

На правах рукописи

ТИМОФЕЕВ
Юрий Сергеевич

**СИСТЕМА ИНСУЛИНОПОДОБНЫХ ФАКТОРОВ РОСТА
У БОЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ КОСТЕЙ:
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ**

14.03.10 - клиническая лабораторная диагностика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2016

Работа выполнена на кафедре терапии и интегративной медицины института ДПО «Экстремальная медицина» ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова» МЧС России

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Кушлинский Николай Евгеньевич

Официальные оппоненты:

Иванов Андрей Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Карпищенко Анатолий Иванович, доктор медицинских наук, профессор, клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Государственное бюджетное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последиplomного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « » 2016 г. часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени 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 имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте <http://www.arcerm.spb.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Санников М. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Опухоли костей – редко встречающаяся, по сравнению с другими онкологическими заболеваниями, группа новообразований. Опухоли костей в общей структуре онкологических заболеваний занимают 1-2%, поражают преимущественно пациентов детского возраста, отличаются крайне агрессивным клиническим течением, поэтому требуют комплексного подхода к лечению – радикального хирургического удаления опухоли, лучевой терапии и химиотерапии [Алиев М. Д., 2008]. При этом эффективность терапии первичных сарком костей зачастую является недостаточной, а количество побочных эффектов весьма значительно [Алиев М. Д., 2014].

К наиболее распространенным первичным злокачественным опухолям костей относятся остеосаркома, хондросаркома, саркома Юинга, а также пограничная (с неопределенным злокачественным потенциалом) - гигантоклеточная опухоль кости [Unni K. K., 2006]. Максимальный пик заболеваемости остеосаркомой наблюдается в пубертатном периоде (15-18 лет), саркома Юинга чаще выявляется во 2-м и 3-м десятилетиях жизни, а хондросаркомой и гигантоклеточной опухолью кости болеют люди в возрасте 3-й и 4-й декады жизни. Среди первичных опухолей костей остеосаркома составляет 35,1%, хондросаркома – 25,8%, саркома Юинга - 16,0%, хордома – 8,4%, недифференцированная плеоморфная саркома – 5,7%, ангиосаркома – 1,4% и другие типы – 7,6% [Мусаев Э. Р., 2010].

Учитывая низкую заболеваемость опухолями костей, практические онкологи мало знакомы с данной группой патологий, что серьезным образом осложняет раннее выявление этих новообразований и назначение своевременного лечения. Для большинства опухолей костей локальная симптоматика является неспецифичной и часто представлена болевыми ощущениями в пораженной области [Friebele J. C., 2015]. В настоящее время основным методом диагностики опухолей костей считают гистологическое исследование материала, полученного при биопсии новообразования, и рентгенологическое исследование пораженной кости.

Известно, что система инсулиноподобного фактора роста (система-ИФР) влияет на развитие злокачественного фенотипа различных опухолей, посредством воздействия на клеточный цикл, оказывает антиапоптотическое влияние и активирует в опухоли процессы неоангиогенеза. Компоненты системы-ИФР могут играть важную роль в деградации внеклеточного матрикса и тем самым усиливать процессы инвазии и метастазирования в результате стимуляции продукции матриксных металлопротеаз (ММП).

Основными компонентами системы-ИФР являются инсулиноподобные факторы роста I и II типа (ИФР-I, ИФР-II), рецептор ИФР-I (ИФР-IP), рецептор инсулина, а также маннозо-6-фосфат/ИФР-II рецептор (ИФР-IP). Помимо этого в систему входят белки, связывающие инсулиноподобные факторы роста 1-10 (ИФРСБ 1-10), которые оказывают модулирующее влияние на действие лигандов, связывая и высвобождая их. Система-ИФР оказывает влияние на такие процессы, как рост, выживание, пролиферация и дифференцировка клеток.

Степень разработанности темы. Влияние системы-ИФР на развитие новообразований костей изучали в ряде преclinical и клинических исследований [Conover C.A., 2008; Ressler S., 2009]. Повышенная экспрессия ИФР-I и ИФР-II отмечена в клеточных линиях остеосаркомы. Также выявлен ряд генетических нарушений при остеосаркоме, которые могли приводить к изменению работы системы-ИФР [Rikhof B., 2009]. Имеются данные о зависимости клеток саркомы Юинга от сигнала рецептора ИФР-IP [Manara M.C., 2007]. В патогенезе плеоморфной недифференцированной саркомы ИФР-система играет важную роль, индуцируя ассоциированную с опухолью гипогликемию. Система-ИФР, главным образом ИФР-IP, может стать перспективной мишенью химиотерапии при опухолях костей [Harwood J.L., 2015]. В исследованиях *in vitro* изучен ряд ингибиторов тирозинкиназной активности ИФР-IP, таких как: GSK1838705A, ADW742, ADW742 + доксорубин + иматиниб или винкристин, BMS-754807, которые демонстрировали эффект ингибирования ИФР-IP и, как следствие, высокий уровень снижения клеточной выживаемости, блокирование сигнальных путей и редукцию роста опухоли [Sabbatini P., 2009]. В клинических исследованиях первой фазы, изучали влияние препаратов, подавляющих активность данного рецептора при саркоме Юинга, однако результаты их были неоднозначными [Kurczok R., 2010, Garofalo C., 2012]. В зарубежных публикациях освещаются также вопросы анализа компонентов системы-ИФР в ткани опухоли, в то же время имеется недостаточно информации по исследованию данных факторов в периферической крови [Rodriguez-Galindo C., 2001; Gu F., 2010; Borinstein S.C., 2014]. Остаются до конца не разработанными методы неинвазивной лабораторной диагностики и оценки прогноза опухолей костей с применением сывороточных уровней компонентов системы-ИФР. В этой связи актуальным является дальнейшее изучение и внедрение эффективных лабораторных иммуноферментных и генетических маркеров в диагностике и прогнозе первичных опухолей костей.

Цель исследования: оценить возможность использования компонентов системы-ИФР в сыворотке крови больных новообразованиями костей для оптимизации их диагностики и прогноза, а также проанализировать роль геномных полиморфизмов, ассоциированных с данной системой в формировании предрасположенности к развитию опухолей костей.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ содержания ИФР-I, ИФР-II, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови у практически здоровых людей и нелеченых больных злокачественными, пограничными, доброкачественными новообразованиями костей методом ИФА, выявить связь уровня аналитов с клинико-морфологическими особенностями заболеваний.
2. Проанализировать прогностическую значимость определения показателей системы-ИФР в сыворотке крови при оценке общей и безрецидивной выживаемости больных опухолями костей.
3. Методом минисеквенирования с масс-спектрометрической детекцией выявить варианты одиночных нуклеотидных полиморфизмов

rs7921(*GHI*), rs7956547(*IGF1*) в геномной ДНК больных новообразованиями костей и здоровых людей для оценки их связи с риском развития данной патологии.

4. Предложить комплекс генетических и иммуноферментных методов анализа системы-ИФР для оценки предрасположенности, улучшения неинвазивной диагностики и прогнозирования общей и безрецидивной выживаемости больных новообразованиями костей.

Научная новизна исследования

Впервые проведено комплексное исследование компонентов системы-ИФР (ИФР-I, ИФР-II, ИФРСБ-1, ИФРСБ-3) в сыворотке крови больных с впервые выявленными злокачественными, пограничными и доброкачественными опухолями костей и проведен анализ связи уровня вышеуказанных факторов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания и отдаленными результатами лечения.

