

*На правах рукописи*

**НИКОЛАЕВ**  
Александр Андреевич

**СИСТЕМА ИНСУЛИНОПОДОБНЫХ ФАКТОРОВ РОСТА  
И ИХ ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ У БОЛЬНЫХ  
КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ**

**14.03.10 - клиническая лабораторная диагностика  
(медицинские науки)**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Санкт-Петербург – 2021 год**

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России

**Научный руководитель:**

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор **Кушлинский Николай Евгеньевич**

**Официальные оппоненты:**

**Великанова Людмила Иосифовна**, доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, НИИ эндокринологии научно-исследовательская лаборатория хроматографии, заведующая;

**Моисеенко Федор Владимирович**, доктор медицинских наук, государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов помощи (онкологического)» Комитета по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга, онкологическое химиотерапевтическое (противоопухолевой лекарственной терапии) отделение биотерапии, заведующий.

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 15 февраля 2022 г. в 14:30 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте: <https://www.nrcerm.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук, доцент

**Санников Максим Валерьевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Выявление и исследование опухолевых маркеров при онкологических заболеваниях является ключевой проблемой современной клинической лабораторной диагностики. Особое внимание исследователи уделяют наиболее распространенным формам злокачественных опухолей, таких как рак молочной железы, рак толстой кишки и яичников, которые занимают в настоящее время лидирующие позиции среди наиболее агрессивных и часто выявляемых опухолей у человека (Заридзе Д.Г., Максимович Д.М., 2017).

Так, колоректальный рак (КРР) – считают наиболее распространенной опухолью во многих странах, а в течение ближайшего десятилетия неминуемо станет основной причиной заболеваемости и смертности во всех регионах мира (Гарин А.М. и Базин И.С., 2016; Ward Z.J. et al., 2020).

Крайне неблагоприятный прогноз относительно показателей заболеваемости и смертности от рака представляет Американское онкологическое общество: за период с 2012 по 2030 гг. число ежегодно регистрируемых новых случаев злокачественных новообразований в мире увеличится с 14 миллионов до более 22 миллионов. По данным GLOBOCAN ежегодно в мире выявляется более 14 миллионов пациентов с онкологическими заболеваниями и более 8 миллионов из них погибают.

Высокие показатели заболеваемости и летальности от онкологических заболеваний – также одна из важнейших проблем в России (Заридзе Д.Г. и соавт., 2017, 2018). Особое внимание онкологов привлекает КРР, так в большинстве стран Европы, США и России наблюдается не только истинный рост показателей заболеваемости, но и смертности от этого вида опухоли (Каприн А.Д., и соавт., 2020). Следует отметить, что рак прямой и ободочной кишок занимает 3-е место по частоте заболеваемости среди онкологических заболеваний, (каждый год в мире выявляют около 1 млн. новых случаев рака) и 4-е место по частоте смертности (смертность от данного вида рака составляет 500 тыс. человек ежегодно). Ожидается, что в России в XXI веке, КРР выйдет на 1-е место в списке по числу заболеваемости, а в настоящее время ежегодно в России выявляется 50 тыс. вновь заболевших КРР и умирают примерно 35 тыс. человек (Заридзе Д.Г. и соавт., 2018). Соотношение между раком ободочной кишки и раком прямой кишки в развитых странах составляет 2:1 соответственно. В России же данное соотношение несколько иное и составляет 1,2:1.

Высокие показатели заболеваемости КРР связаны с тем, что этиология КРР, способы профилактики не разработаны, отсутствуют программы

скрининга, так называемого «скрытого, раннего» КРР, а стало быть, у значительного числа больных первичную опухоль обнаруживают одновременно с региональными или отдаленными метастазами (Станоевич У. и соавт., 2012; García-Albéniz X. et al., 2019; de Kort, S. et al., 2019; Białkowska K. et al., 2020). Невысокая эффективность лекарственной таргетной терапии большинства онкологических заболеваний, в том числе и КРР, выраженные побочные эффекты химиотерапии представляют сложную проблему у таких пациентов (Герштейн, Е.С. и Кушлинский Н.Е., 2012; Piringer G. A. et al., 2018). Поэтому разработка новых подходов в оценке так называемого «биологического фенотипа» опухоли не теряет своей актуальности (Герштейн Е.С., 2016; Asgharzadeh F. et al., 2018).

Большое внимание в последнее десятилетие исследователи уделяют различным специфическим для опухоли клеточным и молекулярным маркерам (Douglas J.B. et al., 2010; Pryczynicz A. et al., 2013). Изучение молекулярно-биологических характеристик КРР необходимо для понимания патогенетических механизмов развития опухолевого процесса (Eiró, N. et al., 2017; Mei X.L., Zheng Q.F., 2019; Barabás L. et al., 2020; Chen, C. et al., 2020), для диагностики, оценки прогноза заболевания и разработки стратегии индивидуальной терапии пациента, усовершенствования ранее разработанных схем комбинированного лечения и внедрения новых патогенетические методов терапии (Кушлинский Н.Е., 2015; Afshar S. et al., 2018; Gupta M.K. et al., 2019; Niu S. et al., 2020;). Кроме того, биологические маркеры при КРР могут быть полезны для выявления пациентов с неблагоприятными прогностическими факторами, которым необходимо проведение дополнительного адъювантного лечения применительно к определенным конкретным видам терапии (De Mattia E., et al., 2020; Nabariya D.K. et al., 2020).

**Степень разработанности темы исследования.** Известно, что регуляция роста клеток опухоли может происходить при участии инсулиноподобных факторов роста (Lee A.V. et al., 2005; Jiang B. et al., 2014; Hou Y.L. et al., 2019). Система ИФР состоит из инсулиноподобных факторов роста 1-го и 2-го типа (ИФР-1 и ИФР-2), трансмембранных клеточных рецепторов и ИФР-связывающих белков (ИФРСБ) (Laviola L., 2007; Hu J. et al., 2018). ИФР могут выступать в роли ауто- и паракринных медиаторов роста и метастазирования в опухолях различной локализации (Pandini G., 2008; Li Z. et al., 2018), а ИФРСБ в свою очередь регулируют их биологическую активность.

При колоректальном раке в клетках опухоли обнаруживаются молекулярные составляющие, которые обеспечивают проявление

аутокринного механизма действия ИФР (Sztefko K. et al., 2009; Yavari K. et al., 2009; García-Albéniz X. et al., 2019). При этом ИФРСБ ингибируют действие ИФР, которое заключается в стимуляции инвазивной и ангиогенной функции клеток (Gao T. et al., 2020). Повышение риска возникновения КРР при высоких уровнях ИФР-1 и ИФРСБ-2 в крови также свидетельствует о перспективности использования специфических ингибиторов ИФР-сигнальной системы в лечении этих пациентов (Bruchim I. & Werner H., 2013; Qu X. et al., 2017; Zhong H. et al., 2017; Walkiewicz K. et al., 2019). В экспериментах *in vitro* рост клеток КРР ингибируют МА к ИФР-рецепторам (Mody K., 2018), низкомолекулярными ингибиторами (Vanamala, J. et al., 2010), рекомбинантными ИФРСБ (Alami, N. et al., 2008).

