

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РАДИОЛОГИИ И ХИРУРГИЧЕСКИХ  
ТЕХНОЛОГИЙ ИМ. АК. А.М. ГРАНОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*



**ИВАНОВА**

**Анастасия Константиновна**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ТАКТИКИ АДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ  
У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ  
С УЧЕТОМ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК**

14.01.12 – Онкология, медицинские науки

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель

Орлова Рашида Вахидовна

доктор медицинских наук, профессор

Научный консультант

Раскин Григорий Александрович

доктор медицинских наук

Санкт-Петербург – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Заболеваемость раком ободочной кишки.....	12
1.2 Виды лечения местнораспространенного рака ободочной кишки.....	16
1.2.1 Хирургический метод.....	16
1.2.2 Адьювантная химиотерапия (история развития: исследования с 5-ФУ± лейковорин, исследования с оксалиплатином, длительность проведения, известные факторы риска при выборе адьювантного лечения, схемы химиотерапии)...	17
1.3 Прогностические факторы при выборе адьювантной химиотерапии ....	24
1.3.1 Индекс пролиферации (Ki 67) .....	24
1.3.2 Мутации в гене RAS .....	25
1.4 Биология опухолевого роста.....	26
1.5 Хемокины .....	28
1.5.1 Классификация цитокинов, их регуляторная роль в организме .....	28
1.5.2 Классификация хемокинов .....	30
1.5.3 Рецепторы хемокинов.....	32
1.5.4 Биологическая роль хемокинов.....	36
1.5.5 Роль хемокинов в ангиогенезе.....	37
1.5.6 Роль хемокинов в метастазировании опухоли.....	42
Глава 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	50
2.1 Характеристика Группы А.....	53
2.2 Характеристика Группы В .....	54
2.3 Методика гистологического исследования.....	55
2.4 Иммуногистохимическое исследование наличия и уровня экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CCR10 ...	57

2.5 Иммуногистохимическое исследование образца опухолевой ткани с целью оценки уровня индекса пролиферации (Ki-67) .....	59
2.6 Молекулярно-генетический анализ KRAS мутации (12, 13 кодон) ...	60
2.7 Статистическая оценка .....	61
<b>Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>63</b>
3.1 Оценка клинических факторов прогноза у больных раком ободочной кишки со II стадией T4N0M0 (Dukes B) (группа A).....	63
3.2 Оценка морфологических факторов прогноза у больных раком ободочной кишки со II стадией T4N0M0 (Dukes B) (группа A).....	68
3.3 Оценка влияния уровня экспрессии CXCR4 на степень распространения метастатического поражения у пациентов группы A .....	74
3.4 Оценка клинических факторов прогноза у больных раком ободочной кишки с III стадией T4N1-2M0 (Dukes C) (группа B) .....	76
3.5 Оценка морфологических факторов прогноза у больных раком ободочной кишки с III стадией T4N1-2M0 (Dukes C) (группа B) .....	81
3.6 Оценка влияния уровня экспрессии CXCR4 на степень распространения метастатического поражения у пациентов группы B.....	86
<b>Глава 4 СОЗДАНИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ С ПОМОЩЬЮ МНОГОФАКТОРНОГО АНАЛИЗА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ II и III СТАДИЕЙ .....</b>	<b>89</b>
4.1 Зависимость безрецидивной выживаемости от уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 в группах A и B.....	89

4.1.1 Группа А .....	89
4.1.2 Группа В.....	91
4.2 Регрессионная модель Кокса у пациентов группы А.....	92
4.3 Регрессионная модель Кокса у пациентов группы В.....	94
4.4 Регрессионная модель Кокса общей группы .....	95
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	97
ВЫВОДЫ .....	102
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Ежегодно отмечается рост впервые выявленных случаев рака ободочной кишки (РОК) как в мире, так и в РФ [132]. За последние 10 лет в нашей стране показатель заболеваемости РОК увеличился с 107,5 до 161,3 на 100 000 населения и переместился с шестого на второе место. Учитывая высокий уровень модернизации и внедрение программ скрининга, удельный вес ранних стадий РОК (I, II, III стадии) значительно вырос и составил в 2020 году 71,4%. Основным методом лечения ранних стадий РОК остается радикальная операция. При выявлении глубокой инвазии первичной опухоли (T4) или поражения региональных лимфоузлов (N1-2) всем пациентам наряду с радикальным хирургическим лечением проводится адъювантная химиотерапия (АХТ) (в 2020 году 64,2% 35,8% соответственно) [5]. Как известно, на показатель безрецидивной выживаемости (БРВ) влияет не только проводимое противоопухолевое лечение, но и биологические особенности опухоли. При РОК к основным прогностическим факторам после выполнения радикального хирургического лечения относят: низкую степень дифференцировки, наличие лимфоваскулярной/периневральной инвазии, R+, операцию в условиях кишечной непроходимости/перитонита, операцию с неадекватным объёмом лимфодиссекции – изучено менее 12 лимфоузлов, РЭА>2,35 нг/мл после операции [14]. На современном этапе развития фундаментальной онкологии известно, что РОК - это биологически гетерогенная опухоль и определение таких молекулярно-биологических маркеров как микросателлитная нестабильность (MSI), KRAS мутация, BRAF мутация, экспрессия HER2neu является хорошо изученными при метастатической стадии [4, 26, 76]. Влияние этих же факторов на показатель БРВ у больных ранними стадиями РОК в настоящее время не достаточно изучено и является предметом клинических исследований.

Исключение составляет отдельная когорта пациентов с наличием микросателитной нестабильности (MSI), которая имеет показатель 5-летней выживаемости более 90% после радикального хирургического лечения без проведения АХТ [53]. Современные практические рекомендации по определению тактики противопухолевого лечения после радикального хирургического лечения при ранних стадиях РОК не учитывают биологическую гетерогенность опухоли. Таким образом, проведение стандартного комплексного лечения без индивидуализации биологического профиля опухоли, приводит у части пациентов со II стадией к показателю БРВ не более одного года, а у части пациентов с III стадией этот показатель превышает 5 лет. По всей вероятности, на показатель БРВ у пациентов ранним РОК влияет не только стадия заболевания, но и биологическая гетерогенность опухоли.

В настоящее время идет широкий поиск дополнительных маркеров опухолевого роста, которые принимают непосредственное участие в метастазировании опухоли. Так, например, особое внимание как отечественных, так и зарубежных авторов обращено к цитокинам, а именно к их подклассу – хемокинам [20, 66]. Основным механизмом действия хемокинов является индуцирование хемотаксиса ряда клеток, а также они участвуют в межклеточных взаимодействиях и в иммунологическом ответе. Хемокины представлены, в основном, четырьмя большими семействами: CXС(a), CC(b), C(y) и CX3C(8) [117], каждое из которых взаимодействует со своими поверхностными рецепторами – CXCR, CCR, CR, CX3CR [16]. Первым был исследован хемокиновый рецептор CXCR4 и выявлена его связь с появлением метастазов в легких при раке молочной железы [62]. В эксперименте CXCR4 экспрессируется многими опухолями и ассоциируется с резким усилением ангиогенеза и более агрессивным течением опухолевого процесса [96, 104, 125]. Определение этого хемокина и изучение его влияния на показатель БРВ у больных РОК является высокоактуальным.

В связи с этим, наряду с клиническими характеристиками, изучение влияния морфологических факторов, таких как индекс пролиферации Ki-67, KRAS мутация, экспрессия хемокиновых рецепторов на показатель БРВ

у пациентов II-III стадий РОК после радикального хирургического лечения с целью оптимизации тактики АХТ является высокоактуальным.

### **Степень разработанности темы исследования**

На данный момент в мире нет комплексных клинических исследований о влиянии клиничко-мофрологических факторов на выживаемость пациентов с ранним РОК. Существует ряд факторов, которые могут помочь нам в назначении АПХТ (низкая степень дифференцировки опухоли, наличие лимфоваскулярной/периневральной инвазии и.т.д). Однако, как показывают клинические исследования РОК - это гетерогенный процесс [64] и при выборе терапии метастатического РОК молекулярно-биологический портрет опухоли обязательно учитывается. Тем не менее, пока не сделано выводов о влиянии клинических, морфологических и биологических маркеров, а так же их комбинации, на выживаемость пациентов с ранним РОК.

### **Цель исследования**

Повышение эффективности лечения больных раком ободочной кишки путем оптимизации адьювантного противоопухолевого лечения с учетом результатов анализа их клиничко-морфологических характеристик.

### **Задачи исследования**

1. Оценить показатель БРВ у пациентов с РОК при II стадии (T4N0M0) и III стадии заболевания (T1-4N1-2M0) после проведенного радикального лечения (операция±АХТ).
2. Сравнить влияние KRAS мутации, уровня пролиферации Ki67, локализации первичной опухоли, уровня РЭА в крови, дифференцировки опухоли, периневральной и сосудистой инвазии опухоли на длительность БРВ

у больных ранним РОК в различных подгруппах (подгруппа 1 –пациенты с отдаленными метастазами (ОМ), подгруппа 2- без ОМ).

3. Изучить уровень экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4, CCR10 в аденокарциноме ободочной кишки и оценить его влияние на показатель БРВ у больных с ранними стадиями РОК.
4. Определить алгоритм комплексного лечения у больных ранним РОК на основе многофакторного анализа с включением изученных клинико-морфологических характеристик.

### **Научная новизна исследования**

1. Впервые в РФ оценены новые прогностические факторы, определяющие назначение комплексного лечения больным операбельным РОК вне зависимости от стадии заболевания: правосторонняя локализация опухоли, индекс пролиферации Ki 67, экспрессия хемокинового рецептора CXCR4 и создан алгоритм лечения больных РОК на основании полученных данных.
2. Впервые в РФ была изучена экспрессия хемокиновых рецепторов CXCR4 и CCR10 в опухолевой ткани РОК и выявлено достоверное влияние экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 на показатель БРВ.
3. Впервые выделена шкала определения уровня экспрессии хемокиновых рецепторов: низкий уровень (0-30%), средний уровень (30-70%), высокий уровень (70-100%). Уровень экспрессии определялся процентом выявления рецепторов хемокинов в аденокарциноме толстой кишки.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

В результате проведенной работы показана значимость экспрессии хемокинового рецептора CXCR4, индекса пролиферации Ki67 и локализации опухоли для определения групп прогноза у пациентов ранним РОК после радикального хирургического лечения. Выделены группы благоприятного и неблагоприятного прогноза на основе изученных клинико-морфологических



характеристик, разработан алгоритм для выбора тактики лечения. Рекомендуется использовать иммуногистохимическую оценку экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 и уровня пролиферации по Ki-67. Однако необходимо помнить, что прогностическую значимость имеет низкий уровень пролиферации Ki-67 (менее 30%) и обуславливает высокий риск развития рецидивов и метастазирования в аденокарциномах толстой кишки. Высокий пролиферативный уровень не имеет самостоятельного прогностического значения, однако в совокупности с негативной реакцией на CXCR4 может определять благоприятное клиническое течение.

### **Реализация результатов исследования**

Результаты исследования рекомендованы к использованию в клинической практике СПбГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер (Санкт-Петербург).

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

1. Экспрессия хемокинового рецептора CXCR4 в опухолевой ткани у пациентов операбельным РОК более 30% является неблагоприятным прогностическим фактором вне зависимости от стадии и характеризует высокую вероятность раннего метастазирования ( $p=0,0001$ ).
2. Уровень пролиферации Ki67 менее 30% свидетельствует об агрессивности опухоли и должен учитываться при выборе тактики лечения при операбельном РОК ( $p=0,0006$ ).
3. У больных со II стадией РОК неблагоприятным фактором прогноза является правосторонняя локализации опухоли ( $p =0,0248$ ).

## **Апробация результатов исследования**

Основные результаты и положения работы доложены на :

1. Научно-практической конференции «Актуальные вопросы лечения колоректального рака», доклад на тему «Современные подходы к лекарственной терапии колоректального рака» (г. Ярославль, 05 октября 2018 г.).
2. Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Мультидисциплинарный подход: особенности междисциплинарного взаимодействия в лечении онкологических больных», доклад на тему: «Новые тенденции в лекарственной терапии опухолей ЖКТ» (Санкт-Петербург, 11-12 октября 2018 г.).
3. Конференции «Три кита клинической онкологии: химиотерапия, таргетная терапия, иммунотерапия», доклад на тему «Биология солидных опухолей и интенсивные режимы химиотерапии: сколько, кому, зачем, почему?» (Санкт-Петербург, 28 марта 2019 г.).
4. Региональной конференции с международным участием о внедрении передовых разработок в клиническую практику «Онкология будущего», доклад на тему «Экспрессия хемокиновых рецепторов как дополнительный фактор прогноза при раннем раке ободочной кишки» (Санкт-Петербург, 10-11 октября 2019 г.).

## **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, 5 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

## **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 119 страницах компьютерного текста, состоит из следующих глав: введения, обзора литературы, описания материала и методов

исследования, результатов собственного исследования, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендации. Диссертация иллюстрирована 15 таблицами и 27 рисунками. Список литературы включает в себя 132 источника из них 23 отечественных и 109 зарубежных.

## Глава 1

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1 Заболеваемость раком ободочной кишки

На сегодняшний день заболеваемость РОК по всему миру растет. По данным мировых статистик IARC, РОК является третьим по распространенности раком среди мужчин (746 000 случаев, 10,0% от общего числа) и вторым среди женщин (614 000 случаев, 9,2% от общего числа) (<http://globocan.iarc.fr>) (рисунки 1, 2).

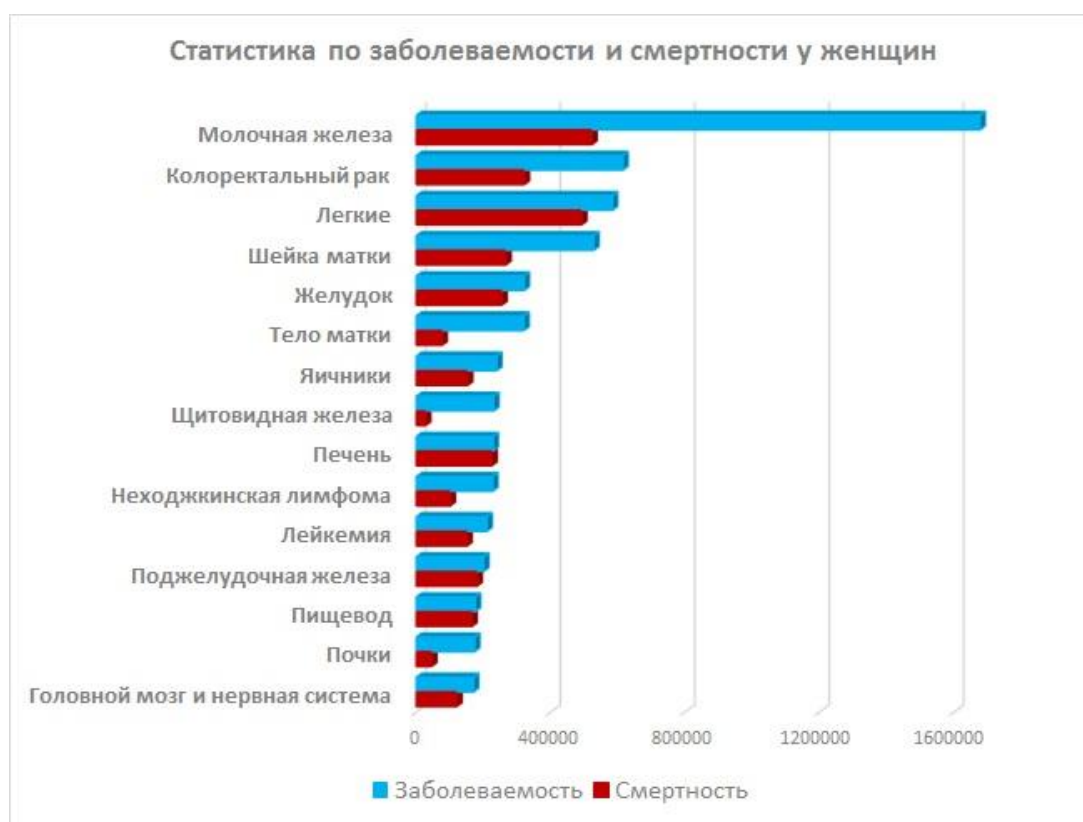


Рисунок 1 – Статистика по заболеваемости и смертности РОК в мире у женщин

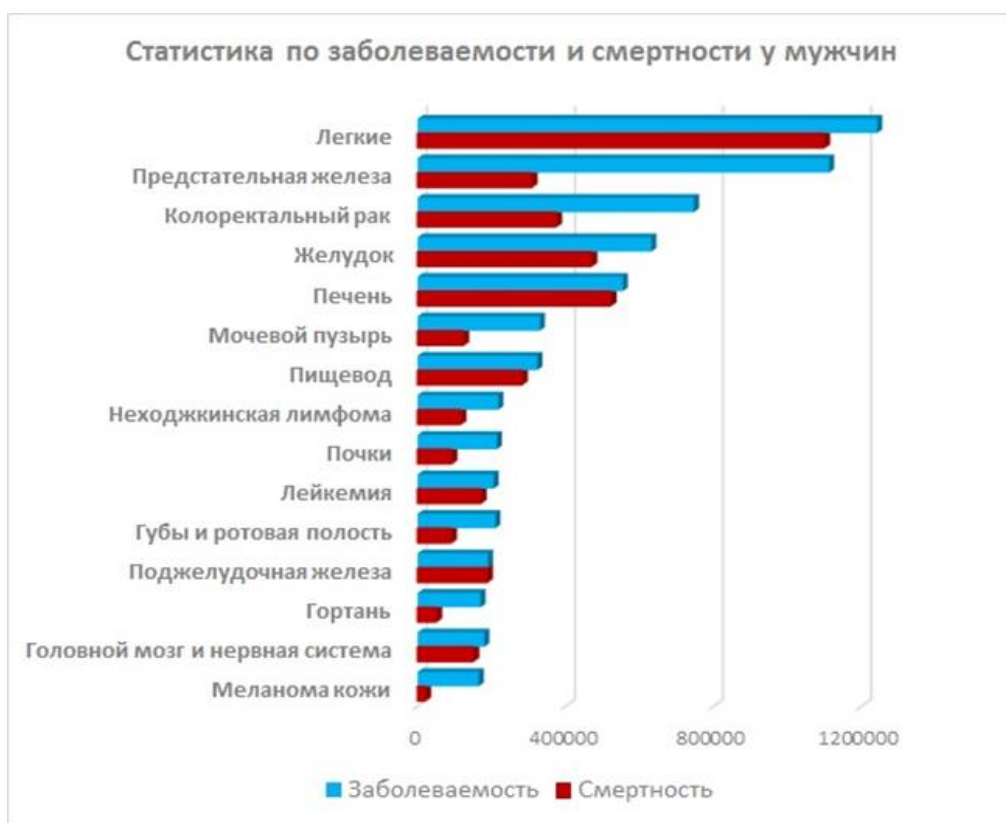


Рисунок 2 – Статистика по заболеваемости и смертности РОК в мире у мужчин

В Соединенных Штатах Америки в 2017 году РОК занял третье место по заболеваемости раком у мужчин и женщин. Так новых случаев рака толстой кишки выявлено 95,520 и 39,910 случаев рака прямой кишки [46].

В Российской Федерации РОК в 2019 году занял пятое место среди заболевших раком [5].

Как видно из таблицы 1, число больных раком ободочной кишки в нашей стране неуклонно растет.

В Санкт-Петербурге РОК у мужчин занимает 3 место, уступив лишь раку предстательной железы и раку легких, а у женщин 2 место после рака молочной железы в имеющейся структуре заболеваемости раком [10].

Таблица 1 – Распространенность злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта в РФ в 2009-2019 гг. (численность больных на 100 тыс. населения) [5].

Локализация, нозологическая форма	Годы										
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Все злокачественные новообразования	1897,0	1968,9	2029,0	2091,9	2159,4	2252,4	2325,2	2472,4	2399,1	2562,1	2675,4
Пищевод	7,7	8,0	8,2	8,2	8,4	8,7	8,7	9,2	9,2	9,4	9,8
Желудок	93,5	94,2	94,1	94,1	94,1	95,0	94,8	95,	95,3	95,1	95,9
<b>Ободочная кишка</b>	<b>102,5</b>	<b>107,5</b>	<b>111,9</b>	<b>116,7</b>	<b>121,4</b>	<b>127,5</b>	<b>132,</b>	<b>138,1</b>	<b>142,8</b>	<b>149,6</b>	<b>157,7</b>
Прямая кишка, ректосигмоидн. соед., анус	81,1	84,5	87,3	90,4	93,4	98,0	101,6	105,4	108,3	111,6	118,0
Примечание – адаптировано из (Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадовой А.О. , 2020) [5].											

В СПбГБУЗ «Городской Клинический Онкологический Диспансер» ежегодно обращается около 330 пациентов с впервые выявленными опухолями толстой кишки (рисунок 3).

Как видно из рисунка 4 у большинства пациентов изначально выявляется II и III стадия заболевания и, соответственно, по имеющимся стандартам им назначается адъювантная химиотерапия.



Рисунок 3 – Количество первичных пациентов РОК  
в СПб ГБУЗ «ГКОД» 2013-2017 гг.

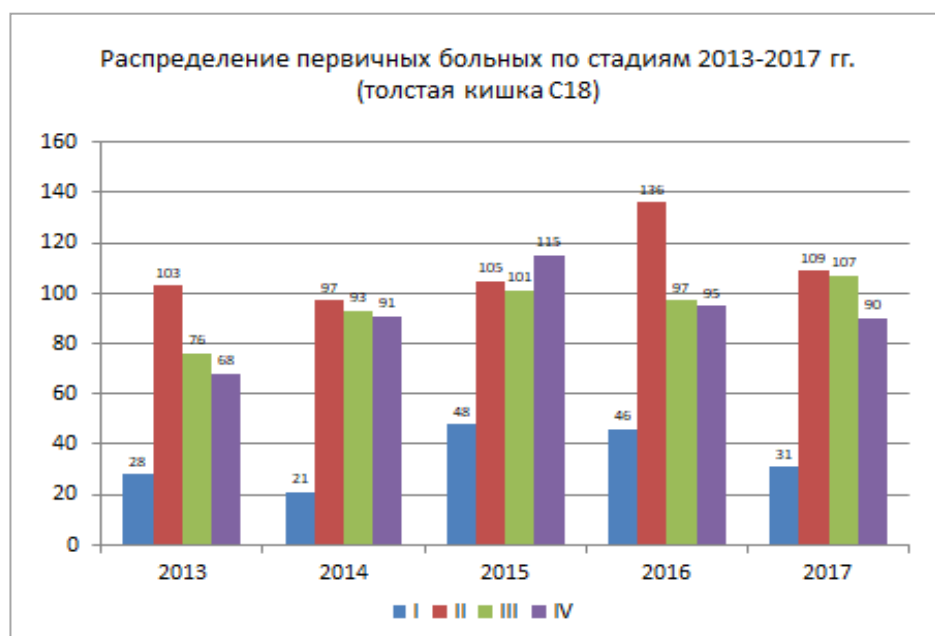


Рисунок 4 – Распределение первичных больных по стадиям 2013-2017 гг.

Таким образом, учитывая стремительный рост заболеваемости раком ободочной кишки, очевидным становится актуальность поиска новых путей лечения больных, индивидуализации и оптимизации всех имеющихся методов лечения.

## 1.2 Виды лечения местнораспространенного рака ободочной кишки

Согласно клиническим рекомендациям Ассоциации Онкологов России к местнораспространенному раку ободочной кишки относятся следующие стадии заболевания: pT2N1-2M0, pT3-4N0-2M0.

### *1.2.1 Хирургический метод*

Основным радикальным методом лечения больных раком ободочной кишки является хирургический метод. В зависимости от локализации опухоли выполняются следующие операции:

- правосторонняя гемиколэктомия;
- расширенная правосторонняя гемиколэктомия с обязательным лигированием у основания a.ileocolica, a.colica dextra, правой ветви a.colica media;
- резекция поперечной ободочной кишки;
- субтотальная колэктомия;
- левосторонняя гемиколэктомия;
- расширенная левосторонняя гемиколэктомия с лигированием a.colica sinistra, левой ветви a.colica media у места отхождения;
- резекция сигмовидной кишки;
- операция типа Гартмана с лигированием нижней брыжеечной артерии [7, 12].

В зависимости от стадии РОК к хирургическому лечению, в рамках комплексного лечения, может быть добавлена системная (адьювантная химиотерапия).



### ***1.2.2 Адьювантная химиотерапия***

***(история развития: исследования с 5-ФУ± лейковорин, исследования с оксалиплатином, длительность проведения, известные факторы риска при выборе адьювантного лечения, схемы химиотерапии)***

Адьювантная химиотерапия (АХТ) при РОК стала активно применяться в 90-е годы, так в 1990 году комбинация 5-ФУ+левамизол была рекомендована в качестве стандартной химиотерапии в США при III стадии [77], а в 1995 году комбинация 5-ФУ+фолиниевая кислота рекомендована к применению при такой же стадии в практике и в Европе [116]. В 1996 году в рандомизированном клиническом исследовании III фазы было показано, что комбинация 5-ФУ+левамизол и 5-ФУ+фолиниевая кислота имеют почти одинаковую эффективность при III стадии РОК [93].

В 1999 году по результатам общего анализа 5 рандомизированных исследований по применению лейковорина и 5-фторурацила в качестве АХТ у пациентов с II стадией РОК (842 пациента) – IMPACTB2 (International Multicentre Pooled Analysis of B 2 Colon Cancer Trials), было отмечено статистически незначимое увеличение БРВ в группе пациентов, получавших АХТ – 76% против 73% группы наблюдения, в показателях 5-летней общей выживаемости (ОВ) также не было различий – 82% и 80% ( $p=0,57$ ). В 2004 году группа IMPACTB2 опубликовала обновленные результаты, включив в анализ 7 исследований (3302 пациента). В группе со II стадией (1 440 пациентов) было зарегистрировано статистически значимое увеличение БРВ у пациентов в группе с АХТ – 76% против 72% у пациентов группы наблюдения ( $p=0,049$ ), однако показатели 5-летней ОВ статистически не различались: 81% против 76% ( $p=0,113$ ) [85].

В 2007 году появились в ощем доступе результаты исследования QUASAR, в котором изучалась эффективность АХТ лейковорина в сочетании с 5-фторурацилом у пациентов с РОК II стадии. В исследование было включено 3 239 пациентов (71% пациентов с диагнозом рак ободочной кишки, 29% – рак прямой кишки). Полностью все лечение завершили только 58%. В результате

исследования стало ясно, что абсолютный выигрыш в показателях 5-летней ОВ имели 3,6% пациентов (95% ДИ 1,0-6,0). В исследовании не был проведен поданализ эффективности лечения среди пациентов с высоким риском прогрессирования. Однако, были оценены показатели пятилетнего риска смерти в группе без адъювантной химиотерапии в зависимости от наличия факторов риска- с факторами риска и без, которые составили 30% и 20% соответственно.

В результате полученных данных группа исследователей предположила, что абсолютный выигрыш в ОВ составит 5,4% и 3,6% в группах с и без факторов риска прогрессирования, соответственно, при проведении адъювантной химиотерапии [27]. Возможно, такой выигрыш связан с не совсем точным стадированием заболевания в ранних исследованиях.

Следующее по хронологии исследование SACURA, которое было проведено авторами из Японии, в него было включено 1 982 пациента с диагнозом РОК II стадии (IIA – 84%, IIB – 13%, IIC – 3%). После радикального хирургического лечения все пациенты были разделены с помощью рандомизации на 2 группы: 1 группа – наблюдалась, 2 группа – принимала UFT в течении 12 месяцев (500 или 600 мг в сутки в зависимости от площади поверхности тела (BSA) с 1-5 дни, 1 неделя перерыв). В результате исследования 5-летняя ОВ составила 78,4% в группе наблюдения и 80,2% в группе UFT (95% ДИ 0,75-1,1,  $p=0,31$ ). БРВ и ОВ практически не различались: ОР 0,82, 95% ДИ 0,65-1,04 и ОР 0,93, 95% ДИ 0,66-1,31, соответственно. Интересный факт, что в группе с факторами риска проведение АХТ UFT также оказалось неэффективным, а вот в группе с Т3 и без венозной инвазии UFT показал свою эффективность [26].