Доказано, что уровни ИФР-I в сыворотке крови пациентов с новообразованиями костей зависят от гистологического типа опухолей, пола и возраста пациентов. Впервые отмечено, что исходные уровни ИФР-I в сыворотке крови достоверно связаны с менее благоприятным прогнозом безрецидивной выживаемости у больных хондросаркомой и общей выживаемостью среди пациентов с саркомой Юинга.

Выявлено достоверное повышение уровней ИФР-II в сыворотке крови больных злокачественными опухолями, относительно доброкачественных новообразований и контроля. Впервые выявлена связь ИФР-II с гистологическим типом опухоли и прогнозом общей выживаемости больных остеосаркомой.

Впервые обнаружены наиболее высокие уровни ИФРСБ-3 в сыворотке крови больных доброкачественными опухолями костей, при этом у больных саркомами костей повышенные уровни ИФРСБ-3 связаны с неблагоприятными показателями безрецидивной и общей выживаемости.

Впервые отмечена достоверная связь сывороточных уровней ИФРСБ-1 и ИФР-II со степенью дифференцировки хондросаркомы.

Не установлено достоверных связей ИФР-I и ИФР-II, ИФРСБ-3 с локализацией опухолевого очага, типом пораженной кости, размером опухоли, стадией заболевания, в то время как уровень ИФРСБ-1 в сыворотке крови продемонстрировал достоверную корреляционную связь с размером первичной опухоли.

Впервые проанализированы ассоциации полиморфизмов rs7921(*GHI*), rs7956547(*IGF1*) с развитием новообразований костей различных гистологических типов. Выявлена достоверная ассоциация полиморфизма *IGF1*.rs7956547 с развитием опухолей костей, при этом аллель С является аллелем риска.

Теоретическая и практическая значимость

Изучены новые теоретические аспекты функционирования системы-ИФР при новообразованиях костей различных гистологических типов.

Показана возможность использования значений ИФР-I и ИФР-II в сыворотке крови в качестве потенциальных маркеров оценки характера новообразования костей. Диагностическая чувствительность ИФР-I у пациентов мужского

пола с остеосаркомой составила 84%, с хондросаркомой - 62,5%, с саркомой Юинга - 75%, при специфичности 95%, что позволяет использовать ИФР-I для диагностики в данной гендерной группе. Диагностическая чувствительность ИФР-II достигала 75% при злокачественных опухолях костей при специфичности 88,8% вне зависимости от пола, при этом наибольшая чувствительность маркера имела место при хондросаркоме - 90% и саркоме Юинга - 77,8%. Показано, что комплексное исследование ИФР-I и ИФР-II позволяет повысить чувствительность теста до 80% в группе больных злокачественными опухолями костей.

Факторами прогноза при остеосаркоме могут служить базальные сывороточные уровни ИФР-I, ИФР-II, ИФРСБ-3, при хондросаркоме – ИФР-I, при саркоме Юинга – ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3.

Доказано, что аллель С, расположенный в полиморфизме *IGF1.rs7956547*, является фактором риска и может стать одним из компонентов методик для выявления предрасположенности к развитию опухолей костей.

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертационной работы является комплексное исследование молекулярных аспектов системы-ИФР при опухолях костей с использованием иммуноферментных и генетических тестов, выполненных с использованием современного оборудования и методик. В исследовании учитывали клинико-морфологические особенности опухолей костей на основании общеклинических, рентгенологических и гистологических данных. В диссертационном исследовании проводили статистический анализ показателей выживаемости с учетом изучаемых лабораторных маркеров.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Лиганды ИФР-I и ИФР-II являются информативными диагностическими маркерами уточнения характера новообразования кости, при этом продукция ИФР-I зависит от гистологического типа опухоли, пола и возраста, а уровни ИФР-II связаны только с гистологическим типом опухоли и степенью ее дифференцировки. ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 не могут быть использованы в качестве диагностических маркеров у больных опухолями костей.

2. Повышенный уровень ИФР-I - неблагоприятный фактор прогноза безрецидивной выживаемости при хондросаркоме и общей выживаемости при саркоме Юинга, а ИФР-II – общей выживаемости при остеосаркоме. ИФРСБ-1 – маркер неблагоприятного прогноза общей и безрецидивной выживаемости больных саркомой Юинга, а ИФРСБ-3 - у больных остеосаркомой и саркомой Юинга.

3. Аллель С в нуклеотидном полиморфизме гена *IGF1* - *rs7956547* - фактор риска развития злокачественных и пограничных опухолей костей. Вариации полиморфизма *rs7921* в гене *GHI* не влияют на предрасположенность к развитию опухолей костей.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Степень достоверности диссертационного исследования основана на полном соответствии с запланированным дизайном, достаточном количестве обследован-

ных пациентов (113 больных опухолями костей), использовании современных лабораторных методик. Применяемые методы статистического анализа полностью соответствуют поставленным задачам. Полученные результаты исследования отвечают современным взглядам на изучаемую проблему и согласуются с отечественными и зарубежными публикациями по данной тематике.

Материалы диссертации доложены на XXI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 7-11 апреля 2014 г.); 26th Annual Meeting of the European Musculo-Skeletal Oncology Society meeting (EMSOS) meeting (Gothenburg, Sweden from May 29-31, 2013); EMSOS 2014 - 27th Annual Meeting of the European Musculo-Skeletal Oncology Society (EMSOS) (Vienna, May 22-23, 2014, Austria); XVIII Форуме «Национальные дни лабораторной медицины России - 2014» (Москва, 1-3 октября 2014 г.); Научно-практической конференции «Актуальные вопросы диагностики и лечения опухолей костей у детей» (Москва, 13-14 ноября 2014 г.); XIX Форуме «Российский конгресс лабораторной медицины (Москва, 30 сентября – 2 октября 2015 г.); Международном научно-практическом конгрессе «Многопрофильная клиника XXI века. Передовые медицинские технологии» (Санкт-Петербург, 26-28 мая 2016 г.).

Диссертация апробирована на совместной научной конференции сотрудников кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики и кафедры онкологии ФДПО ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет» Минздрава России, централизованного клиничко-лабораторного отдела и отдела общей онкологии НИИ клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Личный вклад автора в исследование. Все этапы диссертационной работы выполнены при непосредственном участии автора. Автор разработал дизайн диссертационной работы, выполнял сбор биологического материала, самостоятельно проводил лабораторные исследования. Диссертантом проведена комплексная статистическая обработка данных исследования, интерпретация полученных результатов с последующим формулированием выводов и практических рекомендаций.

Внедрение результатов работы в практику. Полученные результаты исследования внедрены в клиническую практику лаборатории клинической биохимии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Материалы диссертации используют на лекционных, семинарских занятиях с курсантами циклов повышения квалификации врачей на кафедре клинической биохимии и лабораторной диагностики ФДПО ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 10 научных работ, из них 7 статей в научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, в журналах, рекомендованных ВАК для опубликования основных результатов диссертации.