Согласно концептуальной работе D.Hanahan и R.A.Weinberg (2011) одним из главных механизмов инвазии, метастазирования и неоангиогенеза опухолевых клеток считают гидролиз протеазами, ассоциированными с опухолью, базальной мембраны и ВКМ (Герштейн Е.С. и соавт., 2013; Ishikawa T. et al., 2017). Одними из таких протеаз является мультигенное семейство матриксных металлопротеиназ (ММП), получивших свое название за свойство гидролизовать белки ВКМ и, в частности, такие как коллаген (Deryugina E.I. et al., 2010). В различных опухолях, среди которых и КРР, показано повышение экспрессии ММП (Делекторская В.В. и соавт., 2007; Białkowska K. et al., 2020). При этом ММП-7 представляет особый интерес для больных КРР, так как может служить клинически важным маркером неблагоприятного прогноза заболевания (Короткова, Е.А. и соавт., 2012; Chen L. & Ke X., 2021) и его чувствительности к разным видам терапии некоторых опухолей, в том числе КРР (Lubbe W.J. et al., 2006), а ингибиторы ММП рассмотрены как перспективные препараты для лечения этих опухолей (Barabás L. et al., 2020).

Показано, что развитие опухолевого процесса приводит к необратимому приобретению опухолевой клеткой гиперангиогенного фенотипа (Piawah S. & Venook A.P., 2019). Это способствует утрачиванию чувствительности к внешним сигналам и приобретение способности клеток опухоли секретировать ключевой индуктор ангиогенеза VEGF (Герштейн Е.С. и соавт., 2013; Himbert C. et al., 2019). Этот ангиогенный фактор, взаимодействуя со своими рецепторами VEGFR-1, VEGFR-2 в эндотелии сосудов, активирует его пролиферацию, что способствует инвазии и метастазированию опухоли (Kumaran G.C. et al., 2009; Unterleuthner D. et al., 2020), а сами метастазы могут быть островками неоангиогенеза и, таким образом, распространения опухолевого процесса. Известно, что метастазы развиваются в сети капилляров после отделения опухолевых клеток от

первичной опухоли и их рост находится под контролем ряда эндогенных ангиогенных факторов, секретируемых клетками опухолей и ВКМ. Кроме того, развитие и рост метастазов связан с наличием на поверхности не только опухолевых клеток, но и нормальных тканей, рецепторов индукторов ангиогенеза, на которые влияет протеолитическая активность клеток и неоваскуляризация опухоли (Spannuth W.A. et al., 2009). Поэтому, ангиогенез при КРР считают крайне необходимой составляющей онкогенеза по причине повышенной потребности клеток злокачественных новообразований в кислороде (Kircher S.M. et al., 2016). В каком-то смысле неоангиогенез является для опухолей механизмом приспособления, позволяющей опухоли развиваться, обеспечивая ее существование, но является «губительным» для организма хозяина, в котором опухоль развивается. Ключевым фактором неоангиогенеза считается белок VEGF, который в настоящее время активно исследуется как маркер прогноза болезни (Gao Y. et al., 2019) и мишень анти-VEGF терапии (Niu G. et al., 2018; Seeber A. et al., 2018; Kuczynski E.A. & Reynolds A.R., 2020).

Группу факторов роста (VEGF) представляют 7 белков: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и плацентарные факторы роста (PlGF-1, PlGF-2) (Hicklin D.J. & Ellis L.M., 2005). Гистологическое строение опухоли определяет синтез и секрецию этих факторов (Ferrara N. et al., 2003). VEGF – белок, включенный в мембраны клеток. Однако он может быть и в растворимой форме доступной для ЭК. Появление растворимой формы этого белка исследователи объясняют как один из вариантов сплайсинга, а возможно как результат расщепления протеазами более полных изоформ (VEGF(121) и VEGF(165)), основной среди них в опухоли считают VEGF(165) (Kumaran G.C. et al., 2009).

Стало быть, роль ИФР-1, ИФР-2 в механизмах роста, ауто- и паракринной регуляции клеток КРР может иметь клиническое значение. В доступной нам литературе выявлены работы по изучению ИФР-системы у больных раком эндометрия и молочной железы, и встретились единичные исследования, в которых данная регуляторная система изучалась у больных КРР (Onerup A. et al., 2020). Кроме того, представлены единичные, в основном экспериментальные исследования, о связи системы ИФР с активаторами ангиогенеза и протеолитическими ферментами ВКМ, принимающими активное участие в механизмах инвазии и метастазирования опухолей. Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности изучения роли ИФР-системы и ИФРСБ у больных КРР, а также связи маркеров системы ИФР с активаторами неоангиогенеза – VEGF и инвазивной активности опухоли – ММП-7 в клиническом течении заболевания.

Проведенное исследование позволит выделить больных КРР, отличающихся по содержанию в сыворотке крови ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ, VEGF, ММП-7 и обсудить возможности использования этих маркеров не только как дополнительных диагностических критериев заболевания, но и позволит выделить группу пациентов, нуждающихся в пристальном наблюдении и более эффективных целенаправленных методах терапии.

### **Цель исследования**

Определить клинико-лабораторную значимость сывороточных уровней основных компонентов системы ИФР, фактора роста эндотелия сосудов и матриксной металлопротеиназы 7-го типа у больных колоректальным раком с учетом клинических и морфологических характеристик заболевания для выявления перспективных маркеров в оценке биологического поведения опухоли, их роли в диагностике и прогнозе выживаемости.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать исходные уровни ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1, ИФРСБ-2, ИФРСБ-3, VEGF, ММП-7 в сыворотке крови больных колоректальным раком и сравнить с этими показателями в группе здоровых доноров.
2. Выявить связь маркеров системы ИФР с концентрацией VEGF и ММП-7 в сыворотке крови здоровых доноров и больных колоректальным раком.
3. Определить взаимосвязь содержания компонентов системы инсулиноподобных факторов роста, а также VEGF и ММП-7 в сыворотке крови с основными клиническими и морфологическими характеристиками колоректального рака.
4. Выявить взаимосвязь уровня исследованных маркеров в сыворотке крови больных колоректальным раком с клиническим течением заболевания и возможности их использования в диагностике и оценке прогноза выживаемости.

### **Научная новизна исследования**

Впервые проведено исследование компонентов системы ИФР в комплексе с VEGF, ММП-7, которые определяют способность опухоли к неконтролируемой пролиферации и противодействию апоптозу, а также характеризуют ее инвазивную и метастатическую активность.

Выявлено значимое снижение уровня ИФРСБ-3 и повышение содержания ИФР-1, ИФРСБ-2 в сыворотке крови больных колоректальным раком.

Получены новые данные о более высоком сывороточном уровне ИФР-2 в группе мужчин с колоректальным раком и нарушении баланса между ИФР

и ИФРСБ за счет возрастания содержания свободных ИФР, преимущественно ИФР-1, что делает их доступными для ткани опухоли.

Показано существенное повышение содержания VEGF и ММП-7 в сыворотке крови больных колоректальным раком. При этом уровни ММП-7 и в меньшей степени VEGF были взаимосвязаны с основными показателями распространенности опухолевого процесса, согласно системы TNM: стадией заболевания, инвазией опухоли (индекс Т), наличием метастазов в регионарных лимфоузлах (N) и отдаленных органах (M).

Впервые представлены клиничко-лабораторные маркеры (VEGF и ИФР-1), которые наряду со стадией заболевания могут быть использованы в оценке прогноза общей выживаемости больных колоректальным раком.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты проведенного исследования формируют основу для расширения представления о месте компонентов системы ИФР, VEGF, и ММП-7 в диагностике и прогнозе общей выживаемости больных колоректальным раком. Исследованные биохимические показатели могут выступать в роли лабораторных маркеров в диагностике колоректального рака.