В 2004 году, учитывая результаты различных поданализов, проспективных и ретроспективных исследований, Американское общество онкологов (ASCO) предложило учитывать следующие факторы риска прогрессирования при II стадии РОК перед назначением АХТ:

- морфологическая оценка менее 12 лимфоузлов;
- кишечная непроходимость или перфорация стенки кишки в месте первичной локализации опухоли;

- низкодифференцированная опухоль;
- лимфоваскулярная инвазия;
- T4;
- R1 резекция;
- РЭА более 5 нг/мл перед операцией [90].

Однако, авторы рекомендаций отметили, что эти факторы должны рассматриваться как прогностические, а для уточнения их предикторной значимости при выборе АХТ требуется проведение проспективных исследований [30].

### *История развития адъювантной химиотерапии (исследования с оксалиплатином)*

Самыми крупными и значимыми исследованиями по изучению влияния АХТ при РОК были MOSAIC, NSABPC-07 и XELOXA [36, 73, 84]. В данные исследования включались пациенты со II и III стадией, в исследование XELOXA-пациенты только с III стадией. По итогам исследований MOSAIC (6 месяцев АХТ по схеме FOLFOX) и NSABP C-07 (6 месяцев АХТ по схеме FLOX) были сделаны выводы о том, что комбинация с оксалиплатином значимо влияет на БРВ и ОВ в сравнении с комбинацией 5-ФУ и лейковорина. Но в ходе дальнейшего поданализа в исследовании MOSAIC оказалось, что значимый выигрыш имели только пациенты с III стадией заболевания и пациенты со II стадией заболевания с факторами риска в отношении только БРВ (ОР 0,62, 95% ДИ 0,41-0,92), но не ОВ (ОР 0,91, 95% ДИ 0,61-1,36) [28]. В 2015 году после обновления данных показатели 10-летней ОВ у пациентов со II стадией заболевания составляли 79,5% в группе 5-ФУ+лейковорин и 78,4% в группе FOLFOX (ОР 1,0, p=0,98); в группе высокого риска – 71,7% и 75,4% соответственно (ОР 0,895, 95% ДИ 0,606-1,323, p=0,578). В исследовании NSABPC-07 у пациентов со II стадией заболевания также не было зарегистрировано улучшения от добавления оксалиплатина ни в ОВ (ОР 1,04, 95% ДИ 0,72-1,5, p=0,84), ни в БРВ (ОР 0,94, 95% ДИ 0,7-1,26, p=0,67) [84].

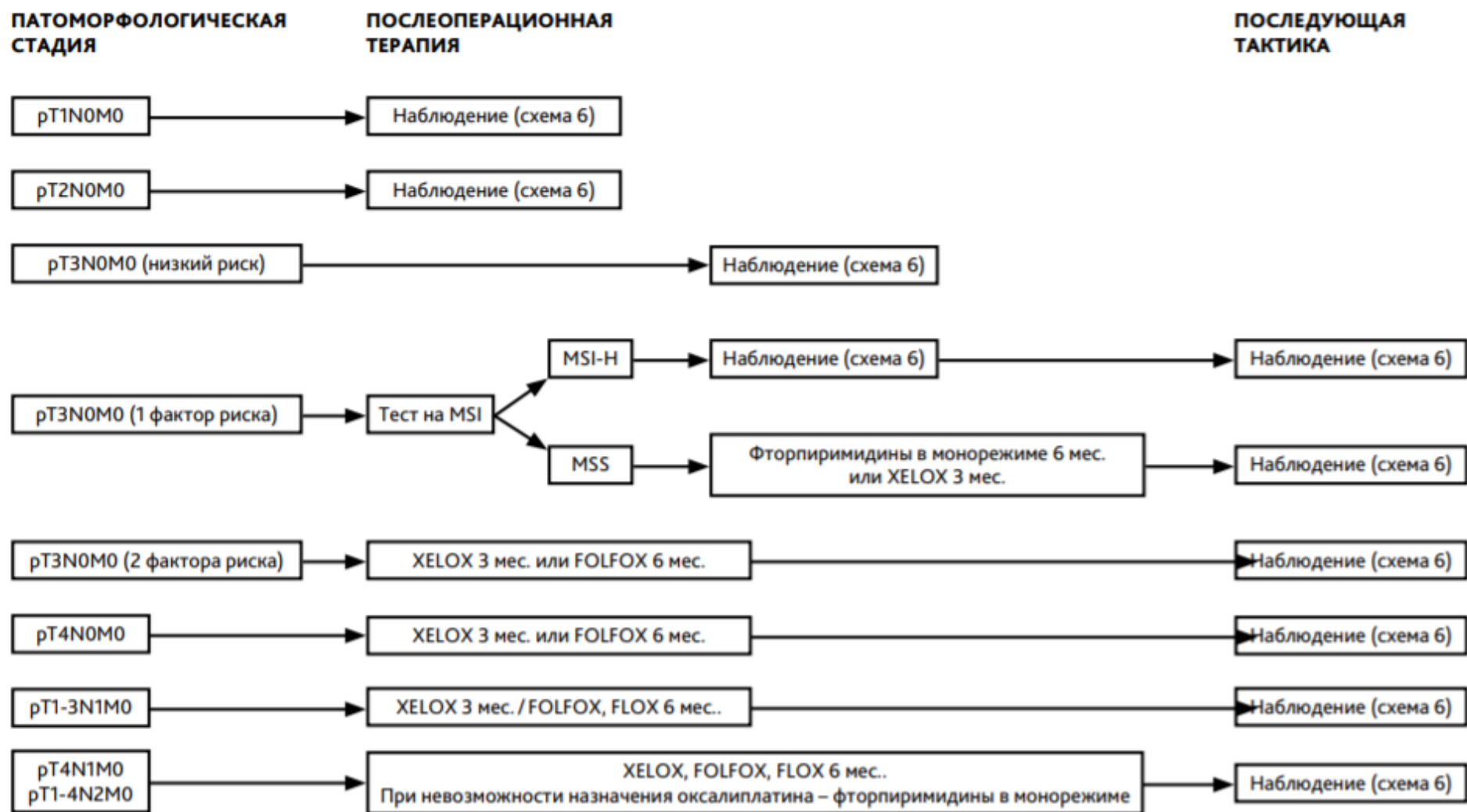
*Длительность проведения адъювантной химиотерапии*

В 2019 году был опубликован анализ программы IDEA, в которой были оценены исследования TOSCA, SCOT, NORG, ACHIEVE2. Главной задачей данной программы являлось сравнение длительности АХТ в течение 3 и 6 месяцев лечения комбинацией оксалиплатина и фторпиримидинов при II стадии РОК с наличием факторов риска. В результате данной программы был выполнен анализ 3 273 пациентов со II стадией заболевания и наличием факторов риска: получили химиотерапию FOLFOX в течение 3 месяцев 619 пациентов; CAPOX- 1020 пациентов; 6 месяцев FOLFOX получили 635 пациентов и 6 месяцев CAPOX- 999 пациентов. В группе пациентов, которым проводилось лечение в течение 3 месяцев, частота возникновения нежелательных явлений 3-4 степени составила 26%, а в группе 6 месяцев лечения – 40%. Во всей группе пациентов не была показана равная эффективность 3 месяцев химиотерапии и 6 месяцев химиотерапии комбинацией оксалиплатина и 5-ФУ: ОР 1,17, 95% ДИ 1,05-1,31; 5-летняя БРВ была 80,7% против 83,9% соответственно. Далее пациентов разделили на группы в зависимости от схемы лечения (FOLFOX или CAPOX) и в результате было отмечено, что среди пациентов, которым проводилась химиотерапия по схеме CAPOX, 3 месяца терапии были не менее эффективными в сравнении с 6 месяцами химиотерапии; 5-летняя БРВ составила 81,7% и 82% соответственно. В группе пациентов, которая получала лечение по схеме FOLFOX, данный показатель составил 79,2% против 86,5% [92]. Таким образом, группой исследователей был сделан вывод, что добавление оксалиплатина к 5-ФУ не приводит к значимому улучшению показателей ОВ при лечении в течении 6 месяцев, тем не менее, можно рекомендовать применение не только 6 месяцев монокимиотерапии 5-ФУ, но и 3-х месячную химиотерапию по схеме CAPOX при II стадии РОК с факторами риска. Однако, выигрыш АХТ даже в этой группе достаточно умеренный, что заставляет задуматься о поисках новых прогностических маркеров [18].

По поводу известных факторов риска у пациентов со II стадией заболевания РОК в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина была проведена ретроспективная работа по анализу зависимости эффективности АХТ от количества факторов риска, имеющихся у пациента. При наличии 2-х и более факторов 5 летние БРВ были следующими: в группе с оксалиплатином и 5-ФУ – 87%, в группе с наблюдением – 76% , а в группе монокимиотерапии 5-ФУ только 65% [19].

В настоящее время в практике стала широко использоваться в качестве дополнительного прогностического маркера при II стадии РОК микросателлитная нестабильность (MSI). MSI – это отражение нарушений в системе репарации неспаренных оснований, которые образовались в результате ошибок в процессе репликации ДНК [120]. При II стадии РОК MSI диагностируется в 22% случаев, при III стадии – в 12%, при IV стадии – в 2% случаев [54]. Эти данные наглядно показывают нам, что опухоли с высоким уровнем MSI не склонны к метастазированию и такие пациенты имеют благоприятный прогноз. В большинстве ретроспективных исследованиях высокий уровень MSI ассоциируется с более высокими показателями ОБ при ранних стадиях РОК [122, 123]. А также оказался, что пациенты с MSI выиграли от лечения 5-ФУ не имеют в сравнении с пациентами с отсутствием MSI [112]. В крупном метаанализе 2010 года, в которое было включено 3 690 пациентов РОК (810 пациентов со II стадией и 2 444 пациентов с III стадией заболевания) было зарегистрировано 454 пациента с MSI [56]. Из всех пациентов 39% получили АХТ 5-ФУ. У пациентов с выявленной MSI не было отмечено преимуществ от проведения АХТ, а у пациентов с не выявленной MSI в опухолевом образце применение 5-ФУ в адъювантном режиме значимо увеличивало показатели выживаемости.

Учитывая все вышеизложенное, рекомендации по проведению АХТ в настоящее время выглядят следующим образом (рисунок 5) [13].



Выбор адъювантной химиотерапии при раке ободочной кишки I–III стадии (схема 1).

Рисунок 5 – Выбор адъювантной химиотерапии при РОК I–III стадии [14]

*Схемы адъювантной химиотерапии:***mFOLFOX6(модифицированный)**

Оксалиплатин 85 мг/м<sup>2</sup> внутривенно, день 1.

Лейковорин 400 мг/м<sup>2</sup> внутривенно, день 1.

5-ФУ 400 мг/м<sup>2</sup> болюсно в день 1, затем 1 200 мг/м<sup>2</sup>/день 2 дня (2 400 мг/м<sup>2</sup> в течение 46-48 часов) непрерывно.

Повторять каждые 2 недели.

**Capecitabine**

Капецитабин 1000-1250 мг/м<sup>2</sup> два раза в день с 1-го по 14 день каждые 3 недели в течение 24-х недель.

**XELOX**

Оксалиплатин 130 мг/м<sup>2</sup> внутривенно день 1.

Капецитабин 1 000 мг/м<sup>2</sup> два раза в день с 1-го по 14 день каждые 3 недели в течение 24-х недель.

**Модифицированный режим De Gramont**

Лейковорин 400 мг/ м<sup>2</sup> внутривенно день 1.

Затем 5-ФУ болюсно 400 мг/м<sup>2</sup>, а затем 1 200 мг/м<sup>2</sup>/Д 2 дня (2 400 мг/м<sup>2</sup> в течение 46-48 часов) непрерывно.

Повторять каждые 2 недели.

**FLOX**

Оксалиплатин 85 мг/м<sup>2</sup> внутривенно, день 1, 15, 29.

Лейковорин 20 мг/м<sup>2</sup> внутривенно струйно

с последующим болюсным введением 5-ФУ 500 мг/м<sup>2</sup> еженедельно в течении 6 недель с последующим 2-х недельным перерывом.

### 1.3 Прогностические факторы при выборе адьювантной химиотерапии.

В настоящий момент выбор АХТ у пациентов после радикального хирургического лечения зависит от стадии заболевания и оценки известных в настоящий момент факторов риска:

- 1) глубина опухолевой инвазии (параметр Т);
- 2) статус регионарных лимфоузлов (параметр N);
- 3) морфологическая дифференцировка опухоли;
- 4) лимфоваскулярная или периневральная инвазия;
- 5) позитивные края резекции;
- 6) перфорация опухоли;
- 7) повышение уровня раково-эмбрионального антигена (РЭА) более 5 нг/мл перед операцией.

Также в настоящий момент имеется ряд прогностических факторов, которые косвенно позволяют нам определить метастатический потенциал опухоли, например, мутации в генах RAS, индекс пролиферации опухоли Ki67.

#### *1.3.1 Индекс пролиферации (Ki 67)*

Одной из важнейших характеристик опухоли, является скорость деления клеток. Исходя из стохастической теории развития опухолевого процесса, чем чаще происходит процесс деления, тем выше вероятность появления новых мутаций, которые, возможно, будут способствовать появлению регионарных и отдаленных метастазов. Часто используемым маркером пролиферативной активности является маркер Ki-67. Ki-67 -это ядерный белок, кодируемый MKI67 геном, локализующимся на 10 хромосоме (10q25-qter) и относящийся к перихромосомальным белкам, окружающим хромосомы в течение митоза. Данное



вещество было впервые описано J. Gerdes et al. в 1983 году, как белок, присутствующий только в пролиферирующих клетках [87]. Данный маркер стал активно использоваться в качестве метки для клеток, находившихся в стадии пролиферации в момент проведения фиксации препарата. Однако, использование данного маркера в качестве прогностического не является перспективным. Связано это с тем, что согласно многочисленным наблюдениям, показатели пролиферативной активности не коррелируют с частотой метастазирования.

### *1.3.2 Мутации в гене RAS*

Мутации KRAS диагностируются в 35-45% случаев КРР [29]. В настоящее время описано более 3 000 точечных мутаций гена KRAS в клетках опухолей. Около 82% и 17% всех мутаций KRAS выявляют в кодонах 12 и 13 соответственно. Мутации гена KRAS играют предиктивную и прогностическую роль. В исследованиях доказано, что активация гена KRAS/NRAS за счет мутации создает потерю эффекта ингибирования EGFR моноклональными антителами, что дает возможность рассматривать их мутационный статус в качестве независимого предиктивного маркера эффективности анти- EGFR терапии [6]. Этот факт позволяет оптимизировать схемы химиотерапии и индивидуально подходить к лечению каждого пациента, добавляя к терапии препараты панитумумаб и цетуксимаб только больным с мКРР дикого типа гена KRAS/NRAS.

Так проведенный анализ клинических данных показывает, что только 3% пациентов КРР с наличием мутации KRAS в опухоли отвечают на терапию анти-EGFR моноклональными антителами, а у пациентов, опухоли которых имеют нормальный (дикий) тип гена, этот показатель составляет 33% [65]. Мутация в гене KRAS/NRAS является прогностическим маркером агрессивного течения опухолевого процесса, связана с более высоким риском развития рецидивов или

метастазов у операбельных пациентов на II и III стадиях РОК, по сравнению с пациентами, у которых обнаружен дикий тип данного гена [89, 94].

Также доказано, что наличие мутации KRAS обуславливает более высокий риск прогрессирования опухолевого процесса в виде метастазов в легкие и головной мозг [76].

Таким образом, в настоящее время появляется все больше факторов, которые могут помочь клиницисту в выборе правильной тактики лечения в том или ином случае. Однако, чаще всего выбор падает именно на биологические характеристики опухоли. Исследование и поиск дополнительных возможных прогностических маркеров, основываясь на биологию опухолевого роста, может позволить принимать более обоснованные решения в будущем [21].

#### **1.4 Биология опухолевого роста**

Ключевые признаки опухолевой клетки и молекулярно-генетические процессы, нарушение которых лежит в основе появления этих признаков, впервые были описаны Робертом Вайнбергом (Robert Weinberg) и Дугласом Ханаханом (Douglas Hanahan) в 2000 г. [66].

Большое разнообразие генотипов раковых клеток авторы объясняли запуском 6 основных изменений в физиологии клетки - приобретенных способностей клетки (acquired capabilities).

Основными приобретенными способностями являются:

- 1) Самодостаточность/независимость от сигналов роста и нечувствительность (потеря чувствительности) к ингибиторам роста клетки.
- 2) Безграничный репликационный потенциал (иммортализация, бессмертие клеток) – преодоление «лимита Хейфлика».
- 3) Способность к тканевому проникновению (инвазия и метастазирование).

- 4) Способность к отсутствию тканевой видоспецифичности (геномная нестабильность).
- 5) Поддержка регенерации тканей (ангиогенез).

В дальнейшем перечень приобретенных способностей опухолевых клеток многократно дополнялся и уточнялся. К наиболее важным дополнениям можно отнести: блокировку клеточной дифференцировки и более содержательное описание геномной нестабильности.

Геномная нестабильность является основной движущей силой непрерывных изменений в геноме опухолевой клетки, что приводит к генерации большого числа неоднородных генетических субклонов клеток опухоли, способных к селективному преодолению (генетическая пластичность) различных барьеров в организме. Таким образом, опухолевая клетка характеризуется ускоренным накоплением мутаций, отчасти связанных со снижением эффективности процессов репарации ДНК. Подобное свойство опухолевых клеток приводит к невероятной биологической пластичности возникающих новообразований, способных быстро приспособиться к изменяющимся условиям внешней среды.

Гены, контролирующие процессы дифференцировки, пролиферации и смерть клеток организма условно подразделяются на 2 группы:

- 1) Доминантные онкогены (позитивные регуляторы роста), которые возникают из нормальных генов клетки (протоонкогенов) в результате их неконтролируемой активации.
- 2) Рецессивные гены-супрессоры опухоли (негативные регуляторы роста), являющиеся ингибиторами протоонкогенов. Активация онкогенов и инактивация генов-супрессоров приводит к одинаковым опухолеродным эффектам [9, 34, 79, 81].

В 2011 году Роберт Вайнберг и Дуглас Ханахан выпустили продолжение своей «исторической» статьи, в которой список обязательных характеристик опухолевых клеток пополнился новыми пунктами: адаптацией стромальных компонентов к потребностям опухолевого роста, воспалением (активацией

провоспалительных генов и провоспалительных цитокинов), ускользанием от иммунного надзора, аэробным гликолизом [67].

Роль цитокинов в инициации опухолевого роста остается предметом дискуссий, однако, в патогенезе опухолевой прогрессии ауто - и паракринная, а также цитокиновая регуляция имеет немалое, а в некоторых случаях решающее значение. Селективный иммуномодулирующий эффект хемокинов рассматривается как частный случай в рамках феномена ускользания опухоли от иммунологической защиты. Хемокины также играют важную роль в регуляции неоангиогенеза, что является ключевым звеном прогрессирования опухоли. Важно отметить, что процесс опухолевой прогрессии (первичный рост опухоли, неоангиогенез, инвазия и метастазирование) является не только цитокин-опосредованным, но и цитокин-зависимым.

## **1.5 Хемокины**

### ***1.5.1 Классификация цитокинов, их регуляторная роль в организме***

Хемокины являются подклассом цитокинов, таким образом, стоит рассмотреть изначально классификацию цитокинов (рисунок 6).

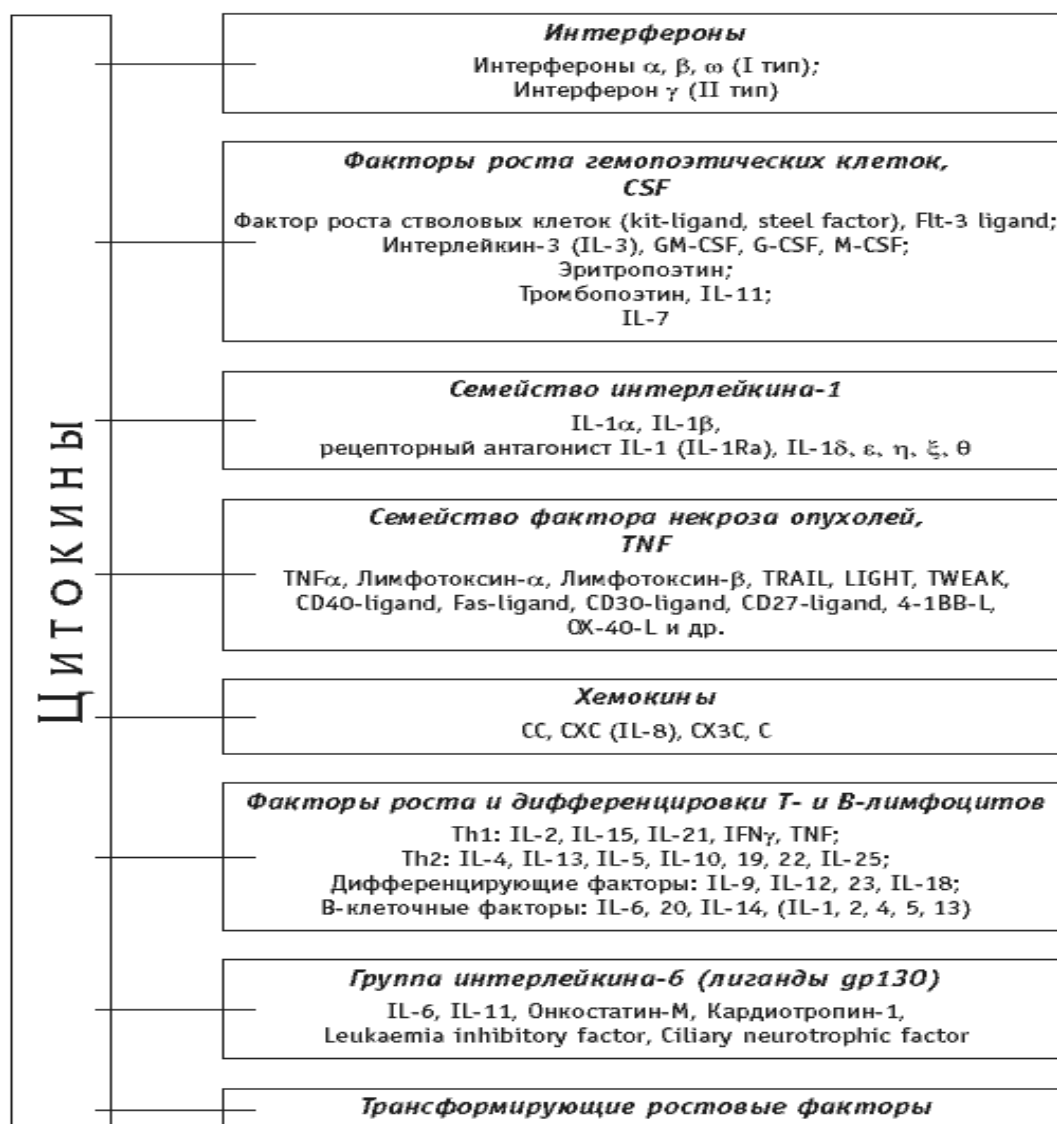


Рисунок 6 – Классификация цитокинов

К системе цитокинов относят около 200 индивидуальных полипептидных веществ [83].

Все они имеют ряд общих биохимических и функциональных характеристик, главные из которых:

- 1) плейотропность и взаимозаменяемость биологического действия;
- 2) отсутствие антигенной специфичности;
- 3) проведение сигнала путем взаимодействия со специфическими клеточными рецепторами;
- 4) формирование цитокиновой сети.

В связи с чем цитокины могут быть выделены в самостоятельную систему регуляции функций организма, наряду с существующими нервной и гормональной регуляцией [17].

Регуляторная роль цитокинов в организме может быть разделена на 4 основных составляющих:

1. Регуляция эмбриогенеза, закладки и развития ряда органов.
2. Регуляция защитных реакций организма на местном и системном уровне.
3. Регуляция отдельных нормальных физиологических функций.
4. Регуляция процессов регенерации для восстановления поврежденных тканей [16].

### *1.5.2 Классификация хемокинов*

Хемокины были впервые идентифицированы в 1977 году. Первым был получен СХС-хемокин 4. В настоящее время изучено около 50 хемокинов, относящихся к 4 подсемействам [20].

Хемокины представляют собой белки с молекулярной массой от 8 до 12 кДа, состоящие из 60-100 аминокислот и обладают высокой гомологичностью как белковой (от 20 до 80% гомологии в первичной аминокислотной последовательности), так и генной (20-50%) последовательности. Отличительной особенностью хемокинов выступает наличие дисульфидных связей между остатками цистеина. Эти мостики формируют пространственную конфигурацию молекул, которая нужна для взаимодействия со специфическими рецепторами и демонстрации биологической активности. На основании положения остатков цистеина в молекулах (в зависимости от взаимного расположения двух первых цистеинов на N-конце пептидной цепи) все хемокины разделены на 4 основные группы:

1) Хемокины подсемейства CXС ( $\alpha$ -хемокины) имеют в наличии одну аминокислоту, которая разделяет N-концевые цистеины. Идентифицировано 17 представителей этой группы, она также подразделяется на две категории в зависимости от присутствия специфической аминокислотной последовательности глутаминовая кислота-лейцин-аргинин (Glu-Leu-Arg) непосредственно перед первым цистеином (ELR-положительные). ELR-положительные хемокины подсемейства CXС вызывают миграцию нейтрофилов, вступая во взаимодействие с рецепторами CXCR1 или CXCR2 на поверхности клеток. К этим хемокинам относится IL-8, приводящий к рекрутированию нейтрофилов из крови в повреждённую ткань. ELR-отрицательные хемокины подсемейства CXС являются хемотаксическими агентами для лимфоцитов, выявлено 7 рецепторов для этого типа хемокинов (CXCR1-7). ELR-положительные хемокины обладают проангиогенными свойствами, а ELR-отрицательные являются ангиостатиками [96, 128].

2) Хемокины подсемейства CC ( $\beta$ -хемокины) отличаются тем, что два N-концевых цистеина не разделены друг от друга другими аминокислотами. Эта самая большая группа, включающая в себя 27 белков. Эти хемокины обозначаются CCL (CC-chemokine ligand) от CCL1 до CCL28 (причем CCL9 и CCL10 оказались одним и тем же геном). Главная функция данного подсемейства CC – индукция хемотаксиса моноцитов/макрофагов, лимфоцитов, базофилов и эозинофилов, а также других клеток, таких как НК-клетки и дендритные клетки. Гены CC-хемокинов человека выявляются, в основном, на 17-й хромосоме, обнаружено 10 рецепторов для этих хемокинов.

3) Хемокины подсемейства C ( $\gamma$ -хемокины) состоят только из 2 цистеинов вместо обычных 4 и, таким образом, на N-конце молекулы имеется лишь один цистеин. Это подсемейство включает 2 хемокина: XCL1 (лимфотактин- $\alpha$ ) и XCL2 (лимфотактин- $\beta$ ). Хемокины подсемейства C синтезируются в основном Т-лимфоцитами, НК-клетками и тучными клетками, и действуют достаточно избирательно только на лимфоциты. Два члена подкласса C-хемокинов обладают хемоаттрактантными свойствами в отношении Т-лимфоцитов [47]. Так же данная

группа хемокинов необходима для рекрутирования Т-лимфоцитов в вилочковую железу.

4) Хемокины подсемейства CX3C ( $\delta$ -хемокины) имеют 3 аминокислоты между N-концевыми цистеинами и включает единственный хемокин CX3CL1, или фракталин (нейротактин). Из всего семейства хемокинов это единственный мембраносвязанный полипептид, синтезируемый эндотелиальными клетками и экспрессируемый на их поверхности [72].

