Genomics Proteomics. – 2013. – Vol. 10, № 2. – P. 55-67.

28. Graziano, F. Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? / F. Graziano, S. Cascinu // Ann. Oncol. – 2003. – Vol. 14. – P. 1026-1038.

29. Molecular prognostics in colorectal cancer / M. S. Kahlenberg [et al.] // Surg. Oncol. – 2003. – Vol. 12. – P. 173-186.

30. Кохнюк, В. Т. Рак ободочной кишки в Республике Беларусь: распространенность, диагностика и результаты лечения / В. Т. Кохнюк // Онкол. журн. – 2013. – № 3 (27). – С. 21-26.

31. Кохнюк, В. Т. Рак прямой кишки в Республике Беларусь: распространенность, диагностика и результаты лечения / В. Т. Кохнюк // Онкол. колопроктология. – 2013. – № 2. – С. 33-36.

32. American Cancer Society: Cancer facts and figures 2002. Special section: colorectal cancer and early detection. – Georgia : ACS, 2002. – 22 p.

33. Epidemiologia i prewencja raka jelita grubego / D. Bielecki [et al.] // Gastrol. Codzien. Prak. Lek. – 2003. – № 5. – S. 85-89.

34. Ma, D. Transforming growth factor- down-regulates major histocompatibility complex class I antigen expression and increases the susceptibility of uveal melanoma cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity / D. Ma, J. Y. Niederkorn // Immunology. – 1995. – № 86. – P. 263-269.

35. Papapolychroniadis, C. Environmental and other risk factors for colorectal carcinogenesis / C. Papapolychroniadis // Tech. Colo-proctol. – 2004. – № 8. – P. 7-9.

36. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013 [Electronic resource] / Natl. Cancer Inst. ; eds.: N. Howlader [et al.]. – Mode of access: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/. – Date of access: 13.01.2017.

37. Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults / J. B. O'Connell [et al.] // Am. Surg. – 2003. – Vol. 69. – P. 866-872.

38. Colorectal cancer in the young / J. B. O'Connell [et al.] // *Am. J. Surg.* – 2004. – Vol. 187, № 3. – P. 343-348.
39. Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001 / T. L. Fairley [et al.] // *Cancer.* – 2006. – Vol. 107, № 5. – P. 1153-1161.
40. Birt, D. F. Effects of the intake of selected vitamins and minerals on cancer prevention / D. F. Birt // *Magnesium.* – 1989. – № 8. – P. 17-30.
41. Dietary fibre and the risk of colorectal cancer / F. Levi [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 37, № 16. – P. 2091-2096.
42. Książczyńska, D. Czynniki środowiskowe a etiologia nowotworów jelit / D. Książczyńska, L. Paradowski // *Gastroenterol. Pol.* – 2004. – № 11. – S. 369-374.
43. Willett, W. C. Diet and cancer: an evolving picture / W. C. Willett // *JAMA.* – 2005. – Vol. 293. – P. 233-234.
44. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study / C. A. Doubeni [et al.] // *Cancer.* – 2012. – Vol. 118. – P. 3636-3644.
45. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence / C. A. Doubeni [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2012. – Vol. 104. – P. 1353-1362.
46. Janout, V. Epidemiology of colorectal cancer / V. Janout, H. Kollárová // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacku. (Olomouc, Czech Repub.).* – 2001. – Vol. 145. – P. 5-10.
47. Santarelli, R. L. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence / R. L. Santarelli, F. Pierre, D. E. Corpet // *Nutr. Cancer.* – 2008. – Vol. 60. – № 2. – P. 1311-44.
48. Larsson, S. C. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies / S. C. Larsson, A. Wolk // *Int. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 119, № 11. – P. 2657-2664.
49. Sinha, R. An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines / R. Sinha // *Mutat. Res.* – 2002. – Vol. 506. – P. 197-204.
50. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association / A. J. Cross [et al.] // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70, № 6. – P. 2406-2414.

51. Physical activity and risk of colorectal cancer in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based prospective study / K. J. Lee [et al.] // *Cancer Causes Control*. – 2007. – Vol. 18, № 2. – P. 199-209.

52. Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer / A. E. de Jong [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 100, № 1. – P. 139-143.

53. Bazensky, I. Colorectal cancer: an overview of the epidemiology, risk factors, symptoms, and screening guidelines / I. Bazensky, C. Shoobridge-Moran, L. H. Yoder // *Medsurg Nurs.* – 2007. – Vol. 16, № 1. – P. 46-51.

54. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis / K. Y. Wolin [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2009. – Vol. 100, № 4. – P. 611-616.

55. Wolin, K. Y. Physical activity and risk of colon adenoma: a meta-analysis / K. Y. Wolin, Y. Yan, G. A. Colditz // *Br. J. Cancer*. – 2011. – Vol. 104, № 5. – P. 882-887.

56. Excess body weight and colorectal cancer risk in Canada: associations in subgroups of clinically defined familial risk of cancer / P. T. Campbell [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2007. – Vol. 16, № 9. – P. 1735-1744.

57. Lifestyle factors and colorectal cancer risk (1): systematic review and meta-analysis of associations with body mass index / D. J. Harriss [et al.] // *Colorectal Dis.* – 2009. – Vol. 11, № 6. – P. 547-563.

58. Moghaddam, A. A. Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events / A. A. Moghaddam, M. Woodward, R. Huxley // *Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2007. – Vol. 16, № 12. – P. 2533-2547.

59. Liang, P. S. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis / P. S. Liang, T. Y. Chen, E. Giovannucci // *Int. J. Cancer*. – 2009. – Vol. 124, № 10. – P. 2406-2415.

60. Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening / A. L. Zisman [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 2006. – Vol. 166, № 6. – P. 629-634.

61. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis / E. Botteri [et al.] // *Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 134, № 2. – P. 388-395.

62. Cigarettes and alcohol in relation to colorectal cancer: the Singapore Chinese Health Study / W. H. Tsong [et al.] // Br. J. Cancer. – 2007. – Vol. 96, № 5. – P. 821-827.

63. Parkin, D. M. Cancers attributable to consumption of alcohol in the UK in 2010 / D. M. Parkin // Br. J. Cancer. – 2011. – Vol. 105, № 2. – P. 14-18.

64. Pöschl, G. Alcohol and cancer / G. Pöschl, H. K. Seitz // Alcohol Alcohol. – 2004. – Vol. 39, № 3. – P. 155-165.

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. – № 64. – P. 27-43.

66. Портянко, А. С. Скрининг колоректального рака / А. С. Портянко, Ю. В. Горун // Медицина. – 2009. – № 4. – С. 35-39.