Сформулировано решающее правило для распознавания злокачественных опухолей данной локализации с учетом поровых уровней биологических маркеров, которые составляют: для ИФР-1 – в возрасте пациентов до 60 лет – выше 181 нг/мл, 60-69 лет – выше 150 нг/мл, от 70 лет и старше – выше 112 нг/мл, для ИФРСБ-2 - более 853 нг/мл, для ИФРСБ-3 – ниже 2,5 мкг/мл, у 75% больных соотношение ИФРСБ-3/ИФР-2 не достигало показателя 4,1. Чувствительность разработанного теста для диагностики колоректального рака составила 94,9%, специфичность 83,9%, что позволяет рекомендовать определение ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-2 и ИФРСБ-3 в клинической и лабораторной практике у онкологических больных.

Показано, что уровень ИФР-1 в сыворотке крови может быть использован как дополнительный диагностический маркер колоректального рака и при пороговом уровне ИФР-1 равном 140 нг/мл чувствительность теста составляет 80%, а специфичность 75%.

Также выявлено, что повышенное содержание сывороточных маркеров VEGF и ИФР-1, как и стадию заболевания, следует считать значимыми и независимыми факторами прогноза колоректального рака. При этом, одновременное определение исходных концентраций VEGF и ИФР-1 в сыворотке крови больных колоректальным раком позволяет существенно уточнить прогноз общей выживаемости.



Анализ исходных концентраций маркеров ММП-7 и ИФРСБ-1 в сыворотке крови больных колоректальным раком позволяет уточнить ранний (2-летний), а ИФРСБ-2 отдаленный (5-летний) прогноз общей выживаемости этой категории пациентов.

Важным в практическом плане является возможность совершенствования диагностического и лечебного алгоритмов при колоректальном раке на основе полученных результатов с учетом характера заболевания, а также наметить перспективные направления клинико-лабораторных исследований.

### **Методология и методы исследования**

Методология проведенного исследования заключалась в комплексном сравнительном анализе уровней белков системы инсулиносвязывающих факторов роста у больных колоректальным раком и здоровых доноров. В работе были использованы современные лабораторные технологии, анализ данных зарубежной и отечественной литературы, широкий спектр статистических методов исследования. Оценку полученных результатов проводили с учетом клинико-морфологических особенностей колоректального рака на основании общеклинических, рентгенологических и морфологических данных. На основе выявленных клинико-лабораторных маркеров был проведен статистический анализ показателей общей выживаемости.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Система ИФР/ИФРСБ играет важную роль в патогенетических механизмах прогрессии колоректального рака, при этом у пациентов нарушен баланс ИФР/ИФРСБ в сыворотке крови за счет повышения уровня свободных ИФР, в первую очередь ИФР-1, что увеличивает биодоступность данного митогенного фактора для опухолевой ткани.

2. Разработано эффективное решающее правило, включающее показатели ИФР-1, ИФРСБ-2 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови, позволяющее выявить злокачественное новообразование толстой и прямой кишки с чувствительностью 94,9% и специфичностью 83,9%.

3. Наиболее информативными маркерами прогноза общей выживаемости у больных колоректальным раком могут служить сывороточные уровни VEGF и ИФР-1 в сочетании со стадией заболевания.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность полученных в диссертации данных обусловлена достаточным количеством обследованных пациентов (95 первичных больных колоректальным раком), использованием современных лабораторных методов, адекватным статистическим анализом результатов исследования.

Работа выполнена в соответствии с общепринятыми этическими и научными принципами. Для интерпретации результатов и обоснования выводов и положений диссертации был использован анализ 297 литературных источников. Работа выполнена в соответствии с запланированным дизайном, выводы и практические рекомендации основаны на полученных результатах и полностью соответствуют цели и задачам диссертационной работы.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации представлены на: XX Российском Национальном Конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 4-8 апреля 2013 г.), на конференции «Национальные дни лабораторной медицины России-2013» (Москва, 1-3 октября 2013 г.), на XXVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая лаборатория: от аналитики к диагнозу» (Москва, 12-14 мая 2021 г.).

### **Внедрение результатов работы в практику**

Полученные результаты исследования внедрены в клиническую практику лаборатории клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Материалы диссертации используются на лекционных, семинарских занятиях с курсантами циклов повышения квалификации врачей на кафедре клинической биохимии и лабораторной диагностики ГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также в работе клинико-лабораторного отдела ФГБУ ВЦЭРМ имени А.М. Никифорова МЧС России.

### **Личный вклад автора**

Все этапы диссертационной работы выполнены при непосредственном участии автора. Автором самостоятельно проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Автор лично принимал участие в заборе материала, проводил биохимические исследования у первичных больных колоректальным раком и здоровых доноров. Диссертантом осуществлены статистическая обработка, анализ и интерпретация собранных материалов, сформулированы выводы и практические рекомендации, оформлена диссертационная работа.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликованы 10 печатных работ, 6 из них в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности 14.03.10.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследований», глав «Результатов собственных исследований», обсуждения полученных результатов, выводов и указателя цитируемой литературы. Общий объем диссертации 149 листа машинописного текста, иллюстрирована 37 таблицами и 21 рисунком. Указатель литературы содержит 297 источников, из них 30 работ отечественных и 267 зарубежных авторов.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Характеристика больных колоректальным раком.** В исследование включено 95 больных КРР (50 мужчин и 46 женщин) в возрасте 20-85 лет (медиана – 62 года), которые проходили обследование и лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации в период с 2011 по 2015 гг. У всех больных впервые выявлена аденокарцинома. Умеренно дифференцированная опухоль обнаружена в 70,3%, высокодифференцированная в 14,1%, низкодифференцированная в 15,6% наблюдений. В группу контроля вошли 48 здоровых доноров (17 мужчин и 31 женщина) в возрасте 29-84 лет (медиана – 61 год).

Всех больных КРР с учетом стадии по системе TNM распределили следующим образом: T<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> - 26 (26,5%), T<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> – 15 (15,3%), T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> – 8 (8,2%), T<sub>3</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub> – 9 (9,2%), T<sub>4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub> – 6 (6,1%), по 4 (12,2%) - T<sub>4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>N<sub>1</sub>M<sub>1</sub> и T<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>1</sub> (12,3%), по 2 – T<sub>2</sub>N<sub>1a</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>N<sub>2</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>N<sub>2</sub>M<sub>1</sub> и T<sub>4</sub>N<sub>2</sub>M<sub>0</sub> (8,16%), остальные варианты по 1 наблюдению - T<sub>2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>N<sub>1c</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>N<sub>1a</sub>M<sub>1a</sub>, T<sub>3</sub>N<sub>1</sub>M<sub>1a</sub>, T<sub>3</sub>N<sub>1a</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>1a</sub>, T<sub>4b</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>4b</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>1a</sub>, T<sub>4a</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>1</sub>, T<sub>4</sub>N<sub>2</sub>M<sub>1a</sub> (14,3%). У большинства обследованных больных опухоль локализовалась в прямой кишке – 58,2%, у 31,6% – в ободочной кишке.

**Специальные лабораторные методы исследования.** Содержание исследуемых белков определяли в образцах сыворотки крови, взятой у больных раком толстой кишки до лечения. Для получения сыворотки кровь забирали в пробирки с активатором свертывания и центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин, разливали на 3-4 аликвоты объемом 300-400 мкл в пластиковые пробирки и хранили при -40°С до проведения иммуноферментного анализа.

Определение маркеров системы ИФР в сыворотке крови у здоровых доноров и больных КРР проводили наборами реактивов, которые

представляют собой классические тест-системы «сэндвичевого» типа для прямого иммуноферментного анализа (таблица 1).