### ***1.5.3 Рецепторы хемокинов***

В настоящее время известно более 20 рецепторов хемокинов, которые взаимодействуют с разной степенью аффинности с одним или несколькими лигандами хемокинового семейства. Рецепторы хемокинов относятся к суперсемейству родопсиновых рецепторов (серпентинов, GPCR) и проводят сигнал с участием G-белков.

Рецепторы всех хемокинов содержат критические участки для проведения сигнала: остаток аспарагиновой кислоты и последовательность Thr-X-Pro (где X-любая аминокислота), которая находится во втором трансмембранном домене, и последовательность Asp-Arg-Tyr (DRY) на границе третьего трансмембранного домена и второй внутриклеточной петли. После связывания лиганда начинается интернализация комплекса, но уже через 10 минут рецепторы экспрессируются на поверхности клеток [80, 119].

Рецепторы хемокинов отличаются по их способности к сигналу после связывания с представителями суперсемейства хемокинов. В данный момент 18 белков человека соответствуют этому определению. Они имеют обозначения CXCR1-5, CCR1-11, CXR1 и CX3CR1 в соответствии с предпочтением ими специфических хемокинов. Их общая биологическая функция заключается в захвате лейкоцитов и в развитии связанных с этим явлений – воспаления,



врожденного и приобретенного иммунитета. Лиганд-связывающий участок рецепторов для хемокинов имеет множественные несоприкасающиеся домены и, по крайней мере, два различных субучастка – один для прикочивания лейкоцитов, а другой для запуска взаимодействия [31].

Рецепторы для хемокинов отличаются друг от друга в соответствии с их экспрессией и функцией [37].

*Подтипы рецепторов для CC-хемокинов:*

CCR1 находится на В- и Т-клетках (преимущественно подтипах), НК-клетках базофилах, тучных клетках и клетках эндотелия; его селективный хемокин – CCL14.

CCR2 представлен на полиморноядерных лейкоцитах, моноцитах, Т-клетках, тучных клетках, клетках эндотелия, астроцитах, нейронах; его селективный хемокин CCL2.

CCR3 экспрессируется на эозинофилах, базофилах, тимоцитах и Т-клетках, несущие селективные хемокины – эотаксины, у него два селективных хемокина: CCL11 и CCL24.

CCR4 (СКR4, CHEMR1) выявляется на тромбоцитах, тимоцитах и Т-клетках, его селективные хемокины CCL17(TARC) и CCL22(MDC). Вовлечение рецептора Т-клеток (TCR) и CD28 положительно регулирует экспрессию CCR4 на Th-клетках 2 типа. Функция этого рецептора заключается в захвате дендритных клеток, рециркуляции Т-клеток из тканей в дренирующие лимфоузлы и расселение Т-клеток памяти в очаги воспаления.

CCR5 экспрессируется на моноцитах/макрофагах, дендритных клетках, тимоцитах, Т-клетках, участвует в модуляции Т-зависимых иммунных реакций, его селективный хемокин CCL4.

CCR6 представлен на моноцитах/макрофагах, тимоцитах, Т-клетках памяти, В-клетках и дендритных клетках, его селективный хемокин CCL20.

CCR7 выявлен на моноцитах/макрофагах, тимоцитах, активированных Т- и В-клетках и на дендритных клетках, его селективные хемокины CCL19 и CCL21. CCR7 основной рецептор расселения в иммунном процессе, который

обеспечивает миграцию Т- и В-клеток, дендритных клеток через вены с высоким эндотелием.

CCR8 находятся на тимоцитах, моноцитах и Th-клетках 2 типа, его селективный хемокин CCL1. CCR8 регулирует миграцию регуляторных Т-клеток.

CCR9 экспрессируется на тимоцитах, незрелых и зрелых Т-клетках, его селективный хемокин CCL25, этот рецептор вовлечен в развитие Т-клеток.

CCR10 находится на тимоцитах и Т-клетках, его единственный хемокин CCL27.

CCR11 представлен в тканях сердца, легких и тонкого кишечника, его лиганды включают CCL2, CCL7, CCL8.

*Подтипы рецепторов для CXС-хемокинов:*

Для наиболее известного IL-8 есть два типа высокоаффинных рецепторов, рецепторы I и II типов, которые гомологичны друг другу на 77%. Согласно единой номенклатуре рецепторов хемокинов они обозначаются как CXCR1 и CXCR2 рецепторы. Оба рецептора экспрессируются на полиморфноядерных нейтрофилах и макрофагах, а CXCR2 – и на эозинофилах. Рецептор CXCR1 связывает только IL-8, а рецептор CXCR2 контактирует с разной степенью аффинности не только с IL-8, но и с другими членами подкласса CXС хемокинов (CXCL5 и CXCL7). На поверхности эритроцитов выявлен еще один тип рецептора IL 8, связывающий лиганд с несколько меньшей аффинностью ( $K_d=5$  nM), он менее специфичен, так как он связывает CXС и CC хемокины. Этот рецептор оказался идентичен изученному ранее антигену групп крови Duffy и был назван DARC (Duffy antigen receptor for chemokines, гликопротеин D) [16].

CXCR3 (IP-10/Mig-R, GPR9) имеет несколько лигандов (CXCL10, CXCL11, CXCL9) и локализован на тимоцитах, В- и Т-клетках, клетках памяти, которые несут высокий уровень интегринов CD49/CD29( $\beta$ 1). CXCR3 принимает участие в стимуляции процессов активации Т-клеток.

CXCR4 (HUMSTER, LESTR, HM89, LCR1) экспрессируется на тимоцитах, дендритных клетках полиморфноядерных нейтрофилах, макрофагах и тромбоцитах, его лиганды включают селективный хемокин CXCL12 (SDF-1).

CXCR4 принимает участие в формировании тромбоцитов и в трансэндотелиальной миграции мегакариоцитов.

CXCR5 (BLR-1, MDR15) выявлен на Т- и В-клетках, его селективным хемокином является CXCL13 (BCA-1). Сигнальная система этого рецептора охватывает хемотаксис и мобилизацию кальция, после стимуляции толл-рецепторов он подвергается положительной регуляции на Т-клетках памяти, что выполняет роль в их миграции в фолликулы В-клеток.

*Подтипы рецепторов для С-хемокинов:*

XCR1 (GPR5) – единственный рецептор для С-хемокинов – он специфичен для лимфотактина (хемокина Т-клеток) и экспрессируется на Т-клетках и НК-клетках.

*Подтипы рецепторов для CX3C-хемокинов:*

CXC3R1 (GPR13M, V28) обнаружен на НК-клетках CD16, Т-клетках (покоящихся и CD8), моноцитах CD14 и макрофагах, его селективный цитокин – CXC3L1 (фралталкин). Этот рецептор отличается своей способностью к непосредственному воздействию на адгезию клетка к клетке, особенно это касается случаев экстравазации лейкоцитов в условиях интенсивного кровотока, а также является медиатором адгезии к клеткам эндотелия и нейронам.

Соответствие между хемокиновыми рецепторами и активизирующими их лигандами представлена на рисунке 7.

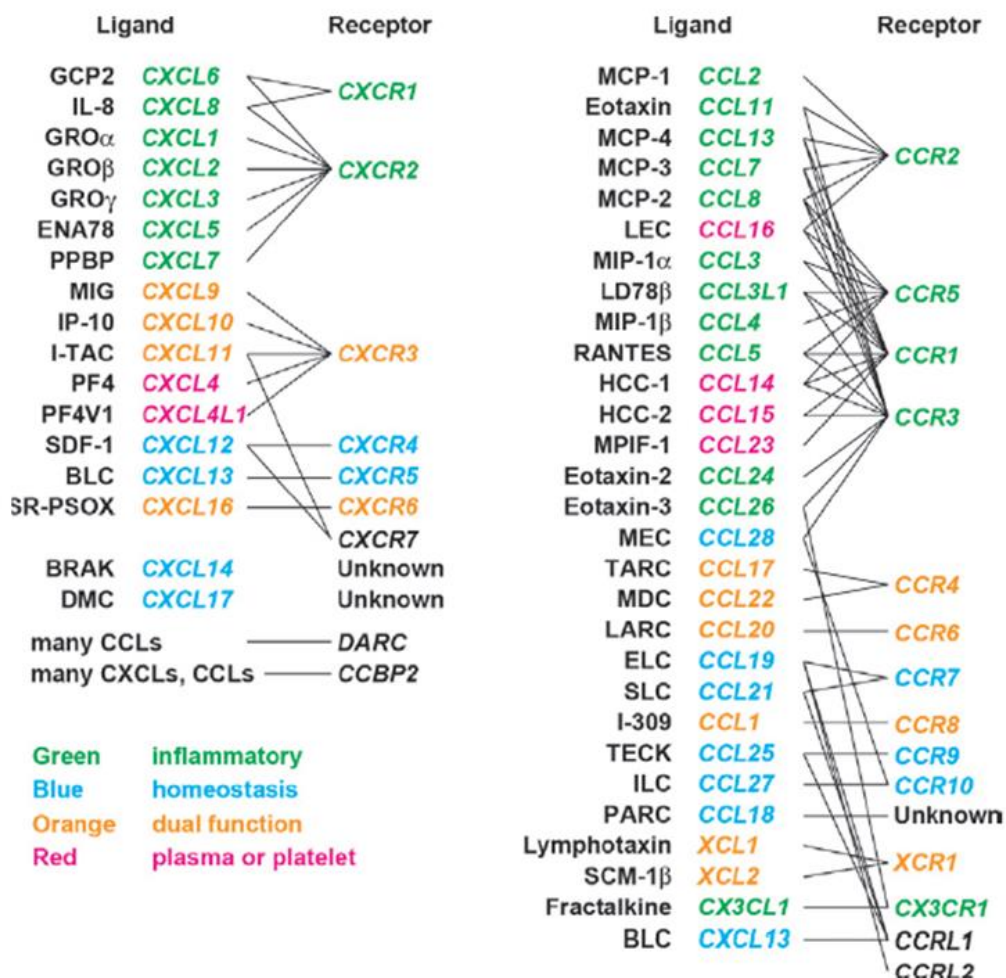


Рисунок 7 – Соответствие между хемокиновыми рецепторами и активизирующими их лигандами

#### 1.5.4 Биологическая роль хемокинов

Хемокины представляют группу эндогенных хемоаттрактантов, которые отличаются от других эндогенных и экзогенных веществ с аналогичными функциями, таких как лейкотриен В<sub>4</sub>, С<sub>5</sub>а-фрагмент комплемента, PDGF и бактериальный пептид формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), так как последние менее специфичны и действуют как на гранулоциты, так и на моноциты и не используют рецепторы хемокинов для связывания с клетками-мишенями. В целом действие хемокинов более избирательно. Хемокины

оказывают воздействие практически на все типы лейкоцитов, но каждый хемокин в отдельности обладает своими индивидуальными особенностями.

MIP-1 $\beta$  в отличие от других C-C хемокинов (RANTES) обладает селективной активностью именно в отношении наивных CD4+T-клеток [97]. Прямой и тесный контакт с дендритными клетками очень важен для выживаемости и пролиферации CD4+T-клеток, которые под влиянием соответствующих хемоаттрактантов попадают в тимусзависимые зоны вторичных лимфоидных органов, где образуют иммунные синапсы с дендритными клетками. Высокий уровень отдельных провоспалительных цитокинов ассоциируется с худшим прогнозом онкологического заболевания и меньшей эффективностью противоопухолевой терапии [69]. Однако восстановление T-клеточного гомеостаза при таких условиях может пойти и по пути пролиферативной экспансии T-клеточных клонов, специфичных к слабоиммуногенным, опухолевым антигенам. Выявлено, что на фоне лимфопении или в период раннего восстановления пула циркулирующих лимфоцитов использование дендритных клеток, которые нагружены опухолевым лизатом, или адаптивный перенос эффекторных T-лимфоцитов позволяет повысить эффективность противоопухолевого иммунного ответа за счет пролиферативной экспансии T-клеточных клонов, специфичных к опухолевым антигенам [129]. Гиперэкспрессия провоспалительных хемокинов (MIP-1 $\beta$ , MCP-1) цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17) имеет место, например, при раке молочной железы, что отражает комплекс системных иммунологических изменений при злокачественных новообразованиях [130].

### ***1.5.5 Роль хемокинов в ангиогенезе***

Формирование новых сосудов является одной из самых актуальных проблем в биологии и патологии человека. Без ангиогенеза невозможен процесс естественной физиологической репарации. Ангиогенез играет одну из главных

ролей при многих патологических процессах: гипер- и неопластических процессах, атеросклерозе, псориазе, заболеваниях с выраженным хроническим воспалением (ревматоидный артрит, болезнь Крона) [100, 114, 121].

Ангиогенез включает в себя несколько последовательных этапов:

- 1) деградация базальной мембраны, фибрина и внеклеточного матрикса (ВКМ);
- 2) миграция эндотелиальных клеток;
- 3) пролиферация эндотелиальных клеток;
- 4) формирование новых капиллярных трубок и новой базальной мембраны.

В регуляции первого этапа ангиогенеза принимает участие система активаторов плазминогена урокиназного типа (РА-u) и тканевого типа (РА-t) и их ингибиторов (РАIs). После активации эндотелиальных клеток они начинают секретировать РА-u и РА-t, которые активно конвертируют плазминоген в сериновую протеазу – плазмин, вызывающую деградацию белков ВКМ (фибронектина, коллагена, ламинина и др.) и активацию матриксных металлопротеиназ (ММП), таким образом, обеспечивая разрушение базальной мембраны и разрыхление ВКМ [82, 115]. Все это приводит к формированию просвета для миграции эндотелиальных клеток, в которых под действием вышеуказанного каскада реакций происходит перестройка цитоскелета и изменяется профиль адгезионных молекул (повышается экспрессия и/или активация интегринов  $\alpha v \beta 3$  и  $\alpha v \beta 5$ , адгезионных молекул PECAM-1(CD31) и VE-cadherin). После миграции происходит интенсивное деление эндотелиальных клеток, их дифференцировка и синтез новой базальной мембраны [103]. Наиболее изученная регуляция ангиогенеза происходит через вазоэндотелиальный фактор роста и фактор роста фибробластов [68].

Представители семейства CXCL-хемокинов достаточно эффективно оказывают влияние на различные стадии ангиогенеза, выступая в качестве как ингибиторов (ELR-негативные), так и стимуляторов ангиогенеза (ELR-позитивные). В отношении ангиогенеза IL-8 наряду с другим ELR-позитивным хемокином GRO $\alpha$  оказывает влияние на миграцию эндотелиальных клеток и

является для них хемотактическим фактором, а также повышает продукцию и активность MMP-2. В опухолевом неонангиогенезе IL-8 стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток, причем этот эффект может быть как прямым (аутокринная регуляция), так и опосредованным через усиление продукции VEGF и bFGF (паракринная регуляция) (рисунок 8) [57, 118].

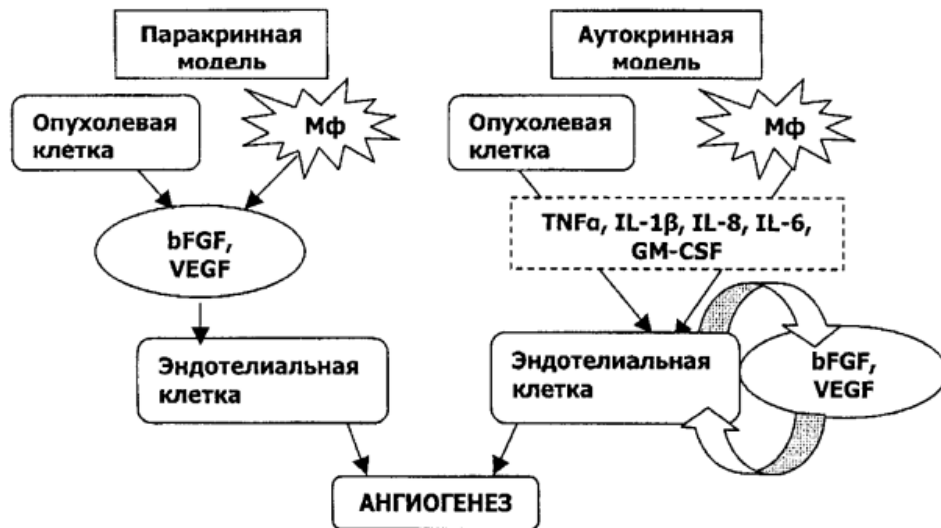


Рисунок 8 – Паракринная и аутокринная модели регуляции ангиогенеза.

Для определения роли хемокинов в васкуляризации опухолевых клеток потребовался не один год сложной кропотливой работы ряда ученых. Первые шаги в изучении роли данных соединений в процессах роста сосудов, были произведены в 1995 году. R. Strieter et al. было показано, что хемокины, содержащие ELR повтор (Glu-Leu-Arg) (ELR-CXC chemokines), обладают выраженной способностью вызывать таксис эндотелиоцитов и при внутрикорнеальном введении способствуют прорастанию сосудов в роговицу [113].

Напротив, хемокины IP-10 (IFN $\gamma$ -индуцибельный белок), MIG (монокин, индуцируемый IFN $\gamma$ ) и TF-4 (тромбоцитарный фактор 4), обладают мультифункциональными свойствами, в том числе и антиангиогенной активностью. Так, IP-10 выступает в качестве ингибитора клональной экспансии гемопоэтических стволовых клеток костного мозга, а также имеет

противоопухолевую активность, выступая в качестве хемоаттрактанта для моноцитов и макрофагов. Ангиостатический эффект PF-4 проявляется через ингибицию пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, с одной стороны, и через связывание bFGF и VEGF со своими рецепторами, тем самым снижая их проангиогенные эффекты, с другой стороны [71].

Усиленный метаболизм трансформированных клеток и быстрые темпы роста требуют формирования своей собственной сети из предсуществующих сосудов, при этом образующие сосуды способствуют метастазированию опухоли и являются одним из основных звеньев прогрессирования опухоли.

Опухолевый неоангиогенез по цитокиновому профилю похож на ангиогенез при заживлении ран, однако, существует значительное различие в морфологическом строении, также они распределяются хаотично, обладают повышенной извитостью, делатацией, неполноценной базальной мембраной, фенестрацией, внутриклеточными порами, их сосудистая стенка содержит не только эндотелиоциты, но и опухолевые клетки [78]. Регуляция опухолевого ангиогенеза тоже имеет свои особенности. В случае роста опухоли, имеет место дисбаланс в регуляции со сдвигом в сторону преобладания проангиогенных стимулов [102]. На начальных этапах прогрессирования опухоли эндотелиальные клетки могут активно секретировать цитокины (IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ ), ограничивающих пролиферацию злокачественно-трансформированных клеток, которые в ответ, секретируют молекулы, обладающие антиангиогенным потенциалом (TSP-1) [99]. В результате дальнейшего развития опухолевого процесса опухолевые клетки теряют чувствительность к ингибирующим сигналам и начинают секретировать ростовые факторы, необходимые для инициации процесса ангиогенеза. Злокачественно трансформированные клетки интенсивно продуцируют VEGF и индуцируют его продукцию стромальными клетками (фибробластами, миоцитами), причем повышенная продукция VEGF коррелирует с интенсивностью васкуляризации опухоли и отвечает за неблагоприятный прогноз (рисунок 9) [121]. В экспериментах установлено, что VEGF существенно важен для инициации опухолевого ангиогенеза, а bFGF необходим для



поддержания данного процесса. Однако, активированные эндотелиальные клетки сами являются источником биологически активных молекул, потенцирующих опухолевую прогрессию (bFGF, IGF, PDGF, CSF) [126].



Рисунок 9 – Реципрокные взаимоотношения между опухолью и эндотелием в процессе опухолевого прогрессирования.

Исследования, S. Gupta et al. показали, что CXС хемокин CXCR4 является самым активно экспрессируемым на поверхности эндотелиальных клеток, а его лиганды SDF-1 $\alpha$  и SDF-1 $\beta$  (CXCL12 $\alpha$  и CXCL12 $\beta$ ) являются главными хемоаттрактантами для эндотелиоцитов экспрессирующих CXС рецепторы [41].

К. Tachibana et al., проводили исследования на мышах, накаутных по генам, содержащим информацию строения рецептора CXCR4. Учеными было показано, что данный рецептор играет важнейшую роль в процессах развития сердечно-сосудистой системы и васкуляризации желудочно-кишечного тракта [111].

Немаловажное значение имеют работы по изучению роли хемокинов в перемещении стволовых клеток крови.

T. Lapidot et al. исследовали особенности миграции человеческих гемопоэтических клеток, экспрессирующих хемокиновый рецептор CXCR4, в организме мышей с дефектной иммунной системой. В ходе опыта наблюдалось накопление данных клеток в местах активного кроветворения. Таким образом,

в данном исследовании была доказана роль хемокинов в процессах миграции, развития и пролиферации гемопоэтических клеток [107].

### ***1.5.6 Роль хемокинов в метастазировании опухоли***

При исследовании профилей экспрессии генов в раковых стволовых клетках опухоли молочной железы выявлено, что практически во всех этих клетках активен ген рецептора CXCR1. Это рецептор к IL-8 (интерлейкин-8), для которого была доказана причастность к развитию злокачественных опухолей (глиома, рак простаты, молочной железы и яичников). Также ранее удалось доказать *in vitro*, что IL-8 стимулирует самообновление раковых стволовых клеток молочной железы. Следующим этапом исследования стало обнаружение эффективных малых молекул-ингибиторов и антител к CXCR1. Молекулы-кандидаты были протестированы на линии раковых клеток молочной железы человека. Малая молекула-ингибитор репариксин (reparixin) и антитела к CXCR1 вызвали значительное снижение количества раковых стволовых клеток в популяции по сравнению с контролем. Разработанные антитела (OMP-21M18) нацелены на блокировку сигнального пути Notch, который участвует в регулировании процессов пролиферации клеток при органогенезе. Механизм действия репариксина заключается в том, что ингибирование CXCR1 запускает синтез растворимого лиганда Fas (sFASL) – одного из внешних факторов (так называемый «фактор смерти»), запускающих в клетке процесс апоптоза – запрограммированного клеточного «самоубийства». На мышах-ксенграфтах с моделью рака молочной железы наилучшие результаты показала терапия, сочетающая репариксин в комбинации с химиотерапией доцетакселом (docetaxel). Продемонстрировано, что в ответ на химиотерапию часть раковых клеток перед гибелью высвобождает сигнальные молекулы, в том числе IL-8 и FasL, которые связываются с рецепторами раковых клеток, резистентных к химиотерапии

и активируют их внутриклеточные сигнальные пути. Ингибирование CXCR1 рецепторов останавливает пролиферацию и активирует апоптоз раковой стволовой клетки [48].

В-клеточные и Т-клеточные опухоли имеют гетерогенную картину привлечения лимфоидных и нелимфоидных органов, которая может складываться в результате различной экспрессии хемокинов и хемокиновых рецепторов [42, 50, 58].

В случае генотипа del32bpCCR5 количество активных рецепторов на поверхности клеток уменьшается вдвое и, как следствие – уменьшается и чувствительность клеток к хемоаттактантным лигандам (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  (macrophage – inflammatory protein), RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and selected), в ответ на которые лимфомные клетки рециркулируют по крови во вторичные лимфоидные органы [70]. Однако, таким патогенетическим механизмом можно объяснить диссеминацию опухолевых клеток не при всех вариантах неходжкинских лимфом (НХЛ), по причине отсутствия экспрессии CCR5 при некоторых типах В- и Т-клеточных НХЛ [101, 127].

Однако, есть данные о вовлечении хемокинов в распространение опухоли путем не только регуляции миграции клеток, но также и стимуляции ангионеогенеза [45].

Имеются данные, что хемокиновый рецептор CCR5 играет ключевую роль не только в миграции, хоминге лимфоцитов, но и в ангионеогенезе [95].

В исследовании Воропаевой Е.Н. с соавт. показано, что дикий тип гена хемокинового рецептора CCR5 при НХЛ был сопряжен с большим распространением опухолевых клеток по лимфоидным органам (лимфоузлы и селезенка), причем у больных с диким типом CCR5 спленомегалия регистрировалась в 1,7 раз чаще. Также была отмечена большая частота встречаемости лейкомизации лимфомы среди пациентов с диким типом гена CCR5 в сравнении с пациентами с делецией данного гена (74 и 45% соответственно) [8].

Данные E. Azenshtein et al. демонстрируют негативную корреляцию между экспрессией CCR532del и ростом рака молочной железы (РМЖ) [108]. Доказан тот

факт, что уровень экспрессии гена рецептора CCR5 в лимфоцитах периферической крови взаимосвязан со стадией заболевания [22].

В исследовании Н.Н. Бабышкиной показано, что оценка распределения генотипов гена CCR5 показало значимое повышение частоты встречаемости гетерозиготного генотипа CCR5/CCR5del32 у больных фиброаденомами молочной железы и фиброзно-кистозной мастопатии, представленных как предопухолевые заболевания молочной железы, и пациенток раком молочной железы по сравнению со среднепопуляционной нормой. Также отмечено достоверно значимое увеличение частоты встречаемости делеционного варианта гена CCR5 у больных РМЖ с локализованным процессом, в сравнении с контрольной выборкой, что дает нам возможность ассоциировать данный генотип с более благоприятным прогнозом клинического течения болезни [2]. А также среди больных РМЖ с благоприятным прогнозом заболевания (отсутствие рецидивов и метастазов при 2 и 5-летнем наблюдении) выявлен более высокий процент лиц с генотипом CCR5/CCR5del32 в сравнении с группой пациенток с неблагоприятным прогнозом. Отмечено, что у больных РМЖ с большим размером первичной опухоли (T3 и T4) экспрессия CCR5 в лейкоцитах крови выше, чем у больных с меньшим размером опухолевого узла (T1 и T2). У больных РМЖ с I степенью патоморфоза после неoadьювантной химиотерапии экспрессия в лейкоцитах крови CCR5 была достоверно ниже пациентов с III степенью патоморфоза [3].

С другой стороны, в исследованиях показано, что дикий тип гена CCR5 и высокая экспрессия соответствующего рецептора связаны с более высоким метастатическим потенциалом опухолевых клеток [108].

При исследовании полиморфизмов генов хемокинового рецептора CCR5 у больных раком легкого (n=181) методами ПЦР и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДР]Ф-анализа) выявлено распределение генотипов CCR5 у больных раком легкого и здоровых: CCR5del32/ CCR5del32-4,8 и 0%, CCR5/CCR5del32-38,1 и 12,5%, CCR5/CCR5-61,9 и 82,7% соответственно. У больных раком легкого с метастазами в региональные лимфоузлы частота CCR5del32 составила 28,6%, без метастазов – 7,8%. У больных раком легкого

выявлена ассоциация CCR5del32 с более высоким риском лимфогенного метастазирования [38].

После проведения неoadъювантной химиотерапии в 80% случаев наблюдается снижение уровня экспрессии гена CCR5 в лимфоцитах периферической крови [22].

Роль хемокинов в патогенезе острых лейкозов является немаловажной [105]. Так, например, IL-8 продуцируется бластными клетками и представляется не только хемоаттрактантом, но и мощным ангиорегулирующим медиатором [33]. С другой стороны, участвующие в хемотаксисе Т-клеток хемокины CXCL-10, CCL-17 могут выделяться бластными клетками и их продукция не имеет корреляции с возрастом, генетическими аномалиями, дифференцировкой бластных клеток и ответом на проводимую химиотерапию. Кроме участия в хемотаксисе IP-10/CXCL-10 действует как антиангиогенный фактор. Хемотаксис Т-лимфоцитов также включает в себя и привлечение Т-лимфоцитов с противоопухолевой активностью [44].

По данным исследований Д.В. Моторина и А.Ю. Зарицкого уровни хемокинов MIG/CXCL-9 и IP-10/CXCL-10 в сыворотке при острых лейкозах достоверно выше, чем в группе контроля. Также ими установлено, что при острых лимфобластных лейкозах уровень I-TAC/CXCL-11 в сыворотке крови имеет отрицательную корреляцию с продолжительностью жизни пациента, а при острых миелобластных лейкозах уровень IP-10/CXCL-10 имеет положительную корреляцию с длительностью ремиссии после проведенного лечения [11].