67. Портянко, А. С. Колоректальный рак: факторы риска и скрининг / А. С. Портянко, Ю. В. Горун // ARS Medica. – 2009. – № 6. – С. 114-125.

68. A comparison of cancer risk in Crohn's disease and ulcerative colitis / A. J. Greenstein [et al.] // Cancer. – 1981. – Vol. 48. – P. 2742-2745.

69. Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years / J. E. Lennard-Jones [et al.] // Gut. – 1990. – Vol. 31. – P. 800-806.

70. Suchy, J. Zespół MSH6 / J. Suchy, J. Lubiński // Postępy Nauk. Med. – 2008. – № 21. – P. 460-462.

71. Choroby jelita grubego // Choroby wewnętrzne / pod red.: A. Szczeklika [i wsp.]. – Kraków : Med. Prakt., 2005. – T. 1, rozdz. 3 : Choroby układu pokarmowego. – S. 829-833.

72. Zespoły polipowatości rodzinnych jelita grubego / M. Drews [i wsp.] // Współcz. Onkol. – 2006. – № 10. – P. 395-400.

73. Davies, R. J. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis / R. J. Davies, R. Miller, N. Coleman // Nat. Rev. Cancer. – 2005. – № 5. – P. 199-209.

74. Low penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility / M. M. de Jong [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2002. – Vol. 11. – P. 1332-1352.

75. Harłodzińska-Szmyrka, A. Nowotwory jako grupa genów / A. Harłodzińska-Szmyrka // Postępy Biochem. – 1995. – № 41. – S. 7-14.

76. Имянитов, Е. М. Клинико-молекулярные аспекты колоректального рака: этиопатогенез, профилактика, индивидуализация лечения / Е. М. Имянитов // *Практ. онкология*. – 2005. – Т. 6, № 2. – С. 65-70.

77. Davies, R. J. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis / R. J. Davies, R. Miller, N. Coleman // *Nat. Rev. Cancer*. – 2005. – Vol. 5. – P. 199-209.

78. Новые мутации в гене APC при семейном аденоматозном полипозе: обнаружение, характеристика и анализ / Т. Музафарова [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и медицины*. – 2005. – Т. 139. – С. 334-336.

79. Hereditary and familial colon cancer / K. W. Jasperson [et al.] // *Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 138, № 6. – P. 2044-2058.

80. Jeter, J. M. Genetics of colorectal cancer / J. M. Jeter, W. Kohlmann, S. B. Gruber // *Oncology*. – 2006. – Vol. 20, № 3. – P. 269-276.

81. Al-Sukhni, W. Hereditary colorectal cancer syndromes: familial adenomatous polyposis and lynch syndrome / W. Al-Sukhni, M. Aronson, S. Gallinger // *Surg. Clin. North. Am.* – 2008. – Vol. 88, № 4. – P. 819-844.

82. Baglioni, S. Simple and complex genetics of colorectal cancer susceptibility / S. Baglioni, M. Genuardi // *Am. J. Med. Genet.* – 2004. – Vol. 129. – P. 35-43.

83. WHO classification of tumors of the digestive system / eds.: F. T. Bosman [et al.]. – Lyon : IARC, 2010. – 417 p.

84. AJCC Cancer Staging Manual / eds.: S. B. Edge [et al.]. – 7thed. – New York : Springer, 2009. – 643 p.

85. Wojciechowska, U. Pięcioletnie przeżycia u chorych na nowotwory złośliwe w Polsce / U. Wojciechowska, J. Didkowska, W. Zatoński // *Nowotwory*. – 2010. – № 60. – S. 122-128.

86. Zatoński, W. Epidemiologia chorób nowotworowych w Europie Środkowej i Wschodniej w porównaniu z Europą Zachodnią i Polską / W. Zatoński, J. Didkowska, U. Wojciechowska // *Pol. Prz. Chirgicz.* – 2009. – № 8110. – S. 808-837.

87. Фридман, М. В. Ангиогенез и рак – медико-биологическое значение, методы оценки, перспективы дальнейшего изучения / М. В. Фридман, Ю. Е. Демидчик // *Онкол. журн.* – 2009. – Т. 3, № 2. – С. 82-90.

88. Sprenger, C. C. Extracellular influences on tumor angiogenesis in the aged host / C. C. Sprenger, S. R. Plymate, M. J. Reed // Br. J. Cancer. – 2008. – Vol. 98. – P. 250-255.

89. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival / A. Jemal [et al.] // Cancer. – 2004. – Vol. 101, № 1. – P. 3-27.

90. Костюк, И. П. Факторы прогноза при раке толстой кишки [Electronic resource] / И. П. Костюк. – Mode of access: <http://colorectalcaner.ru/coloreccancer/prognosis.html>. – Date of acces: 13.01.2017.

91. Аксель, Е. М. Злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта: основные статистические показатели и тенденции / Е. М. Аксель, М. И. Давыдов, Т. И. Ушакова // Соврем. онкология. – 2001. – № 4. – С. 141-145.

92. Беляев, А. М. Возможности нестандартных подходов к лечению острой толстокишечной непроходимости / А. М. Беляев, С. Ю. Дворецкий // Достижения и перспективы лечения и реабилитации в колопроктологии : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием. – СПб., 2007. – С. 63-64.

93. Брюсов, П. Г. Проблемы лечения рака ободочной кишки, осложненного острой кишечной непроходимостью / П. Г. Брюсов, Ю. П. Малахов // Совершенствование специализированной медицинской помощи в многопрофильном стационаре : Всерос. конф. хирургов, посвящ. 80-летнему юбилею проф. В. П. Петрова. – Красногорск, 2004. – С. 65-67.

94. Гринев, М. В. Выбор адекватной хирургической тактики при острой кишечной непроходимости / М. В. Гринев, М. Д. Ханевич // Итоги и перспективы скорой медицинской помощи при неотложных состояниях и травмах : сб. науч. трудов НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе. – СПб., 1992. – С. 69-70.

95. Nuclear thymidylate synthase expression in sporadic colorectal cancer depends on the site of the tumor / V. Sulzyc-Bielicka [et al.] // Virchows Arch. – 2009. – Vol. 454, № 6. – P. 695-702.

96. Rectal and pouch recurrences after surgical treatment for familial adenomatous polyposis / F. G. Campos [et al.] // J. Gastrointest. Surg. – 2009. – Vol. 13, № 1. – P. 129-136.

97. McGuire, M. K. Prognosis versus outcome: a long-term survey of 100 treated periodontal patients under maintenance care / M. K. McGuire // J. Periodontal. – 1991. – Vol. 62. – P. 51-58.

98. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia / J. Folkman [et al.] // *Nature*. – 1989. – Vol. 339. – P. 58-61.
99. Guidi, A. J. Angiogenesis in preinvasive lesions of the breast / A. J. Guidi, S. J. Schmitt // *Breast J.* – 1996. – № 2. – P. 364-369.
100. A multiparametric study on the prognostic value of epidermal growth factor receptor in operable breast carcinoma / G. Gasparini [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 1994. – Vol. 29. – P. 59-71.
101. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as a indicator of node metastasis and survival in breast cancer / E. Horak [et al.] // *Lancet*. – 1992. – Vol. 340. – P. 1120-1124.
102. Tumor angiogenesis: a new, significant, and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma / N. Weidner [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1992. – Vol. 84. – P. 1875-1887.
103. Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma / F. T. Hall [et al.] // *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2003. – Vol. 129, № 7. – P. 716-719.
104. Lymphatic and blood vessel density in the follicular patterned lesion of thyroid / T. A. Giorgadze [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2005. – Vol. 18, № 11. – P. 1424-1431.
105. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis / B. Uzzan [et al.] // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, № 9. – P. 2941-2955.
106. Smith-McCune, K. K. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia / K. K. Smith-McCune, N. Weidner // *Cancer res.* – 1994. – Vol. 54, № 3. – P. 800-804.
107. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small lung cancer / P. Macchiarini [et al.] // *Lancet*. – 1992. – Vol. 340. – P. 145-146.
108. Weidner, N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication / N. Weidner // *Semin. Diagn. Pathol.* – 1993. – Vol. 10, № 4. – P. 302-313.
109. Vascularization of carcinomas of the oesophagus and its correlation with tumour proliferation / R. Porschen [et al.] // *Cancer Res.* – 1994. – Vol. 54, № 2. – P. 587-591.
110. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumour / V. Li [et al.] // *Lancet*. – 1994. – Vol. 344. – P. 82-86.

111. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas / A. J. Dickinson [et al.] // Br. J. Urol. – 1994. – Vol. 74. – P. 762-766.

112. A testicular germ cell tumor: prediction of metastasis disease / D. Olivarez [et al.] // Cancer res. – 1994. – Vol. 54. – P. 2800-2802.

113. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma / T. G. Saclarides [et al.] // Dis. Colon Rectum. – 1994. – Vol. 37, № 9. – P. 921-926.

114. Angiogenesis in malignant fibrous histiocytoma / M. Ohsawa [et al.] // Oncology. – 1995. – Vol. 52, № 1. – P. 51-54.

115. Tumor vascularization, mitotic index, histopathologic grade, and DNA ploidy in the assessment of 114 head and neck squamous cell carcinomas / J. Klijanienko [et al.] // Cancer. – 1995. – Vol. 75, № 7. – P. 1649-1656.

116. Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous carcinoma of the tongue / D. A. Leedy [et al.] // Otolaryngol. Head Neck Surg. – 1994. – Vol. 111, № 4. – P. 417-422.

117. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors / J. K. Williams [et al.] // Am. J. Surg. – 1994. – Vol. 168, № 5. – P. 373-380.

118. Intratumoral α -SMA enhances the prognostic potency of CD34 associated with maintenance of microvessel integrity in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancer / W. Q. Wang [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. e71189. – doi: 10.1371/journal.pone.0071189.

119. Целесообразность изучения опухолевого ангиогенеза, как прогностического фактора развития рака / И. В. Майбородин [и др.] // Новости хирургии. – 2015. – Т. 23, № 3. – С. 339-347.

120. Способы прогнозирования и предсказания рака и мониторинг терапии раковых заболеваний: пат. 2395090 РФ : МПК G 01N 33/50 (2006.01), G 01N 33/577 (2006.01), A 61K 49/16 (2006.01) / Д. Дж. Элтинг, У. П. Карни, П. Дж. Хеймер, Х. Л. Байер; дата публ. : 27.11.2010. – Mode of access: <http://bd.patent.su/2395000-2395999/pat/servlet/servlet65be.htm>. – Date of access: 07.02.2017.

121. Глыбочко, П. В. Значение маркеров опухолевого роста и ангиогенеза в диагностике рака мочевого пузыря / П. В. Глыбочко, А. Н. Понукалин, Н. К. Шахпазян // Онкоурология. – 2009. – Т. 5, № 2. – С. 56-60.

122. The potential clinical relevance of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in recurrent papillary thyroid carcinoma / X. M. Yu [et al.] // *Surgery*. – 2008. – Vol. 144, № 6. – P. 934-940.

123. Bernabeu, C. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer / C. Bernabeu, J. M. Lopez-Novoa, M. Quintanilla // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – № 1792. – P. 954-973.

124. Экспрессия молекулярно-биологических маркеров в высокодифференцированной хондросаркоме и пограничных хрящевых опухолях / И. В. Булычева [и др.] // *Клин. лаб. диагностика*. – 2013. – № 10. – С. 25-30.

125. Нефедова, Н. А. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и гипоксия-индуцибельного фактора (HIF) в опухолевом ангиогенезе / Н. А. Нефедова, С. Ю. Давыдова // *Соврем. проблемы науки и здравоохранения*. – 2015. – № 3. – С. 2-16.

126. Vogl, G. Angiogenic potencial of ductal carcinoma in situ (DCIS) of human breast / G. Vogl, O. Dietze, C. Hauser-Kronberger // *Histopathology*. – 2005. – Vol. 47, № 6. – P. 617-624.

127. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature / G. des Guetz [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2006. – Vol. 94. – P. 1823-1832.

128. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer / S. Cascinu [et al.] // *Clin. Cancer Res*. – 2000. – Vol. 6, № 7. – P. 2803-2807.

129. Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor, and proliferation markers in colorectal cancer / B. van Triest [et al.] // *Clin. Cancer Res*. – 2000. – Vol. 6, № 3. – P. 1063-1072.

130. Poon, R. T. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients / R. T. Poon, S. T. Fan, J. Wong // *J. Clin. Oncol*. – 2001. – Vol. 19, № 4. – P. 1207-1225.

131. Toi, M. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications / M. Toi, T. Matsumoto, H. Bando // *Lancet Oncol*. – 2001. – Vol. 2, № 11. – P. 667-673.

132. Иммуногистохимическая характеристика опухоли толстой кишки на фоне экспериментального иммунодефицита / Г. Ю. Стручко [и др.] // *Мед. науки*. – 2013. – № 4. – С. 75-77.

133. Feng, W. iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells / W. Feng, T. Karel, J. X. Wilson // J. Cell Physiol. – 2008. – Vol. 217, № 1. – P. 207-214.