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 144 листа машинописного текста. Указатель литературы содержит 214, из них 20 работ отечественных и 194 зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 49 таблицами и 23 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клинико-лабораторные исследования выполнены на базе кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования ГОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет» Минздрава России и лаборатории клинической биохимии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (зав. лабораторией профессор Кушлинский Н. Е.). Обследование больных проводили при их информированном согласии с соблюдением этических норм в соответствии с требованиями Независимого локального этического комитета при ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

В исследование включено 113 больных злокачественными (65,4%), пограничными (12,3%) и доброкачественными (22,1%) новообразованиями костей, которые поступили на лечение в отдел общей онкологии (рук. отдела профессор, академик РАН Алиев М.Д.) НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2011 по 2014 гг. Опухоль у обследованных пациентов выявлена впервые и все они в период забора образцов сыворотки и плазмы крови не получали специфического лечения. В контрольную группу по иммуноферментному исследованию маркеров системы ИФР включили 49 практически здоровых людей соответствующего возраста и пола. Контрольную группу для молекулярно-генетических исследований составили 90 практически здоровых людей без онкологических заболеваний.

В группу 74 больных злокачественными опухолями костей вошли 47 мужчин и 27 женщин в возрасте от 15 до 69 лет со следующими гистологическими вариантами: остеосаркома (n=25), хондросаркома (n=21), саркома Юинга (n=18), недифференцированная плеоморфная саркома (n=5) и хордома (n=5). У 47 больных опухолью были поражены трубчатые кости, в 27 наблюдениях – плоские. Больные злокачественными опухолями костей получали комбинированное лечение, включающее адьювантную и/или неоадьювантную химиотерапию, а также хирургическое лечение, согласно современным стандартам.

В группу больных с пограничной (гигантоклеточной) опухолью кости вошли 7 мужчин и 7 женщин в возрасте от 15 до 58 лет. У больных гигантоклеточной опухолью выполняли хирургическое удаление новообразования.

В группу больных доброкачественными новообразованиями и опухолеподобных поражений костей вошли 6 мужчин и 19 женщин в возрасте от 15 до 68 лет со следующими нозологическими вариантами: костно-хрящевой экзостоз

(3), остеобластома (2), остеома (2), хондробластома (4), аневризмальная костная киста (3), энхондрома (3), доброкачественная фиброзная гистиоцитома (2), остеохондрома (3), фиброзная дисплазия (3). У больных доброкачественными новообразованиями выполняли хирургическое удаление опухоли.

Содержание ИФР-I, ИФР-II, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 определяли в сыворотке крови, взятой у пациентов и здоровых людей натощак утром с 8:00 до 9:00 из кубитальной вены с помощью системы для сбора крови S-Monovette ("Sarstedt", Германия). Обработку образцов цельной крови проводили методом центрифугирования при 3000 об/мин при 8°C на центрифуге Rotina 380 ("Hettich Zentrifugen", Германия). Полученную сыворотку разливали по 400-500 мкл в пластиковые пробирки и хранили при -70°C до проведения анализа. Определение маркеров системы-ИФР проводили иммуноферментным методом «сэндвичевого типа» с помощью наборов реактивов фирмы «Diagnostic System Laboratories, Inc». (США) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Для считывания абсорбции использовали автоматический ридер "Elx 800" ("Biotek Instruments Inc.", США). Построение калибровочных кривых и расчет концентраций проводили в программе DYNATECH P.C. SOFTWARE.

Молекулярно-генетические методы исследования. Исследованы полиморфизмы в следующих генах (символ гена): гормон роста 1 типа (*GHI*) и инсулиноподобный фактор роста I типа (*IGF-I*) и для каждого, соответственно, идентификатор полиморфизма в базе данных dbSNP NCBI rs7921 и rs7956547.

Для анализа использовали геномную ДНК, выделенную из 5 мл лейкоцитарной фракции крови с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя. Определение аллелей нуклеотидных полиморфизмов проведено посредством реакции минисеквенирования с последующим масс-спектрометрическим анализом продуктов реакции на времяпролетном масс-спектрометре (MALDI-TOF минисеквенирование). Спектры получали с использованием MALDI-времяпролетного масс-спектрометра Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия). Для анализа использовали программное обеспечение фирмы Bruker Daltonics (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11).

Статистическая обработка данных. Проводили в программе «Statistica 7.0» (StatSoft Inc), с использованием модулей «Basic statistics and tables», «ANOVA», «Nonparametrics», «Advanced linear/Nonlinear Models». Использовали параметрические и непараметрические методы. Для выявления различий между несколькими группами проводили дисперсионный анализ (one-way ANOVA, main effects ANOVA). Достоверность различий определяли методом наименьших квадратов (LSD panel of comparison). Для малых выборок и для типа распределения отличного от нормального достоверность различий средних значений между двумя группами оценивали с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test), для сравнения нескольких групп тест Краскелла-Уоллиса (Kruskal-Wallis Multiple Comparisons test). Различия считали достоверными при $p < 0,05$ и высокодостоверными при $p < 0,001$.

Корреляционные связи оценивали с помощью параметрического коэффициента корреляции Пирсона, также для малых выборок и для типа распределения отличного от нормального применяли ранговый коэффициент корреляции Спирмена (Spearman Rank Order Correlations).

Анализ кривых выживаемости проводили методом Kaplan-Mayer, сравнения кривых выживаемости проводили с использованием критерия Log-Rank.

Для анализа результатов генотипирования использовали статистическую программу R-studio с использованием пакета SNPassoc, предназначенного для анализа геномных ассоциаций и построения моделей наследования.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровни ИФР-I, ИФР-II, ИФРСБ-1, ИФРСБ-3 в основных группах. Уровни ИФР-I и ИФР-II, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 у больных опухолями костей высоко достоверно отличались от контроля (табл. 1). Выделены пороговые уровни маркеров исходя из референсного интервала контроля: ИФР-I – 243 нг/мл, ИФР-II – 1700 нг/мл, ИФРСБ-1 – 68 нг/мл, ИФРСБ-3 – 5500 нг/мл.

Таблица 1. Содержание основных компонентов системы-ИФР в сыворотке крови здоровых людей и в общей группе больных опухолями костей

Показатель	ИФР-I, нг/мл		ИФР-II, нг/мл	
	Контроль	Опухоли	Контроль	Опухоли
Группы				
N	49	113	49	113
Медиана	142	222	1452	1858
Квартили	126-172	159-302	1337-1579	1532-2117
Среднее ± SE	154±6,5	241±11	1457±38	1892±45
Пределы колебаний	73,6-296	55,5-645	594-2150	807-3662
P	<0,001		<0,001	
Показатель	ИФРСБ-1, нг/мл		ИФРСБ-3, нг/мл	
	Контроль	Опухоли	Контроль	Опухоли
Группы				
N	49	113	49	113
Медиана	16,6	31,2	4084	113
Квартили	5,7-35,3	19,9-41,6	3487-4710	5175
Среднее ± SE	23,9±3,2	33,1±2,1	4106±125	4339-6136
Пределы колебаний	2,7-90,1	0,6-132	1943-5831	5306±126
P	<0,05		<0,001	

Показатели системы-ИФР при злокачественных (ЗОК), пограничных (ПОК) и доброкачественных (ДОК) опухолях костей представлены в таблице 2.

Уровни ИФР-I в сыворотке крови больных злокачественными, пограничными и доброкачественными опухолями костей не различались, но достоверно отличались от контрольной группы. Уровни ИФР-II в сыворотке крови больных саркомами и пограничными опухолями достоверно превышали его показатели при доброкачественных новообразованиях и в контроле. При использовании

ROC-анализа получено пороговое значение ИФР-II (1700 нг/мл), при котором диагностическая специфичность относительно контроля была ниже (88,8%), но в то же время возросла диагностическая чувствительность (75%) для ЗОК и ПОК (92%).