Механизмы, используемые опухолевыми клетками при метастазировании, во многом схожи с теми, что используются различными клетками в процессе осуществления физиологических функций.

Предпосылками для появления теории о том, что хемокины (CXCR4/CXCL12), могут участвовать в процессах направленного движения метастазов в определенный орган, стали работы, показавшие исключительную роль данных соединений в перемещении гемопоэтических клеток к местам

крововетворения, миграции иммунокомпетентных клеток в очаги воспаления и эндотелиоцитов в направлении ишемизированных очагов [15].

К. Mashino et al. в исследовании доказали наличие корреляции между экспрессией опухолевыми клетками рецептора CCR7 и метастазами в регионарные лимфатические узлы. При добавлении в культивируемую среду с клетками рака желудка, данных лигандов, наблюдалась активация хемотактических и инвазивных способностей данных клеток. Данное исследование показывает, что рецептор CCR7 играет важную роль в процессах миграции и инвазии опухолевых клеток [60].

А. Letsch et al. исследовали зависимость экспрессии хемокинового рецептора CCR9 на поверхности клеток меланомы и метастазирование в тонкую кишку. Данный хемокиновый рецептор является типичным для хемокина, выделяемого тимусом (ТЕСК) и тонкой кишкой. В ходе исследования была выявлена прямопропорциональная зависимость между экспрессией данного рецептора на поверхности клеток и появлением метастазов в тонкой кишке [63].

Гипотезы о том, что хемокиновые рецепторы участвуют в процессах метастазирования в определенные органы, подразумевает, что в организме, существуют очаги, выделяющие хемокины в системный кровоток. Наиболее вероятно, что клетки синтезирующие данные цитокины, находятся в местах наиболее частого метастазирования опухолей. Р. Gassmann et al. показали, путем использования прижизненной иммунофлуоресцентной микроскопии, что лиганд CXCL12 (рецептор CXCR4) секретируется эндотелиальными и Купферовскими клетками синусоид печени.

А. Muller et al. предположили, что процесс регионарного метастазирования опухолевых клеток, во многом схож с процессами перемещения дендритных клеток в лимфатические узлы. Он показал, что опухолевые клетки при раке молочной железы и меланоме экспрессируют рецепторы CXCR4 и CCR7 соответственно, лигандами для которых являются CXCL12/SDF-1 (alpha) и CCL21/6Ckine. Данные лиганды в большом количестве секретируются в лимфатических узлах, печени и красном костном мозге – в местах наиболее

часто выявляемых метастазах при данных типах опухолей [74]. Таким образом, была показана роль экспрессии данных рецепторов в процессах распространения метастазов при меланоме и раке молочной железы.

Рядом авторов проведено исследование зависимости экспрессии хемокиновых рецепторов в опухолевой ткани рака яичников и наличия у пациенток гипертиреоза, что усугубляет прогноз заболевания у данной когорты пациенток [23].

Одним из путей определения роли вещества в каком-либо процессе, является создание модели, с дефектом продукции данного соединения. Далее следует детальное изучение данной модели с позиции функционирования интересующих процессов. P. Gassmann et al. путем применения анти-CXCR4 антител добились нарушения процессов выхода опухолевых клеток из циркуляторного русла [52].

I. Zeelenberg et al. остановили работу рецептора CXCR4, путем трансфекции внутрь клеток рака толстой кишки линии гена SDF-1, сцепленного с геном KDEL. SDF-KDEL задерживается в эндоплазматическом ретикулуме за счет KDEL-рецептора, и связывая CXCR4 рецепторы, предотвращая их выход на поверхность клетки. В ходе культивирования данных клеток *in vivo*, было отмечено значительное снижение частоты метастазирования в легкие и печень. Было показано, что нарушение процессов метастазирования происходило не только из-за нарушения процессов проникновения в ткани, доказанное ранее, но и из-за нарушения функционирования микрометастазов [131].

A. Sehgal et al. показали, что рецептор CXCR4 экспрессируется в 57% всех случаев глиомы головного мозга. Введение в культивируемые клетки анти-CXCR4 последовательности нуклеотидов, приводило к прекращению экспрессии данного рецептора. Клетки, подвергшиеся трансфекции, приостанавливали процессы деления и пролиферации [49]. Таким образом, было показано, что хемокиновые рецепторы также участвуют в процессах деления и пролиферации клеток глиом.

Данные работы показали, что хемокиновые рецепторы играют немаловажную роль в метастазировании, участвуя в процессах выхода клеток

в циркуляторное русло, выживании микрометастазов, процессах проникновения в ткани и последующей пролиферации, что в конечном итоге приводит к формированию метастатической опухоли.

Дальнейшие исследования были направлены на поиск наличия зависимости между экспрессией хемокинового рецептора и некоторыми клиническими данными.

J. Kim et al., путем анализа общей выживаемости пациентов, страдающих раком толстой кишки, достоверно доказали, что высокая экспрессия рецептора CXCR4 значительно уменьшает медиану выживаемости пациентов (median 27 months vs 10 months, respectively;  $p=0,036$ ). Для пациентов, страдающих меланомой, данная корреляция была недостоверна [40].

D. Uchida et al., путем подсчета клеток плоскоклеточного рака головы и шеи методами проточной цитометрии, выявили, что повышение количества клеток, экспрессирующих рецептор CXCR4, увеличивает частоту метастазирования в регионарные лимфатические узлы [86].

Рядом авторов была показана роль экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 при распространении метастазов при нейробластоме и раке поджелудочной железы [25, 61]. W. Shen et al. показали роль данного хемокина и в процессах прикрепления пре-В клеток острой лимфобластной лимфомы в строме красного костного мозга [110].

Проведенные многочисленные работы по поиску корреляции между экспрессией хемокиновых рецепторов и наличием метастазов в различных органах позволяют сделать вывод об исключительной роли данных соединений в процессах гематогенного [131] и лимфогенного [109] метастазирования. Наличие зависимости было обнаружено для рецепторов CXCR4 [98], CCR7 [106], CCR9 [63] и CCR6 [39], экспрессируемыми различными опухолевыми клетками.

На основе данных наблюдений было предложено использование анти-CXCR4 антител в качестве антиметастатического средства. M. Dowsland предлагал использование данных антител для предотвращения появления как местных, так и отдаленных метастазов при раке молочной железы [43].



Учитывая вышеизложенные данные, становится очевидным, что поиск дополнительных маркеров и факторов риска прогрессирования РОК продолжает оставаться областью для исследований.

Так в настоящее время рядом исследователей ведутся работы о изучении предиктивного и прогностического значения хемокинового рецептора CXCR4 при колоректальном раке [88]. В нашей работе планируется провести анализ клинических и морфологических факторов у больных РОК и оценить их влияние на показатель БРВ. В результате работы мы планируем создать алгоритм, который, возможно, позволит оптимизировать адьювантное противоопухолевое лечение.

## Глава 2

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проведено открытое проспективное нерандомизированное исследование больных раком ободочной кишки (РОК), находившихся под наблюдением в СПб ГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер» с период с 2010 по 2016 год.

В исследование включено 113 пациентов с верифицированной аденокарциномой ободочной кишки, у которых после проведенного радикального хирургического лечения стадия заболевания была определена как II (T4N0M0) или III (Тлюбое N1-2 M0). На момент включения пациентов в исследование с целью стадирования рака ободочной кишки и ректосигмоидного соединения использовалась классификация TNM, 7-е издание (2009 г.). Кроме того, с целью распределения больных в группы исследования, нами использовалась классификация, созданная Duke's еще в 1932 г., которая в настоящий момент используется в основном в странах Северной Америки и Западной Европы [12] (таблица 2).

Таблица 2 – Стадирование рака ободочной кишки по классификации Duke's

Стадирование рака ободочной кишки по Duke's		
Duke's A	Duke's B	Duke's C
T1-2N0M0	T3-4N0M0	Любая TN1-2M0

В зависимости от стадии заболевания все пациенты были разделены на 2 группы: Группе А (53 пациента) составили пациенты, у которых выявлена II стадия заболевания (Dukes B), Группу Б (60 пациентов) – пациенты, у которых выявлена III стадия заболевания (Dukes C). Всем пациентам было проведено лечение по клиническим протоколам, действующим на момент проведения

настоящего исследования (2010-2016 гг.). Пациентам группы А было проведено только хирургическое лечение, пациентам группы В – комплексное лечение (хирургическое лечение + АХТ).

Все пациенты были прооперированы в колопроктологическом отделении СПб ГБУЗ ГКОД. Выбор объема хирургического вмешательства определялся исходя из стадии заболевания и локализации первичного опухолевого очага: при локализации опухоли в правом фланке (слепая кишка, восходящая ободочная кишка, печеночный изгиб ободочной кишки, проксимальная треть поперечной ободочной кишки) выполнялась правосторонняя гемиколэктомия; при локализации опухоли в средней трети поперечной ободочной кишки выполнялась резекция поперечной ободочной кишки; при локализации опухоли в левом фланке (дистальная треть поперечной ободочной кишки, селезеночный изгиб ободочной кишки, нисходящая ободочная кишка, проксимальная треть сигмовидной кишки) выполнялась левосторонняя гемиколэктомия; при локализации опухоли в сигмовидной кишки выполнялась резекция сигмовидной кишки или операция по типу Гартмана. Все операции были выполнены с тотальной мезоколонэктомией лимфодиссекцией в объеме D3.

АХТ проводилась только пациентам группы В, длительность терапии была ограничена сроком в 6 месяцев после хирургического лечения. Терапия проводилась по стандартным схемам АХТ- схема FOLFOX4 (оксалиплатин 85 мг/м<sup>2</sup> в/в капельно в день 1, лейковорин 200 мг/м<sup>2</sup> в/в капельно в дни 1 и 2. 5-фторурацил 400 мг/м<sup>2</sup> в/в струйно в дни 1 и 2, 5-фторурацил 600 мг/м<sup>2</sup> 22-часовая инфузия в дни 1 и 2; цикл каждые 14 дней) и De Gramont (оксалиплатин 85 мг/м<sup>2</sup> в/в капельно в день 1, лейковорин 200 мг/м<sup>2</sup> в/в капельно в дни 1 и 2. 5-фторурацил 400 мг/м<sup>2</sup> в/в струйно в дни 1 и 2. 5-фторурацил 600 мг/м<sup>2</sup> 22-часовая инфузия в дни 1 и 2; цикл каждые 14 дней).

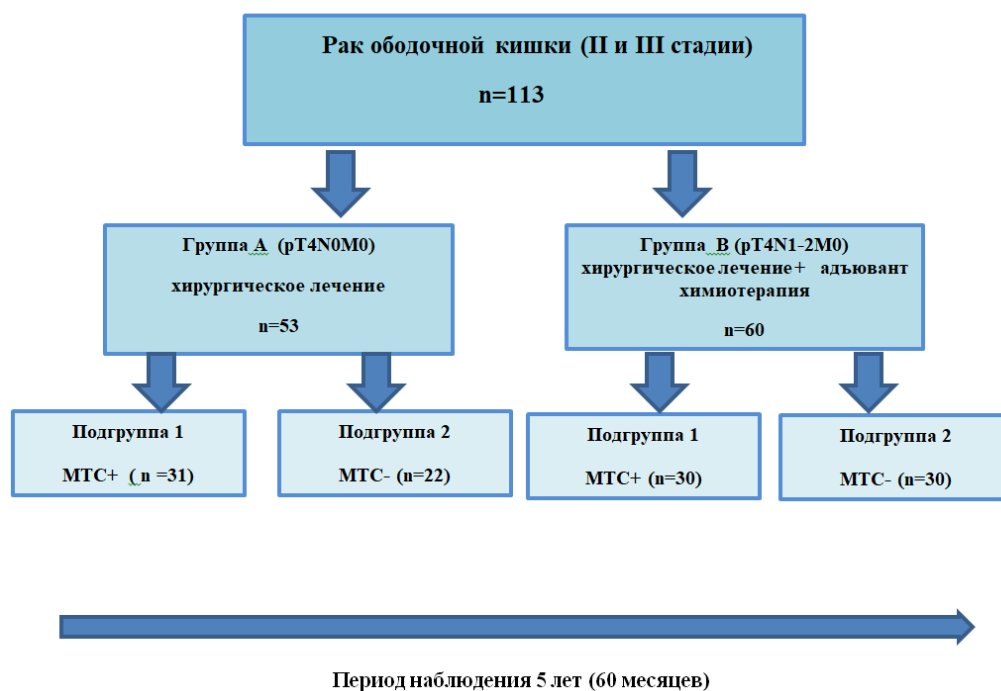
После проведенного лечения всем проводились диагностические процедуры согласно стандартам наблюдения пациентов имеющих рак ободочной кишки в течение 5 лет после хирургического вмешательства.

*Стандарты наблюдения пациентов с II-III стадией рака ободочной кишки после радикального хирургического лечения:*

- 1) Физикальный осмотр каждые 3-6 месяцев в течение 2 лет, дальше каждые 6 месяцев до 5 лет.
- 2) Кровь на РЭА каждые 3-6 месяцев в течении 2 лет, дальше каждые 6 месяцев до 5 лет.
- 3) КТ органов грудной клетки, органов брюшной полости с контрастированием 1 раз в 12 месяцев до 5 лет.
- 4) МРТ органов малого таза каждые 12 месяцев до 5 лет.
- 5) Фиброколоноскопия 1 раз в 12 месяцев.

Каждая группа пациентов (Группа А и Группа Б) в зависимости от факта возникновения отдаленных метастазов в течении 5 лет была разделена на две подгруппы: у пациентов подгруппы 1 каждой группы в течение 60 месяцев не было зарегистрировано появления прогрессирования в виде визуализации регионарных и отдаленных метастазов при использовании стандартных методик наблюдения; у пациентов подгруппы 2 зарегистрировано прогрессирование процесса в виде появления отдаленных очагов метастазирования за 60-месячный период наблюдения при использовании стандартных методик наблюдения.

Таким образом, дизайн исследования выглядел следующим образом (рисунок 10):



МТС+ – появление метастазов; МТС- – отсутствие метастазов.

Рисунок 10 – Дизайн исследования

Общий период наблюдения за пациентами составил 60 месяцев с момента проведения хирургического вмешательства.

## 2.1 Характеристика пациентов Группы А

В группу А было включено 53 пациента: 26 мужчин и 27 женщин в возрасте от 28 до 76 лет, средний возраст составил  $59,41 \pm 8,62$  год, медиана возраста составила 61 год.

Все пациенты имели верифицированный диагноз аденокарциномы ободочной кишки. Распределение больных по локализации первичной опухоли представлено на рисунке 11: сигмовидная кишка – 26 (49,05%), слепая кишка – 6 (11,3%), селезеночный изгиб ободочной кишки – 6 (11,3%), поперечно-ободочная кишка – 6 (11,3%), печеночный изгиб ободочной кишки – 1 (1,89%),

нисходящий отдел ободочной кишки – 3 (5,66%), восходящий отдел ободочной кишки – 5 (9,43%) (рисунок 11). Таким образом, правосторонняя локализация выявлена у 12 пациентов (23%), левосторонняя у 41 пациента (77%).



Рисунок 11 – Локализации первичной опухоли в группе А.

## 2.2 Характеристика больных Группы В

В группу В было включено 60 пациентов: из них 30 мужчин и 30 женщин в возрасте от 31 до 70 лет, средний возраст составил  $59,60 \pm 3,48$  года, медиана возраста составила 61 год.

Все пациенты группы В имели верифицированный диагноз аденокарциномы ободочной кишки. Распределение больных по локализации первичной опухоли представлено на рисунке 12: сигмовидная кишка была поражена у – 24 пациентов, слепая кишка – у 18, селезеночный изгиб ободочной кишки – у 2 восходящий отдел ободочной кишки – у 6: соответственно. Таким образом, правосторонняя

локализация выявлена у 24 пациентов (40%), левосторонняя у 36 пациентов (60%).



Рисунок 12 – Локализации первичной опухоли в группе В.

После проведенного хирургического лечения все пациенты были стадированы по классификации TNM, редакция 7.0, по параметру Т все пациенты были идентичны – Т4, по параметру N: 42 пациент имели параметр N2 и 18 пациентов N1, что соответствовало III стадия, Dukes C.

### 2.3 Методика гистологического исследования

Материал, полученный во время операции (первичная опухоль и регионарные лимфатические узлы) подвергались гистологическому исследованию в патологоанатомическом отделении (ПАО) СПб ГБУЗ ГКОД. Подготовка материала проводилась по существующим правилам и включала следующие этапы:

- фиксация материала в 3% растворе формалина в условиях операционной (после чего материал передавался в патологоанатомическое отделение);
- регистрация материала в ПАО СПб ГБУЗ ГКОД;
- фиксация материала в течение не менее 24 часов, но не более 72 часов;
- извлечение материала из раствора формалина, промывка в проточной воде, высушивание на фильтровальной бумаге и заливка парафином;
- помещение залитого в формалине материала в термостат с выдерживанием в течение 24 часов при температуре 37 °С с целью равномерного и полного пропитывания тканевого образца парафином;
- подготовка гистологических срезов с помощью микротомы (толщина не более 10-15 мкм);
- нанесение срезов на предметные стекла и прокрашивание гематоксилином и эозином;
- микроскопическое исследование: обзорный осмотр проводили под увеличением, кратным 5-10, а прицельный – под увеличением, кратным 25-40.

Изначально все гистологические препараты были исследованы на наличие опухолевой ткани, был подтвержден диагноз аденокарциномы ободочной кишки.

После выполнения гистологического исследования выбирался блок, содержащий опухолевую ткань, который подвергался иммуногистохимическому исследованию: определялся уровень экспрессии Ki-67; наличие и уровень экспрессии хемокиновых рецепторов CCRX 4 и CCR 10 и молекулярно-генетическому анализу (определение мутации в гене KRAS 12,13 кодон).



## 2.4 Иммуногистохимическое исследование наличия и уровня экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CCR10

Данный этап работы проводился в лаборатории иммуногистохимии ФБГУ РНЦРХТ им. А.М. Гранова.

При микроскопическом исследовании выбирался блок с опухолью и нормальной слизистой оболочкой. С данного блока нарезались срезы толщиной 4 микрон, которые помещали на стёкла с поли-L-лизиновым покрытием. Срезы подсушивались, депарафинировались и подвергались демаскировке антигенов при помощи цитратного буфера в условиях водяной бани,  $t=95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 минут. После чего они остывали при комнатной температуре и промывались трис-буфером с твином. Каждый срез обводился парафиновым карандашом, после чего на образец наносили 3 капли 3% перекиси водорода и выдерживали в течение 20 минут для ингибирования эндогенной пероксидазы. Затем на каждый срез наносилось первое антитело анти- CCR10, экспозиция длилась 30 минут на термостойке в условиях «водяной бани» при температуре  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Антитело к CXCR4 инкубировалась в течение 12-18 часов при температуре  $+2 - +8\text{ }^{\circ}\text{C}$  (в условиях холодильной камеры), демаскировка антигенов на данном срезе не проводилась, в остальном протокол иммуногистохимического исследования не отличался от CCR10. Визуализация реакция антиген-антитело осуществлялось при помощи системы визуализации EnVisionReal (DAKO) и диаминобензидином в качестве хромогена.

Гистологические блоки всех пациентов были исследованы на экспрессию хемокиновых рецепторов CXCR4, CCR10 иммуногистохимическим методом. Учитывая, что в настоящее время нет стандартов градации окраски для хемокиновых рецепторов в опухолевой ткани, нами была самостоятельно определена и выделена шкала определения уровня экспрессии хемокиновых рецепторов: низкий, средний, высокий. Уровень экспрессии определялся

интенсивностью окраски в процентном содержании рецепторов хемокинов в аденокарциноме толстой кишки (таблица 3).

Таблица 3 – Уровни экспрессии хемокиновых рецепторов

Уровень экспрессии	Шкала градации
0-30% (мало интенсивная окраска)	Низкий уровень
30-70% (умеренно интенсивная окраска)	Средний уровень
70-100% (высоко интенсивная окраска)	Высокий уровень

Под микроскопом ( $\times 400$ ) уровни экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 выглядели как видно на рисунках 13-15.

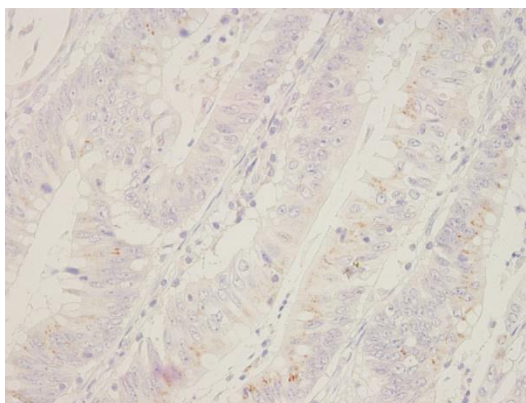


Рисунок 13 – Низкий уровень хемокиновых рецепторов ( $\times 400$ )

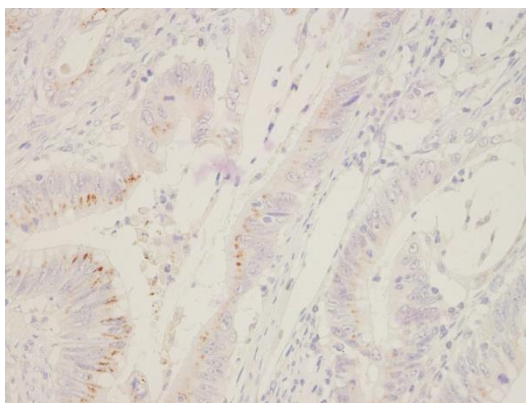


Рисунок 14 – Средний уровень хемокиновых рецепторов ( $\times 400$ )

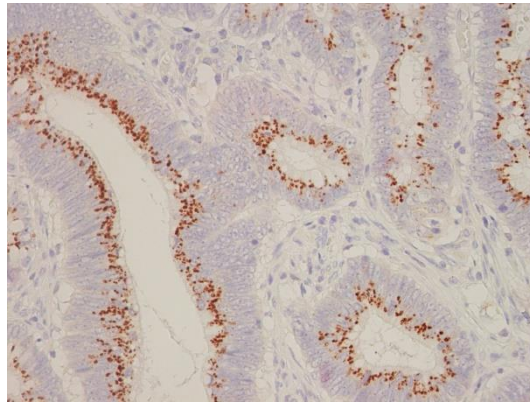


Рисунок 15 – Высокий уровень хемокиновых рецепторов ( $\times 400$ )

## **2.5 Иммуногистохимическое исследование образца опухолевой ткани с целью оценки уровня индекса пролиферации (Ki-67)**

Материал поступал в лабораторию для иммуногистохимического исследования в виде парафиновых блоков.

При микроскопическом исследовании выбирался наиболее подходящий блок, содержащий опухолевую ткань. С данного блока нарезались срезы толщиной 4 микрон, которые помещали на стёкла с поли-L-лизинным покрытием. Срезы подсушивались, депарафинировались и подвергались демаскировке антигенов при помощи цитратного буфера в условиях водяной бани,  $t=95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 минут. После чего они остывали при комнатной температуре и промывались трис-буфером с твином. Каждый срез обводился парафиновым карандашом, после чего осуществлялось ингибирование эндогенной пероксидазы 3% перекисью водорода в течение 20 минут. Затем на каждый срез наносилось антитело (Клон SP6, антитела кроличьи, моноклональные, разведение 1:200, фирма производитель LabVision), экспозиция длилась 1 час на термостойке в условиях «водяной бани» при температуре  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Для визуализации реакции антиген-антитело применялась полимерная система детекции EnVision (DAKO), в качестве хромогена применялся

диаминобензидин. Контрокрашивание ядер осуществлялось с помощью гематоксилина Майера. После каждого из этапов до этапа окрашивания диаминобензидином стекла со срезами промывались в трис-буфере (рН 7,1). Стекла заключались в среду BioMaunt (BioOptica).

Уровень пролиферации оценивался при помощи экспрессии Ki-67: менее 15% расценивался как низкий, уровень от 15 до 30% как умеренный, свыше 30% как высокий.

## **2.6 Молекулярно-генетический анализ KRAS мутации (12, 13 кодон)**

Материалом для детекции K-ras мутации служили образцы опухолевой ткани в парафиновых блоках. Генотипирование проводилось путем поиска горячих точек мутагенеза в гене KRAS (12, 13 кодон) с помощью полимеразной цепной реакции по стандартной методике, описанной в работе М.А. Сазоновой в 2005 году [1]. ПЦР проводилась с помощью электрофореза в 1,5-2% агарозном геле с использованием однократного трис-ацетатного (ТАЕ) буфера с предварительным окрашиванием гелей бромистым этидием. SSCP-анализ амплифицированного экзона 1 гена K-ras (157 пар оснований и 200 пар оснований) проводили безизотопным методом. Сиквенс амплифицированного фрагмента гена K-ras (200 пар оснований), содержащего аномалии, выявленные в ходе SSCP-анализа или рестрикционного анализа, проводили с помощью автоматического секвенатора фирмы «AppliedBioSystems», модель 377, используя систему «BigDye-terminators». Геномную ДНК из образцов опухолевых тканей выделяли с помощью набора «QIAampBloodandTissueKit» фирмы «QIAGEN» по соответствующим протоколам [1].

При ПЦР – амплификации фрагментов k-ras (157 пар оснований и 200 пар оснований), содержащих 12-й и 13-й кодоны, использовали следующие праймеры:

1) 5/ACTGAATATAAACTTGT – GGTAGTTGGACCT 3/ и 5/TCAAAGAATGGTCCTGGACC3/ для фрагмента размером 157 пар оснований.

2) 5/ GТАCTGGTGGAGTATTTGATA 3/ и 5/ СТСАТGAAAATGGTCAGAGA 3/ для фрагмента размером 200 пар оснований реакционная смесь объемом 35 мкл содержала 0,3-0,4 мкг геномной ДНК, 25 пмоль каждого праймера, 200 мкмоль дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 10 ммольтрис\_HCl (pH 8,3), 50 ммоль KCl, 2 ммоль MgCl<sub>2</sub> и 1,5 ед. Taq-полимеразы («PerkinElmer») [1].

Режим ПЦР выполнялся следующим образом: денатурация ДНК при температуре 95 °С в течение 3 мин, затем при температуре 94 °С в течение 1 мин, при температуре 55 °С в течение 1 мин и при температуре 72 °С – 30 с, всего 30 циклов с заключительным синтезом при 72 °С в течение 7 мин [1].

Рестрикционный анализ продуктов ПЦР (фрагмент 157 пар оснований) проводили с помощью эндонуклеазы BstNI в условиях, рекомендованных изготовителем («NewEnglandBioLabs»), определение продуктов рестрикции – методом электрофореза в полиакриламидных гелях после окрашивания их бромистым этидием; SSCP-анализ амплифицированного 1-го экзона гена k-ras (157 и 200 пар оснований) проводили безизотопным методом, как описано ранее. Секвенирование амплифицированного фрагмента гена k-ras (200 пар оснований), содержащего аномалии, выявленные в ходе SSCPанализа или реестрикационного анализа, проводили с помощью автоматического секвенатора фирмы «AppliedBioSystems» (модель 377) и системы «BigDye-terminators» в соответствии с рекомендациями изготовителя [1].