134. Bing, R. J. Nitric oxide, prostanoids, cyclooxygenase, and angiogenesis in colon and breast cancer / R. J. Bing, M. Miyataka, K. A. Rich // Clin. Cancer Res. – 2001. – № 7. – P. 3385-3392.

135. Jaiswal, M. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis / M. Jaiswal, N. F. LaRusso, G. J. Gores // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2001. – Vol. 281. – P. 626-634.

136. Immunohistochemical expression of cytokine induced nitric oxide synthase in colorectal carcinoma / T. Nozoe [et al.] // Oncol. Rep. – 2002. – № 9. – P. 521-524.

137. Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor / C. V. Rao [et al.] // Cancer Res. – 2002. – Vol. 62. – P. 165-170.

138. Tumor angiogenesis in lymph node-negative rectal cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis / F. Cianchi [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2002. – Vol. 9, № 1. – P. 20-26.

139. Role of inducible nitric oxide synthase expression in aberrant crypt foci-adenoma-carcinoma sequence / M. H. Xu [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2003. – № 6. – P. 1246-1250.

140. Nitric oxide synthase as a marker in colorectal carcinoma / J. A. Lagares-Garcia [et al.] // Am. Surg. – 2001. – № 7. – P. 709-713.

141. Expression of inducible nitric oxide synthase in colorectal cancer and its association with prognosis / K. M. Ropponen [et al.] // Scand. J. Gastroenterol. – 2000. – Vol. 35. – P. 1204-1211.

142. Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype / D. Oxmann [et al.] // Oncogene. – 2008. – Vol. 27, № 25. – P. 3567-3575.

143. Royston, D. Mechanisms of lymphatic metastasis in human colorectal adenocarcinoma / D. Royston, D. G. Jackson // J. Pathol. – 2009. – Vol. 217, № 5. – P. 608-619.

144. Expression of endoglin (CD105) in cervical cancer / H. J. Zijlmans [et al.] // Br. J. Cancer. – 2009. – Vol. 100, № 10. – P. 1617-1626.

145. Карамышева, А. Анти-ангиогенная терапия: надежды и разочарования. Сигнальные системы, регулирующие ангиогенез опухоли, и их изменение при опухолевой прогрессии / А. Карамышева. – GmbHKG : LAP, 2013. – 72 с.

146. Экспрессия белка сосудистого эндотелиального фактора роста в ткани опухолей у больных раком яичника I-II стадий / В. Л. Карапетян [и др.] // Опухоли жен. репродукт. системы. – 2010. – № 3. – С. 73-76.

147. Семейство факторов роста VEGF в ткани рака яичников на разных стадиях заболевания / О. И. Кит [и др.] // Междунар. журн. эксперим. образования. – 2016. – № 8. – С. 115.

148. Полушкина, И. Л. Молекулярно-биологические маркеры, характеризующие апоптоз, пролиферацию и ангиогенез при раке яичников / И. Л. Полушкина, Е. В. Степанова, Ж. Н. Дбар // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2003. – Т. 14, № 4. – С. 60-64.

149. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour / N. G. de la Torre [et al.] // Endocr.-Relat. Cancer. – 2006. – Vol. 13, № 3. – P. 931-944.

150. Моноклональные антитела в терапии низкодифференцированных глиом / И. В. Чехонин [и др.] // Вестн. РАМН. – 2014. – Т. 69, № 9. – С. 131-139.

151. Assessment of CD105, α -SMA and VEGF expression in gastric carcinomas / D. Grigore [et al.] // Rom. J. Morphol. Embryol. – 2013. – Vol. 54. – P. 701-707.

152. Association of angiogenesis markers with lymph node metastasis in early colorectal cancer / D. M. Iddings [et al.] // Arch. Surg. – 2007. – Vol. 142, № 8. – P. 738-744.

153. Vascularization in primary breast carcinomas: its prognostic significance and relationship with tumor cell dissemination / H. P. Dhakal [et al.] // Clin. Cancer. Res. – 2008. – Vol. 14, № 8. – P. 2341-2350.

154. Szala, S. Naczynia okołonowotworowe jako cele terapii przeciwnowotworowej / S. Szala, J. Markowska // Ginekologia onkologiczna / pod red. J. Markowskiej. – Wyd. 2. – Wrocław : Wydaw. Med. Urban & Partner, 2006. – Т. 1. – S. 44-57.

155. Kwidzińska, E. Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach / E. Kwidzińska, W. Naumnik, E. Chyczewska // *Pneumonol. Alergol. Pol.* – 2006. – № 74. – S. 414-420.

156. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy / N. Ferrara // *Oncologist.* – 2004. – Vol. 9, № 1. – P. 2-10.

157. Jurczyszyn, A. Szpiczak mnogirola angiogenezy i zastosowanie talidomidu / A. Jurczyszyn, T. Wolska-Smołeń, B. A. Skotnicki // *Prz. lek.* – 2003. – № 60. – S. 542-547.

158. Najda, J. Mechanizmy kontroli angiogenezy oraz ich wykorzystanie kliniczne w zaawansowanych przypadkach raka jelita grubego / J. Najda, A. Kozaczka, D. Woszczyk // *Współcz. Onkol.* – 2004. – № 8. – S. 373-378.

159. Folkman, J. Angiogenesis / J. Folkman // *Annu. Rev. Med.* – 2006. – Vol. 57. – P. 1-18.

160. Badania nad angiogenezą w raku czaszki twarzowej / J. Jeleń-Krzeszewska [i wsp.] // *Dent. Med. Probl.* – 2004. – № 4. – S. 625-630.

161. Blumenson, L. E. A possible mechanism for enhancement of increased production of tumor angiogenic factor / L. E. Blumenson, I. D. Bross // *Growth.* – 1976. – № 3. – P. 205-209.

162. Angiogenesis inhibition with bevacizumab and the surgical management of colorectal cancer / A. D. Thornton [et al.] // *Br. J. Surg. Soc. Ltd.* – 2006. – № 12. – P. 1456-1463.

163. Users, user interfaces, and objects: Envision, a digital library / E. A. Fox [et al.] // *J. Am. Soc. Inf. Sci.* – 1993. – Vol. 44, № 8. – P. 480-491.

164. Thompson, A. C. Indolealkylamines of *Desmanthus illinoensis* and their growth inhibition activity / A. C. Thompson, G. F. Nicollier, D. F. Pope // *J. Agric. Food Chem.* – 1987. – № 3. – P. 361-365.

165. Ribatti, D. «Sprouting angiogenesis», a reappraisal / D. Ribatti, E. Crivellato // *Dev. Biol.* – 2012. – № 2. – P. 157-165.

166. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia / H. Gerhardt [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 161, № 6. – P. 1163-1177.

167. Ausprunk, D. H. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis / D. H. Ausprunk, J. Folkman // *Microvasc. Res.* – 1977. – Vol. 14. – P. 53–65.

168. Mechanizmy angiogenezy nowotworowej / I. Sacewicz [i wsp.] // *Postępy Hig. Med. Dosw.* – 2009. – T. 63. – S. 159-168.

169. Paku, S. First steps of tumor-related angiogenesis / S. Paku, N. Paweletz // *Lab. Invest.* – 1991. – Vol. 65. – P. 334-346.

170. Swidzińska, E. Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach / E. Swidzińska, W. Naumnik, E. Chyczewska // *Pneumonol. Alergol. Pol.* – 2006. – T. 74. – S. 414-420.

171. Коган, Е. А. Автономный рост и прогрессия опухолей / Е. А. Коган // *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* – 2002. – № 4. – С. 45-49.

172. Роль ангиогенеза в развитии наружного генитального эндометриоза / Д. И. Соколов [и др.] // *Цитокины и воспаление.* – 2007. – № 2. – С. 10-17.

173. Tumor thickness is a histopathologic predictive parameter of tumor metastasis and prognosis in patients with Dukes stage C ulcerative-type colorectal carcinoma. A two-hospital-based study / T. Hasebe [et al.] // *Cancer.* – 2000. – № 1. – P. 35-45.

174. Ghajar, C. M. Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis / C. M. Ghajar, S. C. George, A. J. Putnam // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 2008. – Vol. 18. – P. 251-278.

175. Петрова, Л. В. Фактор роста эндотелия сосудов как показатель гипоксии тканей, его возможная роль в патогенезе плоского лишая слизистой оболочки рта / Л. В. Петрова, Н. Е. Кушлинский, Л. В. Ильина // *Вестн. дерматологии и венерологии.* – 2004. – № 5. – С. 4-5.

176. Bamberger, E. S. Angiogenesis in epithelial ovarian cancer / E. S. Bamberger, C. W. Perrett // *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* – 2002. – Vol. 55 – P. 348-359.

177. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression / V. Hanrahan [et al.] // *J. Pathol.* – 2003. – Vol. 200, № 2. – P. 183-194.

178. Neufeld, G. The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF / G. Neufeld, O. Kessler, Y. Herzog // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2002. – № 515. – P. 81-90.

179. Klagsbrun, M. The role of neuropilin in vascular and tumor biology / M. Klagsbrun, S. Takashima, R. Mamluk // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2002. – № 515. – P. 33-48.

180. Pettersson, A. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor / A. Pettersson, J. A. Nagy, L. F. Brown // *Lab. Invest.* – 2000. – № 80. – P. 99-115.

181. Increased in situ expression of nitric oxide synthase in human colorectal cancer / N. Yagihashi [et al.] // *Virchows Arch.* – 2000. – № 2. – P. 109-114.

182. Leeman, M. F. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression / M. F. Leeman, S. Curran, G. I. Murray // *J. Pathol.* – 2003. – № 4. – P. 528-534.

183. Faraci, F. M. Nitric oxide synthase: from molecular biology to cerebrovascular biology / F. M. Faraci, J. E. Brian // *News Physiol. Sci.* – 1994. – № 9. – P. 64-67.

184. Hillen, F. Tumor vascularization: sprouting angiogenesis and beyond / F. Hillen, A. W. Griffioen // *Cancer Metastasis Rev.* – 2007. – № 26. – P. 489-502.

185. Conway, E. M. Molecular mechanisms of blood vessel growth / E. M. Conway, D. Collen, P. Carmeliet // *Cardiovasc. Res.* – 2001. – № 49. – P. 507-521.

186. Christofor, G. New signals from the invasive front / G. Christofor // *Nature.* – 2006. – № 441. – P. 444-450.

187. Lynch, C. C. Matrix metalloproteinases in tumor–host cell communication / C. C. Lynch, L. M. Matrisian // *Differentiation.* – 2002. – № 70. – P. 561-573.

188. Werner, J. A. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck / J. A. Werner, I. O. Rathcke, R. Mandic // *Clin. Exp. Metastasis.* – 2002. – № 4. – P. 275-282.

189. Vasculogenic mimicry and tumor-cell plasticity / M. J. C. Hendrix [et al.] // *Rev. Nat. Cancer.* – 2003. – № 3. – P. 411-422.

190. Letterio, J. J. Regulation of immune responses by TGF-beta / J. J. Letterio, A. B. Roberts // *Annu. Rev. Immunol.* – 1998. – № 16. – P. 137-161.

191. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients / M. G. Tutton [et al.] // *Cancer.* – 2003. – № 4. – P. 541-550.

192. Edlund, S. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3 / S. Edlund, S. Bu, N. Schuster // *Mol. Biol. Cell.* – 2003. – № 14. – P. 529-544.

193. Pathophysiology of tumor neovascularization / M. Furuya [et al.] // *Vasc. Health Risk Manag.* – 2005. – Vol. 1. – P. 277-290.

194. Zielonka, T. M. Angiogeneza. Część II. Czynniki modulujące proces powstawania nowych naczyń krwionośnych / T. M. Zielonka // *Alergia Astma Immunol.* – 2004. – T. 9 (1). – S. 25-31.

195. Gajdusek, C. M. Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1: synergistic mediators of angiogenesis in vitro / C. M. Gajdusek, Z. Luo, M. R. Mayberg // *J. Cell Physiol.* – 1993. – № 157. – P. 133-144.

196. Ueki, N. Excessive production of transforming growth-factor beta 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth / N. Ueki, M. Nakazato, T. Ohkawa // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – № 2. – P. 189-196.

197. Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis / I. Schwarte-Waldhoff [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – № 97. – P. 9624-9629.

198. Pertovaara, L. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells / L. Pertovaara, A. Kaipainen, T. Mustonen // *J. Biol. Chem.* – 1994. – № 269. – P. 6271-6274.

199. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction / V. Kaartinen [et al.] // *Nat. Genet.* – 1995. – № 11. – P. 415-421.

200. Potts, J. D. Epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart can be mediated, in part, by transforming growth

factor beta / J. D. Potts, R. B. Runyan // *Dev. Biol.* – 1989. – № 134. – P. 392-401.

201. Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies / J. P. Thiery // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2003 – № 6. – P. 740-746.

202. Moustakas, A. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression / A. Moustakas, C. H. Heldin // *Cancer Sci.* – 2007. – № 98. – P. 1512-1520.