Уровни ИФРСБ-1 не различались между группами больных саркомами костей, но отличались от контроля. Уровни ИФРСБ-3 в сыворотке крови при доброкачественных новообразованиях костей с высокой степенью достоверности превышали его медианы в группах больных пограничными и злокачественными опухолями костей, а также в контрольной группе. Медианы уровней ИФРСБ-3 в сыворотке крови пациентов со злокачественными и пограничными опухолями костей были также достоверно выше, чем в контрольной группе (табл. 3).

Таблица 2. Содержание ИФР-I и ИФР-II в сыворотке крови больных злокачественными, пограничными и доброкачественными опухолями костей

Показатели	Контроль	Группы больных опухолями костей		
		ЗОК	ПОК	ДОК
N	49	74	14	25
Медиана ИФР-I	142	245	220	182
Квартили ИФР-I	126-172	180-308	150-320	157-246
Среднее \pm SE ИФР-I	154 \pm 6,5	250 \pm 13	243 \pm 31	212 \pm 22
Колебания ИФР-I	73,6-296	55,5-645	78,4-486	76,9-485
Частота ИФР-I выше 243 нг/мл	5,0%	51,3%	42,8%	28,0%
Различия с контролем (p)	-	<0,001	<0,001	<0,05
Показатели	Контроль	Группы больных опухолями костей		
		ЗОК	ПОК	ДОК
N	49	74	14	25
Медиана ИФР-II	1452	1918	1892	1488
Квартили ИФР-II	1337-1579	1674-2259	1793-2252	1340-1784
Среднее \pm SE ИФР-II	1457 \pm 38	1983 \pm 59	1991 \pm 86	1569 \pm 63
Колебания ИФР-II	594-2150	808-3662	1418-2552	1119-2170
Частота ИФР-II выше 1700 нг/мл	11,2%	75,0%	92,0%	30,0%
$P_{\text{к/зok}} < 0,001$; $P_{\text{к/пoc}} < 0,001$; $P_{\text{зok/доk}} < 0,001$; $P_{\text{пoc/доk}} < 0,01$				

Полагаем, что возможно использование ИФР-I и ИФР-II как дополнительных маркеров злокачественных опухолей костей, направленных на предварительную оценку характера новообразования, в комплексе с другими клиническими, инструментальными и лабораторными методами. При изолированном

использовании ИФР-I показал диагностическую чувствительность для злокачественных опухолей костей равную 51,3% (при специфичности 95%), а ИФР-II – 75% (при специфичности 88,8%). У 80% больных злокачественными опухолями костей был повышен хотя бы один из изученных маркеров, в то время как оба маркера были повышены у 43% пациентов. У здоровых людей ни в одном наблюдении не обнаружено одновременное повышение ИФР-I и ИФР-II выше порогового уровня. Повышенные значения ИФРСБ-3 (более 5500 нг/мл) характерны для доброкачественных опухолей.

Таблица 3. Содержание ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови больных злокачественными, пограничными и доброкачественными опухолями костей

Показатели	Контроль	Группы больных опухолями костей		
		ЗОК	ПОК	ДОК
N	49	74	14	25
Медиана ИФРСБ-1	16,6	31,6	32,6	29,8
Квартили ИФРСБ-1	5,7-35,3	21,1-41,4	19,8-41,3	11,7-46,5
М ± SE ИФРСБ-1	23,9±3,2	33,2±2,5	32,6±4,8	33,7±5,3
Колебания ИФРСБ-1	2,7-90,1	1,5-132	6,5-78,8	0,6-92,5
Частота ИФРСБ-1 выше 68 нг/мл	5,0%	5,4%	7,0%	8,0%
Различия с контролем (p)	-	P_{к/зОК}<0,01	-	-

Показатели	Контроль	Группы больных опухолями костей		
		ЗОК	ПОК	ДОК
N	49	74	14	25
Медиана ИФРСБ-3	4084	4977	4748	6031
Квартили ИФРСБ-3	3487-4710	4328-5920	3993-5800	4948-7023
М ± SE ИФРСБ-3	4106±125	5127±135	4894±259	6128±352
Колебания ИФРСБ-3	1943-5831	1967-8269	3500-6371	3424-10210
Частота ИФРСБ-3 выше 5500 нг/мл	5,0%	31,5%	21,4%	65,2%
P_{кvsЗОК}<0,001; P_{кvsПОК}<0,01; P_{кvsДОК}<0,001; P_{ДОКvsЗОК}<0,001; P_{ПОКvsДОК}<0,001				

Компоненты системы-ИФР при различных гистологических типах сарком костей. Наиболее высокие медианы ИФР-I наблюдали при остеосаркоме и саркоме Юинга, в то время как значения данного показателя при хондросаркоме были достоверно ниже. Частота превышения порогового уровня ИФР-I (243 нг/мл) у пациентов с остеосаркомой составила 64%, при саркоме Юинга - 72%. Максимальные значения ИФР-I также выявлены у больных остеосаркомой и саркомой Юинга. Низкие уровни ИФР-I отмечены при хордومه (табл. 4). Дисперсионный анализ выявил достоверные различия уровней ИФР-II при остеосаркоме с уровнями этого лиганда при хордومه и плеоморфной недифференцированной саркоме. Максимальное значение ИФР-II обнаружено у пациен-

тов с остеосаркомой. Частота превышения порогового уровня ИФР-II (1700 нг/мл) достигала наиболее высоких значений у больных остеосаркомой (76%), саркомой Юинга (77%) и хондросаркомой (90%). Содержание ИФР-I при остеосаркоме и саркоме Юинга достоверно превышало содержание данных маркеров в контроле и у больных доброкачественными опухолями костей.

Таблица 4. Содержание ИФР-I и ИФР-II в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей различного гистологического строения

Гистологический Вариант	N	Медиа- на	Кварти- ли	Пределы	Частота выше порогового уровня
ИФР-I, нг/мл					
Остеосаркома ¹	25	274	189-344	55,5-644	64,0%
Хондросаркома ²	21	217	147-260	67,1-363	33,0%
Саркома Юинга ³	18	291	194-328	103-475	72,0%
Плеоморфная недифференцированная саркома ⁴	5	235	182-289	118-334	40,0%
Хордома ⁵	5	142	79,1-145	60,9-164	0,0%
$P_{1vs2}<0,01$; $P_{1vs5}<0,001$; $P_{2vs3}<0,05$; $P_{2vs5}<0,05$; $P_{\text{ПОКvsДОК}}<0,001$					
ИФР-II, нг/мл					
Остеосаркома ¹	25	2040	1701-2461	808-3662	76,0%
Хондросаркома ²	21	1924	1850-2252	1291-2928	90,0%
Саркома Юинга ³	18	1893	1753-2118	1128-3418	77,8%
Плеоморфная недифференцированная саркома ⁴	5	1582	1478-1749	1383-1937	40,0%
Хордома ⁵	5	1574	1525-1762	1206-1965	40,0%
$P_{1vs4}<0,05$; $P_{1vs5}<0,05$					

Уровни ИФР-II при остеосаркоме, хондросаркоме и саркоме Юинга отличались как от контроля, так и от группы доброкачественных опухолей костей. Не обнаружено достоверных различий в содержании регуляторных белков ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 у больных злокачественными опухолями костей в зависимости от их гистологического типа. Только у пациентов с остеосаркомой уровни ИФРСБ-1 достоверно ($p=0,002$) отличались от контрольной группы. В то же время медианы ИФРСБ-3 у пациентов с остеосаркомой (5117 нг/мл), саркомой Юинга (4839 нг/мл) и хондросаркомой (4987 нг/мл) были достоверно выше медиан этого белка в контроле (4084 нг/мл) и ниже, чем у больных доброкачественными новообразованиями (6031 нг/мл) костей. У больных хондросаркомой кости отмечена достоверная связь маркеров системы-ИФР со степенью дифференцировки и степенью злокачественности по шкале «Grade 4».