## 2.7 Статистическая оценка

Статистический анализ выполнен с использованием статистического пакета MedCalc (ver. 19.4.1), MicroSoft Exel (ver. 16.16.22). Расчет объема выборки

производили с помощью программы Pass 11.0.7. Количественные переменные оценивались с помощью методов описательной статистики. В случае нормального распределения признака результаты представлялись в виде  $M \pm m$ , ( $M$  – среднее выборочное,  $m$  – ошибка среднего); при отсутствии нормального распределения в виде медианы с межквартильным размахом [Q25-Q75]. При условии нормального распределения признака, определенного при помощи теста Шапиро-Уилка для проведения сравнительного анализа использовался параметрический t-критерий Стьюдента (для независимых выборок). В случае распределения признака, отличного от нормального, для сравнительного анализа использовались методики непараметрического анализа: U-критерий Манна-Уитни, критерий  $\chi^2$  хи-квадрат (для независимых выборок). Оценку корреляционных взаимосвязей проводили с помощью коэффициента корреляции Пирсона. Выживаемость без прогрессирования и общая выживаемость оценивались с помощью процедуры Каплана-Майера. Значимость различий между сравниваемыми группами (однофакторный анализ) определялась с помощью логарифмического рангового критерия (log-rank test). С целью проведения многофакторного анализа для изучения факторов, влияющих на риск прогрессирования и смерти больных использовался регрессионный метод Кокса (Proportional hazard regression model).

Различия принимались значимыми при двустороннем  $p < 0,05$ .

### Глава 3

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Оценка клинических факторов прогноза у больных раком ободочной кишки со II стадией T4N0M0 (Dukes B) (группа А)

В группу А было включено 53 пациента с верифицированным диагнозом аденокарциномы ободочной кишки со II стадией T4N0M0 (Dukes B) после радикального хирургического лечения, проведенного в 2014-2016 гг. Согласно рекомендациям Ассоциации онкологов России на 2014-2016 гг. больным этой группы назначено динамическое наблюдение без проведения адьювантной химиотерапии. Медиана наблюдения за больными составила 60 месяцев. По мере возникновения отдаленных метастазов в различные сроки периода наблюдения, все пациенты были разделены на 2 подгруппы: с отдаленными метастазами (MTC+) и без отдаленных метастазов (MTC-).

Клиническая характеристика пациентов группы А представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Клиническая характеристика больных раком ободочной кишки группы А (стадия T4N0M0) (n=53)

Характеристика пациентов	Подгруппа 1 (n=31) (MTC+)	Подгруппа 2 (n=22) (MTC-)	p-value
Стадия pT4N0M0	31 (100%)	31 (100%)	p=1,00
Возраст *			
18-44	5 (16,5%)	0 (0%)	p=0,045
45-59	6 (19%)	12 (55%)	p=0,006
60-74	18 (58%)	10 (45%)	p=0,350
старше 75	2 (6,5%)	0 (0%)	p=0,222

Продолжение таблицы 4

Характеристика пациентов	Подгруппа 1 (n=31) (МТС+)	Подгруппа 2 (n=22) (МТС-)	p-value
Пол			
Женщины	16 (51,61%)	12 (54,5%)	p=0,835
Мужчины	15 (48,39%)	10 (45,5%)	p=0,829
Локализация первичной опухоли:			
– правые отделы ободочной кишки;	6 (19,4%)	12 (54,5%)	p=0,007
– левые отделы ободочной кишки	25 (80,6%)	10 (45,5%)	p=0,007
Характер хирургического лечения:			
– резекция сигмовидной кишки;	18 (58%)	8 (36,3%)	p=0,119
– левосторонняя гемиколэктомия;	7 (22,5%)	2 (9%)	p=0,196
– резекция слепой кишки;	0 (0%)	4 (18,3%)	p=0,013
– правосторонняя гемиколэктомия;	3 (9,75%)	5 (22,7%)	p=0,194
– резекция поперечно-ободочной кишки	3 (9,75%)	3 (13,7%)	p=0,655
Примечание – * – ВОЗ, 2019 г.			



В 1 подгруппу был включен 31 пациент, из них 15 (48,39%) мужчин и 16 (51,61%) женщин в возрасте от 28 до 76 лет, средний возраст составил  $59,10 \pm 2,23$  года (95% ДИ от 54,54 до 63,66). Медиана возраста составила 61 год (95% ДИ от 55,59 до 65,00). Во 2-ую подгруппу было включено 22 пациента, из них 10 (45,5%) мужчин и 12 (54,5%) женщин в возрасте от 47 до 72 лет, средний возраст составил  $59,86 \pm 1,70$  года (95% ДИ от 56,32 до 63,40). Медиана возраста составила 57 лет (95% ДИ от 54,00 до 66,05). Проведенный сравнительный анализ демографических характеристик пациентов обеих подгрупп позволил определить, что в 1-ой подгруппе достоверно чаще встречались пациенты более молодого возраста от 18-44 лет (16,5% против 0%;  $p=0,045$ ). Однако, в подгруппе 2 в 55% случаев пациенты имели возраст от 45-59 лет, что достоверно отличалось от подгруппы 1, где пациентов этой возрастной когорты было всего 19% ( $p=0,006$ ). Пациенты возрастных групп от 60-74 лет и старше 75 лет одинаково часто встречались в обеих подгруппах ( $p=0,350$ ,  $p=0,222$  соответственно). По гендерному признаку пациенты обеих подгрупп были сопоставимы ( $p=0,835$  и  $p=0,829$ ).

У всех пациентов группы А гистологически верифицирована аденокарцинома с различной локализацией первичной опухоли: в 1-ой подгруппе – у 18 (58,06%) пациентов первичная опухоль локализовалась в сигмовидной кишке, у 2 (6,45%) – в слепой кишке, у 6 (19,35%) – в селезеночном изгибе ободочной кишки, у 3 (9,68%) – в поперечном отделе, у 1 (3,23%) – в печеночном изгибе и 1 (3,23%) – в нисходящем отделе ободочной кишки. Во 2-ой подгруппе у 8 (36,36%) пациентов опухоль локализовалась в сигмовидной кишке, у 4 (18,18%) пациентов в слепой кишке, у 3 (13,63%) – в поперечно-ободочном отделе толстой кишки, у 2 (9,09%) – в нисходящем отделе ободочной кишки, у 5 (22,72%) – в восходящем отделе ободочной кишки.

Учитывая последние данные изученной литературы, локализация первичной опухоли является важным прогностическим критерием с точки зрения показателей безрецидивной выживаемости. Так, правосторонняя локализация опухоли является одним из факторов раннего метастазирования и агрессивности опухоли ободочной кишки [35]. Как показано в таблице 5, в 1-ой подгруппе

пациентов (MTC+) правосторонняя локализация опухоли выявлялась только у 6 пациентов (19,4%), а во 2-ой подгруппе (MTC-) у 12 пациентов (54,5%). Таким образом, в нашем исследовании локализация первичной опухоли в правом фланке кишки значимо чаще выявлялась в подгруппе без признаков отдаленного метастазирования ( $p=0,007$ ) и, соответственно, не являлась фактором неблагоприятного прогноза, что, возможно связано с малым объемом выборки.

Одним из условий включения в исследование было радикальное хирургическое лечение, подтвержденное патоморфологическим исследованием: R0 резекция, края резекции вне опухолевого роста, лимфаденэктомия в объеме не менее 14-16 регионарных лимфоузлов, отсутствие лимфоваскулярной и перинеуральной инвазии и интраоперационной перфорации опухоли. Таким критериям соответствовали все 53 пациента (100%) группы А.

Хирургическое лечение представлено различными операциями в каждой подгруппе в соответствии с локализацией первичной опухоли в радикальном объеме. Так, в 1-ой подгруппе 18 (58%) пациентам проведена резекция сигмовидной кишки, 7 (22,5%) – левосторонняя гемиколэктомия, 3 (9,75%) – правосторонняя гемиколэктомия, 3 (9,75%) – резекция поперечно-ободочной кишки. Во 2 подгруппе характер хирургического лечения представлен следующим образом: 8 пациентам (36,3%) выполнена резекция сигмовидной кишки, 2 (9%) – левосторонняя гемиколэктомия, 4 (18,3%) – резекция слепой кишки, 5 (22,7%) – правосторонняя гемиколэктомия, 3 (13,7%) – резекция поперечно-ободочной кишки. Резекция сигмовидной кишки ( $p=0,119$ ), левосторонняя гемиколэктомия ( $p=0,196$ ), правосторонняя гемиколэктомия ( $p=0,194$ ), резекция поперечно-ободочной кишки ( $p=0,655$ ) одинаково часто были проведены в обеих подгруппах.

У всех 53 пациентов группы А (100%) не наблюдалось повышение РЭА более 5 нг/мл в послеоперационном периоде.

При последующем динамическом наблюдении у 1-ой подгруппы пациентов группы А было выявлено прогрессирование опухолевого процесса в промежутке от 1 месяца до 44 месяцев. Характеристика метастатического поражения у пациентов 1-ой подгруппы представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика метастатического поражения у пациентов РОК 1 подгруппы группы А

Распределение метастазов	Количество пациентов (n=31)
Характер метастазов	
• Солитарные	5 (16,1%)
• Множественные	26 (83,9%)
Локализация метастазов	
• Печень	22 (70,9%)
• Легкие	7 (22,5%)
• Кости	1 (3,2%)
• Лимфоузлы брюшной полости и забрюшинного пространства	7 (22,5%)
• Местный рецидив	6 (19,3%)
• Другие локализации (брюшина, паховые лимфоузлы, яичники, большой и малый сальник, пупочная область, надключичные лимфоузлы, мягкие ткани брюшной стенки, надпочечники)	10 (32,2%)

Как видно из таблицы 5, множественные метастазы в различные органы встречались у пациентов чаще (83,9%), чем солитарные (16,1%) с преимущественным поражением печени в 70,9% случаев. Также наиболее часто регистрировались метастазы в легкие – у 22,5%, лимфоузлы брюшной полости и забрюшинного пространства – 22,5% и местный рецидив – 19,3%.

### 3.2 Оценка морфологических факторов прогноза у больных раком ободочной кишки со II стадией T4N0M0 (Dukes B) (группа A)

Кроме гистологической верификации первичной опухоли ободочной кишки морфологический материал всех пациентов был нами исследован на дополнительные маркеры – экспрессию хемокиновых рецепторов CXCR4 и CCR 10, KRAS мутацию, а также был определен индекс пролиферации Ki67.

Морфологическая характеристика первичной опухоли пациентов группы A представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Морфологическая характеристика первичной опухоли больных раком ободочной кишки группы A (стадия T4N0M0) (n=53)

Морфологический признак	Подгруппа 1 (n=31)	Подгруппа 2 (n=22)	p-value
Дифференцировка опухоли			
G1	2 (6,5%)	7 (32%)	p=0,015
G2	27 (87%)	12 (54,5%)	p=0,008
G3	0 (0%)	3 (13,5%)	p=0,035
G1+2	2 (6,5%)	0 (0%)	p=0,222
CXCR4 (экспрессия)			
0-30% низкая	6 (19,35%)	16 (72,72%)	p=0,0001
30-70% средняя	16 (51,5%)	1 (4,55%)	p=0,0003
70-100% высокая	9 (29,05%)	5 (22,73%)	p=0,6071
CCR 10	0 (100%)	0 (100%)	p=1,00
Ki 67 (уровень)			
0-15% низкий	0 (0%)	0 (0%)	p=1,00
15-30% средний	4 (12,9%)	1 (4,55%)	p=0,305
30-100% высокий	27 (87,1%)	21 (95,45%)	p=0,305

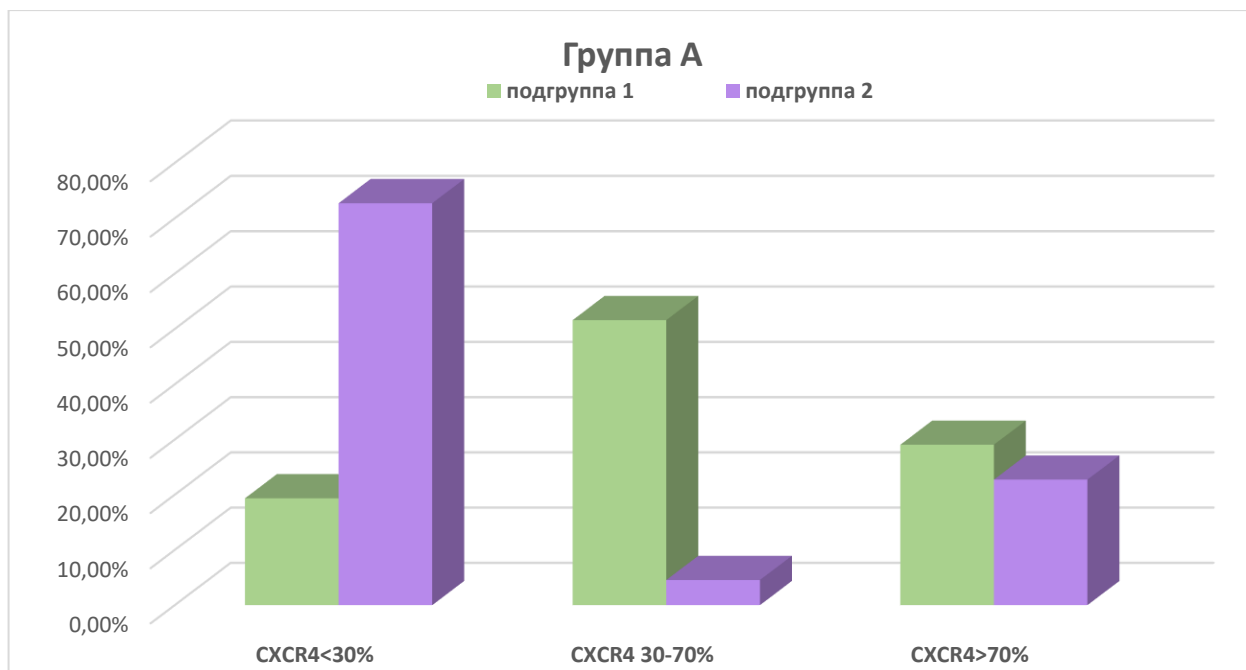
## Продолжение таблицы 6

Морфологический признак	Подгруппа 1 (n=31)	Подгруппа 2 (n=22)	p-value
KRAS мутация			
выявлена	14 (45,16%)	9 (40,90%)	p=0,757
не выявлена	17 (54,84%)	13 (59,09%)	p=0,758

Как видно из представленной таблицы 6, при гистологическом исследовании у 2 (6,5%) пациентов подгруппы 1 процесс верифицирован как высокодифференцированная аденокарцинома, у 27 (87%) – умеренно-дифференцированная аденокарцинома, у 2 (6,5%) – сочетание высоко и умеренно-дифференцированной аденокарциномы. Во 2-ой подгруппе морфологический подтип опухоли представлен у 7 пациентов (32%) высокодифференцированной аденокарциномой, у 12 пациентов (54,5%) – умеренно-дифференцированной аденокарциномой, у 3 пациентов (13,5%) выявлена низкодифференцированная аденокарцинома. Проведенный сравнительный анализ показал, что у пациентов 2-ой подгруппы достоверно чаще выявлялась опухоль высокой (p=0,015) и низкой (p=0,035) дифференцировки. В подгруппе 1 большинство пациентов имели умеренную дифференцировку опухоли (p=0,008). Сочетание высоко и умеренной дифференцировки встречалось только в подгруппе 1, но количество зарегистрированных случаев достоверно не отличалось от подгруппы 2 (p=0,222).

На момент начала исследования не было достаточно литературных данных о значении какого-либо типа хемокиновых рецепторов, характерного для РОК. В связи с этим, нами изучались два самых распространенных типа рецепторов – CXCR4 и CXCR10 (таблица 6). Как было описано во II главе уровень экспрессии хемокиновых рецепторов определялся по шкале, выделенной нами самостоятельно, и дифференцировался интенсивностью окраски в процентом выявлении рецепторов хемокинов в аденокарциноме толстой кишки: низкий (0-30%), средний (30-70%), высокий (70-100%).

При ИГХ исследовании различный уровень (низкий, средний, высокий) экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR 4 выявлен у всех пациентов исследуемой группы (рисунок 16).



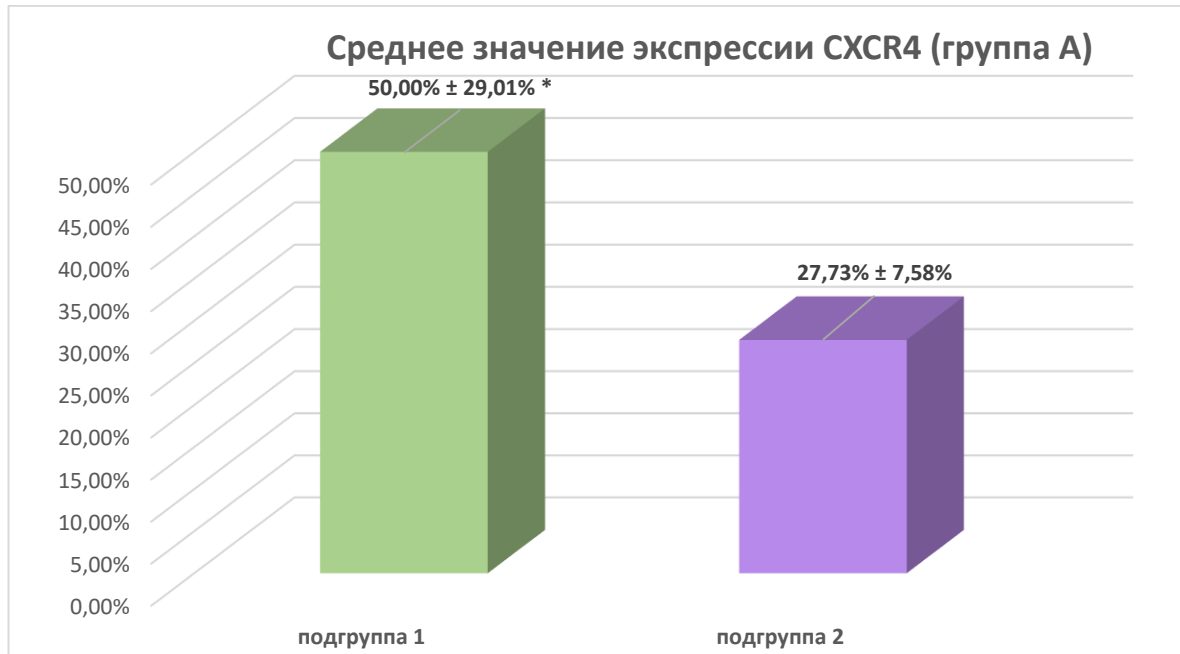
\* –  $p=0,0001$ ; \*\* –  $p=0,0003$ .

Рисунок 16 – Уровни экспрессии хемокиновых рецепторов у пациентов группы А

В 1 подгруппе выявлена экспрессия хемокинового рецептора CXCR 4 в первичной опухоли со средним значением  $50\% \pm 29,01\%$  (95% ДИ от 39,36% до 60,64%). Более чем у половины пациентов (51,6%) в опухоли определялась экспрессия в пределах 30-70% и почти у трети пациентов (29,1%) более 70%. Низкий уровень экспрессии рецептора CXCR 4 выявлен лишь в опухоли 6 пациентов, что составило 19%.

При исследовании экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 во 2-ой подгруппе, среднее значение данного показателя составило  $27,73\% \pm 7,58\%$  (95% ДИ от 11,97% до 43,49%), что почти в два раза меньше, чем в подгруппе 1 (рисунок 17). Наиболее характерным для этой подгруппы было выявление низкой экспрессии рецептора CXCR4, что составило 72,7%, а высокая экспрессия встречалась лишь в 22% случаев. Средний уровень экспрессии CXCR4 был зарегистрирован у 4,55% пациентов подгруппы 2. Сравнительный анализ уровня

экспрессии CXCR4 в подгруппах достоверно показал, что низкий уровень экспрессии рецептора встречался в подгруппе 2 (72,72% против 19,35%;  $p=0,0001$ ), а высокий ее уровень встречался у большинства пациентов подгруппы 1 (72,75% против 22,73%;  $p<0,00001$ ) ( $p=0,23$ ).



\* –  $p=0,011$ .

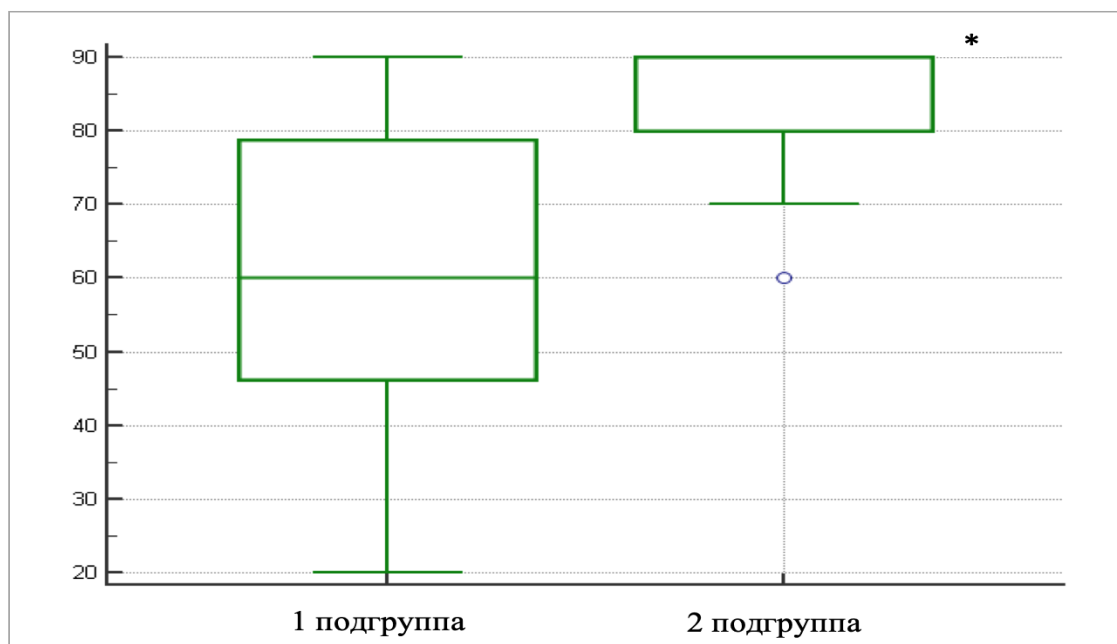
Рисунок 17 – Сравнение уровня экспрессии CXCR4 в исследуемых группах

Таким образом, при сравнении двух подгрупп по уровню экспрессии CXCR4 с использованием критерия Манни-Уитни в 1 подгруппе уровень экспрессии изучаемого рецептора оказался достоверно выше, чем в 2 подгруппе ( $U=201,50$ ;  $Z=2,535$ ;  $p=0,011$ ) (рисунок 17), что является показателем высокого метастатического потенциала опухоли и показателем неблагоприятного прогноза у больных РОК после радикального хирургического лечения.

При ИГХ исследовании презентации хемокиновых рецепторов CCR10 на поверхности опухолевой клетки, экспрессии изучаемого рецептора выявлено не было ни в одном случае. На сегодняшний день этот факт подтверждается как зарубежными, так и отечественными авторами, которые отмечают, что в эпителиальных клетках толстой кишки выявляется экспрессия только одного хемокина – CXCR4.

При анализе индекса пролиферации Ki67, ни в одной из подгрупп не был зарегистрирован низкий уровень пролиферации (<15%), что в целом является характерным для аденокарцином ободочной кишки. Средний уровень пролиферации Ki67 (15-30%) был зарегистрирован в 12,9% и 4,55% случаях, соответственно ( $p=0,305$ ) и наиболее часто в обеих подгруппах регистрировался высокий уровень пролиферативной активности опухоли (>70%): 87,1% случаев в первой подгруппе и 95,45% случаев во второй подгруппе ( $p=0,305$ ). Таким образом, в 1 подгруппе среднее значение данного показателя составило  $60,16\% \pm 3,94\%$  (95% ДИ от 52,12% до 68,20%), а во 2-ой подгруппе  $85\% \pm 1,68\%$  (95% ДИ от 81,51 до 88,49%)

При сравнении уровня индекса пролиферации Ki 67 с использованием критерия Манни-Уитни в 1 подгруппе уровень этого показателя оказался достоверно ниже, чем в 2 подгруппе ( $U=96,50$ ;  $Z=4,482$ ;  $p<0,0001$ ) (рисунок 18).



\* –  $p<0,0001$ .

Рисунок 18 – Уровень индекса пролиферации Ki67 в группе А

Таким образом, в нашем исследовании показано, что чем ниже уровень пролиферативной активности раннего РОК, тем выше метастатический потенциал опухоли. Однако, использовать его в качестве единственного прогностического



маркера не рекомендуется в связи с тем, что, согласно многочисленным наблюдениям, показатели пролиферативной активности не коррелируют с частотой метастазирования. Учитывая эти данные, в своем исследовании, мы решили использовать индекс пролиферации Ki 67 в многофакторном анализе, чтобы изучить его влияние на метастазирование РОК в совокупности с другими клинико-морфологическими характеристиками опухоли.

Одним из известных факторов агрессивности течения РОК является наличие мутации в гене KRAS. При молекулярно-генетическом исследовании, мутация в гене KRAS обнаружена у 14 (45,1%) пациентов 1-ой подгруппы и у 9 пациентов (40,90%) 2-ой подгруппы ( $p=0,757$ ).

При оценке этого показателя в изучаемых подгруппах пациентов группы А с использованием критерия Манни-Уитни статистической разницы выявлено не было: 14 против 9, соответственно ( $U=315,50$ ;  $Z=0,524$ ;  $p=0,6001$ ) (рисунок 19).

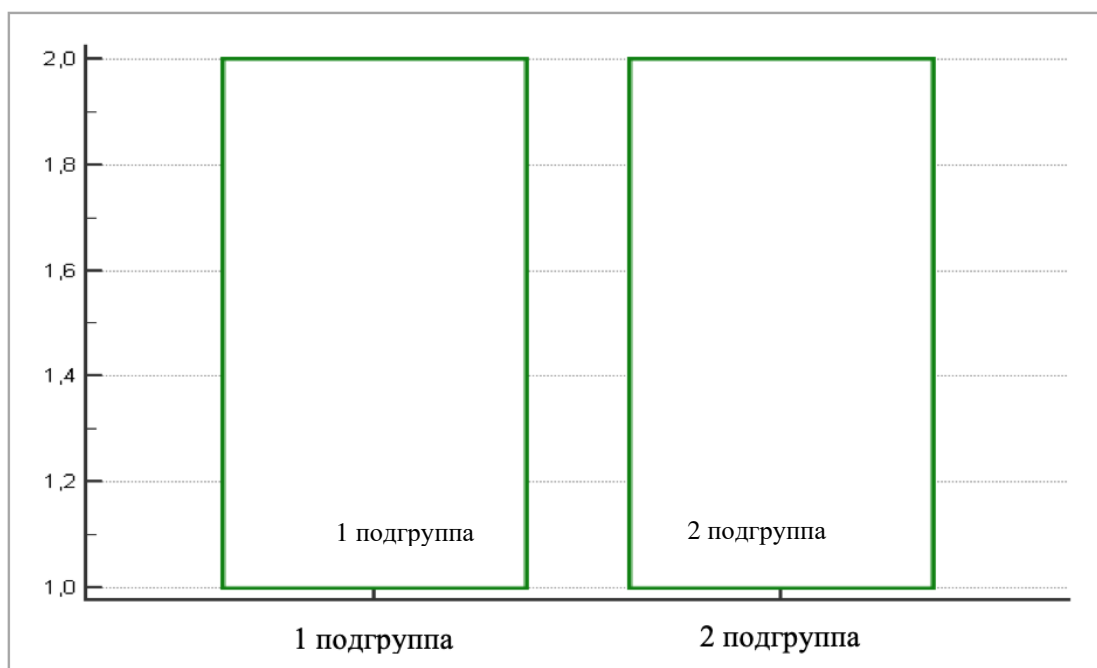


Рисунок 19 – KRAS мутация у пациентов в группе А

Таким образом, при изучении влияния клинико-морфологических характеристик на частоту метастазирования у больных со стадией pT4N0M0 (Dukes B) РОК, после радикального хирургического лечения, были выделены

факторы неблагоприятного прогноза – экспрессия хемокинового рецептора CXCR4 выше 30% с достоверностью  $p=0,011$  и пролиферативная активность Ki67 ниже 30% с достоверностью  $p<0,0001$ .