**Таблица 1.** Наборы реактивов для иммуноферментного анализа белков системы ИФР, использованные в работе

№	Показатель	Название набора	Производитель
1.	ИФРСБ-1	«IGFBP-1-ELISA»	Mediagnost <sup>®</sup> , Германия
2.	ИФРСБ-2	«IGFBP-2-ELISA»	Mediagnost <sup>®</sup> , Германия
3.	ИФРСБ-3	«IGFBP-3-ELISA»	Mediagnost <sup>®</sup> , Германия
4.	ИФР-1	«IGF-I-ELISA»	IDS, Германия
5.	ИФР-2	«IGF-II-ELISA»	Mediagnost <sup>®</sup> , Германия
6.	ММП-7	Quantikine <sup>®</sup> , «Human MMP-7 (total) ELISA»	R&D systems, США
7.	VEGF	Quantikine <sup>®</sup> , «Human VEGF»	R&D systems, США

**Статистические методы анализа.** При анализе полученных результатов применяли однофакторный и многофакторный дисперсионный анализ, вычисления проводили на персональном компьютере с помощью стандартного пакета статистических программ. Достоверность различия показателей оценивали с помощью непараметрических критериев – медианного, Колмогорова-Смирнова, Mann-Whitney. Мету линейной связи оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона, коэффициента корреляции рангов Spearman. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### **Результаты собственных исследований**

Провели иммуноферментный анализ биохимических показателей системы ИФР в сыворотке крови больных КРР до лечения: ИФР-1 (n=95), ИФР-2 (n=80), ИФРСБ-1 (n=80), ИФРСБ-2 (n=67), ИФРСБ-3 (n=80), а также у 48 обследованных здоровых доноров группы контроля. Распределение уровней маркеров системы ИФР отличалось от закона нормального распределения Гаусса, поэтому при описании показателей применяли медиану и квартили, а при сравнении групп – непараметрические критерии. В таблице 2 представлены статистические показатели концентрации исследованных маркеров в сыворотке крови общей группы больных КРР и группы контроля. Обнаружено статистически значимое увеличение медиан

ИФР-1 и ИФРСБ-2 и снижение ИФРСБ-3 у больных КРР по сравнению с контролем.

**Таблица 2.** Содержание компонентов системы ИФР в сыворотке крови больных колоректальным раком и в контроле

Группы	Медиана; квартили; пределы колебания				
	ИФР-1 нг/мл	ИФР-2 мкг/мл	ИФРСБ-1 нг/мл	ИФРСБ-2 нг/мл	ИФРСБ-3 мкг/мл
Контроль	n=48	n=31	n=31	n=14	n=31
	110; 83,1- 135; 38,5-232	0,75; 0,55-0,94; 0,42-4,62	2,5; 0,8-7,5; 0-20,8	359; 247-626; 67,2-853	4,3; 3-5; 1,9-22,8
Колоректальный рак	n=95	n=80	n=80	n=67	n=80
	160; 113-212; 43-637	0,83; 0,7-1,0; 0,5-8,1	2,7; 1,3-4,5; 0,2-47,2	689; 413-1056; 73,4-2954	2,3; 2,0-3,2; 1,5-24,7
P (Mann-Whitney t)	<0,0001	0,19	0,9	0,0036	<0,0001

Совокупность этих изменений свидетельствует об увеличении доли свободного ИФР-1 в сыворотке крови (увеличение соотношения ИФР-1/ИФРСБ-3) и его биодоступности для тканей (увеличение уровня ИФРСБ-2). Однако только у 35 из 95 (37%) больных уровни ИФР-1 превышали верхний 95% порог распределения контроля, составивший 181 нг/мл, т.е. чувствительность этого теста при данном пороговом значении и 95% специфичности была недостаточной. Однако, если снизить специфичность до 75% (пороговый уровень – 140 нг/мл), то диагностическая чувствительность ИФР-1 в общей группе больных КРР может быть повышена до 80%.

Медиана ИФРСБ-2 в контроле была статистически значимо ниже, чем у больных КРР (359 против 689 нг/мл), поэтому нами выделен верхний показатель уровня маркера равный 853 нг/мл. Напротив, у больных КРР медиана ИФРСБ-3 была статистически значимо ниже, чем в контроле (2,3 против 4,1 мкг/мл), а для маркера ИФРСБ-3 выявлено пороговое значение равное 2,5 мкг/мл, которое является верхним пределом содержания этого белка в сыворотке крови больных КРР.

При совмещении 3-х тестов (ИФР-1, ИФРСБ-2, ИФРСБ-3), только у 7 из 79 больных КРР уровни всех трех маркеров были в пределах нормы, тогда

как у 72 пациентов выявлены отличия хотя бы одного из показателей от группы контроля (чувствительность - 91%). При этом отмечено либо превышение порогового значения, т.е. «высокие» уровни ИФР-1 или ИФРСБ-2, либо «низкие» значения ИФРСБ-3.

На основании полученных данных можно сделать заключение, что определение содержания ИФР-1, ИФРСБ-2 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови можно использовать в качестве дополнительного теста при подозрении на опухоль толстой кишки злокачественного характера. При этом необходимо отметить, что такие маркеры, как ИФР-2 и ИФРСБ-1 практически не отличались у больных КРР и в контроле.

Проведен анализ корреляционных взаимосвязей изученных показателей в сыворотке крови больных КРР и здоровых доноров. В отличие от больных КРР у здоровых доноров выявлена положительная корреляционная связь между сывороточными уровнями ИФР-2 и ИФРСБ-3 ( $R=0,82$ ;  $p=0,0001$ ) и отрицательная - между уровнями ИФР-1 и ИФРСБ-1 ( $R=-0,4$ ;  $p=0,03$ ). Но, в тоже время, у больных КРР выявлена положительная корреляционная взаимосвязь между уровнями ИФРСБ-1 и ИФРСБ-2 ( $R=0,54$ ;  $p=0,0001$ ) и отрицательная между уровнями ИФР-1 и ИФРСБ-2 ( $R=-0,44$ ;  $p=0,0002$ ). На основании этих данных можно предположить, что у больных КРР нарушен баланс между ИФР и связывающими их белками сыворотки крови, что свидетельствует об изменении биодоступности данных факторов роста, в первую очередь ИФР-1.

Изучена также диагностическая значимость соотношения концентраций различных ИФР и ИФРСБ в сыворотке крови. Наиболее информативными оказались соотношения ИФРСБ-3/ИФР-2 и ИФРСБ-3/ИФР-1 ( $p<0,00001$ ). Так, наилучшее разделение здоровых доноров и больных КРР получено по пороговому уровню соотношения ИФРСБ-3/ИФР-2, равному 4,1 (верхний квартиль этого соотношения в группе пациентов). При этом частота нехарактерных для группы контроля «низких» значений соотношения (ИФРСБ-3/ИФР-2  $<4,1$ ) у больных КРР составила 75% ( $p=0,000001$ ). Наилучшее разделение для соотношения ИФРСБ-3/ИФР-1 получено по пороговому уровню 17,4 (нижняя граница 95% ДИ в контроле). Специфичность равнялась 93%, чувствительность 61%.

Нами установлено, что уровни ИФР-1 снижались, а ИФРСБ-1 статистически значимо повышались с увеличением возраста как в группе контроля, так и у больных КРР: как в контроле, так и у больных КРР обнаружена статистически значимая отрицательная корреляция между возрастом обследованных и содержанием ИФР-1 в сыворотке крови, однако связь с возрастом у больных была значительно слабее, чем в контроле

( $R=-0,29$ ;  $p=0,014$  и  $R=-0,76$ ;  $p=0,0001$  соответственно). Другие показатели не связаны с возрастом пациентов и здоровых доноров. Таким образом, возрастная динамика двух показателей системы ИФР (ИФР-1 и ИФРСБ-1) отражает преимущественно возрастные особенности, как у здоровых доноров, так и у больных КРР, но не особенности опухолевой патологии.