203. Epithelial-mesenchymal transformation of a newly established cell line from ovarian adenocarcinoma by transforming growth factor-1 / K. Kitagawa [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 1996. – № 66. – P. 91-97.

204. Miettinen, P. J. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors / P. J. Miettinen, R. Ebner, A. R. Lopez // *J. Cell Biol.* – 1994. – № 127. – P. 2021-2036.

205. Oft, M. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis / M. Oft, K. H. Heider, H. Beug // *Curr. Biol.* – 1998. – № 8. – P. 1243-1252.

206. Downregulation of urokinase plasminogen activator receptor expression inhibits Erk signalling with concomitant suppression of invasiveness due to loss of uPAR-beta1 integrin complex in colon cancer cells / N. Ahmed [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2003. – № 89. – P. 374-384.

207. Fang, J. Y. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer / J. Y. Fang, B. C. Richardson // *Lancet Oncol.* – 2005. – № 6. – P. 322-327.

208. Kolch, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors / W. Kolch // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – № 6. – P. 827-837.

209. The roles of MAPKs in disease / M. C. Lawrence [et al.] // *Cell Res.* – 2008. – № 18. – P. 436-442.

210. Raman, M. Differential regulation and properties of MAPKs / M. Raman, W. Chen, M. H. Cobb // *Oncogene.* – 2007. – № 26. – P. 3100-3112.

211. Tremblay, P. L. Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases / P. L. Tremblay, F. A. Auger, J. Huot // *Oncogene.* – 2006. – № 25. – P. 6563-6573.

212. TGF- β and the Smad signaling pathway support transcriptional reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition / U. Valcourt [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2005. – № 16. – P. 1987-2002.
213. Chen, J. J. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L) / J. J. Chen, Y. Sun, G. J. Nabel // *Science.* – 1998. – № 282. – P. 1714-1717.
214. Feng, X. H. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF- β / X. H. Feng, X. Lin, R. Derynck // *EMBO J.* – 2000. – № 19. – P. 5178-5193.
215. Reynisdottir, I. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β / I. Reynisdottir, K. Polyak, A. Iavarone // *Genes Dev.* – 1995. – № 9. – P. 1831-1845.
216. Seoane, J. TGF β influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b / J. Seoane, C. Poupponnot, P. Staller // *Nat. Cell Biol.* – 2001. – № 3. – P. 400-408.
217. Warner, B. J. Myc downregulation by transforming growth factor β required for activation of the p15Ink4b G1 arrest pathway / B. J. Warner, S. W. Blain, J. Seoane // *Mol. Cell Biol.* – 1999. – № 19. – P. 5913-5922.
218. Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor- β type I receptor-induced responses / S. Itoh [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – № 6. – P. 3751-3761.
219. Landstrom, M. Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor β in prostatic carcinoma cells / M. Landstrom, N. E. Heldin, S. Bu // *Curr. Biol.* – 2000. – № 10. – P. 535-538.
220. Perlman, R. TGF- β -induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation / R. Perlman, W. P. Schiemann, M. W. Brooks // *Nat. Cell Biol.* – 2001. – № 3. – P. 708-714.
221. Lin, S. Y. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase / S. Y. Lin, S. J. Elledge // *Cell.* – 2003. – № 113. – P. 881-889.
222. Adams, R. H. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis / R. H. Adams, K. Alitalo // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – № 8. – P. 464-478.
223. Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis / J. E. Rundhaug // *J. Cell Mol. Med.* – 2005. – № 9. – P. 267-285.

224. Integrins: A flexible platform for endothelial vascular tyrosine kinase receptors / L. Napione [et al.] // *Autoimmun. Rev.* – 2007. – № 7. – P. 18-22.

225. Davis, G. E. An $\alpha 2\beta 1$ integrin-dependent pinocytotic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix / G. E. Davis, C. W. Camarillo // *Exp. Cell Res.* – 1996. – Vol. 224. – P. 39-51.

226. Alternative vascularization mechanisms in cancer. Pathology and therapeutic implications / B. Döme [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 170. – P. 1-15.

227. Split for the cure: VEGF, PDGF-BB and intussusception in therapeutic angiogenesis / R. Gianni-Barrera [et al.] // *Biochem. Soc. Trans.* – 2014. – Vol. 42, № 6. – P. 1637-1642.

228. Brat, D. J. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF / D. J. Brat, E. G. Van Meir // *Am. J. Pathol.* – 2001. – Vol. 158. – P. 789-796.

229. Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery / C. Sundberg [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2001. – Vol. 158. – P. 1145-1160.

230. Dvorac, H. F. How tumors make bad blood vessels and stroma / H. F. Dvorac // *Am. J. Pathol.* – 2003. – Vol. 162. – P. 1747-1757.

231. Ribatti, D. New non-angiogenesis dependent pathways for tumour growth / D. Ribatti, A. Vacca, F. Dammacco // *Eur. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 39. – P. 1835-1841.

232. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation / G. D. Yancopoulos [et al.] // *Nature.* – 2000. – Vol. 407. – P. 242-248.

233. Maniotis, A. J. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry / A. J. Maniotis [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1999. – Vol. 155. – P. 739-752.

234. Zetter, B. R. Angiogenesis and tumor metastasis / B. R. Zetter // *Annu. Rev. Med.* – 1998. – Vol. 49. – P. 407-424.

235. Weidner, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer / N. Weidner // *Am. J. Pathol.* – 1995. – № 147, № 1. – P. 9-19.

236. O'Reilly, M. S. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma / M. S. O'Reilly, L. Holmgren, . Shing // Cell. – 1994. – № 2. – P. 315-328.

237. Holmgren, L. Dormancy of micrometastases: balance proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression / L. Holmgren, M. S. O'Reilly, J. Folkman // Nat. Med. – 1995. – № 1. – P. 149-153.

238. Royston, D. Mechanism of lymphatic metastasis in human colorectal adenocarcinoma / D. Royston, D. G. Jackson // J. Pathol. – 2009. – № 217. – P. 608-619.

239. Adenoviral expression of vascular endothelial growth factor-C induces lymphangiogenesis in the skin / B. Enholm [et al.] // Circ. Res. – 2001. – № 88. – P. 623-629.

240. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses / T. T. Rissanen [et al.] // Circ. Res. – 2003. – № 92. – P. 1098-106.

241. Gasparini, G. Biological and clinical role of angiogenesis in breast cancer / G. Gasparini // Breast Cancer Res. Treat. – 1995. – № 36. – P. 103.

242. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously / W. H. Wan [et al.] // J. Immunol. Methods. – 1987. – Vol. 103. – P. 121-129.