### 3.3 Оценка влияния уровня экспрессии CXCR4 на степень распространения метастатического поражения у пациентов группы А

Учитывая полученные нами данные, что хемокины принимают непосредственное участие в метастазировании опухоли мы решили изучить взаимосвязь количества пораженных метастазами органов от уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 в первичной опухоли (таблица 7).

Таблица 7 – Оценка зависимости количества пораженных метастазами органов от уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 в первичной опухоли

Экспрессия хемокинового рецептора CXCR4	Количество пациентов (n=31)	Количество пораженных органов		p value
		1	2 и более	
Низкая (0-30%)	6 (19,35%)	4	2	$p=0,222$
Средняя (30-70%)	16 (51,5%)	7	9	$p=0,296$
Высокая (70-100%)	9 (29,05%)	3	6	$p=0,0189$

Как видно из таблицы 7 группу с низкой экспрессией хемокинового рецептора CXCR4 составили 6 пациентов (19,35%), солитарные очаги были выявлены у 4-х пациентов с преимущественным поражением печени (n=2), лимфоузлов брюшной полости (n=1) и местный рецидив (n=1); множественные метастазы выявлены у 2-х пациентов, метастазы были зарегистрированы в печени, легких, в надключичных лимфоузлах и лимфоузлах брюшной полости, также у 1 пациента был выявлен местный рецидив.

Проведение регрессионного анализа в группе пациентов с низкой экспрессией хемокинового рецептора CXCR4 не показало достоверной линейной регрессионной модели ( $r^2=0,342$ ;  $p=0,222$ ):

$$y = 1,1000 + 0,06000 x, \quad (1)$$

где  $y$  – показатель количества метастатически пораженных органов;

$x$  – уровень экспрессии хемокиновых рецепторов.

Группу с средней экспрессией хемокинового рецептора CXCR4 составили 16 пациентов (51,5%), солитарные очаги были выявлены у 7-х пациентов также с преимущественным поражением печени ( $n=4$ ), брюшины ( $n=1$ ), местный рецидив ( $n=1$ ); множественные метастазы выявлены у 9 пациентов – в печени, легких, лимфоузлах брюшной полости, брюшине, яичниках и местный рецидив.

Проведение регрессионного анализа в группе пациентов с средней экспрессией хемокинового рецептора CXCR4 не показало достоверной линейной регрессионной модели ( $r^2=0,077$ ;  $p=0,296$ ):

$$y = 0,9185 + 0,1517 x, \quad (2)$$

Группу с высоким уровнем экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 составили 9 пациентов (29,05%), солитарные очаги были выявлены у 3-х пациентов, у 1 пациента поражена печень, у 1 – лимфоузлы брюшной полости, у 1 – брюшина. Множественные метастазы были выявлены у 6 пациентов и определялись в печени, костях, легких, лимфоузлах брюшной полости, надключичных лимфоузлах, паховых лимфоузлах, яичниках, брюшине и надпочечниках.

Проведение регрессионного анализа в группе пациентов с высокой экспрессией хемокиновых рецепторов также не показало достоверной линейной регрессионной модели ( $r^2=0,2286$ ;  $p=0,1930$ ):

$$y = -4,4667 + 0,8000 x, \quad (3)$$

Однако, построение общей регрессионной модели при анализе данных пациентов всех групп выявил ее достоверность ( $r^2=0,1756$ ;  $p=0,0189$ ):

$$y = 1,1233 + 0,01366 x, \quad (4)$$

где  $y$  – показатель количества метастатически пораженных органов;

$x$  – уровень экспрессии хемокиновых рецепторов.

В результате проведенного исследования нами была выявлена прямая зависимость между экспрессией хемокинового рецептора CXCR4 в опухолевой ткани и агрессивностью РОК. Так, у пациентов со средней и высокой экспрессией данного рецептора, чаще наблюдается метастазирование опухолевого процесса после проведенного радикального хирургического лечения с множественным поражением различных органов.

Принимая во внимание полученные нами результаты, мы решили изучить влияние клиничко-морфологических характеристик опухоли на прогноз течения РОК у пациентов III стадии, используя тот же дизайн исследования, что и у пациентов со II стадией РОК.

### **3.4 Оценка клинических факторов прогноза у больных раком ободочной кишки с III стадией T4N1-2M0 (Dukes C) (группа B)**

По дизайну исследования в группу B было включено 60 пациентов с верифицированным диагнозом аденокарциномы ободочной кишки с III стадией T4N1-2M0 (Dukes C) после радикального хирургического лечения, проведенного в 2014-2016 гг. Также как и в группе A, медиана наблюдения за больными составила 60 месяцев и по мере возникновения отдаленных метастазов в различные сроки периода наблюдения, все пациенты были разделены на 2 подгруппы: с отдаленными метастазами (MTC+) и без отдаленных метастазов (MTC-).

Клиническая характеристика пациентов группы B представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Клиническая характеристика больных раком ободочной кишки группы В (стадия T4N1-2M0) (n=60)

Характеристика пациентов	Подгруппа 1 (n=30) (MTC+)	Подгруппа 2 (n=30) (MTC-)	p-value
Стадия			
pT4N1M0	8 (26,7%)	10 (33,3%)	p=0,5770
pT4N2M0	22 (73,3%)	20 (66,7%)	p=0,5770
Возраст			
18-44	3 (10%)	0 (0%)	p=0,0756
45-59	6 (20%)	9 (30%)	p=0,3711
60-74	21 (70%)	21 (70%)	p=1,00
старше 75	0 (0%)	0 (0%)	p=1,00
Пол			
Женщины	15 (50%)	12 (40%)	p=0,4363
Мужчины	15 (50%)	18 (60%)	p=0,4363
Локализация опухоли:			
– правые отделы ободочной кишки;	15 (50%)	18 (60%)	p=0,4363
– левые отделы ободочной кишки	15 (50%)	12 (40%)	p=0,4363
Характер хирургического лечения			
– резекция сигмовидной кишки;	2 (6,7%)	4 (13,4%)	p=0,3881
– левосторонняя гемиколэктомия;	3 (10%)	7 (23,3%)	p=0,1667
– операция Гартмана;	5 (16,7%)	7 (23,3%)	p=0,5228
– правосторонняя гемиколэктомия	20 (66,6%)	12 (40%)	p=0,9389

## Продолжение таблицы 8

Характеристика пациентов	Подгруппа 1 (n=30) (MTC+)	Подгруппа 2 (n=30) (MTC-)	p-value
Повышение уровня РЭА более 5 нг/мл перед операцией			
выявлено	10 (33,3%)	12 (40%)	p=0,5902
не выявлено	20 (66,7%)	18 (60%)	p=0,5902

В 1 подгруппу был включен 30 пациент, из них 15 (50%) мужчин и 15 (50%) женщин в возрасте от 31 до 70 лет, средний возраст составил  $59,60 \pm 3,48$  года (95% ДИ от 51,73 до 67,47). Медиана возраста составила 61 год (95% ДИ от 56,95 до 67,05). Во 2-ю подгруппу было включено 30 пациентов, из них 18 мужчин и 12 женщин в возрасте от 58 до 74 лет, средний возраст составил  $64,4 \pm 1,82$  года (95% ДИ от 60,28 до 68,52). Медиана возраста составила 63,5 лет (95% ДИ от 59,00 до 70,58). Проведенный сравнительный анализ демографических характеристик пациентов обеих подгрупп показал, что в подгруппе 1 достоверно чаще встречались пациенты в возрасте от 18-44 лет (10% против 0%;  $p=0,0756$ ). Пациенты возрастных групп от 60-74 лет и старше 75 лет одинаково часто встречались в обеих подгруппах ( $p=1,0$  в обеих подгруппах). По гендерному признаку пациенты обеих групп были сопоставимы ( $p=0,4363$  и  $p=0,4363$ ).

В 1-ой и во 2-ой подгруппах большая часть пациентов – 73,3% и 66,7% соответственно имели стадию заболевания T4N2M1, при сравнительном анализе подгруппы были сопоставимы ( $p=0,5770$ ).

У всех пациентов группы В гистологически верифицирована аденокарцинома с различной локализацией первичной опухоли: в 1-ой подгруппе у 12 (40%) пациентов опухоль локализовалась в сигмовидной кишке, у 9 (30%) пациентов – в печеночном отделе ободочной кишки, у 3 (10%) пациентов – в слепой кишке, у 3 (10%) пациентов – в восходящем отделе ободочной кишки,

у 3 (10%) пациентов – в селезеночном отделе ободочной кишки. Во 2-ой подгруппе у 12 (40%) пациентов опухоль локализовалась в сигмовидной кишке, у 9 (30%) пациентов – в слепой кишке, у 6 (20%) пациентов – в селезеночном отделе ободочной кишки, у 3 пациентов – в восходящем отделе ободочной кишки (10%). Также как и у пациентов группы А была проанализирована встречаемость поражения левого и правого фланга ободочной кишки. При сравнении достоверно значимых отличий выявлено не было, поражение правого и левого фланка было сопоставимо ( $p=0,4363$ ).

По поводу первичного диагноза также как и в группе А всем пациентам было проведено радикальное хирургическое лечение. Так, в 1-ой подгруппе 2 пациентам (6,7%) была выполнена резекция сигмовидной кишки, 5 пациентам (16,7%) – операция Гартмана, 20 пациентам (66,6%) – правосторонняя гемиколэктомия, 3 пациентам (10%) – левосторонняя гемиколэктомия. Во 2-ой подгруппе было проведено следующее радикальное хирургическое лечение: 4 (13,4%) пациентам выполнена резекция сигмовидной кишки, 7 (23,3%) пациентам – левосторонняя гемиколэктомия, 7 (23,3%) пациентам – операция Гартмана, 12 (40%) пациентам – правосторонняя гемиколэктомия. Данные хирургические пособия одинаково часто проводились в обеих подгруппах при сравнительном анализе.

В отличие от группы А, пациенты в этой группе в послеоперационном периоде имели повышение уровня РЭА в 33,3% случаев в 1 подгруппе и в 40% случаев во 2 подгруппе пациентов, при сравнительном анализе подгруппы были сопоставимы ( $p=0,5902$ ).

Учитывая стадию заболевания, все пациенты группы В получали адъювантную химиотерапию, распределение схем АПХТ представлено в таблице 9.

Таблица 9 – Распределение схем АПХТ у пациентов группы В

Схема АПХТ	Подгруппа 1 (n=30)	Подгруппа 2 (n=30)	p (value)
De Gramont	10 (33,3%)	12(40%)	p=0,5902
FOLFOX4	20 (66,7%)	18(60%)	p=0,5902

В обеих подгруппах большая часть пациентов получала в качестве адъювантной химиотерапии схему FOLFOX4 – 66,7% и 60% соответственно, при сравнительном анализе значимых отличий выявлено не было (p=0,5902).

При последующем динамическом наблюдении у 1-ой группы пациентов были выявлено прогрессирование опухолевого процесса в промежутке от 2 до 60 месяцев. Характеристика метастатического поражения в 1 подгруппе представлена в таблице 10.

Таблица 10 – Характеристика метастатического поражения у пациентов РОК 1 подгруппы группы В

Распределение метастазов	Количество пациентов (n=30)
Характер метастазов	
• Солитарные	11 (36,6%)
• Множественные	19 (63,4%)
Локализация метастазов	
• Печень	21 (70%)
• Легкие	15 (50%)
• Брюшина	3 (10%)
• Лимфоузлы брюшной полости	6 (20%)



Как видно из таблицы 10, множественные метастазы в различные органы встречались у пациентов чаще (63,4%), чем солитарные (36,6%), преимущественно чаще метастазами поражалась печень (70%), а также легкие (50%), брюшина (10%) и лимфоузлы брюшной полости (20%).

### 3.5 Оценка морфологических факторов прогноза у больных раком ободочной кишки с III стадией T4N1-2M0 (Dukes C) (группа B)

Также как и у пациентов группы А морфологический материал всех пациентов был гистологически верифицирован и исследован на дополнительные маркеры – экспрессию хемокиновых рецепторов CXCR4, KRAS мутацию, индекс пролиферации Ki67. Учитывая полученные результаты в группе А, экспрессия хемокинового рецептора CCR10 в опухолевых блоках у пациентов группы В не изучалась.

Морфологическая характеристика первичной опухоли пациентов группы В представлена в таблице 11.

Таблица 11 – Морфологическая характеристика первичной опухоли больных раком ободочной кишки группы В (стадия T4N1-2M0) (n=60)

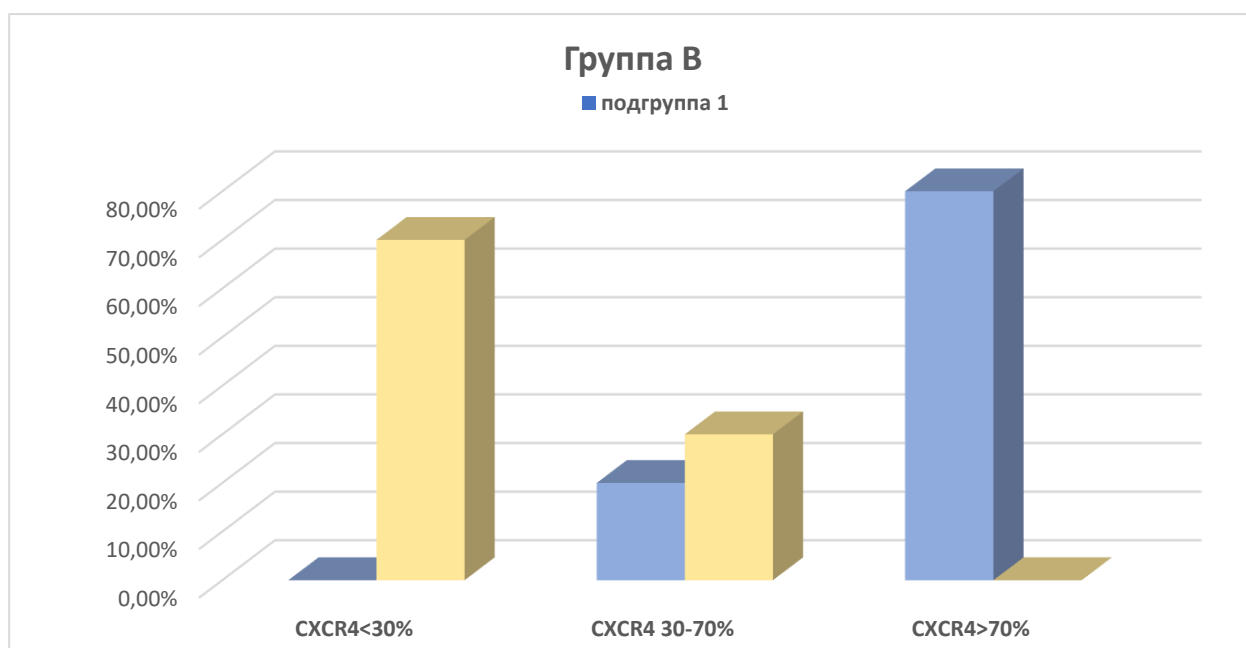
Морфологический признак	Подгруппа 1 (n=30) MTC(+)	Подгруппа 2 (n=30) MTC(-)	p-value
Дифференцировка опухоли			
G1	9 (30%)	0 (0%)	p=0,0011
G2	18 (60%)	21 (70%)	p=0,4168
G3	3 (10%)	9 (30%)	p=0,0528

Продолжение таблицы 11

Морфологический признак	Подгруппа 1 (n=30) МТС(+)	Подгруппа 2 (n=30) МТС(-)	p-value
СХСR4 (экспрессия)			
0-30% низкая	0 (0%)	21 (70%)	p<0,00001
30-70% средняя	6 (20%)	9 (30%)	p=0,3711
70-100% высокая	24 (80%)	0 (0%)	p<0,00001
Ki 67 (уровень)			
0-15% низкий	0 (0%)	0 (0%)	p=1,00
15-30% средний	9 (30%)	6 (20%)	p=0,3711
30-100% высокий	21 (70%)	24 (80%)	p=0,3711
KRAS мутация			
выявлена	15 (50%)	15 (50%)	p=1,00
не выявлена	15 (50%)	15 (50%)	p=1,00

Как видно из таблицы 11, в 1-ой подгруппе у 9 пациентов (30%) процесс верифицирован как высокодифференцированная аденокарцинома, у 18 пациентов (60%) – умереннодифференцированная аденокарцинома и у 3 пациентов (10%) – низкодифференцированная аденокарцинома. Во 2-ой подгруппе морфологический подтип опухоли представлен у 21 (70%) пациента умереннодифференцированной аденокарциномой, у 9 (30%) пациентов – низкодифференцированной аденокарциномой, высокодифференцированной аденокарциномы не было выявлено ни у одного пациента данной подгруппы. Проведенный сравнительный анализ показал, что у пациентов 1 подгруппы достоверно чаще встречались опухоли высокой дифференцировки (p=0,0011), а у пациентов 2 подгруппы чаще выявлялись опухоли низкой дифференцировки (p=0,0528).

При ИГХ-исследовании в 1 подгруппе не было выявлено опухолей с низкой экспрессией хемокинового рецептора CXCR4, а в 2 подгруппе опухолей с высокой экспрессией хемокинового рецептора CXCR4 (рисунок 20).

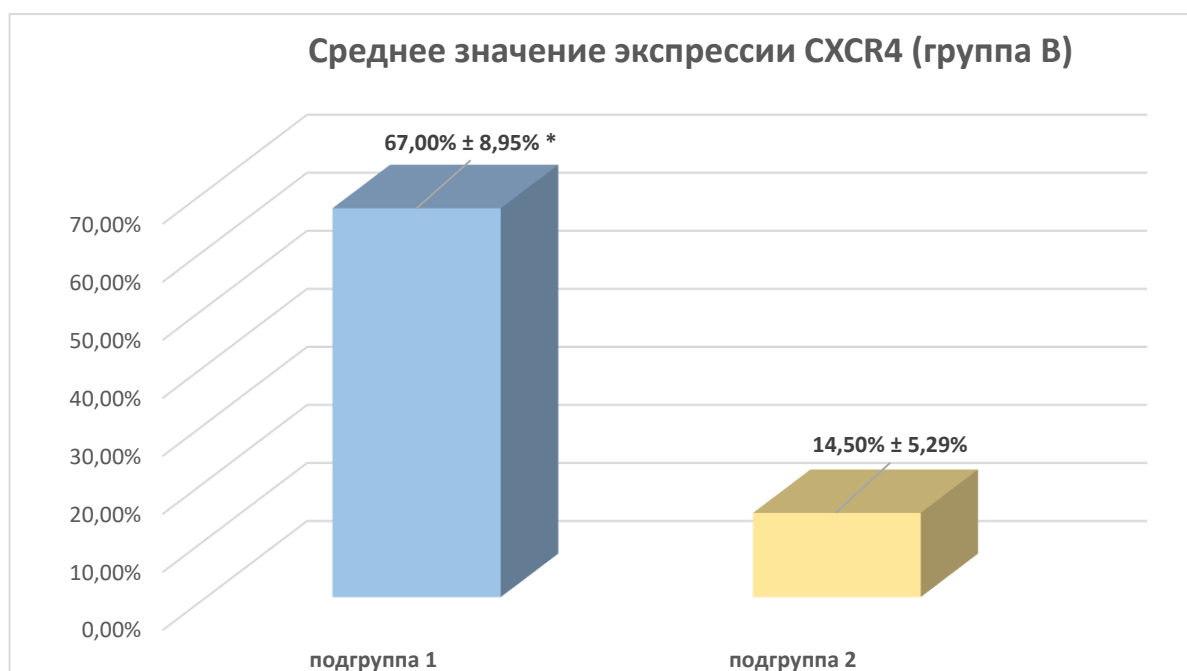


\* –  $p < 0,00001$ .

Рисунок 20 – Уровни экспрессии хемокиновых рецепторов у пациентов группы В

В 1 подгруппе выявлена экспрессия хемокинового рецептора CXCR 4 в первичной опухоли со средним значением  $67,00\% \pm 8,95\%$  (95% ДИ от 46,75% до 87,25%). У 80% пациентов в опухоли определялась экспрессия хемокинового рецептора CXCR4 более 70% и у 20% в пределах 30-70%, случаев низкой экспрессии, как уже говорилось выше, выявлено не было.

При исследовании экспрессии хемокинового рецептора CXCR 4 у пациентов 2-ой подгруппы среднее значение данного показателя составила  $14,50\% \pm 5,29\%$  (95% ДИ от 2,52% до 26,48%), что значительно меньше, чем в подгруппе 1 (рисунок 21). Наиболее часто у пациентов данной подгруппы выявлялась низкая экспрессия хемокинового рецептора CXCR4 – у 70% пациентов, средняя экспрессия – у 30% пациентов, высокой экспрессии не было выявлено ни у одного пациента. Сравнительный анализ уровня экспрессии CXCR4 достоверно показал, что низкий уровень экспрессии рецептора чаще встречался в подгруппе 2 (70% против 0%,  $p < 0,0001$ ), а высокий уровень рецептора встречался чаще в подгруппе 1 (80% против 0%;  $p < 0,0001$ ).



\* –  $p=0,0014$ .

Рисунок 21 – Сравнение уровня экспрессии CXCR4 в исследуемых подгруппах

При сравнении двух подгрупп по уровню экспрессии CXCR4 с использованием критерия Манни-Уитни в 1 подгруппе уровень экспрессии, как и у пациентов группы А, оказался достоверно выше, чем в 2 подгруппе ( $U=8,00$ ;  $Z=3,193$   $p=0,0014$ ).

При анализе индекса пролиферации Ki67 ни в одной из подгрупп, идентично группе А, не был определен низкий уровень пролиферации ( $<15\%$ ).

В 1 подгруппе среднее значение данного показателя составила  $42,50\% \pm 6,38\%$  (95% ДИ от 28,07% до 56,93%), а в 2-ой подгруппе  $44,00\% \pm 6,18\%$  (95% ДИ от 30,01 до 57,99%).

При сравнении уровня индекса пролиферации Ki 67 с использованием критерия Манни-Уитни статистически достоверной разницы между исследуемыми группами не получено ( $U=46,50$ ;  $Z= 0,266$ ;  $p=0,7903$ ) (рисунок 22).

При молекулярно-генетическом исследовании мутации в гене KRAS у 15 (50%) пациентов 1 и 2 подгруппы мутация обнаружена ( $p=1,00$ ).

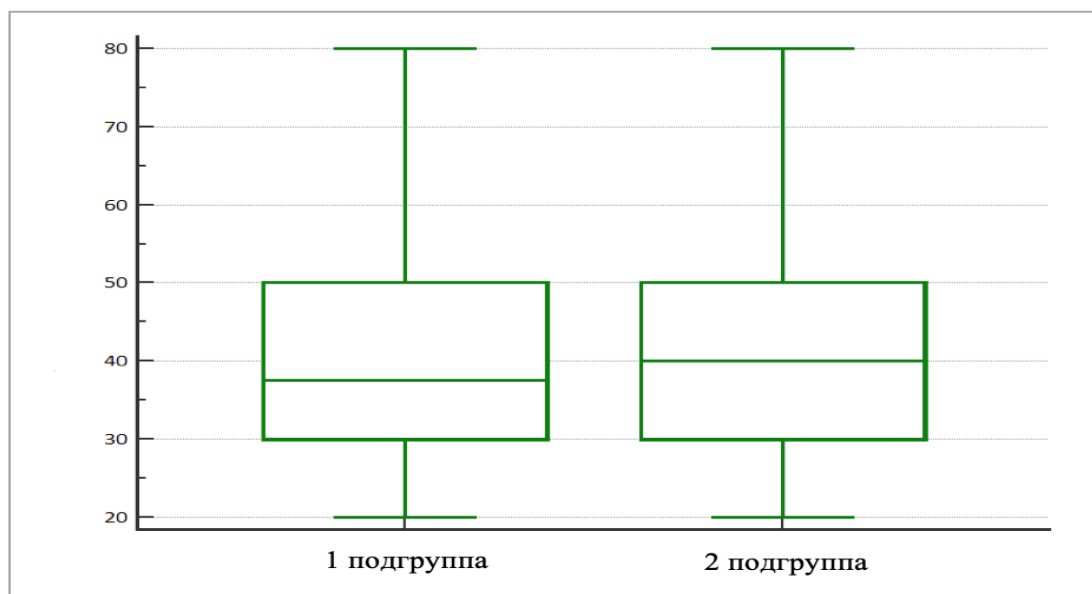


Рисунок 22 – Уровень индекса пролиферации Ki67 в группе В

При сравнении двух подгрупп по уровню определения KRAS мутации с использованием критерия Манни-Уитни группы были абсолютно идентичными ( $U=50,0$ ;  $Z=0,000$ ;  $p=1,0000$ ) (рисунок 23).

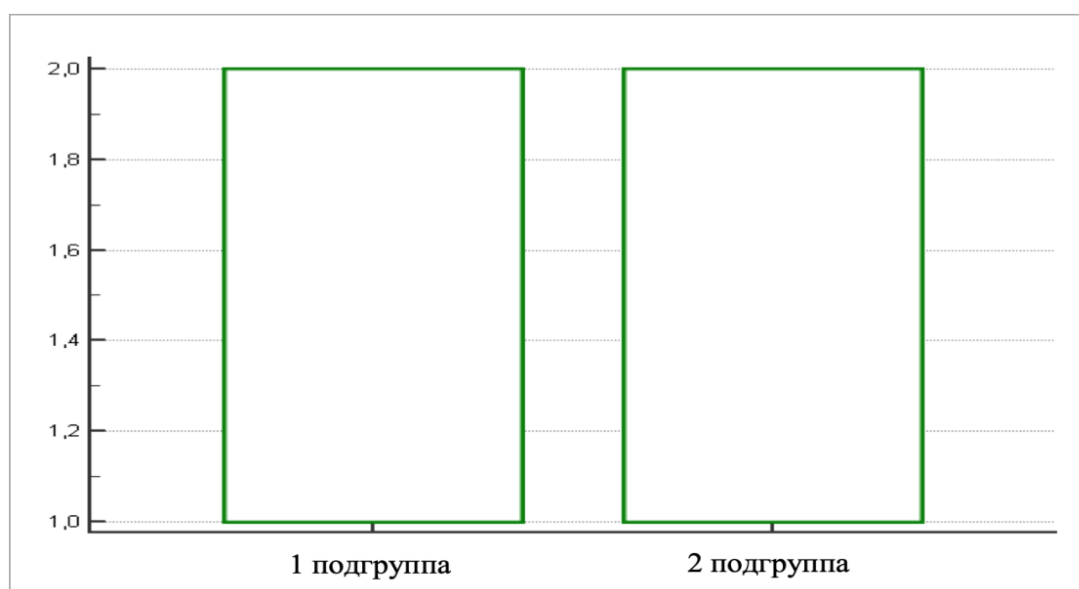


Рисунок 23 – KRAS мутация у пациентов в группе В

Таким образом, у пациентов группы В, также как и у пациентов группы А, экспрессия хемокинового рецептора CXCR4 в опухолевой ткани выше

у пациентов в подгруппе 1 (MTC+), что позволяет нам сделать вывод о том, что экспрессия CXCR4 выше 30% в опухолевой ткани РОК – это показатель неблагоприятного прогноза для больных РОК после радикального хирургического лечения как при II так и при III стадиях.

### 3.6 Оценка влияния уровня экспрессии CXCR4 на степень распространения метастатического поражения у пациентов группы В

По аналогии с пациентами группы А мы решили изучить взаимосвязь количества пораженных метастазами органов от уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 в первичной опухоли у пациентов группы В (таблица 12).

Таблица 12 – Оценка зависимости количества пораженных метастазами органов от уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 в первичной опухоли

Экспрессия хемокинового рецептора CXCR4	Количество пациентов (n=30)	Количество пораженных органов		p value
		1	2 и более	
Низкая (0-30%)	0	–	–	–
Средняя (30-70%)	6 (20%)	3	3	p=0,0110
Высокая (70-100%)	24(80%)	3	6	p=0,0110

Проведенное исследование показало, что у пациентов с III стадией РОК низкой экспрессии CXCR4 не было зафиксировано ни у одного пациента (0%).