Вместе с тем, диагностическая информативность ИФР-1 в сыворотке крови по пороговому уровню 181 нг/мл зависела от возраста пациентов ( $p=0,04$ ). Так, информативность ИФР-1 была наибольшей у больных в возрасте до 50 лет (50%), равнялась 43% на 5-ом десятилетии жизни, но снижалась до 37% в возрасте 60-69 лет, до 26% в возрасте 70-79 лет и до 0 у пациентов старше 80 лет. Более целесообразным представляется использование различного порогового значения ИФР-1 (верхнее значение 95% ДИ в контроле) для больных разного возраста (до 60 лет – 181 нг/мл, 60-69 лет – 150 нг/мл, 70 лет и старше – 112 нг/мл). В этом случае уже 56% больных КРР с высокой вероятностью отличаются от контроля. Однако более оптимальным представляется использование общего для всех возрастных групп порогового уровня 140 нг/мл, при котором диагностическая чувствительность составляет 80% при 75% специфичности.

Выявлена связь уровней некоторых компонентов системы ИФР в сыворотке крови с полом пациентов (таблица 3).

Так, например, уровни ИФР-2, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови здоровых доноров были статистически значимо выше у женщин по сравнению с мужчинами. У больных КРР аналогичные статистически значимые различия отмечены только для ИФРСБ-3. У пациентов мужского пола уровень ИФР-2 статистически значимо превышал его значение у здоровых мужчин контрольной группы ( $p=0,007$ ). Различия, выявленные для ИФР-1, ИФРСБ-2 и ИФРСБ-3 при анализе общей группы пациентов, сохранялись как у мужчин, так и у женщин, а именно, уровень ИФР-1 и ИФРСБ-2 в сыворотке крови больных был повышен, а уровень ИФРСБ-3 – снижен по сравнению с контролем. В целом, нарушения в балансе сывороточных ИФР/ИФРСБ были более выражены у больных КРР мужчин, чем у женщин.

Особый интерес с клинической точки зрения представлял анализ связи содержания изученных маркеров системы ИФР и ИФРСБ в сыворотке крови с основными показателями распространенности КРР. Нами обнаружено, что сывороточные уровни ИФР-2 у больных КРР статистически значимо связаны с критерием  $N$ , при этом уровни маркера при  $N_0$  были наименьшими (0,78 мкг/мл), а при  $N_2$  – наибольшими (0,98 мкг/мл). Аналогичная, но не значимая взаимосвязь отмечена также и для ИФРСБ-2. При этом эффективность

комплексного теста из 3-х показателей (ИФР-1, ИФРСБ-2, ИФРСБ-3/ИФР-2) не зависела от критерия N и составила 96% при отсутствии метастазов в регионарных лимфоузлах, 92% при единичных метастазах и 100% при множественных регионарных метастазах. При сопоставлении с показателем отдаленного метастазирования (M) нами не обнаружено различий в уровнях всех исследованных компонентов ИФР-сигнальной системы.

**Таблица 3.** Содержание компонентов системы ИФР в сыворотке крови здоровых доноров и больных КРР с учетом пола

Группы	Медиана; квартили; пределы колебаний				
	ИФР-1, нг/мл	ИФР-2, мкг/мл	ИФРСБ-1, нг/мл	ИФРСБ-2, нг/мл	ИФРСБ-3, мкг/мл
<b>Контроль</b>					
Мужчины <sup>01</sup>	n=17	n=17	n=17	n=10	n=17
	128; 108-150; 66-202	0,7; 0,5-0,8; 0,4-4,6	1,4; 0,3-2,5; 0-10,1	490; 247-635; 67,2-853	3,2; 3-3,7; 1,9-22,8
Женщины <sup>02</sup>	n=31	n=14	n=14	n=1	n=14
	99; 76-125; 38,5-232	0,9; 0,7-1,2; 0,5-4,6	5,5; 2,3-12; 1,1-20,8	330	4,8; 4,2-5,6; 2,6-6,8
P (Mann-Whitney t)	0,9	0,054	<b>0,003</b>	-	<b>0,02</b>
<b>Больные колоректальным раком</b>					
Мужчины <sup>11</sup>	n=50	n=42	n=42	n=36	n=42
	165; 123-224; 43-541	0,82; 0,7-1,0; 0,46-8,1	2,1; 1,2-4,1; 0,6-18,9	688; 428-908; 73,4-2954	2,2; 2-2,7; 1,5-9,1
Женщины <sup>12</sup>	n=45	n=38	n=38	n=31	n=38
	157; 106-199; 44,6-637	0,83; 0,7-0,9; 0,48-2,2	3,2; 1,3-5,4; 0,2-47,2	707; 396-1094; 143-1735	2,9; 2,2-3,6; 1,7-24,7
P (Mann-Whitney t)	0,4	0,3	0,8	0,8	<b>0,006</b>
P (контроль-больные)	<sup>01-11</sup> =0,0067 <sup>02-12</sup> =0,0003	<sup>01-11</sup> =0,017 <sup>02-12</sup> =0,3	<sup>01-11</sup> =0,056 <sup>02-12</sup> =0,052	<sup>01-11</sup> =0,043	<sup>01-11</sup> <0,0001 <sup>02-12</sup> =0,0003



Таким образом, представленные нами данные свидетельствуют о недостаточной связи изученных маркеров системы ИФР, за исключением ИФР-2, с показателями распространенности КРР и не позволяют использовать их в выявлении отдаленных и регионарных метастазов.

Вместе с тем, у больных КРР в I стадии эффективность комплексного теста из показателей ИФР-системы была очень высокой и составила 88%. К сожалению, недостатком известных на сегодня онкологических биохимических маркеров является то, что их диагностическая информативность очень низкая при ранних стадиях, что не позволяет использовать их в практической онкологии для скрининга. Однако, комплекс тестов, а именно, несколько маркеров системы ИФР-ИФРСБ может быть использовано в качестве дополнительного диагностического теста при подозрении на опухоль (КРР) независимо от стадии процесса.

Исследованные компоненты системы ИФР не были связаны с дифференцировкой КРР, при этом диагностическая информативность с использованием показателей ИФРСБ-2 и ИФРСБ-3 повышалась при снижении степени дифференцировки опухоли с 37,5 до 75%. В то же время комплексный тест позволил распознать 100% больных КРР с высокой степенью дифференцировки новообразования.

Не выявлено также значимых различий в сывороточном содержании исследованных компонентов системы ИФР в группах с различной локализацией первичной опухоли в толстой кишке, хотя заметно более высокие уровни ИФР-1 (медиана 187 пг/мл) и ИФРСБ-2 (медиана 826 нг/мл) отмечены в сыворотке крови больных раком сигмовидной кишки по сравнению с таковыми показателями у пациентов с опухолями других локализаций в толстой кишке. Оценив диагностическую эффективность изученных маркеров системы ИФР в сыворотке крови больных КРР с учетом локализации опухоли, мы обнаружили, что у всех 15 больных с поражением сигмовидной кишки комплексный тест соответствовал диагнозу «злокачественная опухоль».

Проведено сравнительное исследование уровней VEGF и MMP-7 в сыворотке крови больных КРР и здоровых доноров, а также проанализирована связь этих маркеров с содержанием основных компонентов системы ИФР.

Анализ полученных данных показал, что уровни VEGF и MMP-7 в сыворотке крови здоровых доноров и больных КРР значительно различались (таблица 4). Так, медиана VEGF в сыворотке крови больных была статистически значимо выше, чем в контроле, и это согласуется с результатами многих зарубежных исследователей. Однако, рассчитанный

нами пороговый уровень, соответствующий 95% перцентилю контроля (906 пг/мл) не обладал значимой диагностической ценностью (всего у 16% больных значения показателя превышали 906 пг/мл), поэтому для разделения больных и здоровых доноров применяли пороговое значение VEGF, равное 410 пг/мл, полученное методом построения кривых ROC: у 67% больных КРР уровни VEGF превышали 410 пг/мл, тогда как в контроле – только у 38% ( $p=0,005$ ).

**Таблица 4.** Содержание VEGF и ММП-7 в сыворотке крови больных КРР и здоровых доноров

Группы	Медиана; квартили; пределы колебаний	
	VEGF (пг/мл)	ММП-7 (нг/мл)
Контроль	n=34	n=14
	349; 216-552; 77,4-1042	3,4; 3,2-4,5; 2,0-9,0
	152-906	2-9
Колоректальный рак	n=67	n=67
	513; 349-633; 100-2406	4,9; 3,8-4,9; 1,9-29,7
P (Mann-Whitney t)	0,011	0,0038

Таким образом, содержание VEGF в сыворотке крови более 906 пг/мл с высокой вероятностью может указывать на опухолевую патологию толстой кишки злокачественного характера, однако чувствительность теста при этом пороговом уровне очень низкая, но она существенно возрастает при снижении порогового значения маркера до 410 пг/мл.

Медиана сывороточного содержания ММП-7 в группе контроля была статистически значимо ниже, чем у больных КРР (3,4 против 4,9 нг/мл), однако частота превышения верхнего 95% порога контроля, равного 9 нг/мл, составила в группе больных всего 12%, т.е. чувствительность этого теста была очень низкой. Вместе с тем, при разделении по пороговому уровню ММП-7 равному 5,5 нг/мл получены значимые различия: у 37% больных КРР выявлены уровни ММП-7 выше 5,5 нг/мл, тогда как в группе контроля такие показатели обнаружены только в 7% наблюдений ( $p=0,023$ ). В целом, эти данные согласуются с полученными ранее результатами определения ММП-7 в плазме крови больных КРР (Короткова, Е.А. и соавт., 2012).

В проведенном нами исследовании повышенные уровни VEGF и ММП-7 выявлены преимущественно в сыворотке крови больных КРР с так называемыми «неблагоприятными» показателями концентраций ИФР-1, ИФРСБ-2 и ИФРСБ-3.

В группе контроля и у больных КРР не обнаружено значимых корреляционных взаимосвязей между возрастом и уровнями VEGF, тогда как у пациентов выявлена статистически значимая положительная

корреляционная связь между возрастом и содержанием MMP-7 в сыворотке крови ( $R=0,32$ ;  $p=0,008$ ), отсутствующая в контроле. У больных обнаружена также положительная взаимосвязь между уровнями VEGF и ИФРСБ-2 ( $R=0,4$ ;  $p=0,001$ ), VEGF и MMP-7 ( $R=0,29$ ;  $p=0,017$ ) в сыворотке крови, отсутствующая в контроле. Соотношения показателей ИФР-1/VEGF, ИФР-1/MMP-7 и ИФРСБ-2/VEGF не различались у больных и в контроле.

По данным проведенного нами исследования, у больных КРР выявлено статистически значимое повышение содержания MMP-7 в сыворотке крови при увеличении критерия T системы TNM и не значимое увеличение VEGF (таблица 5). Следует отметить, что корреляционная зависимость между сывороточными уровнями VEGF и MMP-7 у больных КРР с распространенностью опухоли T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> отсутствовала, но была статистически значимой у пациентов с T<sub>3</sub>-T<sub>4</sub> ( $R_s=0,49$ ;  $p=0,0007$ ). Аналогично, выявленная ранее корреляционная зависимость между уровнями VEGF и ИФРСБ-2 в сыворотке крови у больных КРР с распространенностью опухоли T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> отсутствовала, но была значимой при T<sub>3</sub>-T<sub>4</sub> ( $R=0,48$ ;  $p=0,001$ ). Регрессионный анализ связи уровней всех изученных нами показателей с наличием отдаленных метастазов показал, что наибольшим образом их наличие взаимосвязано с повышением уровня MMP-7 ( $\beta=0,59\pm 0,14$ ;  $p=0,0002$ ).

**Таблица 5.** Маркеры VEGF и MMP-7 в сыворотке крови больных КРР с учетом критерия T

Группы	Медиана; квартили; пределы колебаний	
	VEGF, пг/мл	MMP-7, нг/мл
T <sub>1</sub> (n=8)	370; 268-550; 204-955	3,9; 3,0-4,8; 2,6-6,0
T <sub>2</sub> (n=15)	516; 287-611; 99,7-1129	4,4; 3,1-5,2; 2,6-8,5
T <sub>3</sub> (n=32)	504; 351-586; 138-2040	5,3; 4,2-7,3; 3,4-29,7
T <sub>4</sub> (n=12)	643; 502-1330; 130-2406	6,6; 3,6-9,2; 1,9-27,3
P (Kruskal-Wallis t)	0,11	0,032

Как было установлено ранее, комплексное определение сывороточных уровней ИФР-1, ИФРСБ-2 и ИФРСБ-3 позволяет с достаточно высокой вероятностью отличить больных КРР от группы контроля, однако не обладает ценностью в определении отдаленных метастазов и метастазов в регионарных лимфоузлах. В то же время, сывороточные уровни VEGF и MMP-7 значимо связаны с показателями распространенности опухолевого процесса (таблица 6).

Проведенный регрессионный анализ показал, что наличие отдаленных метастазов у больных КРР наибольшим образом отражало повышение сывороточного уровня MMP-7 ( $\beta=0,59\pm 0,14$ ;  $p=0,0002$ ). При этом,

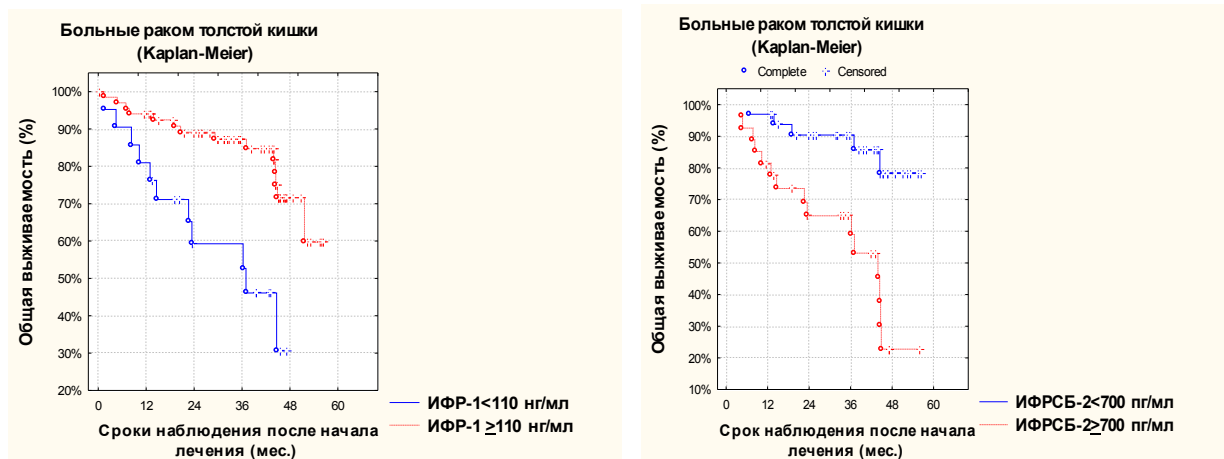
сывороточные показатели VEGF также были связаны с показателями распространенности опухолевого процесса.