243. Удостоверение № 1689 на рационализаторское предложение. Способ изготовления парафиновых блоков для иммуногистохимических исследований / Т. Т. Штабинская ; ГрГМУ. – 17.11.2014.

244. Иммуногистохимические методы : руководство / eds.: G. L. Kumar, L. Rudbeck ; пер. с англ., под ред. Г. А. Франка, П. Г. Малькова. – Москва, 2011. – 223 с.

245. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – Спб. : СпецЛит, 2010. – 95 с.

246. Recombinant single-chain variable fragment antibodies against extracellular epitopes of human multidrug resistance protein MRP3 for targeting malignant gliomas / C. T. Kuan [et al.] // Int. J. Cancer. – 2010. – Vol. 127, № 3. – P. 598-611.

247. Холанский, А. С. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. II. Использование в качестве модели для экспериментальной

терапии опухолей мозга / А. С. Халанский, Л. И. Кондакова, С. Э. Гельперина // Клини. и эксперим. морфология. – 2014. – № 1. – С. 50-59.

248. Мнихович, М. В. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в карциномах молочной железы: современное состояние проблемы / М. В. Мнихович // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И. П. Павлова. – 2014. – № 2. – С. 153-162.

249. Прогностическое значение уровня экспрессии фактора роста эндотелия сосудов в колоректальном раке / Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Журн. ГрГМУ. – 2015. – № 3 (51). – С. 64-69.

250. Оценка прогностической значимости уровня экспрессии индуцибельной NO-синтазы в раке толстой кишки / Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Современные подходы в клинико-морфологической диагностике и лечении заболеваний человека : сб. науч. тр. Всерос. конф. с междунар. участием памяти чл.-корр. РАМН, з.д.н. РФ, проф. О. К. Хмельницкого. – СПб., 2015. – С. 376-380.

251. Петрушко, М. Ю. Экспрессия металлопротеиназы-9 в раке толстой кишки / М. Ю. Петрушко, Т. Т. Штабинская, М. Боднар // Материалы 62-й Всероссийской межвузовской студенческой научной конференции с международным участием с проведением открытого конкурса на лучшую студенческую научную работу, 21 апр. 2016. – Тверь, 2016. – С. 384-385.

252. Expression of Endoglin and Vascular Endothelial Growth Factor as Prognostic Markers in Experimental Colorectal Cancer / N. Ilhan [et al.] // Anticancer Res. – 2016. – Vol. 36, № 8. – P. 3953-3959.

253. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression / M. L. George [et al.] // Neoplasia. – 2001. – Vol. 3, № 5. – P. 420-427.

254. Зависимость уровня экспрессии нейропилина 1 в раке толстой кишки и его микроокружении от клинико-морфологических показателей / В. В. Живицкая, А. В. Говор, Т. Т. Штабинская, М. Боднар // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Бойко Ю. Г., [Гродно], 23-24 апр. 2015 г. [Электронный ресурс] / МЗ Респ. Беларусь,

УО «ГрГМУ», Каф. патол. анатомии, СНО, Совет молодых ученых ; [редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред. и др.)]. – Гродно : ГрГМУ, 2015. – Электрон. текстовые дан. и прогр. (5, 37 Мб). – С. 199-200. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM).

255. Assessment of the predictive role of level of the expression of TGF- β at the colon rectal cancer : 10th Warsaw intern. Med. Congr. for Young Sci., Warsaw, May 15-18, 2014 / E. N. Kendysh, T. T. Shtabinskaya, M. Bodnar, S. A. Lyalikov, V. A. Basinski, A. K. Marszalek // Arch. Med. Sci. – 2014. – P. 176-177.

256. Юхник, О. И. Выживаемость пациентов с колоректальным раком в зависимости от уровня экспрессии Erk2 / О. И. Юхник, А. Ю. Равданович, Т. Т. Штабинская // Мечниковские чтения-2016 : сб. материалов 89-й конф. СНО, Санкт-Петербург, 27-28 апр. 2016 г. – СПб., 2016. – С. 35.

257. Оценка прогностической значимости уровня экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 в раке толстой кишки / Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – Т. 46, № 4. – С. 36-40.

258. Молчанов, Р. Н. Иммуногистохимическая оценка рака мочевого пузыря, протекающего на фоне хронического воспаления / Р. Н. Молчанов, И. С. Шпонька // Морфология. – 2014. – Т. 8, № 3. – С. 42-49.

259. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms / H. Miletic [et al.] // Expert Opin. – 2009. – Vol. 13, № 4. – P. 455-468.

260. Significance of Neuropilin 1 expression in colorectal cancer for the prognosis of the disease course / T. Shtabinskaya, M. Bodnar, W. Zivitskaya, A. Govor // 23th International students scientific conference, April 23-25, 2015. – Gdansk, 2015. – P. 186.

261. Равданович, А. Ю. Экспрессия ERK-2 в раке толстой кишки. Корреляция с метастазированием и прогнозом течения заболевания / А. Ю. Равданович, Т. Т. Штабинская, М. Боднар // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Бойко Ю. Г., [Гродно], 23-24 апр. 2015 г. [Электронный ресурс] / МЗ Респ. Беларусь, УО «ГрГМУ», Каф. патол. анатомии, СНО, Совет молодых ученых ; [редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред. и др.)]. – Гродно : ГрГМУ, 2015. –

Электрон. текстовые дан. и прогр. (5,37 Мб). – С. 482-483. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM).

262. Shtabinskaya, T. Expression of transforming growth factor in the transition zone of cancer in normal colon mucosa / T. Shtabinskaya, E. Kendysh, M. Bodnar // 10th International Medical Students' Congress in Novi Sad : abstr. book, Serbia, July 16-17, 2015. – Novi Sad, 2015. – P. 38.

263. The role of transforming growth factor (TGF)- β in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut / P. Biancheri [et al.] // Cytokine Growth Factor Rev. – 2014. – Vol. 25, № 1. – P. 45-55.

264. Bufill, J. A. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location / J. A. Bufill // Ann. Int. Med. – 1990. – Vol. 113, № 10. – P. 779-788.

265. Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location / P. Gervaz [et al.] // Dis. Colon Rectum. – 2001. – Vol. 44. – P. 364-372.

266. Gervaz, P. Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications / P. Gervaz, P. Bucher, P. Morel // J. Surg. Oncol. – 2004. – Vol. 88. – P. 261-266.

267. Li, F. Y. Colorectal cancer, one entity or three / F. Y. Li, M. D. Lai // J. Zhejiang Univ. Sci. B. – 2009. – Vol. 10. – P. 219-229.