Как видно из таблицы 12 группу с средней экспрессией хемокинового рецептора CXCR4 составили 6 пациентов (20%), солитарные очаги были выявлены у 3-х пациентов и у всех 3-х пациентов была поражена брюшина,

у 3-х пациентов характер поражения носил множественный характер и включал метастазы в печень, легкие, лимфоузлы брюшной полости.

Группу с высоким уровнем экспрессии составили 24 пациента, очаги метастатического поражения у них распределились следующим образом: у 15 пациентов был поражен 1 орган (у 9 пациентов поражена печень, у 6 пациентов легкие); у 9 пациентов было поражено 2 органа (у 6 пациентов были метастазы в печень и легкие и у 3 пациентов печень и лимфоузлы брюшной полости).

Проведение регрессионного анализа в 1 подгруппе пациентов между количеством метастатически пораженных органов и уровнем экспрессии хемокиновых рецепторов показало достоверную линейную зависимость регрессионной модели ( $r^2=0,5748$ ;  $p=0,0110$ ) (рисунок 24):

$$y = 3,1775 + (-0,02205) x, \quad (5)$$

где  $y$  – показатель количества метастатически пораженных органов;

$x$  – уровень экспрессии хемокиновых рецепторов.

Причем следует особенно отметить, что эта зависимость носит обратно пропорциональный характер: наибольший уровень экспрессии CXCR4 равный 90% был зарегистрирован у пациентов с поражением только одного органа – брюшины, что может считаться неблагоприятным прогностическим фактором в течении мКРР.

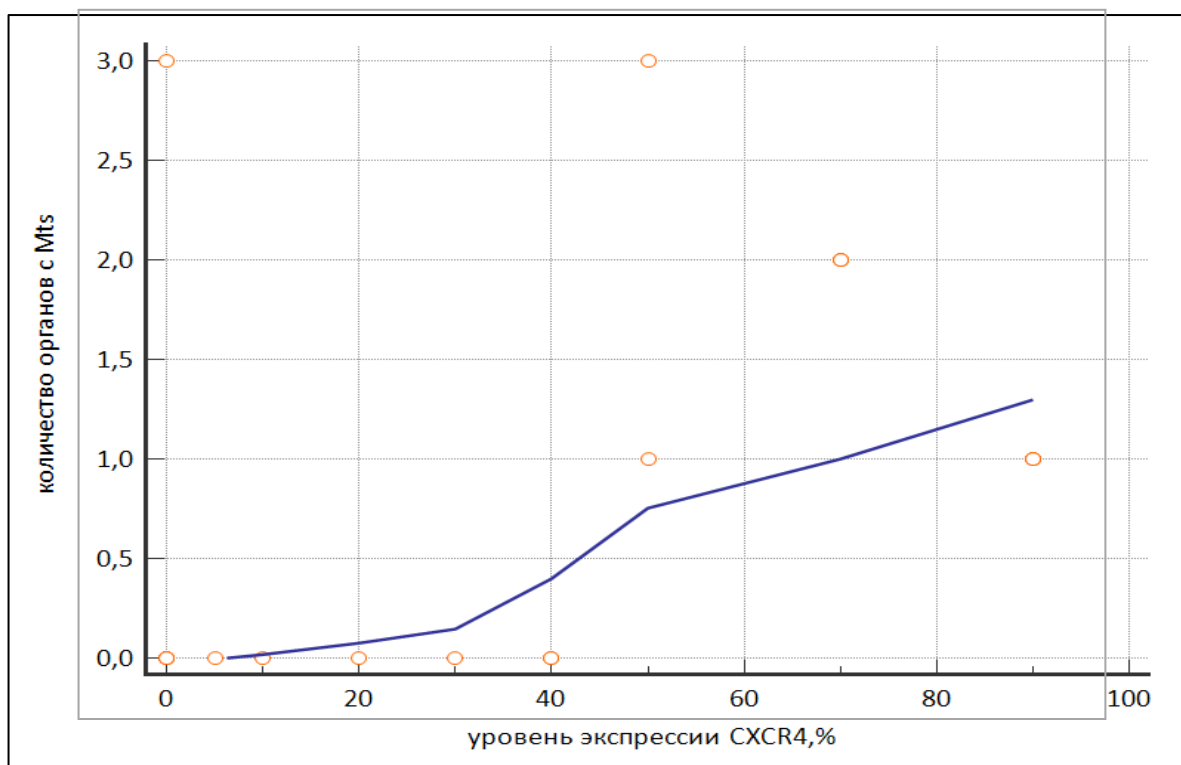


Рисунок 24 – Зависимость количества пораженных органов от экспрессии CXCR4 в группе В

Для того чтобы с достоверностью утверждать о влиянии экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 на течение РОК далее мы посмотрели зависимость безрецидивной выживаемости от уровня экспрессии CXCR4 и создали прогностическую модель с помощью многофакторного анализа.



## Глава 4

# СОЗДАНИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ С ПОМОЩЬЮ МНОГОФАКТОРНОГО АНАЛИЗА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ II и III СТАДИЕЙ

### 4.1 Зависимость безрецидивной выживаемости от уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 в группах А и В

#### 4.1.1 Группа А

Для того чтобы сделать определенные выводы и получить искомые результаты нашей работы, необходимо было посчитать медиану безрецидивной выживаемости (БРВ) в обеих группах по подгруппам. Так медиана БРВ в 1 подгруппе группы А составила 9,5 месяцев (95% ДИ от 8 до 13 месяцев).

Медиана общей выживаемости 1 подгруппы – 37 месяцев (95% ДИ от 33,00 до 45,00 месяцев).

Медиана БРВ у пациентов 2 подгруппы не была достигнута в связи с тем, что все пациенты пережили 60 месяцев наблюдения. Медиану общей выживаемости у пациентов 2 подгруппы на момент окончания исследования посчитать не представлялось возможным, так все пациенты были живы.

Медиана БРВ у пациентов с низким уровнем хемокинового рецептора CXCR4 не была достигнута на момент окончания исследования, в связи с этим рассчитан средний уровень медианы БРВ  $48,619 \pm 4,256$  месяцев (95% ДИ от 40,277 до 56,961 месяцев).

Медиана БРВ у пациентов с средним и высоким уровнем хемокинового рецептора CXCR-4 были сопоставимы и составили: у пациентов со средним уровнем 13 месяцев (95% ДИ от 6 до 19 месяцев), у пациентов с высоким уровнем 12 месяцев (95% ДИ от 8 до 31 месяца). Показатель 3-годовой БРВ в группе с

низким уровнем экспрессии CXCR4 составил 81%, со средним уровнем – 39%, с низким уровнем – 16%. 5-летний показатель БРВ в группах с высоким, средним и низким уровнем экспрессии CXCR4 составил соответственно 76%, 36% и 16%.

С целью оценки влияния уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 на БРВ нами была построена регрессионная модель Кокса, показавшая наличие достоверную зависимость медианы безрецидивной выживаемости у пациентов РОК от экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 в опухолевой ткани ( $p=0,0157$ , 95% ДИ – 1,0024-1,0226). Зависимость медианы БРВ от уровня экспрессии CXCR4 в группе А представлена на рисунке 25.

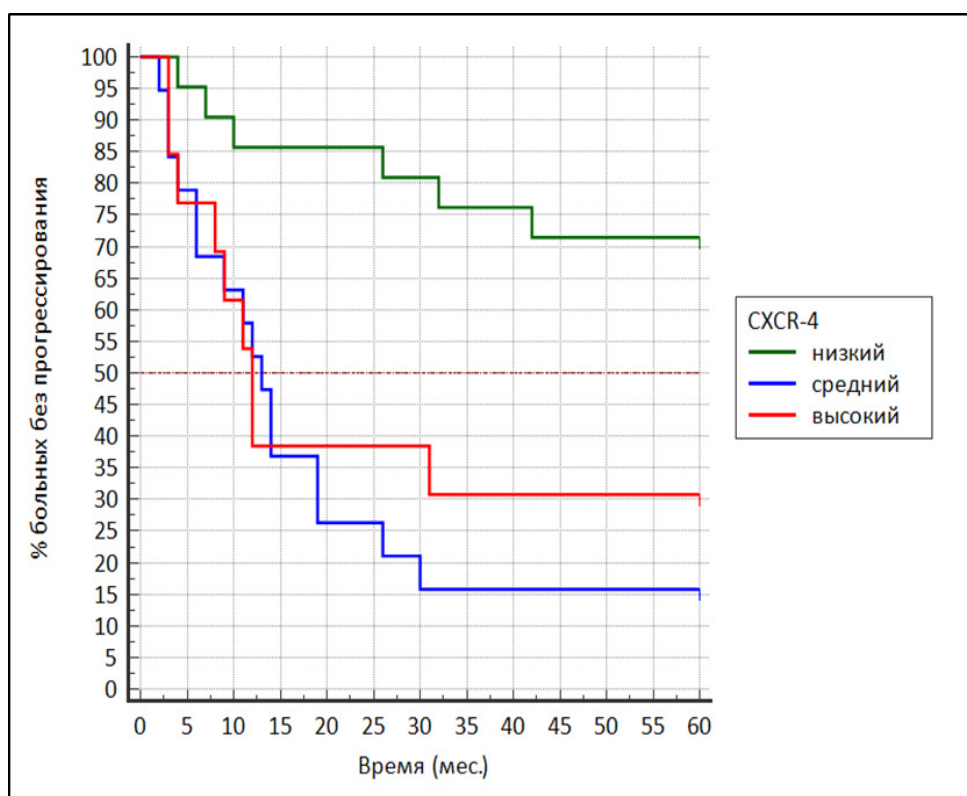


Рисунок 25 – Зависимость медианы БРВ от уровня экспрессии CXCR4 в группе А

По рисунку видно, что те пациенты, у которых определялась высокая и средняя экспрессия хемокинового рецептора CXCR4 в опухолевой ткани имели медиану безрецидивной выживаемости ниже, чем те пациенты в опухолевой ткани которых была выявлена низкая экспрессия данного рецептора.

#### **4.1.2 Группа В**

По аналогии с группой А, у пациентов группы В также была посчитана медианы безрецидивной выживаемости и общей выживаемости в подгруппе 1. Медиана БРВ в 1 подгруппе группы В составила 9 месяцев (95% ДИ от 3 до 9 месяцев).

Медиана общей выживаемости 1 подгруппы – 32 месяца (95% ДИ от 9,00 до 32,00 месяцев). Медианы БРВ и ОВ у пациентов 2 подгруппы также как и у пациентов группы А, не были достигнуты.

Медиана БРВ у пациентов с низким уровнем экспрессии хемокинового рецептора не достигнута, поэтому рассчитано среднее значение –  $53,89 \pm 5,76$  (95% ДИ от 42,60 до 65,18). Показатель 5-летней БРВ составил 89%. У пациентов со средним уровнем экспрессии – медиана БРВ составила 7 месяцев (95% ДИ от 3 до 9 месяцев), показатель 5-летней БРВ -29%, у пациентов с высоким уровнем экспрессии – 2 месяца (95% ДИ от 1 до 4 месяцев).

Общая значимость регрессионной модели зависимости медианы БРВ от уровня экспрессии CXCR4 была достоверной:  $p=0,0002$ . Зависимость медианы БРВ от уровня экспрессии CXCR4 в группе В представлена на рисунке 26.

Таким образом, медиана безрецидивного периода оказалась достоверно более низкой в подгруппах пациентов с отдаленными метастазами, где выявлена высокая экспрессия хемокиновых рецепторов в опухолевой ткани, что позволяет сделать вывод, согласно которому чем выше экспрессия хемокиновых рецепторов, тем агрессивнее опухоль и ниже показатель БРВ.

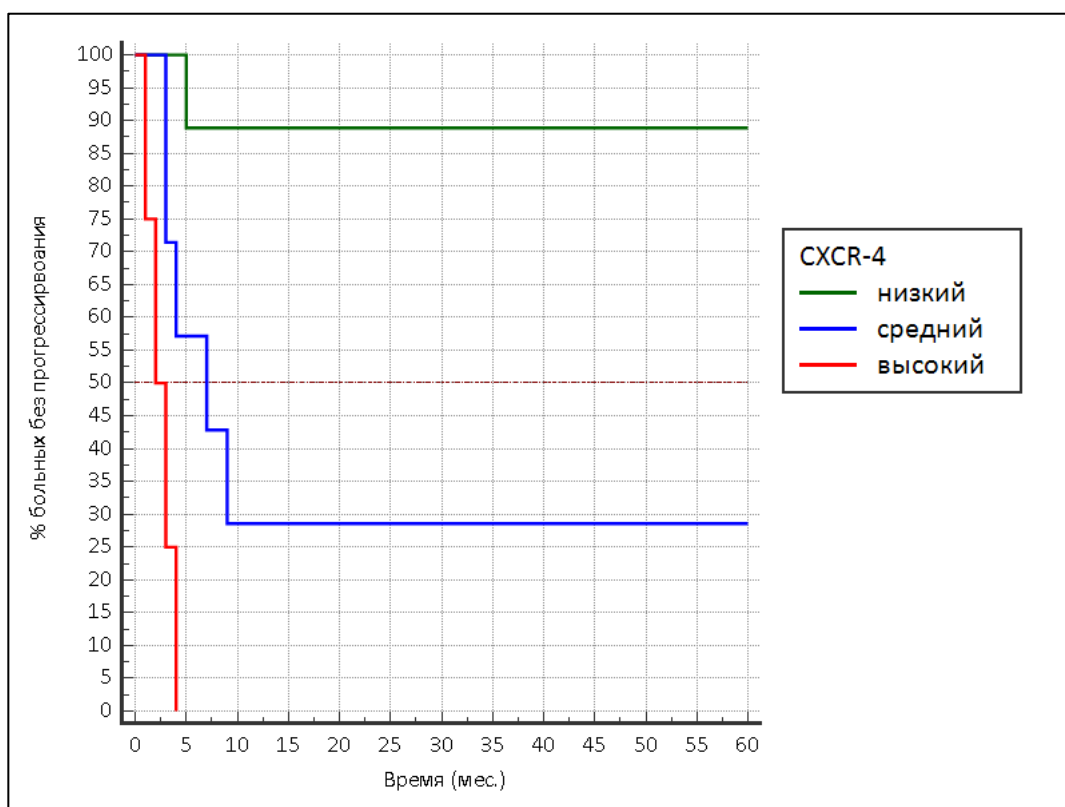


Рисунок 26 – Зависимость медианы БРВ от уровня экспрессии CXCR4 в группе В

Учитывая многообразие факторов, которые могут оказывать влияние на выживаемость пациентов и необходимость назначения адъювантной химиотерапии нами была построена регрессионная модель Кокса для каждой группы с целью определения значимости каждого из факторов.

#### 4.2 Регрессионная модель Кокса у пациентов группы А

В таблице 13 представлены регрессионные модели Кокса и их достоверность у пациентов в группе А для показателя БРВ.

Таблица 13 – Регрессионные модели Кокса и их достоверность у пациентов в группе А для показателя БРВ

Регрессионная модель Кокса	Достоверность	Уровень значимости
1. Зависимость БРВ от уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4	Значимая	p=0,0157
2. Зависимость БРВ от индекса пролиферации Ki67	Значимая	p<0,0001
3. Зависимость БРВ от KRAS мутации	Не значимая	p=0,5324
4. Зависимость БРВ от возраста	Не значимая	p=0,7000
5. Зависимость БРВ от пола	Не значимая	p=0,8934
6. Зависимость БРВ от фланка	Значимая	p=0,0248

Таким образом, в общую регрессионную модель мы включили только значимые факторы, а именно уровень экспрессии хемокинового рецептора CXCR4, уровень пролиферации Ki67 и локализацию опухоли (правосторонней/ левосторонний фланк) и построили модель множественной регрессии в виде уравнения:

$$\text{ВДП} = 13,5580 - 0,08668 \times X + 0,5616 \times Y - 9,5141 \times Z, \quad (6)$$

где X – уровень экспрессии хемокинового рецептора CXCR4;

Y – индекс пролиферации Ki67;

Z – фланк (1 – правый фланк, 2 – левый фланк).

### 4.3 Регрессионная модель Кокса у пациентов группы В

В таблице 14 представлены регрессионные модели Кокса и их достоверность у пациентов в группе В для показателя БРВ.

Таблица 14 – Регрессионные модели Кокса и их достоверность у пациентов в группе В для показателя БРВ

Регрессионная модель Кокса	Достоверность	Уровень значимости
1. Зависимость БРВ от уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4	Значимая	p=0,0001
2. Зависимость БРВ от индекса пролиферации Ki67	Незначимая	p=0,9238
3. Зависимость БРВ от KRAS мутации	Не значимая	p=0,9782
4. Зависимость БРВ от возраста	Не значимая	p=0,3006
5. Зависимость БРВ от пола	Не значимая	p=0,6391
6. Зависимость БРВ от фланка	Не значимая	p=0,6990

Учитывая тот факт, что в результате построения регрессионной модели Кокса выявлена зависимость показателя БРВ от уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 мы построили однофакторную модель регрессионного анализа зависимости БРВ от экспрессии CXCR4:

$$Y = 24,3566 - 0,2419 \times X, \quad (7)$$

где Y – время до прогрессирования;

X – уровень экспрессии CXCR4.

Общая значимость регрессионной модели зависимости показателя БРВ от уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 достоверна,  $p=0,0002$ .

#### 4.4 Регрессионная модель Кокса общей группы

С целью попытки вывести единую зависимость для групп А и В был произведен анализ всей когорты пациентов. На первом этапе произведено построение регрессионной модели Кокса для выявления факторов достоверно влияющих на показатель БРВ в общей когорте пациентов.

В таблице 15 представлены регрессионные модели Кокса и их достоверность в общей когорте пациентов показателя БРВ.

Таблица 15 – Регрессионные модели Кокса и их достоверность для показателя БРВ в общей группе

Регрессионная модель Кокса	Достоверность	Уровень значимости
1. Зависимость БРВ от уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4	Значимая	<b><math>p=0,0001</math></b>
2. Зависимость БРВ от индекса пролиферации Ki67	Значимая	<b><math>p=0,0006</math></b>
3. Зависимость БРВ от KRAS мутации	Не значимая	$p=0,5754$
4. Зависимость БРВ от фланка	Не значимая	<b><math>p=0,0615</math>, имеется уверенная тенденция к значимости</b>
5. Зависимость БРВ от возраста	Не значимая	$p=0,3944$
6. Зависимость БРВ от пола	Не значимая	$p=0,9016$

В результате построения модели Кокса в общей группе выявлена достоверная зависимость БРВ от экспрессии хемокинового рецептора CXCR4.

При построении однофакторного уравнения линейной регрессии общая регрессионная модель достоверна  $p=0,0010$ , уравнение выглядит следующим образом:

$$\text{БРВ} = 38,2263 - 0,2607 \times X, \quad (8)$$

где  $X$  – экспрессия хемокинового рецептора CXCR4.

Таким образом, в результате нашей работы мы достоверно выявили еще один прогностический фактор для пациентов с РОК, который можно использовать при планировании лечения, особенно адъювантной химиотерапии, так как в настоящее время именно назначение адъювантной химиотерапии больным РОК является одной из спорных областей в клинической онкологии.



## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Решение проблемы лечения больных РОК является одной из приоритетных задач современного медицинского сообщества. Высокий процент заболеваемости, обращение за помощью на поздних стадиях, дороговизна цитостатических препаратов, развитие лекарственной резистентности, низкая эффективность проводимой терапии и высокая смертность, остаются основными барьерами в лечении данной патологии.

Одной из главных задач для клинического онколога в настоящее время является назначение самого эффективного лечения, которое имеется в мировой практике в тот момент, когда пациент впервые обратился за помощью и, которое зачастую включает в себя комплексное лечение (проведение радикального хирургического лечения с последующим назначением АХТ). Несмотря на достижения в хирургии и АХТ показатели 5-летней ОВ пациентов с резектабельными стадиями рака толстой кишки остаются на уровне 60% (Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О., 2020) [5]. И наиболее сложная в плане необходимости выбора АХТ является II стадия заболевания (Iveson T., Sobrero A.F., Yoshino T. et al., 2019) [92].

С 2004 года, учитывая результаты различных поданализов, проспективных и ретроспективных исследований, Американское общество онкологов предложило определять факторы риска прогрессирования при II стадии РОК перед назначением АХТ такие как: низкая степень дифференцировки, наличие лимфоваскулярной/периневральной инвазии, R+, операция в условиях кишечной непроходимости/перитонита, операция с неадекватным объёмом лимфодиссекции – изучено менее 12 лимфоузлов, РЭА>2,35 нг/мл после операции. Однако, до сих пор не выделены группы благоприятного и неблагоприятного прогноза, так как нет универсального прогностического фактора, который бы помог дифференцировать пациентов по риску возникновения рецидива заболевания и подобрать максимально эффективный режим и определить длительность

проведения АХТ. При назначении комплексного лечения также не принимается во внимание гетерогенность опухоли и не учитывается биологический подтип опухоли, что с нашей точки зрения, значимо может повлиять на показатель БРВ у пациентов с РОК.

В мире активно ведутся исследования по поиску новых прогностических маркеров для раннего РОК: влияние микроокружения опухоли (Herrera M., Mezheyeuski A., Villabona L. et al., 2020) [91], изучение панели комплексного влияния таких биомаркеров как PD-L1, GLUT-1, dMMR и CDX2 (Azcue P., Guerrero Setas D., Encío I. et al., 2021) [24], оцениваются возможности персонализировать АХТ на основании молекулярно-генетического портрета опухоли (Dienstmann R., Salazar R., Tabernero J., 2015) [55].

Учитывая имеющуюся тенденцию мы в своем исследовании запланировали изучить в комплексе клинические характеристики пациентов, известные прогностические факторы и изучаемые в настоящий момент морфологические характеристики опухоли, в том числе и микроокружение опухоли (экспрессия хемокиновых рецепторов) у пациентов с ранним РОК и влияние их в совокупности на показатель БРВ. Одной из поставленных задач в нашем исследовании являлась оценка целесообразности назначения АХТ всем пациентам с ранним РОК и создание алгоритма по назначению АХТ в зависимости от полученных результатов. С нашей точки зрения, это очень актуальный вопрос, учитывая высокую токсичность схем химиотерапии (так в программе IDEA, проведенной в 2019 нежелательные явления в группе лечения длительностью 3 месяцев регистрировались у 26% пациентов, 6 месяцев – 40%).

Планируя дизайн нашего исследования, мы решили включить в него как пациентов с II стадией заболевания, так и пациентов с III стадией для того, чтобы результаты лечения и полученные нами выводы мы могли отнести, в принципе, ко всем пациентам с ранним РОК. Для получения достоверных результатов в исследование мы набирали пациентов, которые получали радикальное хирургическое лечение и АХТ в одном учреждении, в котором использовались идентичные для всех методики хирургического лечения и режимы химиотерапии.

Таким образом, мы достоверно можем утверждать, что группы для сравнения в нашем исследовании были идентичны подобраны.

По дизайну в исследование было включено 113 пациентов с диагнозом рак ободочной кишки II и III стадии, пациентам группы А (II стадия) было выполнено только радикальное хирургическое лечение, а пациентам группы В (III стадия) – комплексное лечение (операция+ АХТ), далее в течении 60 месяцев пациенты находились под динамическим наблюдением и в зависимости от сроков появления метастазов были разделены на 2 подгруппы: 1 подгруппа – пациенты с зарегистрированными отдаленными метастазами, 2 подгруппа – пациенты без отдаленных метастазов. Следующим этапом нашей работы был морфологический этап, на котором все гистологические блоки были изучены иммуногистохимическим методом на экспрессию хемокиновых рецепторов (CXCR4, CCR10), индекс пролиферации Ki67 и молекулярно-генетическим методом была изучена KRAS мутация. Далее использовался однофакторный и многофакторный анализы для выявления зависимости показателя безрецидивной выживаемости от основных изучаемых клиничко-морфологических характеристик.

Учитывая, что в настоящее время нет стандартов градации окраски для хемокиновых рецепторов в опухолевой ткани, нами была самостоятельно определена и выделена шкала определения уровня экспрессии хемокиновых рецепторов: низкий (0-30%), средний (30-70%), высокий (70-100%). Уровень экспрессии определялся интенсивностью окраски в процентом выявления рецепторов хемокинов в аденокарциноме толстой кишки

По результатам нашего исследования, показатель БРВ у пациентов с экспрессией хемокинового рецептора более 30% оказался ниже, что свидетельствует о более злокачественном течении опухолевого процесса и менее благоприятном прогнозе у данной группы пациентов, что показывают и мировые данные, так в эксперименте, проведенным в 2011 г. С.G. Rivera, J.S. Vader, A.S. Popel [96] – было показано, что CXCR4 экспрессируется многими опухолями и ассоциируется с резким усилением ангиогенеза и более агрессивным течением опухолевого процесса, а J. Kim, T. Mori, S.L. Chen в 2006 году [40] путем анализа

ОВ пациентов, страдающих раком толстой кишки, достоверно доказали, что высокая экспрессия рецептора CXCR4 значительно уменьшает медиану выживаемости пациентов (median 27 months vs. 10 months, respectively;  $p=0,036$ ). Таким образом, при планировании радикального лечения данной когорте пациентов необходимо выбирать комплексный подход (операция+ АХТ).

Также на более неблагоприятное течение опухолевого процесса при раннем РОК указывает уровень пролиферации Ki 67 менее 30%, однако, использовать данный маркер как самостоятельный не рекомендуется, учитывая результаты многочисленных исследований (Pircher A., Hilbe W., Heidegger I. et al., 2011; Grimm F., Maurus R., Beschoner R. et al., 2019) [32, 75] в которых показатели пролиферативной активности не коррелируют с частотой метастазирования, но в совокупности с экспрессией хемокинового рецептора CXCR4 данный маркер может помочь выбрать оптимальный вариант лечения пациенту с РОК.

Что касается локализации опухоли, то у больных II стадии правосторонняя локализация, по данным нашего исследования, является неблагоприятным фактором прогноза, как и при метастатическом РОК (Stintzing S., Tejpar S., Gibbs P. et al., 2017) [124], однако, при раннем РОК данный фактор не учитывается при планировании лечения пациентам на первоначальном этапе, что является еще одним нашим предложением.

Наличие KRAS мутации в опухоли значимо не влияло на показатель БРВ в нашем исследовании, хотя мы знаем, что при метастатическом колоректальном раке выявление в опухолевой ткани мутаций RAS-это неблагоприятный прогностический признак (Tie J., Lipton L., Desai J. et al., 2011) [76] возможно, для более достоверного утверждения влияния данного показателя на течение РОК необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, основываясь на полученные в нашем исследовании результаты, для оптимизации тактики адъювантной химиотерапии у больных РОК мы рекомендуем использовать следующий алгоритм (рисунок 27).