**Таблица 6.** Содержание VEGF и ММП-7 в сыворотке крови больных КРР с учетом критерия М

Группы	Медиана; квартили; пределы колебаний	
	VEGF, пг/мл	ММП-7, нг/мл
M <sub>0</sub> (n=53)	483; 340-593; 99,7-2406	4,5; 3,8-5,3; 1,9-11,7
M <sub>1</sub> (n=14)	697; 508-1368; 130-2039	7,6; 6,3-26,3; 3,5-29,7
P (Mann-Whitney t)	0,02	0,0003

Выявлено статистически значимое снижение содержания ИФРСБ-1 в сыворотке крови больных раком прямой кишки по сравнению с больными раком ободочной кишки. Анализ полученных данных показал, что уровни VEGF и ММП-7 в сыворотке крови не связаны с дифференцировкой опухоли.

**Общая выживаемость больных колоректальным раком в зависимости от уровней исследованных маркеров в сыворотке крови.** Наилучшим прогностическим маркером у больных КРР следует считать ИФР-1 с пороговым его значением 110 нг/мл ( $p=0,0019$ ; рисунок 1). Многофакторный анализ с включением в модель критериев системы TNM и концентрации ИФР-1 в сыворотке крови больных КРР показал, что критерий М и уровни ИФР-1 по порогу 110 нг/мл можно считать статистически значимыми независимыми факторами общего прогноза заболевания.



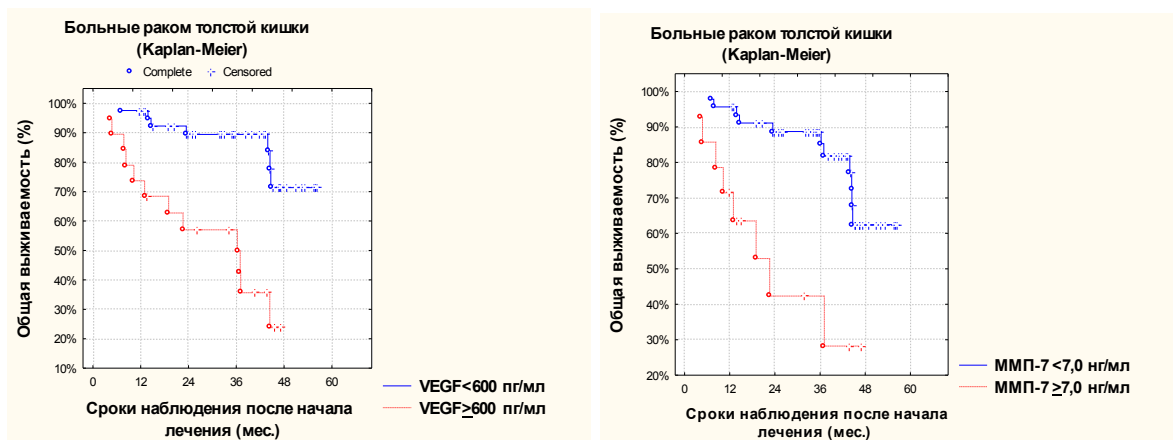
**Рисунок 1.** Общая выживаемость больных колоректальным раком в зависимости от концентраций ИФР-1 и ИФРСБ-2 в сыворотке крови.

Показано, что «высокие» уровни ИФРСБ-2 (>700 пг/мл) в сыворотке крови указывают на неблагоприятный 4- и 5-летний прогноз у больных КРР, а количество таких наблюдений составило 45% (рисунок 1). При многофакторном анализе с включением в модель критериев системы TNM и концентраций белка ИФРСБ-2 в сыворотке крови, показал, что данный

маркер статистически значимо связан с отдаленными результатами лечения больных КРР ( $p=0,03$ ) наряду с критерием М ( $p=0,0001$ ).

Многофакторный анализ не выявил связи отдаленных результатов лечения больных КРР с учетом сывороточных уровней ИФР-2, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3.

Нами проведен анализ общей выживаемости больных КРР с учетом различных исходных значений VEGF в сыворотке крови. Так, при разделении больных КРР на 2 группы по уровню концентрации сывороточного VEGF менее и более 600 пг/мл выявлены статистически значимые различия в показателях общей выживаемости ( $p=0,00026$ ; рисунок 2).



**Рисунок 2.** Общая выживаемость больных колоректальным раком в зависимости от уровней VEGF и ММП-7 в сыворотке крови.

Таким образом, пороговое значение сывороточного VEGF, равное 600 пг/мл, можно рекомендовать для использования в клинической практике при обследовании и ведении больных КРР. Общая выживаемость в группах больных КРР с концентрациями ММП-7 менее 7 нг/мл была сопоставима, тогда как в группе пациентов с уровнем сывороточного ММП-7 более 7 нг/мл статистически значимо снижалась и этот уровень нами выбран как пороговый (рисунок 2). Однако при многофакторном анализе с включением в модель критериев системы TNM и уровней сывороточного маркера ММП-7 установлено, что показатель ММП-7 не был значимым фактором в оценке прогноза общей выживаемости больных КРР ( $p=0,48$ ).

Подводя итоги анализа отдаленных результатов лечения больных КРР с учетом основных клинико-морфологических характеристик заболевания и уровня исследованных биологических маркеров в сыворотке крови можно сделать следующее заключение: стадия КРР, а также маркеры VEGF и ИФР-1 - основные факторы прогноза заболевания. Иммуноферментный анализ исходных концентраций маркеров ММП-7 и ИФРСБ-1 в сыворотке крови

больных КРР позволяет уточнить ранний (2-летний), а ИФРСБ-2 отдаленный (5-летний) прогноз общей выживаемости этой категории пациентов.

На основании проведенного ИФА исследования можно заключить, что определение в сыворотке крови больных КРР комплекса маркеров, характеризующих такие фундаментальные свойства опухолей, как способность к неконтролируемой пролиферации и противодействию апоптоза (компоненты системы ИФР), инвазивная и метастатическая активности (ММП-7), активный неоангиогенез (VEGF), может рассматриваться в качестве дополнительного диагностического подхода при постановке первичного диагноза.

Разработано эффективное решающее правило для распознавания злокачественных опухолей толстой кишки на основании выделения пороговых уровней маркеров: для ИФР-1 с учетом возраста пациентов – в возрасте до 60 лет – выше 181 нг/мл, 60-69 лет – выше 150 нг/мл, от 70 лет и старше – выше 112 нг/мл, для ИФРСБ-2 - более 853 нг/мл, для ИФРСБ-3 - ниже 2,5 мкг/мл. Чувствительность этого комбинированного теста для диагностики КРР составляет 94,9% [95% ДИ=87,5-98,6%], специфичность 83,9% [95% ДИ=66,3-94,6%]. Тогда как ИФР-1 может рассматриваться в качестве самостоятельного дополнительного диагностического маркера КРР, чувствительность которого составляет 80% при 75% специфичности и пороговом уровне 140 нг/мл.

Выявленные изменения в соотношении ИФР/ИФРСБ, свидетельствующие об увеличении уровня свободных ИФР, в первую очередь ИФР-1 и увеличении их биодоступности для опухолевой ткани. Эти результаты согласуются с эпидемиологическими данными о повышении риска возникновения КРР при высоких уровнях ИФР-1 и ИФРСБ-2 в крови (Jenab M. et al., 2007; Rinaldi S. et al., 2010). У больных КРР также наблюдали увеличение сывороточных уровней VEGF и ММП-7, особенно выраженное при распространенном процессе и косвенно подтверждающее необходимость использования ингибиторов ММП и ангиогенеза при лечении этого заболевания.