Содержание компонентов системы-ИФР в сыворотке крови больных новообразованиями костей с учетом их возраста и пола. Для уровней ИФР-I выявлена достоверная отрицательная корреляционная связь с возрастом у больных доброкачественными опухолями ($R=-0,72$) и саркомами костей ($R=-0,63$) костей.

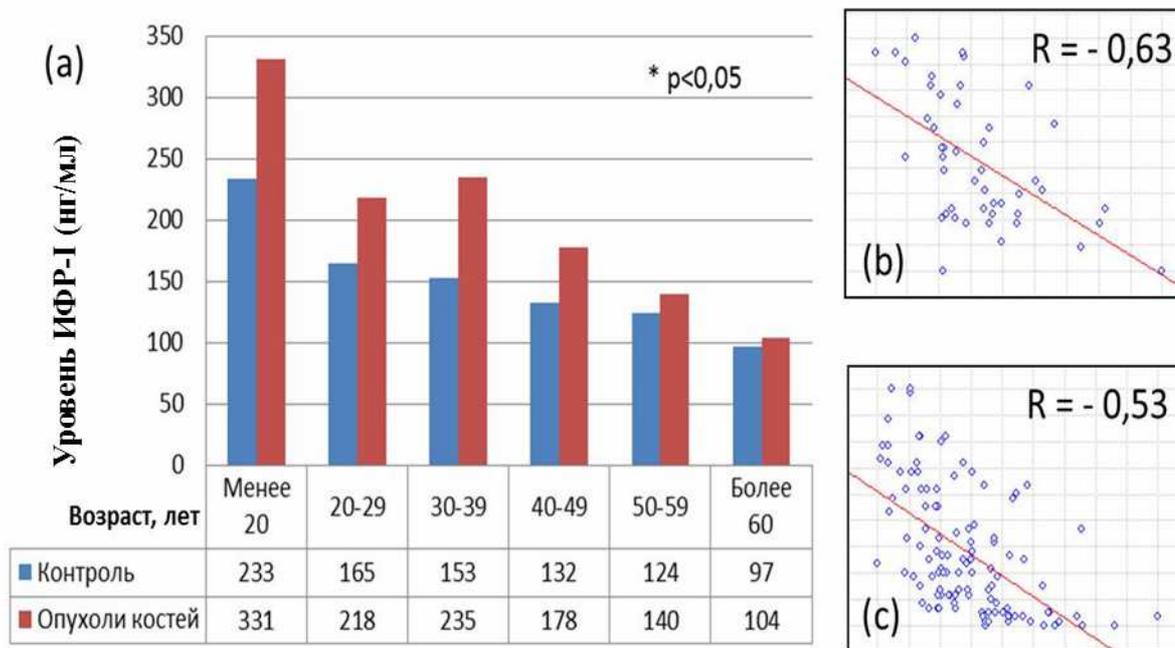


Рис. 1. Связь уровней ИФР-I в сыворотке крови с возрастом больных опухолями костей и в контрольной группе: *a* – уровни ИФР-I в различных возрастных группах, *b* – корреляция ИФР-I с возрастом в контрольной группе, *c* – корреляция ИФР-I с возрастом в группе опухолей костей.

Поскольку ИФР-I оказался фактором, который зависит от возраста, необходимо было проведение анализа уровней маркера в разных возрастных группах больных и в контроле. Из данных рисунка 1 следует, что во всех возрастных группах больных наблюдаются отличия уровней ИФР-I от контроля. Для преобладающей группы пациентов со злокачественными опухолями костей в возрасте до 25 лет диагностическая чувствительность ИФР-I при пороговом его уровне 243 нг/мл составила 80%, при специфичности 95,5%. Для старших возрастных групп были рассчитаны соответствующие пороговые значения. При этом чувствительность в группах больных старшего возраста для ИФР-I была ниже. Таким образом, ИФР-I продемонстрировал наибольшую диагностическую эффективность у пациентов со злокачественными опухолями в возрасте до 25 лет.

В отличие от группы контроля, достоверные различия в уровнях ИФР-I выявлены между больными мужского и женского пола. Частота превышения порогового значения ИФР-I в сыворотке крови (243 нг/мл) выявлена у 70,2% мужчин с саркомами костей и только у 18,5% женщин. Так, в группе мужчин: с остеосаркомой кости частота превышения порогового уровня ИФР-I составила 84%, с хондросаркомой - 62,5%, с саркомой Юинга - 75%. Показатели ИФР-II, ИФРСБ-1, ИФРСБ-3 не зависели от пола, как в контрольной группе, так и у

больных опухолями костей. Размер опухоли, локализация и тип пораженной опухолью кости не был связан с уровнями маркеров системы-ИФР. Исключение составил ИФРСБ-1, для которого выявлена достоверная положительная корреляционная связь с размером первичной опухоли.

Связь компонентов системы-ИФР с эффективностью лечения и прогнозом у больных опухолями костей. Эффективность химиотерапии оценена у 41 больного с саркомой кости. Выявлено достоверное различие в значениях ИФРСБ-1 у пациентов, у которых химиотерапия привела к стабилизации опухолевого роста и у больных с прогрессированием процесса ($p=0,033$). При этом в группе пациентов резистентных к химиотерапии исходные показатели ИФРСБ-1 были наиболее низкими. Показатели ИФР-I, ИФР-II и ИФРСБ-3 не продемонстрировали достоверных связей с эффективностью химиотерапии.

ИФР-I - фактор прогноза безрецидивной и общей выживаемости у больных новообразованиями костей. В общей группе больных саркомами костей уровни ИФР-I в сыворотке крови достоверно связаны с прогнозом безрецидивной и общей выживаемости. Так, у пациентов с ИФР-I ≤ 243 нг/мл 1-летняя безрецидивная выживаемость составила 80,9%, 3-летняя - 70,1%; у больных с ИФР-I >243 нг/мл показатели 1- и 3-летней безрецидивной выживаемости составили соответственно 66,2% и 43,1%, а медианы соответственно 31,5 и 14,5 мес. (рис. 2). Также достоверно отличались медианы показателей общей выживаемости в группе пациентов с низкими и высокими значениями ИФР-I соответственно 47 и 25 мес. (рис. 2).

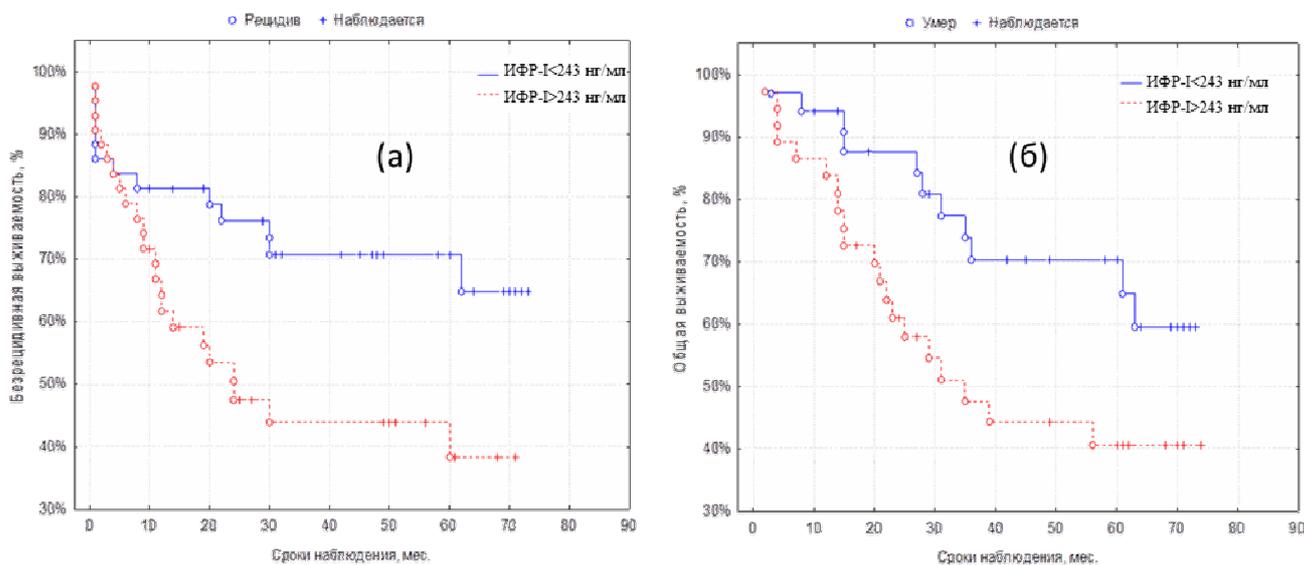


Рис. 2. Показатели безрецидивной (а) и общей (б) выживаемости в общей группе больных саркомами костей в зависимости от сывороточных уровней ИФР-I.

Выявлена связь высоких уровней ИФР-I с неблагоприятным прогнозом безрецидивной выживаемости среди больных хондросаркомой, что позволяет предположить о возможном использовании ИФР-I как фактора прогноза безрецидивной выживаемости. Также обнаружено, что медиана безрецидивной выживаемости больных саркомой Юинга с уровнями ИФР-I >243 нг/мл была в 2 раза ниже, чем с уровнями маркера ≤ 243 нг/мл. Полагаем, что ИФР-I может

быть потенциальным фактором прогноза общей выживаемости у больных саркомой Юинга.

Связь уровней ИФР-II с показателями безрецидивной и общей выживаемости больных новообразованиями костей. Показатели 1- и 3-летней безрецидивной выживаемости больных с низкими значениями ИФР-II (≤ 1968 нг/мл) составили 77,5% и 65,1%, а с высокими (>1968 нг/мл) - 66,6% и 40,2% соответственно. Достоверность данных различий не подтвердилась критерием log-rank ($p=0,11$), однако различия медиан безрецидивной выживаемости достоверны - 13,0 и 43,5 мес. с высокими и низкими значениями ИФР-II. Отмечена тенденция к низким показателям 3-летней безрецидивной выживаемости у больных остеосаркомой с высокими значениями ИФР-II. Аналогичная тенденция в различии медиан выживаемости отмечена в группе больных саркомой Юинга. Не выявлено достоверных различий ($p=0,108$) в показателях 1-летней общей выживаемости между пациентами с высокими и низкими значениями ИФР-II в сыворотке крови 88,4% и 92,5%; показатели 3-летней общей выживаемости составили 65,8% и 51,5% соответственно и не различались достоверно ($p=0,24$). В то же время анализ по конкретным нозологическим формам опухолей костей выявил связь показателей общей выживаемости с уровнями ИФР-II при остеосаркоме и не выявил достоверных ассоциаций в случае хондросаркомы и саркомы Юинга.

Связь уровней ИФРСБ-1 с показателями безрецидивной и общей выживаемости больных новообразованиями костей. Выявлены достоверные различия в показателях безрецидивной выживаемости (при пороговом уровне ИФРСБ-1 – 31 нг/мл) в общей группе больных злокачественными опухолями костей, а также у пациентов с саркомой Юинга (рис. 3).

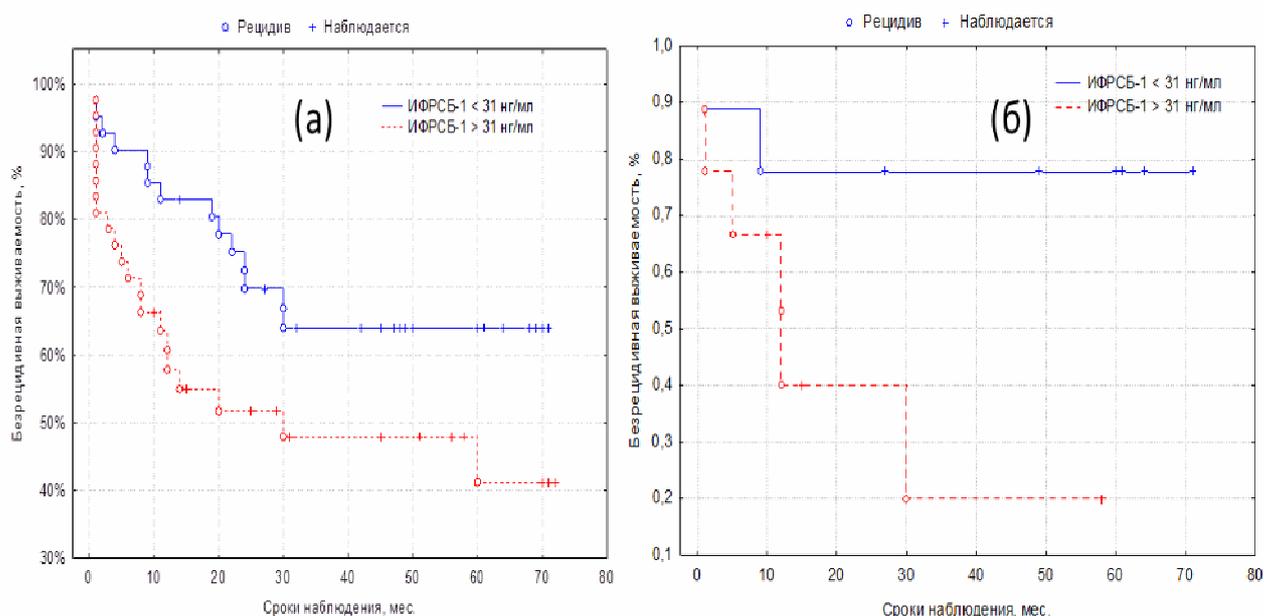


Рис. 3. Показатели безрецидивной выживаемости больных саркомами костей в зависимости от уровней ИФРСБ-1: а - общая группа; б - саркома Юинга.

Выявлена достоверная связь ($p=0,045$) повышенных уровней ИФРСБ-1 в сыворотке крови с неблагоприятным прогнозом общей выживаемости у боль-

ных саркомами костей. Так, показатели 1- и 3-летней общей выживаемости с низкими и высокими пороговыми значениями ИФРСБ-1 составили соответственно 97,0% и 82,0%, а 3-летней – 73,1% и 44,8%. Анализ в группах с различными гистологическими вариантами сарком костей выявил различия в показателях 3-летней общей выживаемости среди пациентов с саркомой Юинга при высоких и низких пороговых значениях сывороточного ИФРСБ-1 – 29,9% и 78,4% соответственно.

ИФРСБ-3 - как фактор прогноза показателей безрецидивной и общей выживаемости больных новообразованиями костей. В общей группе больных новообразованиями костей не выявлено достоверной связи исходных значений ИФРСБ-3 с показателями безрецидивной и общей выживаемости. Только в группе больных остеосаркомой с уровнями ИФРСБ-3 в сыворотке крови ≤ 5845 и >5845 нг/мл 1-летняя безрецидивная выживаемость составила 76,9% и 57,9%, 3-летняя - 56,6% и 11,6%. Медиана безрецидивной выживаемости с высокими значениями ИФРСБ-3 была в 2 раза ниже. При остеосаркоме и саркоме Юинга высокие показатели ИФРСБ-3 ассоциированы с неблагоприятным прогнозом как безрецидивной, так и общей выживаемости. Согласно полученным нами данным, уровни ИФРСБ-3 выше порогового ассоциированы с худшей 3-летней общей выживаемостью больных остеосаркомой и саркомой Юинга (рис. 4).

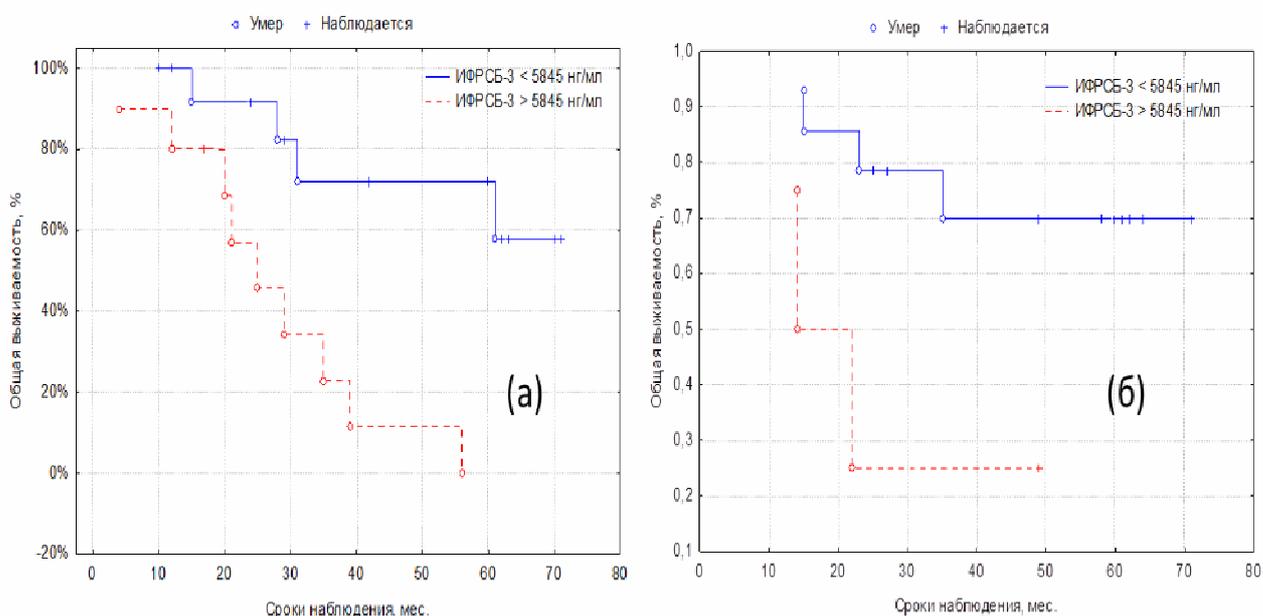


Рис. 4. Показатели общей выживаемости у пациентов с новообразованиями костей в зависимости от уровней ИФРСБ-3: а – остеосаркома; б - саркома Юинга.

Исследование точечных нуклеотидных полиморфизмов, связанных с системой-ИФР. Проведен анализ 2 нуклеотидных полиморфизмов, которые локализованы в генах, участвующих в росте и формировании костной ткани: rs7921(*GHI*), rs7956547(*IGF1*). Распределение частот генотипов в контрольной группе не отклоняются от распределения, предсказываемого законом Харди-Вайнберга. Ассоциации полиморфизмов с развитием злокачественных и погра-

ничных новообразований считались достоверными при $p < 0,05$. Были проанализированы генотипы в общей выборке пациентов, которая включала больных с доброкачественными, пограничными и злокачественными опухолями костей.

Нами выявлено достоверное различие в распределении частот аллелей между больными злокачественными и пограничными новообразованиями костей и контрольной группой, а также различие в распределении частот аллелей между группой больных новообразованиями в целом и контрольной группой для полиморфизма IGF1.rs7956547, расположенного в гене, кодирующем ИФР-I, при этом аллелем риска являлся аллель С (табл. 5).

Таблица 5. Ассоциации одиночного нуклеотидного полиморфизма IGF1.rs7956547. с различными группами новообразований костей

Генотип	Контрольная группа (%)	Больные (%)	Соотношение шансов	Достоверность
Сравнение больных со всеми новообразованиями костей и контролем				
t/t – c/t	87,5	62,3	1,00	P=0,0002
c/c	12,5	37,7	4,16	
Сравнение больных злокачественными и пограничными опухолями костей и контрольной группы				
t/t – c/t	87,5	68,1	1,00	P=0,0039
c/c	12,5	31,9	3,28	

Не выявлено связи полученных генотипов с гистологическим типом опухолей, безрецидивной и общей выживаемостью больных опухолями костей. Распределение аллелей в изученных группах больных опухолями костей было достаточно однородным. Не выявлено связей между уровнями ИФР-I, ИФР-II и ИФРСБ-1, ИФРСБ-3 в сыворотке крови и наличием того или иного аллеля или генотипа в полиморфизме IGF1.rs7956547. В то же время, полученная ассоциация при построении рецессивной модели по методологии случай-контроль позволяет предположить о связи аллеля С в точечном нуклеотидном полиморфизме IGF1.rs7956547 с развитием опухолей костей различных гистологических типов, что может быть использовано как компонент тестов для выявления предрасположенности к новообразованиям костей.

ВЫВОДЫ

1. Доказана связь сывороточных уровней ИФР-I у больных новообразованиями костей с гистологическим строением опухоли и их зависимость от пола и возраста пациентов. Наиболее высокие медианы ИФР-I выявлены у мужчин с остеосаркомой и саркомой Юинга.

2. Обнаружены достоверно более высокие уровни ИФР-II в сыворотке крови больных саркомами костей, чем при доброкачественных новообразованиях и в контроле. Показатели ИФР-II связаны с гистологическим строением опухоли и не связаны с полом и возрастом пациентов, при этом уровни маркера

достоверно выше у больных остеосаркомой, саркомой Юинга и хондросаркомой по сравнению с недифференцированной плеоморфной саркомой и хордовой кости.

3. Выявлено, что медиана ИФРСБ-1 у больных остеосаркомой достоверно превышала значения маркера в контроле, а уровни ИФРСБ-3 были достоверно выше у больных доброкачественными новообразованиями костей по сравнению с саркомами и пограничными опухолями, а также при всех гистологических вариантах сарком относительно контроля.

4. Сывороточные уровни ИФР-I, ИФР-II, ИФРСБ-3 являются факторами, независимыми от локализации опухолевого очага, типа пораженной кости, размера опухоли и стадии заболевания.

5. Выявлена достоверная связь уровней ИФРСБ-1 и ИФР-II со степенью дифференцировки хондросаркомы, а высокие показатели ИФРСБ-1 свидетельствуют об агрессивном течении хондросаркомы, для уровней ИФР-II характерна противоположная закономерность.

6. Сывороточные уровни ключевых компонентов системы ИФР выше порогового достоверно связаны: ИФР-I - с неблагоприятным прогнозом безрецидивной выживаемости больных хондросаркомой и общей выживаемости при саркоме Юинга; ИФР-II - с менее благоприятным прогнозом при остеосаркоме; ИФРСБ-1 - с менее благоприятным прогнозом общей и безрецидивной выживаемости больных саркомой Юинга; ИФРСБ-3 - с неблагоприятным прогнозом безрецидивной и общей выживаемости больных остеосаркомой и саркомой Юинга.

7. По данным анализа ассоциаций нуклеотидных полиморфизмов методом минисеквенирования, аллель С в полиморфизме IGF1.rs7956547 является аллелем риска развития злокачественных и пограничных опухолей костей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Врачам клинической лабораторной диагностики, онкологам, травматологам и ортопедам, работающим в специализированных онкологических стационарах, рекомендуется:

1. Рекомендуется использовать в качестве дополнительных диагностических маркеров ИФР-I у пациентов мужского пола в возрасте до 25 лет при остеосаркоме, саркоме Юинга (диагностическая чувствительность, соответственно, 84% и 75%, специфичность 95%) при пороговом уровне маркера в сыворотке крови - 243 нг/мл.

2. Рекомендуется использовать ИФР-II в качестве уточняющего диагностического маркера при пороговом уровне 1700 нг/мл (диагностическая чувствительность - 75%, специфичность - 89%), у пациентов с саркомами костей, независимо от пола и возраста.

3. Факторами прогноза при остеосаркоме являются базальные сывороточные уровни ИФР-I (пороговый уровень 243 нг/мл), ИФР-II (1968 нг/мл), ИФРСБ-3 (5845 нг/мл), при хондросаркоме – ИФР-I (243 нг/мл), при саркоме Юинга – ИФРСБ-1 (31 нг/мл) и ИФРСБ-3 (5845 нг/мл).

4. Рекомендуется анализ нуклеотидного полиморфизма IGF1.rs7956547 в качестве фактора риска развития злокачественных и пограничных опухолей костей (аллель С) при подозрении на первичную опухоль кости.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее изучение темы является перспективным направлением в диагностике и прогнозировании опухолей костей. В качестве перспектив дальнейшей разработки темы следует отметить:

1. Определение сывороточных уровней всего семейства регуляторных белков ИФРСБ 1-6 при новообразованиях костей;
2. Изучение роли сывороточных компонентов систем-ИФР в качестве критериев оценки эффективности терапии опухолей костей;
3. Расширение спектра нуклеотидных полиморфизмов как факторов риска развития опухолей костей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ **Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых российских научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертации**

1. Кушлинский, Н.Е. Система инсулиноподобных факторов роста / Н.Е.Кушлинский, **Ю.С.Тимофеев** // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2011. - №12. – С. 3-22.
2. Кушлинский, Н. Е. Инсулиноподобные факторы роста и связывающие их белки у больных новообразованиями костей / Н.Е. Кушлинский, **Ю.С. Тимофеев**, И.В. Бабкина, О.И. Костылева, И.В. Булычева, И.Н. Кузнецов, Ю.Н. Соловьев, М.Д. Алиев // Технологии живых систем. - 2012. - Т. 9, № 9. - С. 33-37.
3. Кушлинский, Н. Е. Ассоциации одиночных нуклеотидных полиморфизмов со злокачественными и пограничными опухолями костей у больных в российской популяции / Н.Е. Кушлинский, **Ю.С. Тимофеев**, Э.В. Генерозов, В.А. Наумов, Ю.Н. Соловьев, И.В. Булычева // Молекулярная медицина. - 2013. - №1. - С. 20-23.
4. Кушлинский, Н.Е. Опухоли костей и система инсулиноподобных факторов роста / Н.Е. Кушлинский, Ю.Н. Соловьев, **Ю.С. Тимофеев**, И.В. Бабкина, О.И. Костылева, И.В. Булычева, М.Д. Алиев // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. - 2012. - №3. - С. 53-56.
5. Кушлинский, Н. Е. Молекулярно-генетические исследования при опухолях костей / Н.Е. Кушлинский, **Ю.С. Тимофеев**, Э.В. Генерозов, И.В. Булычева, Ю.Н. Соловьев // Технологии живых систем. - 2013. - Т. 10, №2. - С. 5-17.
6. Кушлинский, Н.Е. Инсулиноподобные факторы роста и их транспортные белки в прогнозе злокачественных опухолей костей / Н.Е., Кушлинский, **Ю.С. Тимофеев**, И.В. Бабкина, Д.В. Рогожин, В.Ю. Рощин, И.В. Булычева, Ю.Н. Соловьев // Патогенез. – 2014. – №2. – С. 32-36.

7. Кушлинский, Н. Е. Ассоциации одиночных нуклеотидных полиморфизмов со злокачественными и пограничными опухолями костей / Н.Е. Кушлинский, **Ю.С. Тимофеев**, Э.В. Генерозов, В.А. Наумов, Ю.Н. Соловьев, И.В. Булычева, М.Д. Алиев // Клиническая лабораторная диагностика (биомаркеры при различных патологиях). - 2013. - №10. - С. 22-24.

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов:

8. **Тимофеев, Ю.С.** Циркулирующие маркеры системы инсулиноподобных факторов роста в прогнозе опухолей костей / **Ю.С. Тимофеев** // В материалах XIX Форума «Российский конгресс лабораторной медицины (Москва, 30 сентября – 2 октября 2015г.) // Клиническая лабораторная диагностика. - 2015. - Т. 60. - №9. - С. 33.

9. **Тимофеев Ю.С.** Сывороточные компоненты системы инсулиноподобного фактора роста у пациентов с новообразованиями костей / Ю.С. Тимофеев // В материалах Международного научно-практического конгресса «Многопрофильная клиника XXI века. Передовые медицинские технологии» под ред. С.С. Алексанина. – Спб.: Человек, 2016, - С. 206

10. **Тимофеев Ю.С.** Анализ нуклеотидных полиморфизмов rs7921(*GHI*), rs7956547(*IGF1*) при новообразованиях костей / Ю.С. Тимофеев // В материалах Международного научно-практического конгресса «Многопрофильная клиника XXI века. Передовые медицинские технологии» под ред. С.С. Алексанина. – Спб.: Человек, 2016, - С. 206