Рисунок 27 – Рекомендуемый алгоритм назначения адьювантной химиотерапии у больных ранним РСК

## ВЫВОДЫ

1. Частота прогрессирования у больных РОК после радикального хирургического лечения при II стадии составила 58,5% при медиане БРВ – 26 месяцев (95% ДИ 12,0-42,0); при III стадии – 50% при медиане БРВ 9 месяцев (95% ДИ 3,0-9,0).
2. При сравнении влияния клиничко-морфологических характеристик на частоту метастазирования и медиану БРВ в подгруппах больных РОК II стадии выявлен высокий уровень прогностической значимости правосторонней локализации первичной опухоли ( $p=0,00248$ ), показателя пролиферативной активности Ki 67 менее 30% ( $p<0,0001$ ) и экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 выше 30% ( $p=0,0157$ ); при III стадии – только экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 более 30% ( $p=0,0001$ ).
3. При изучении презентативности хемокиновых рецепторов в аденокарциноме ободочной кишки иммуногистохимическим методом определена шкала градации экспрессии хемокиновых рецепторов: низкая (0-30%), средняя (30-70%) и высокая (70-100%). Экспрессия хемокинового рецептора CCR10 не была выявлена ни в одном случае РОК.
4. У пациентов с низким уровнем экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 в опухолевой ткани не выявлено случаев отдаленного метастазирования и медиана БРВ не достигнута независимо от стадии РОК. У пациентов со II стадией РОК при среднем и высоком уровне экспрессии хемокинового рецептора медиана БРВ составила 13 и 12 месяцев соответственно ( $p=0,0001$ ), при III стадии – 7 и 2 месяца соответственно ( $p=0,0008$ ).
5. По результатам многофакторного анализа были выделены группы благоприятного и неблагоприятного прогноза (в зависимости от уровня порогового значения экспрессии хемокинового рецептора CXCR4  $> 30\%$  или  $<30\%$ , уровня пролиферации Ki67  $> 30\%$  или  $< 30\%$  и локализации первичной опухоли) и определен алгоритм назначения АХТ больным с ранним РОК после радикального хирургического лечения.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразно внедрить в перечень стандартного иммуногистохимического исследования раннего РОК определение уровня экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 и индекса пролиферации Ki67.
2. Пациентов с уровнем экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 более 30%, низким уровнем пролиферации Ki 67 (менее 30%), правосторонней локализацией следует отнести в группу неблагоприятного прогноза и рекомендовать проведение комплексного лечения вне зависимости от стадии (операция+ АПХТ).
3. Пациентов с низким уровнем экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 (менее 30%), уровнем пролиферации Ki 67 более 30%, левосторонней локализацией следует отнести в группу благоприятного прогноза и рекомендовать проведение только радикального хирургического лечения вне зависимости от стадии.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- БРВ – безрецидивная выживаемость
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИГХ – иммуногистохимический метод
- КРР – колоректальный рак
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- НХЛ – неходжкинская лимфома
- ОВ – общая выживаемость
- ОМ – отдаленные метастазы
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РМЖ – рак молочной железы
- РОК – рак ободочной кишки
- РЭА – раково-эмбриональный антиген
- СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита
- ХВГ – хронический вирусный гепатит
- ХР – хемокиновые рецепторы
- 5-ФУ – 5 фторурацил
- IL-8 – интерлейкин-8
- MSI – микросателлитная нестабильность
- АХТ – адъювантная химиотерапия



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Анализ соматических мутаций гена k-RAS при аденокарциноме толстой кишки и поджелудочной железы / М.А. Сазонова, Т.П. Казубская, Е.Л. Корчагина [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2005. – Т. 16, № 3-4. – С. 16-22.
2. Бабышкина, Н.Н. Роль цитокинов и рецептора CCR5 в формировании предрасположенности и прогрессии рака молочной железы / Н.Н. Бабышкина // Медицинская Иммунология. – 2006. – Т. 8, № 2-3. – С. 330-331.
3. Взаимосвязь экспрессии гена хемокинового рецептора CCR5 в лейкоцитах крови с эффективностью неоадьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы / А.А. Пономарева, Н.В. Литвяков, Е.Ю. Гарбуков [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – Приложение № 2. – С. 93-94.
4. Злокачественные новообразования ободочной кишки и ректосигмоидного отдела : клинические рекомендации / Федянин М.Ю., Мамедли З.З., Гордеев С.С. [и др.]. Ассоциация Онкологов России; Нучный Совет МЗ РФ, 2020. – 70 с.
5. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 г. / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова. – Москва, 2020. – 182 с.
6. Кит, И. Молекулярная биология колоректального рака в клинической практике / И. Кит, Д.И. Водолажский // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, № 4. – С. 531-540.
7. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком ободочной кишки / В.С. Ананьев, Е.В. Артамонова, С.И. Ачкасов [и др.]. – Москва, 2014. – 13 с.
8. Клиническое значение делеции гена CCR5 у больных неходжкинскими злокачественными лимфомами / Е.Н. Воропаева, Н.В. Скворцова, М.И. Воевода, Р.В. Тарновский // Бюллетень СО РАМН. – 2011. – Т. 31, № 2. – С. 26-30.

9. Копнин, Б. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения / Б. Копнин // Практическая онкология. – 2002. – Т. 3, № 4. – С. 229-235.
10. Мерабишвили, В.М. Злокачественные новообразования в северо-западном федеральном округе России (заболеваемость, смертность, контингенты, выживаемость больных) / В.М. Мерабишвили; под ред. А.М. Беляева. – Выпуск третий. – Санкт-Петербург, 2017. – С. 22-32.
11. Моторин, Д.В. Оценка уровня хемокинов CXCL 8-11 у больных острыми лейкозами / Д.В. Моторин, А.Ю. Зарицкий // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2009. – Т. 25, № 1. – С. 69-72.
12. Практические рекомендации по лекарственному лечению больных раком ободочной кишки // RUSSCO. – 2012. – С. 120-127.
13. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака ободочной кишки и ректосигмоидного соединения / М.Ю. Федянин, С.И. Ачкасов, Л.В. Болотина [и др.] // «Злокачественные опухоли» Российское общество клинической онкологии. – 2019. – Т. 9, № 3s2. – С. 324-364.
14. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака ободочной кишки и ректосигмоидного соединения / М.Ю. Федянин, С.И. Ачкасов, Л.В. Болотина [и др.] // «Злокачественные опухоли» Российское общество клинической онкологии. – 2021. – Т. 11, № 3s2. – С. 346-357.
15. Роль стволовых раковых клеток, хемокинов и их рецепторов в канцерогенезе, рецидивировании и метастазировании опухолей / Г.А. Раскин, Р.В. Орлова, А.Э. Протасова [и др.] // Вопросы онкологии. – 2013. – № 6. – С. 694-700.
16. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16-22.
17. Симбирцев, А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 9-17.

18. Федянин, М.Ю. Адьювантная терапия больных раком толстой кишки II стадии – трудное решение для химиотерапевта / М.Ю. Федянин // Журнал «Злокачественные опухоли». – 2019. – Т. 9, № 3s1. – С. 15-22.
19. Федянин, М.Ю. Современная и молекулярно-генетическая платформа лечения больных раком толстой кишки : автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.12 / Федянин М.Ю. – Москва, 2017. – 48 с.
20. Хемокины и прогрессия злокачественных новообразований / Н.В. Чердынцева, П.А. Гервас Н.В. Литвяков [и др.] // Медицинская Иммунология. – 2006. – Т. 8, № 2-3. – С. 355-356.
21. Химиотерапия злокачественных опухолей: проблемы и перспективы / Р.В. Орлова, Р.И. Вайзьян, А.К. Иванова [и др.] // Вопросы онкологии. – 2015. – № 2. – С. 244-251.
22. Экспрессия гена хемокинового рецептора CCR5 в лимфоцитах периферической крови больных раком молочной железы / Н.В. Литвяков, А.А. Пономарева, М.Н. Стахеева [и др.] // Медицинская Иммунология. – 2006. – Т. 8, № 2-3. – С. 344-345.
23. Экспрессия хемокиновых рецепторов в опухолевой ткани рака яичника у пациенток с гипертиреозом / Р.И. Глушаков, А.К. Иванова, Г.А. Раскин, Н.И. Тапильская // Вестник РВМА. – 2012. – Т. 40, № 4. – С. 81-86.
24. A Novel Prognostic Biomarker Panel for Early-Stage Colon Carcinoma / P. Azcue, D. Guerrero Setas, I. Encío [et al.] // Cancers (Basel). – 2021. – Vol. 23, № 13. – P. 5909. – doi: 10.3390/cancers13235909.
25. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma / H. Geminder, O. Sagi-Assif, L. Goldberg [et al.] // J. Immunol. – 2001. – Vol. 167. – P. 4747-4757.
26. A randomized-controlled trial of 1-year adjuvant chemotherapy with oral tegafur-uracil versus surgery alone in stage II colon cancer: SACURA trial / C. Matsuda, M. Ishiguro, S. Teramukai [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2018. – Vol. 96. – P. 54-63.

27. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: A randomized study / R. Gray, J. Barnwell, C. McConkey [et al.] // *Lancet*. – 2007. – Vol. 370. – P. 2020-2029.
28. Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75 years) with colon cancer: subgroup analyses of the Multicenter International Study of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer Trial / C. Tournigand, T. Andre, F. Bonnetain [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30, № 27. – P. 3353-3360.
29. Alberto, B. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer / B. Alberto, S. Salvatore // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 1254-1261.
30. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer / A.B. Benson 3<sup>rd</sup>, D. Schrag, M.R. Somerfield [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2004. – Vol. 22, № 16. – P. 3408-3419.
31. An atypical addition to the chemokine receptor nomenclature: IUPHAR Review 15 / F. Bachelierie, G.J. Graham, M. Locati [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 172, № 16. – P. 3945-3949.
32. Biomarkers in tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy / A. Pircher, W. Hilbe, I. Heidegger [et al.] // *Review Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – Vol. 12, № 10. – P. 7077-7099. – doi: 10.3390/ijms12107077.
33. Cancer CXC chemokine networks and tumor angiogenesis / R.M. Strieter, M.D. Burdick, J. Mestas [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 42. – P. 768-778.
34. Cancer related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability / F. Colotta, P. Allavena, A. Sica [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2009. – Vol. 30, № 7. – P. 1073-1081.
35. Cancer Research UK. Bowel cancer. – Cancer Statistics Key Facts, 2014. – URL: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/bowel-cancer>.
36. Capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) versus bolus 5-fluorouracil/leucovorin (5-FU/LV) as adjuvant therapy for stage III colon cancer: survival follow-up of study

- NO16968 (XELOXA) / H.-J. Schmoll, J. Tabernero, A. Maroun [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30, Suppl. 4. – P. 388.
37. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of Receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 Ligands / J. Korbecki, S. Grochans, I. Gutowska [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 20. – P. 7619.
38. CCR5 is Associated With Immune Cell Infiltration and Prognosis of Lung Cancer / J. Zhang, J. Wang, Z. Qian, Y. Han // *J. Thorac. Oncol.* – 2019. – Vol. 14, № 5. – P. e102-e103.
39. Chemokine receptor CCR6 expression level and liver metastases in colorectal cancer / P. Ghadjar, S.E. Coupland, I.K. Na [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 1910-1916.
40. Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome / J. Kim, T. Mori, S.L. Chen [et al.] // *Ann. Surg.* – 2006. – Vol. 244, № 1. – P. 113-120.
41. Chemokine receptors in human endothelial cells: functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines / S.K. Gupta, P.G. Lysko, K. Pillarisetti [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 4282-4287.
42. Chemokine receptors that mediate B-cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination / S. Lopez-Giral, N.E. Quintana, M. Cabrerizo [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2004. – Vol. 76, № 2. – P. 462-471.
43. Chemokines and breast cancer: a gateway to revolutionary targeted cancer treatments? / M.H. Dowsland, J.R. Harvey, T.W. Lennard [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 10. – P. 579-592.
44. Chemokines: multiple level of leukocyte migration control / B. Moser, M. Wolf, A. Walz, P. Loetscher // *Trends immunol.* – 2004. – Vol. 25. – P. 75-84.

45. Clinical effects of tumor-associated macrophages and dendritic cells on renal cell carcinoma / I. Hamada, M. Kato, T. Yamasaki [et al.] // *Anticancer Res.* – 2002. – Vol. 22. – P. 4281-4284.
46. Colorectal Cancer Statistics, 2017 / R.L. Siegel, K.D. Miller, S.A. Fedewa [et al.] // *CA: Cancer J. Clin.* – 2017. – Vol. 67, № 3. – P. 177-193. – doi: 10.3322/caac.21395.
47. Conroy, M.J. CX3CL1 Signaling in the Tumor Microenvironment / M.J. Conroy, J. Lysaght // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2020. – Vol. 1231. – P. 1-12.
48. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts / C. Ginestier, S. Liu, M.E. Diebel [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2010. – Vol. 120, № 2. – P. 485-497.
49. CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells / A. Sehgal, C. Keener, A.L. Boynton [et al.] // *J. Surg. Oncol.* – 1998. – Vol. 69. – P. 99-104.
50. CXCR4 and CCR7 Expression in Primary Nodal Diffuse Large B-Cell Lymphoma-A Clinical and Immunohistochemical Study / H. Du, L. Zhang, G. Li [et al.] // *Am. J. Med. Sci.* – 2019. – Vol. 357, № 4. – P. 302-310.
51. CXCR4 and CXCR7 Signaling Pathways: A Focus on the Cross-Talk Between Cancer Cells and Tumor Microenvironment / S. Santagata, C. Ieranò, A.M. Trotta [et al.] // *Front Oncol.* – 2021. – Vol. 15, № 11. – P. 591386.
52. CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo / P. Gassmann, J. Haier, K. Schlüter [et al.] // *Neoplasia.* – 2009. – Vol. 11, № 7. – P. 651-661.
53. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer / D. Sargent, S. Marsoni, G. Monges [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28, № 30. – P. 4664.
54. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer / M. Koopman, G.A. Kortman, L. Mekenkamp [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2009. – Vol. 100. – P. 266-273.

55. Dienstmann, R. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients / R. Dienstmann, R. Salazar, J. Tabernero // Review J. Clin. Oncol. – 2015. – Vol. 33, № 16. – P. 1787-1796. – doi: 10.1200/JCO.2014.60.0213.
56. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis / G. des Guetz, O. Schischmanoff, P. Nicolaset [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2009. – Vol. 45. – P. 1890-1896.
57. Down-regulation of CXCL1 inhibits tumor growth in colorectal liver metastasis / O.R. Bandapalli, F. Ehrmann, V. Ehemann [et al.] // Cytokine. – 2012. – Vol. 57, № 1. – P. 46-53.
58. Effect of chemokine receptors CCR7 on disseminated behavior of human T cell lymphoma: clinical and experimental study / J. Yang, S. Wang, G. Zhao [et al.] // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2011. – Vol. 30, № 1. – P. 51.
59. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer: International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators // J. Clin. Oncol. – 1999. – Vol. 17. – P. 1356-1363.
60. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis in gastric carcinoma / K. Mashino, N. Sadanaga, H. Yamaguchi [et al.] // Cancer Res. – 2002. – Vol. 62. – P. 2937-2941.
61. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression / T. Koshiba, R. Hosotani, Y. Miyamoto [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2000. – Vol. 6. – P. 3530-3535.
62. Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma / M. Kato, J. Kitayama, S. Kazama [et al.] // Breast Cancer Research. – 2003. – Vol. 5, № 5. – P. R144-150.
63. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis / A. Letsch, U. Keilholz, D. Schadendorf [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2004. – Vol. 122, № 3. – P. 685-690.

64. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value / L. Marisa, A. de Reyniès, A. Duval [et al.] // *PLoS Med.* – 2013. – Vol. 10, № 5. – P. e1001453. – doi: 10.1371/journal.pmed.1001453.
65. Genetic analysis of KRAS mutation status in metastatic colorectal cancer patients / K. Zavodna, M. Konecny, T. Krivulcik [et al.] // *Neoplasma.* – 2009. – Vol. 56, № 3. – P. 275-278.
66. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R. Weinberg // *Cell.* – 2000. – Vol. 100, № 1. – P. 57-70.
67. Hanahan, D. The hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol. 144. – P. 646-674.
68. Helsten, T. Fibroblast growth factor receptor signaling in hereditary and neoplastic disease: biologic and clinical implications / T. Helsten, M. Schwaederle, R. Kurzrock // *Cancer Metastasis Rev.* – 2015. – Vol. 34, № 3. – P. 479-496.
69. Hofseth, L.J. Inflammation, cancer, and targets of ginseng / L.J. Hofseth, M.J. Wargovich // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137, № 1. – P. 183-185.
70. Homeostatic chemokines drive migration of malignant B-cells in patients with non-Hodgkin lymphomas / L. Trentin, A. Cabrelle, M. Facco [et al.] // *Blood.* – 2004. – Vol. 104. – P. 502-508.
71. Horst Ibelgayft's COPE // Cytokine online Pathfinder Encyclopedia. – 2012. – URL: <http://copewithcytokines.de>.
72. Identification of novel members of the *Xenopus* Ca<sup>2+</sup>-dependent lectin family and analysis of their gene expression during tail regeneration and development / T. Ishino, T. Kunieda, S. Natori [et al.] // *J. Biochem.* – 2007. – Vol. 141, № 4. – P. 479-488.
73. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial / T. Andre, C. Boni, M. Navarro [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27, № 19. – P. 3109-3116.



74. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis / A. Muller, B. Homey, H. Soto [et al.] // *Nature*. – 2001. – Vol. 410. – P. 50-56.
75. Ki-67 labeling index and expression of p53 are non-predictive for invasiveness and tumor size in functional and nonfunctional pituitary adenomas / F. Grimm, R. Maurus, R. Beschoner [et al.] // *Acta Neurochir (Wien)*. – 2019. – Vol. 161, № 6. – P. 1149-1156. – doi: 10.1007/s00701-019-03879-4.
76. KRAS mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer / J. Tie, L. Lipton, J. Desai [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17. № 5. – P. 1122-1130.
77. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon cancer / C.G. Moertel, T.R. Fleming, J.S. Macdonald [et al.] // *New Engl. J. Medicine*. – 1990. – Vol. 332. – P. 352-358.
78. Lugano, R. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities / R. Lugano, M. Ramachandran, A. Dimberg // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2020. – Vol. 77, № 9. – P. 1745-1770.
79. Luo, J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction / J. Luo, N. Solimini, S. Elledge // *Cell*. – 2009. – Vol. 136, № 5. – P. 823-837.
80. Najdaghi, S. An overview of the role of interleukin-8 in colorectal cancer / S. Najdaghi, S. Razi, N. Rezaei // *Cytokine*. – 2020. – Vol. 135. – P. 155205.
81. Negrini, S. Genomic instability – an evolving hallmark of cancer / S. Negrini, V. Gorgoulis, T. Halazonetis // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2010. – Vol. 11, № 3. – P. 220-228.
82. Newby, A.C. Поменять на: Proteinases and plaque rupture: unblocking the road to translation / A.C. Newby // *Curr Opin Lipidol.* – 2014. – Vol. 25. № 5. – P. 358-366.
83. Oppenheim, J. Cytokine Reference / J. Oppenheim, M. Feldman. – London: Academic Press, 2000. – 2015 p.
84. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trials, including survival and subset analyses / G. Yothers, M.J. O'Connell, C.J. Allegra [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29, № 28. – P. 3768e-3774.

85. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: Who benefits and by how much? / S. Gill, C.L. Loprinzi, D.J. Sargent [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 1797-1806.
86. Possible role of stromal-cell derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma / D. Uchida, N.M. Begum, A. Almofti [et al.] // *Exp. Cell. Res.* – 2003. – Vol. 290. – P. 289-302.
87. Producing of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation / J. Gerdes, U. Schwab, H. Lemke, H. Stein // *Int. J. Cancer.* – 1983. – Vol. 31. – P. 13-20.
88. Prognostic and Predictive Role of CXC Chemokine Receptor 4 in Metastatic Colorectal Cancer Patients / A. Ottaiano, S. Scala, N. Normanno [et al.] // *Appl. Immunohistochem Mol. Morphol.* – 2020. – Vol. 28, № 10. – P. 755-760.
89. Prognostic and predictive value of KRAS mutation number in metastatic colorectal cancer / G. Ucar, Y. Ergun, S. Aktürk Esen [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2020. – Vol. 99, № 39. – P. e22407.
90. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999 / C.C. Compton, L.P. Fielding, L.J. Burgart [et al.] // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2000. – Vol. 124. – P. 979-994.
91. Prognostic Interactions between FAP+ Fibroblasts and CD8a+ T Cells in Colon Cancer / M. Herrera, A. Mezheyeuski, L. Villabona [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2020. – Vol. 12, № 11. – P. 3238. – doi: 10.3390/cancers12113238.
92. Prospective pooled analysis of four randomized trials investigating duration of adjuvant oxaliplatin-based therapy (3 vs 6 months for patients with high-risk stage II colorectal cancer) / T. Iveson, A.F. Sobrero, T. Yoshino [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2019. – Vol. 37, Suppl. – Abstr. 3501.
93. Randomized phase III trial of active specific immunotherapy versus control in patients with Duke's B2, B3 or C colon cancer / J. Vermorcken, A. Claessen, H. Gall [et al.] // *Proc. of ASCO.* – 1996. – abstr. 444. – P. 201.

94. RAS Mutations as Predictive Biomarkers in Clinical Management of Metastatic Colorectal Cancer / P. Waring, J. Tie, D. Maru, C.S. Karapetis // *Clin. Colorectal. Cancer.* – 2016. – Vol. 15, № 2. – P. 95-103.
95. Reduced risk of AIDS lymphoma in individuals heterozygous for the CCR5-delta32 mutation / M. Dean, L.P. Jacobson, G. McFarlane [et. al.] // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59, № 15. – P. 3561-3564.
96. Rivera, C.G. Angiogenesis-associated crosstalk between collagens, CXC chemokines, and thrombospondin domain-containing proteins / C.G. Rivera, J.S. Bader, A.S. Popel // *Ann. Biomed. Eng.* – 2011. – Vol. 39, № 8. – P. 2213-2222. – doi: 10.1007/s10439-011-0325-2.
97. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension / T.P. Mikolajczyk, R. Nosalski, P. Szczepaniak [et al.] // *FASEB J.* – 2016. – Vol. 30, № 5. – P. 1987-1999.
98. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis / M. Darash-Yahana, E. Pikarsky, R. Abramovitch [et al.] // *FASEB J.* – 2004. – Vol. 18. – P. 1240-1242.
99. Role of TSP-1 as prognostic marker in various cancers: a systematic review and meta-analysis / S. Sun, H. Dong, T. Yan [et al.] // *BMC Med. Genet.* – 2020. – Vol. 21, № 1. – P. 139.
100. Rosenkilde, M.M. The chemokine system – a major regulator of angiogenesis in health and disease / M.M. Rosenkilde, T.W. Schwartz // *APMIS.* – 2004. – Vol. 112, № 7-8. – P. 481-495.
101. Sakurai, E. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization / E. Sakurai, A. Anand, B.K. Ambati // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – P. 1093-1102.
102. Sharma, S. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis / S. Sharma, M.C. Sharma, C. Sarkar // *Histopathology.* – 2005. – Vol. 46, № 5. – P. 481-489.

103. Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin  $\alpha v\beta 3$  / T. Gloe, H. Sohn, G. Meininger [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 26. – P. 23453-23458.
104. Shi, Y. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer / Y. Shi, D.J. Riese 2nd, J. Shen // *Front Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 574667.
105. T lymphocyte chemotactic chemokines in acute myelogenous leukemia (AML): local release by native human AML blasts and systemic levels of CXCL10 (IP-10), CCL5 (RANTES) and CCL17 (TARC) / A.M. Olsnes, D. Motorin, A. Rynningen [et al.] // *Cancer Immunol Immunother.* – 2006. – Vol. 55, № 7. – P. 830-840.
106. Takanami, I. Overexpression of CCR7 mRNA in non small cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis / I. Takanami // *Int. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 105. – P. 186-189.
107. TGF-beta1 enhances SDF-1alpha-induced chemotaxis and homing of naive T cells by up-regulating CXCR4 expression and downstream cytoskeletal effector molecules / T. Lapidot, S. Franitza, O. Kollet [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2002. – Vol. 32, № 1. – P. 193-202.
108. The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity / E. Azenshtein, G. Luboshits, S. Shina [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 11. – P. 2663-2676.
109. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes / K.J. Till, K. Lin, M. Zuzel [et al.] // *Blood.* – 2002. – Vol. 99. – P. 2977-2984.
110. The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow / W. Shen, L.J. Bendall, D.J. Gottlieb [et al.] // *Exp. Hematol.* – 2001. – Vol. 29. – P. 1439-1447.
111. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract / K. Tachibana, S. Hirota, H. Iizasa [et al.] // *Nature.* – 1998. – Vol. 393. – P. 591-594.

112. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status / R. Jover, P. Zapater, A. Castells [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2009. – Vol. 45. – P. 365-373.
113. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis / R.M. Strieter, P.J. Polverini, S.L. Kunkel [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 27348-27357.
114. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis / H.A. Elshabrawy, Z. Chen, M.V. Volin [et al.] // *Angiogenesis.* – 2015. – Vol. 18, № 4. – P. 433-448.
115. The Plasminogen-Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis / A.A. Ismail, B.T. Shaker, K. Bajou [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 23, № 1. – P. 337.
116. The relative efficacy of 5-FU +leucovorin, 5-FU+levamisole and 5-FU+leucovorin+levamisole in patients with Duke's B and C carcinoma of the colon first report of NS-ABPC-04 / N. Wolmark, H. Rockette, E. Mamounas [et al.] // *Proc. of ASCO.* – 1996. – abstr. 460. – P. 205.
117. The Role of CXC Chemokine Receptors 1-4 on Immune Cells in the Tumor Microenvironment / K.H. Susek, M. Karvouni, E. Alici [et al.] // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2159.
118. The role of interleukin 8 / CXCL8 in the immunopathogenesis and carcinogenesis of inflammatory bowel diseases (review) / A. Doszhan, R. Bektayeva, N. Imanbayeva [et al.] // *Med. News.* – 2019. – Vol. 296. – P. 150-153.
119. The Role of Interleukins in Colorectal Cancer / J. Li, L. Huang, H. Zhao [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2020. – Vol. 16, № 13. – P. 2323-2339.
120. Thibodeau, S.N. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon / S.N. Thibodeau, G. Bren, D. Schaid // *Science.* – 1993. – Vol. 260. – P. 816-819.
121. Tumor-derived exosomes: Implication in angiogenesis and antiangiogenesis cancer therapy / C. Aslan, S. Maralbashi, F. Salari [et al.] // *Cell. Physiol.* – 2019. – Vol. 234, № 10. – P. 16885-16903.

122. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer / R. Gryfe, H. Kim, E.T.K. Hsieh [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342. – P. 69-77.
123. Tumor microsatellite – instability status as a predictor of benefit from fluorouracil based adjuvant chemotherapy for colon cancer / C.M. Ribic, D.J. Sargent, M.J. Moore [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 349. – P. 247-257.
124. Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes / S. Stintzing, S. Tejpar, P. Gibbs [et al.] // *Review Eur. J. Cancer.* – 2017. – Vol. 84. – P. 69-80. – doi: 10.1016/j.ejca.2017.07.016.
125. Upregulation of CXC chemokine receptor 4-CXC chemokine ligand 12 axis in invasive breast carcinoma: A potent biomarker predicting lymph node metastasis / R. Dayer, S. Babashah, S. Jamshidi [et al.] // *J. Cancer Res. Ther.* – 2018. – Vol. 14, № 2. – P. 345-350.
126. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis / C.S. Melincovici, A.B. Boşca, S. Şuşman [et al.] // *Rom. J. Morphol. Embryol.* – 2018. – Vol. 59, № 2. – P. 455-467.
127. Vilgelm, A.E. Chemokines Modulate Immune Surveillance in Tumorigenesis, Metastasis, and Response to Immunotherapy / A.E. Vilgelm, A. Richmond // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 333.
128. Vinader, V. The emerging role of CXC chemokines and their receptors in cancer / V. Vinader, K. Afarinkia // *Future Med Chem.* – 2012. – Vol. 4, № 7. – P. 853-867.
129. Wang, L.-X. Host lymphodepletion augments T-cell adoptive immunotherapy through enhanced intratumoral proliferation of effector cells / L.-X. Wang, S. Shu, G.E. Plautz // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 9547-9554.
130. Yoshimura, T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? / T. Yoshimura // *Cell. Mol. Immunol.* – 2018. – Vol. 15, № 4. – P. 335-345.

131. Zeelenberg, I.S. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases / I.S. Zeelenberg, L. Ruuls-Van Stalle, E. Roos // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63, № 13. – P. 3833-3839.
132. Zheng, Y. Interpretation of global colorectal cancer statistics / Y. Zheng, Z.Z. Wang // *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* – 2021. – Vol. 10. – Vol. 42, № 1. – P. 149-152.