## **ВЫВОДЫ**

1. Выявлено статистически значимое повышение содержания ИФР-1, ИФРСБ-2 и снижение уровня ИФРСБ-3 в сыворотке крови больных колоректальным раком по сравнению с контролем, а у больных мужчин повышение уровня ИФР-2, что свидетельствует об увеличении биодоступности ИФР при данном онкологическом заболевании.

2. Обнаружена статистически значимая отрицательная корреляция между возрастом обследованных и содержанием ИФР-1 как в контроле, так и

у больных колоректальным раком. Кроме того, у больных колоректальным раком отсутствовала корреляционная зависимость между уровнями ИФР и ИФРСБ, отмеченная в контроле, что свидетельствует о нарушении баланса ИФР/ИФРСБ при данном заболевании.

3. Не выявлено статистически значимой взаимосвязи содержания и соотношения концентраций ИФР и ИФРСБ в сыворотке крови с ключевыми клинико-морфологическими особенностями колоректального рака (локализация и гистологическое строение опухоли, стадия).

4. Установлено, что при использовании порогового уровня 181 нг/мл (95% специфичность) чувствительность ИФР-1 как потенциального диагностического маркера колоректального рака составляет всего 37%, однако при 75% специфичности (пороговый уровень - 140 нг/мл) она возрастает до 80%.

5. Составлено решающее правило, включающее показатели ИФР-1 (возраст пациентов до 60 лет – выше 181 нг/мл, 60-69 лет – выше 150 нг/мл, от 70 лет и старше – выше 112 нг/мл), ИФРСБ-2 (более 853 нг/мл) и ИФРСБ-3 (ниже 2,5 мкг/мл), которые указывают на злокачественную опухоль толстой кишки. Чувствительность этого комбинированного теста составляет 94,9%, специфичность 83,9%.

6. Выявлено статистически значимое увеличение уровней VEGF и ММП-7 в сыворотке крови больных колоректальным раком по сравнению с контролем. При этом уровень ММП-7 следует считать наиболее информативным маркером распространенности колоректального рака.

7. Показано, что сывороточные маркеры ИФР-1, ИФРСБ-2 и VEGF наряду со стадией заболевания следует считать статистически значимыми независимыми факторами прогноза у больных колоректальным раком. Иммуноферментный анализ уровней ММП-7 и ИФРСБ-1 в сыворотке крови позволяет уточнить ранний (2-летний), а ИФРСБ-2 отдаленный (5-летний) прогноз общей выживаемости больных колоректальным раком.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Практические рекомендации предназначены специалистам клинической лабораторной диагностики, онкологам на этапе специализированной медицинской помощи:

1. Рекомендуется использование решающего правила, которое указывает на злокачественный характер опухоли толстой и прямой кишки и включает следующие показатели: ИФР-1 (возраст пациентов до 60 лет – выше 181 нг/мл, 60-69 лет – выше 150 нг/мл, от 70 лет и старше – выше 112 нг/мл), ИФРСБ-2 (выше 853 нг/мл) и ИФРСБ-3 (ниже 2,5 мкг/мл).

Чувствительность этого комбинированного теста равняется 94,9%, специфичность 83,9%.

2. В качестве информативного маркера распространенности колоректального рака рекомендуется определять уровень ММП-7 в сыворотке крови пациентов.

3. Рекомендуется рассматривать сывороточные маркеры VEGF и ИФР-1 наряду со стадией заболевания статистически значимыми независимыми факторами прогноза общей выживаемости у больных колоректальным раком.

4. Рекомендуется использовать иммуноферментный анализ концентраций маркеров ММП-7 и ИФРСБ-1 в сыворотке крови до проводимого лечения с целью уточнения раннего (2-летний), а ИФРСБ-2 отдаленного (5-летний) прогноза общей выживаемости больных колоректальным раком.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертационных работ по научной специальности диссертации:**

1. Костылева О.И., Герштейн Е.С., Масляев А.В., Крюк Ю.В., Тулеуова А.А., Кушлинский Д.Н., Карабекова З.К., Николаев А.А. Гормонозависимые опухоли и система инсулиноподобных факторов роста (обзор литературы) // Альманах клинической медицины.-2011.-№24.-с.68-74.

2. Николаев А.А. Колоректальный рак и инсулиноподобные факторы роста / Николаев А.А., Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Делекторская В.В., Дворова Е.К. // Онкологическая колопроктология.-2013.-№2.-с.11-14.

3. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Николаев А.А., Делекторская В.В., Короткова Е.А., Дворова Е.К., Костылева О.И. Инсулиноподобные факторы роста (IGF), белки, связывающие IGF (IGFBP), и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови больных колоректальным раком // Бюлл. Экспер. Биол. Мед.-2013.-том 156, № 11.-с.632-636.

4. Герштейн Е.С. Инсулиноподобные факторы роста в сыворотке крови больных раком толстой кишки / Герштейн Е.С., Николаев А.А., Короткова Е.А., Делекторская В.В., Кушлинский Н.Е. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.-2013.-№8.-с.69-75.

5. Герштейн Е.С., Николаев А.А., Короткова Е.А., Делекторская В.В., Головков Д.А. Инсулиноподобные факторы роста в сыворотке крови больных колоректальным раком // Молекулярная медицина.-2014.-№1.-с.28-33.

6. Николаев А.А., Делекторская В.В., Кушлинский Н.Е. Рак толстой кишки и система инсулиноподобных факторов роста // Клиническая лабораторная диагностика.-2014.-Том 59.-№9.-с.55-56.

Прочие научные публикации

7. Николаев А.А., Герштейн Е.С., Костылева О.И., Делекторская В.В., Дворова Е.К., Пророков В.В. Сравнительный анализ ключевых показателей системы



инсулиноподобных факторов роста в сыворотке крови больных колоректальным раком и у здоровых людей / В материалах конференции «Национальные дни лабораторной медицины России-2013» (1-3 октября 2013, Москва) // Клиническая лабораторная диагностика.-2013.-№9.-с.33-34. Тезисы

8. Korotkova E.A., Nikolaev A.A., Gershtein E.S., Prorokov V.V. Metalloproteinases (MMPS) and their tissue inhibitors (TIMPS) in tumor and plasma of colorectal cancer patients: relationship, clinico-pathologic and prognostic implication // Proceedings of 21<sup>th</sup> International Charles Heidelberger Symposium (Moscow, May 25-27, 2016).-p. 58.

9. Николаев А.А., Короткова Е.А., Костылева О.И. Инсулиноподобные факторы роста (ИФР) и ИФР-связывающие белки у больных колоректальным раком / В материалах III Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 12-14 сентября 2016 г.) // Медицинский Академический Журнал.-2016.-Т. 16, № 3.-с.283-286.

10. Николаев А.А., Бабкина И.В., Герштейн Е.С., Делекторская В.В., Кушлинский Н.Е. Маркеры опухолевого роста, ангиогенеза и инвазии в сыворотке крови при колоректальном раке / В материалах XXVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая лаборатория: от аналитики к диагнозу» (Москва, 12-14 мая 2021 г.) // Клиническая лабораторная диагностика (приложение).-2021.-Т. 66, № 4.-с.48.

## **СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

ВКМ – внеклеточный матрикс

ИГХ – иммуногистохимия

ИФА – иммуноферментный анализ

КРР – колоректальный рак

ММП – матриксная металлопротеиназа

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

РМЖ – рак молочной железы

ТИМП – тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