268. Lynch, H. T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review / H. T. Lynch, T. Smyrk // Cancer. – 1996. – Vol. 78. – P. 1149-1167.

269. Comparative description of expression of neuropilin 1 in proximally and distally localized cancers / T. Shtabinskaya, M. Bodnar, W. Zivitskaya, A. Govor // 10th Bialystok International Medical Congress for Young Scientists : abstr. submission., 14-16 maja 2015. – Bialystok, 2015. – P. 187.

270. Hypoxia, angiogenesis and apoptosis markers in locally advanced rectal cancer / G. E. Theodoropoulos [et al.] // Int. J. Colorectal Dis. – 2006. – Vol. 21, № 3. – P. 248-257.

271. Clarke, J. M. Understanding and targeting resistance to anti-angiogenic therapies / J. M. Clarke, H. I. Hurwitz // J. Gastrointest. Oncol. – 2013. – Vol. 4, № 3. – P. 253-263.

272. Angio-genesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma / Y. Takebayashi [et al.] // Cancer. – 1996. – Vol. 78. – P. 226-231.

273. Tumor angiogenesis and mode of metastases in patients with colorectal cancer / N. Tanigawa [et al.] // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57. – P. 1043-1046.

274. Vascular endothelial growth factor and endoglin expression in colorectal cancer / K. Dassoulas [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 136, № 5. – P. 703-708.

275. Штабинская, Т. Т. Корреляция уровня экспрессии CD 105 в раке толстой кишки с прогнозом течения заболевания / Т. Т. Штабинская, Е. Н. Кендыш, М. Боднар // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Бойко Ю. Г., [Гродно], 23-24 апр. 2015 г. [Электронный ресурс] / МЗ Респ. Беларусь, УО «ГрГМУ», Каф. патол. анатомии, СНО, Совет молодых ученых ; [редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред. и др.)]. – Гродно : ГрГМУ, 2015. – Электрон. текстовые дан. и прогр. (5,37 Мб). – С. 638-639. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM).

276. Грачев, Ю. В. Клеточные и молекулярные механизмы неоваскуляризации глиом больших полушарий головного мозга и перспективы антиангиогенной стратегии / Ю. В. Грачев // *В мире науки.* – 2012. – Т. 116, № 10. – С. 7-10.

277. Клиническое значение VEGFR-2 в опухолях и сыворотках крови больных раком молочной железы / Е. А. Ким [и др.] // *Опухоли жен. репродукт. системы.* – 2008. – № 1. – С. 28-32.

278. Shtabinskaya, T. T. The prognostic significance of the expression of angiogenic markers in colon cancer depends on the stage of disease / T. T. Shtabinskaya // *Modern European science – 2016 : materials of the XII intern. sci. and practical conf.* – Sheffield, 2016. – P. 13-15.

279. Transforming growth factor-beta-dependent and-independent pathways of induction of tubulointerstitial fibrosis in beta6(-/-) mice / L. J. Ma [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2003. – Vol. 163, № 4. – P. 1261-1273.

280. Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease / G. C. Blobe [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342. – P. 1350-1358.

281. TGF- β and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition / U. Valcourt [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2005. – Vol. 16. – P. 1987-2002.

282. Матриксные металлопротеиназы 2, 3, 13 и их тканевой ингибитор 2-го типа в опухолях и плазме крови больных раком

толстой кишки / Е. С. Герштейн [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 3. – С. 337-341.

283. Ассоциированные с опухолью протеазы – прогностические маркеры колоректального рака / Е. С. Герштейн [и др.] // Клини. лаб. диагностика. – 2013. – № 10. – С. 5-10.

284. Shtabinskaya, T. T. Expression of angiogenic markers depending on the degree of colon adenocarcinoma differentiation / T. T. Shtabinskaya, E. N. Kendysh // Наука и технологии: шаг в будущее – 2017 : материалы XI Междунар. науч.-практ. конф., Прага, 22-28.02.2017. – Прага, 2017. – С. 10-13.

285. Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis / J. E. Rundhaug // J. Cell Mol. – 2005. – Vol. 9 (2). – P. 267-285.

286. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica-M / О. Ю. Реброва. – МедиаСфера, 2006. – 312 с.

287. Shtabinskaya, T. T. Influence of clinical, morphological and immunohistochemical parameters on the survival of patients with colorectal cancer / T. T. Shtabinskaya // Achievement of high school – 2016 : материалы за XII Междунар. науч.-практ. конф., София, 17-25 Nov., 2016. – София, 2016. – P. 22-24.

288. Штабинская, Т. Т. Прогностическое значение экспрессии маркеров ангиогенеза в низкоккачественном раке дистального отдела толстой кишки / Т. Т. Штабинская // Журн. ГрГМУ. – 2016. – № 3 (55). – С. 62-65.

289. Способ прогнозирования выживаемости пациентов с послеоперационной химиотерапией колоректального рака : патент № 22145 ВУ : МПК G 01N 33/48, A 61B 5/00 / Т. Т. Штабинская, С. А. Ляликов, В. А. Басинский ; дата публ.: 25.05.2018.

290. Значение уровня позитивности CD105 в раке толстой кишки для прогноза эффективности химиотерапии / Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Евраз. онкол. журн. – 2015. – Т. 7, № 4. – С. 35-42.

291. Роль уровня экспрессии маркеров ангиогенеза в прогнозе эффективности послеоперационной химиотерапии колоректального рака / Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Вестн. ВГМУ. – 2015. – Т. 14, № 6. – С. 84-92.

292. Прогноз эффективности послеоперационной химиотерапии пациентов с колоректальным раком по уровню экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в опухоли и микроокружении / Т. Т. Штабинская, М. Боднар, С. А. Ляликов, В. А. Басинский, А. К. Маршалэк // Евраз. онкол. журн. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 42-48.

293. Способ прогнозирования выживаемости пациентов с низко-злокачественным раком дистального отдела толстой кишки : патент № 21882 ВУ : МПК G 01N 33/48, А 61В 5/00 / Т. Т. Штабинская, С. А. Ляликов, В. А. Басинский ; дата публ.: 29.01.2018.

Научное издание

Штабинская Татьяна Тадеушевна
Басинский Виктор Анатольевич
Ляликов Сергей Александрович

**АНГИОГЕНЕЗ
В АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ**

Монография

Ответственный за выпуск С. Б. Вольф

Компьютерная верстка М. Я. Милевской
Корректор Л. С. Засельская

Подписано в печать 06.06.2018.
Формат 60х84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 7,67. Уч.-изд. л. 4,90. Тираж 30 экз. Заказ 95.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования
«Гродненский государственный медицинский университет».
ЛП № 02330/445 от 18.12.2013.
Ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно.