

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРВЫЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

КИСЕЛЕВА

Елена Владимировна

**РОЛЬ МИКРОРНК-21
В ДИАГНОСТИКЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Захаренко Александр Анатольевич

Санкт-Петербург – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1 КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК – СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ	
ПРОБЛЕМЫ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Распространенность и смертность при колоректальном раке	15
1.2 Этиология, патогенез и классификация колоректального рака	17
1.3 Роль микроРНК в патогенезе колоректального рака	21
1.4 Подходы к диагностике колоректального рака	27
1.4.1 Тесты на скрытую кровь в стуле	28
1.4.2 Инструментальные визуализирующие методы	29
1.4.3 Молекулярно-генетические маркеры колоректального рака	31
1.5 Подходы к скринингу колоректального рака	
в мировой медицинской практике	33
1.6 МикроРНК как один из методов ранней диагностики	
колоректального рака	43
Глава 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1 Дизайн исследования.....	46
2.2 Критерии включения/невключения	48
2.3 Обследование пациентов	49
2.4 Общая характеристика обследуемых групп пациентов.....	52
2.4.1 Характеристика основной группы пациентов	
с колоректальным раком	54
2.4.2 Характеристика контрольной группы,	
здоровых добровольцев.....	57
2.4.3 Характеристика групп пациентов с немелкоклеточным раком	
легкого (группа сравнения – 1) и глиальными церебральными	
опухолями (группа сравнения – 2).....	58

2.5 Молекулярно-генетическое исследование	59
2.5.1 Выделение микроРНК-21 и проведение обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции.....	61
2.5.1.1 Забор и подготовка клинических образцов.....	61
2.5.1.2 Выделение тотальной рибонуклеиновой кислоты	61
2.5.1.3 Реакция обратной транскрипции	63
2.5.1.4 Методика полимеразной цепной реакции.....	64
2.5.2 Расчеты.....	65
2.6 Статистическая обработка данных	66
 Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. АНАЛИЗ УРОВНЕЙ ОНКОМАРКЕРОВ РАКОВОЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА, СА-19.9, СА-125, ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТЕСТА НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКРЫТОЙ КРОВИ В СТУЛЕ (Fecal Occult Blood Test) И ЭКСПРЕССИИ микроРНК-21 В СЛЮНЕ И В ПЛАЗМЕ КРОВИ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ.....	67
3.1 Характеристика основной группы (пациенты с колоректальным раком) и контрольной группы (здоровые добровольцы) по онкомаркерам раковоэмбриональному антигену, СА-19.9, СА-125.....	67
3.2 Характеристика основной группы (пациенты с колоректальным раком) по иммунохроматографическому тесту определения скрытой крови в стуле (Fecal Occult Blood Test).....	71
3.3 Уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови в исследуемой когорте.....	73
3.3.1 Уровень экспрессия микроРНК-21 в слюне и плазме крови в контрольной группе (здоровые добровольцы)	73
3.3.2 Анализ взаимосвязи экспрессии микроРНК-21 в плазме крови и слюне с некоторыми характеристиками контрольной группы (здоровые добровольцы)	74

3.3.3	Уровень экспрессия микроРНК-21 в слюне и плазме крови у пациентов основной группы (пациенты с колоректальным раком).....	75
3.3.4	Анализ взаимосвязи экспрессии микроРНК-21 в плазме крови и слюне с некоторыми характеристиками опухолевого процесса в основной группе (пациенты с колоректальным раком).....	81
3.3.5	Уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (группа сравнения – 1) и глиальными церебральными опухолями (группа сравнения – 2) и анализ взаимосвязи с клиническими характеристиками групп.....	82
3.4	Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-21 в исследуемых группах	86
3.4.1	Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-21 в подгруппе возраст исследуемых групп	87
3.4.2	Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-21 в подгруппе пол исследуемых групп	88
3.4.3	Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-21 в подгруппе T in situ – T2 классификации TNM основной группы (пациенты с колоректальным раком) и группы сравнения – 1 (пациенты с немелкоклеточным раком легкого).....	89
Глава 4 ЭКСПРЕССИЯ микроРНК-21 В СЛЮНЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ КАК МЕТОД ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НАЛИЧИЯ ОПУХОЛИ (КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК, НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫЙ РАК ЛЕГКОГО, ГЛИАЛЬНЫЕ ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ)		90
4.1	Экспрессия микроРНК-21 в слюне и плазме крови как метод диагностики опухоли (колоректальный рак,	

немелкоклеточный рак легкого, глиальные церебральные опухоли)....	90
4.2 Однофакторный анализ прогнозирования колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого, глиальных церебральных опухолей	92
4.3 Регрессионный анализ прогнозирования колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого, глиальных церебральных опухолей на основе уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне	93
4.4 Формирование рискованных классов и модель прогнозирования колоректального рака, основанная на определении уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови (диагностический алгоритм колоректального рака).....	98
4.5 Сравнительный анализ предложенного диагностического алгоритма колоректального рака с используемым в практике иммунохроматографическим тестом на определение скрытой крови в стуле (Fecal Occult Blood Test)	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	102
ВЫВОДЫ	112
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	114
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Несмотря на развитие медицинских технологий и разработанные методы диагностики, колоректальный рак (КРР) остается одной из серьезных проблем в онкологии, занимая ведущие позиции по показателям заболеваемости и смертности [96, 186].

В России опухоли толстой кишки в структуре общей онкологической заболеваемости до сих пор удерживают третье место после рака легких и желудка у мужчин и второе место после рака молочной железы у женщин [11].

Во всем мире пятилетняя выживаемость при КРР приблизительно равна 50-60%. На начальных стадиях заболевания этот показатель значительно выше (75-90%), а на поздних стадиях он составляет <15% [101, 180]. Таким образом, раннее выявление КРР имеет большое значение.

Во многих развитых странах внедренные в последние 20 лет скрининговые программы, такие как тест на скрытую кровь в стуле (FOBT) и фиброколоноскопия, привели к снижению заболеваемости и смертности от КРР, однако ложноположительные результаты при FOBT нуждаются в дополнительном обследовании, тогда как ложноотрицательные способствуют мнимому успокоению [82, 90, 144]. Колоноскопия вследствие своего инвазивного характера, риска осложнений и себестоимости не может широко использоваться в профилактических целях для массовых обследований [144].

Еще одним неинвазивным методом диагностики КРР является обнаружение аномальной ДНК и скрытой крови в образцах кала [60, 67].

Колоректальные эпителиальные клетки попадают в фекалии, и стабильная форма ДНК может быть извлечена из образцов и исследована с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот процесс позволяет выявить мутации в нескольких генах, включая K-RAS, APC, BAT-26, p53 [139].

Данные небольших исследований показали, что чувствительность этого метода составляет 91% в отношении выявления КРР и 82% – аденоматозных полипов более 1 см в диаметре; специфичность в обоих случаях достигает около 90% [74, 179]. По другим данным, чувствительность метода колебалась в диапазоне от 52 до 91% – при диагностике КРР и 27-82% – при аденоматозных полипах [144].

Таким образом, поиск новых маркеров, пригодных для ранней диагностики КРР, которые бы позволяли выявить заболевание с высокой чувствительностью и специфичностью, является актуальной задачей.

В последнее время появилось большое количество исследований, посвященных роли малых, не кодирующих белок молекул РНК (микроРНК) в канцерогенезе. Семейство генов микроРНК насчитывает немногим более 1% от всего генома человека, но регулирует экспрессию почти трети всех генов на посттранскрипционном уровне, при этом являясь наиболее консервативным по последовательностям и механизмам экспрессии. В «здоровых» клетках микроРНК являются одним из основных регуляторов экспрессии генов, принимающих участие практически во всех процессах ее жизнедеятельности, функционировании, пролиферации и развитии [79].

В процессах канцерогенеза опухолей толстой кишки описано как усиление, так и подавление или полное прекращение экспрессии различных микроРНК [200].

В 2008 г. было доказано, что микроРНК присутствуют не только в тканях, но и во всех жидкостях организма, таких как кровь (сыворотка и плазма), моча, спинномозговая жидкость и слюна [189].

Также было доказано, что циркулирующие микроРНК устойчивы при неблагоприятных физиологических условиях (циклы замораживания-оттаивания, значительные изменения рН среды, длительное нахождение при комнатной температуре) и, в целом, показывают высокую устойчивость к воздействию рибонуклеаз, присутствующих в плазме и сыворотке крови [55, 75].

МикроРНК-21 – одна из таких микроРНК. Это онкогенная микроРНК, которая регулирует экспрессию нескольких связанных с раком генов-мишеней, таких как PTEN, TPM1 и PDCD. Его сверхэкспрессия была показана в различных опухолях человека. Доказано, что экспрессия генов микроРНК-21 при колоректальном раке повышена [56]. Кроме того, экспрессия микроРНК-21, активируемая в тканях колоректальной опухоли, увеличивается при ее прогрессировании и связана с плохой выживаемостью и ответом на химиотерапию [191]. С этого начались публикации большого количества работ, посвященных микроРНК-21 при раке толстой кишки. Учитывая тот факт, что микроРНК во внеклеточной среде стабилизированы благодаря формированию комплексов с белками, липопротеинами высокой и низкой плотности соответственно, а также упакованы во внеклеточные везикулы (экзосомы, микровезикулы, онкосомы, апоптические тельца и др.), что позволяет им быть устойчивыми к воздействию неблагоприятных внешних факторов [52, 193], необходимо обратить внимание на слюну, так как она имеет много преимуществ перед кровью, поскольку ее сбор прост, безопасен, неинвазивен и экономичен. В литературе встречаются исследования, посвященные изучению уровня экспрессии различных микроРНК в слюне [36, 107], однако все эти исследования в основном являются пилотными. А исследований, посвященных изучению уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне при колоректальном раке, в мировой литературе нет, за исключением исследования, выполненного нашей группой в 2017 году [151].

Степень разработанности темы исследования

Благодаря способности микроРНК определяться за пределами опухоли в различных биологических жидкостях организма секрет слюнных желез является привлекательным источником потенциально новых опухолевых маркеров для диагностики и мониторинга рака. Изучение уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне, как маркера неинвазивной диагностики колоректального рака, является

перспективным направлением. Несмотря на появляющиеся публикации, посвященные изучению уровня экспрессии микроРНК-21, в слюне при различных онкологических заболеваниях остаются не до конца разработанными алгоритмы диагностики отдельных онкологических патологий. А учитывая тот факт, что выявление опухолевого процесса на ранней стадии заболевания способствует увеличению выживаемости пациентов в 75-90% случаев, поиск маркеров, способствующих своевременно заподозрить патологический процесс и произвести более детальное обследование пациента, остается актуальной задачей.

Цель исследования

Разработать диагностический алгоритм прогнозирования колоректального рака, основанный на определении уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови.

Задачи исследования

1. Определить, проанализировать и сравнить уровни экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови у пациентов с колоректальным раком и здоровых добровольцев
2. Оценить уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови как метода диагностики и произвести анализ факторов, влияющих на прогнозирование колоректального рака.
3. Разработать оптимальный диагностический алгоритм прогнозирования колоректального рака.
4. Произвести сравнительный анализ и оценить эффективность предложенного диагностического алгоритма с используемым в настоящее время методом неинвазивной диагностики колоректального рака (FOB).

Научная новизна исследования

На достаточном клиническом материале продемонстрированы результаты неинвазивной диагностики колоректального рака, не требующей специальной подготовки. Впервые определен уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне у пациентов с колоректальным раком и здоровых добровольцев, а также произведено сравнение уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови. Методика определения экспрессии микроРНК-21 с использованием реагентов российского производства в образцах слюны и периферической крови у пациентов с колоректальным раком адаптирована для жителей РФ. На основании полученных данных разработан алгоритм прогнозирования колоректального рака, основанный на неинвазивном исследовании уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови. Выполнен сравнительный анализ предложенного диагностического алгоритма на основе микроРНК-21 в слюне и плазме крови с используемым в настоящее время иммунохроматографическим тестом на определение скрытой крови в стуле (FOB). Показана эффективность предложенной модели прогнозирования колоректального рака, основанной на экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме, которая может быть применена в клинической практике. А исследование экспрессии микроРНК-21 в слюне, ввиду доступности биоматериала, является перспективным в ранней диагностике колоректального рака, а также может использоваться в качестве мониторинга неограниченное количество раз.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Разработанный метод неинвазивной диагностики, основанный на определении уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови, в качестве доступного и быстрого инструмента выявления колоректального рака в клинической практике, обладает достаточной чувствительностью и специфичностью. Изучение уровня экспрессии микро РНК-21 в слюне и плазме

крови, а также комплексная модель прогнозирования колоректального рака, в дополнение к общепринятым методам, позволят диагностировать заболевание до наступления клинических проявлений, на ранних стадиях, тем самым обеспечив высокий уровень пятилетней выживаемости после проведенного лечения. А также позволит уменьшить объем проводимого хирургического лечения.

Методология и методы исследования

Методологическая часть исследования включала в себя анализ литературных данных отечественных и зарубежных авторов, посвященных ранней диагностике колоректального рака. На основании полученных данных определены основные факторы, указывающие на наличие колоректального рака, разработан план диссертационного исследования, определены цели, задачи и сформулирована гипотеза. Материалом настоящего проспективного исследования послужили данные 166 пациентов (65 пациентов с колоректальным раком, 66 здоровых добровольцев, 14 пациентов с немелкоклеточным раком легкого и 21 пациент с глиальными церебральными опухолями), которые проходили обследование и лечение в НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России. Всем пациентам дополнительно производился забор слюны и плазмы крови для определения уровня экспрессии микроРНК-21 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). На основании анализа полученных данных предложен диагностический алгоритм, который позволяет заподозрить у человека наличие колоректального рака. Оценена его диагностическая значимость. При сравнении данного алгоритма с используемым в настоящее время методом неинвазивной диагностики колоректального рака он ничуть ему не уступает, а даже превосходит по простоте выполнения.

Положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с колоректальным раком уровень экспрессии микроРНК-21 в плазме крови и в слюне выше, чем у здоровых добровольцев контрольной группы.
2. Оценка уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне представляется более специфичным методом для диагностики колоректального рака, чем для немелкоклеточного рака легкого и глиальных церебральных опухолей.
3. Максимальные уровни экспрессии микроРНК-21 в слюне наблюдались у пациентов с начальными (T_{in situ}+T₂) стадиями колоректального рака, что позволяет рассматривать возможное применение данного метода неинвазивной диагностики в качестве скрининга.
4. Разработанный алгоритм прогнозирования наличия колоректального рака на основании трех легко определяемых маркеров (возраста, уровня экспрессии микроРНК-21 в плазме крови и в слюне) обладает достаточно высокими чувствительностью и специфичностью и высоким прогнозным качеством и может быть использован как дополнительный метод неинвазивной диагностики колоректального рака.

Статистическая достоверность и апробация работы

Достаточный объем выборок (65 пациентов с колоректальным раком, 66 здоровых добровольцев (контрольная группа), 14 пациентов с немелкоклеточным раком легкого, 21 пациент с глиальными церебральными опухолями) и полученные результаты подтверждаются статистической достоверностью проведенного исследования. В работе применены современные методы математического анализа и использовано современное программное обеспечение.

Основные результаты, изложенные в работе, были представлены и обсуждены на различных конференциях и форумах:

- Русско-Японский симпозиум «Russian Week 2021 in Kanazawa University» Kanazawa (30.09.2021 года);

- IX Международной конференции «Современные биотехнологии для науки и практики», посвященной Международному Дню ДНК (28-29.04.2022 года, Санкт-Петербург, Россия);
- VI Конгрессе Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное (12-17 июля 2022 года, Санкт-Петербург, Россия);
- V Юбилейный международный форум онкологии и радиотерапии (19-23.09.2022 года, Москва, Россия).

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из которых 2 входят в международную реферативную базу данных и систему цитирования Scopus. Получено 1 свидетельство о регистрации базы данных.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования отражены в научных статьях, внедрены и активно используются в научной и лечебной работе онкологических отделений НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России (197022, Россия, СанктПетербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8) (акт внедрения от 13.03.2023г.).

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автором самостоятельно разработаны дизайн, цели и задачи, а также сформулированы выводы проспективного исследования. Автор лично осуществлял сбор информации по теме диссертации, подборе, лабораторном и клиническом обследовании пациентов исследуемых групп. Под руководством д.м.н., профессора М.И. Зарайского автор лично участвовал в проведении молекулярно - генетического исследования: осуществлял забор и подготовку клинических образцов, выделение тотальной рибонуклеиновой кислоты, проводил реакцию обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Автором лично осуществлялась обработка и систематизация полученных

результатов обследования пациентов с последующим составлением электронной базы данных. Автор самостоятельно осуществлял статистическую обработку полученных данных с последующим оформлением результатов исследования. Автором лично разработан и внедрен в клиническую практику на онкологических отделениях НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России алгоритм диагностики колоректального рака, основанный на трех наиболее значимых факторах (возраста, уровне экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови).

Соответствие паспорту специальности

Основные научные положения и выводы диссертации «Роль микроРНК-21 в диагностике колоректального рака» соответствуют паспорту специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 139 страницах машинописного текста и написана по традиционной форме, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и практических рекомендаций, списка литературы и списка сокращений. Список литературы включает 32 отечественных и 170 зарубежных авторов и содержит 32 таблицы, 15 рисунков.

Глава 1

КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК – СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Распространенность и смертность при колоректальном раке

Колоректальный рак (КРР) – это злокачественная опухоль, поражающая все отделы толстой кишки, в том числе и анальный канал. В настоящее время КРР является не только актуальной проблемой современной онкологии, но и одной из ведущих проблем общественного здравоохранения [14, 32]. Длительное время КРР удерживает ведущие позиции по показателям заболеваемости [31]. С каждым годом число больных КРР увеличивается. В мире каждый год регистрируется около 1,9 миллиона первичных случаев КРР, причем около 900 тыс. из которых заканчивается летальным исходом [11, 147].

По распространенности среди всех локализаций рака в мире КРР занимает 3-е место после рака легкого и рака молочной железы [96, 186]. По частоте смертности заболевание находится на втором месте, уступая лидирующее место раку легкого [11]. Высокий уровень заболеваемости КРР отмечается в развитых странах Европы и северной Америки, тогда как в развивающихся странах Африки, Азии и Южной Америки он ниже [98]. Каждый год в США выявляют около 150 тыс. новых случаев КРР, из которых 50-55 тыс. заканчиваются летальным исходом [43].

В Великобритании этот показатель составляет 30 тыс., из них 17 тыс. случаев заканчиваются летальным исходом. В Нидерландах – 8 400, из них 4 400 с летальным исходом. В Германии ежегодно диагностируют 50 тыс. первичных случаев заболеваний КРР [86, 125].

В России число первичных случаев заболеваемости КРР за последние 50 лет выросло в 7 раз. Стоит отметить, что за последние 10 лет количество больных

КРР увеличилось на 47,8%. В 2020 г. среди мужского населения Российской Федерации удельный вес КРР составил 12,6%, среди женского – 12,0% [11].

В 85% случаев КРР встречается у лиц старше 55 лет [184]. Пик заболеваемости приходится на возраст старше 70 лет [15]. Крайне редко можно наблюдать данную форму рака у лиц моложе 30 лет.

Высокие показатели смертности от колоректального рака у обоих полов наблюдаются в Центральной и Восточной Европе, а самые низкие в Средней Африке. Уменьшению показателей смертности в нескольких странах мира способствовала ранняя диагностика по средствам скрининга, а также применяемые более сложные и эффективные методы лечения [50, 197].

В России с 2005 года отмечается неуклонный рост смертности от КРР и в 2020 году зарегистрировано более 18 тысяч летальных исходов, тогда как в США этот показатель составлял порядка 50 тысяч, а в Японии более 50 тысяч смертей от данной патологии [12, 16].

Продолжительность жизни больных КРР, в основном, зависит от степени распространенности опухолевого процесса. Пятилетняя выживаемость пациентов с ранней стадией заболевания (I-II ст.) составляет 95,2-72,2%, тогда как у пациентов с более запущенными формами заболевания (III-IV ст.) этот показатель равен 44,3-8,1% [2, 5, 8]. В основном, пациенты с КРР обращаются к врачу, имея запущенную форму рака, которая регистрируется в 80% случаев (на 100 вновь выявленных больных КРР приходится более 70 умерших, из них на первом году после установки диагноза около 40%) [1, 17, 27, 28].

Таким образом, в связи с крайне высокими показателями распространенности и смертности, КРР представляет для современного здравоохранения проблему. Одним из путей ее решения может стать ранняя диагностика КРР, основанная, в том числе, на знаниях об этиологии и патогенезе заболевания.

1.2 Этиология, патогенез и классификация колоректального рака

В настоящее время известны следующие факторы риска, способствующие развитию КРР:

1. Диета с низким содержанием фруктов и овощей, чрезмерное потребление красного мяса и насыщенных жиров.
2. Потребление алкоголя.
3. Избыточный вес и малоподвижный образ жизни.
4. Хронические воспалительные заболевания кишечника (ВЗК).
5. Рак толстой кишки у близких родственников.
6. Возраст.

Стоит отметить, что в 75% случаев у больных с КРР проследить какие-то факторы риска из известных не удается [124].

В большинстве случаев КРР является спорадическим, при этом возраст является главным фактором риска. Генетически обусловленные формы встречаются гораздо реже: семейный аденоматозный полипоз – 1%, неполипозный наследственный КРР или синдром Линча – 2-5% и МҮН-ген ассоциированный полипоз – менее 1%. По некоторым данным, на долю семейного КРР приходится 20-25% случаев [16, 38].

В одном из полигеномных исследований, изучающих общие и редкие генетические варианты риска развития КРР, произведен анализ наследуемости КРР [81]. Выявлено, что риск развития опухолей толстой кишки очень полигенен. Более масштабные и всеобъемлющие исследования, позволяющие анализировать редкие варианты, улучшат понимание патобиологии КРР и повлияют на персонализированные стратегии скрининга.

Развитие КРР происходит в связи с накоплением генетических и эпигенетических изменений, которые приводят к перерождению нормальной слизистой оболочки толстой кишки в инвазивный рак. Большинство раков толстой кишки начинает свое развитие из аденом (модель «аденома-карцинома»).

Обычно такое перерождение происходит за 10-15 лет [198]. В канцерогенезе КРР выделяют три основных направления:

Первое предложил Fearon et al. [91] – путь хромосомной нестабильности. Он включает в себя накопление мутаций, приводящих к активации онкогена (KRAS) и гена супрессора инактивации (DCC, APC, SMAD4, TTP 53). Накопление этих молекулярных повреждений ведет к неопластической трансформации.

Второе направление связано с накоплением ошибок во время репликации фрагмента ДНК из-за наличия мутаций в генах, ответственных за ее репарацию (MSH2, MLH1, Msh6, PMS2, MLH3, MSH3, PMS1 и EXO1) [63]. Накопление этих ошибок в повторяющихся фрагментах ДНК (микросателлитах), которые локализуются в различных участках генома, приводит к мутациям в различных генах. Этот механизм вовлечен в развитие синдрома Линча и в 15-20% в развитие спорадических раков толстой кишки [113]. Опухоли, возникающие в результате мутации в генах, локализуются в проксимальных отделах толстой кишки до селезеночного угла [108]. Гистологически они характеризуются повышенной лимфоцитарной инфильтрацией и являются муцинозными низкокодифференцированными опухолями.

Третье направление – абиррантное гиперметиличирование. Так называемый механизм угнетения функции генов. Динуклеотидное метилирование в промоторной части множества генов представлено CpG фрагментом. CpG island methylator phenotype (CIMP) ответственна за 15-20% спорадических раков толстой кишки. CIMP положительными считаются опухоли, в которых метилирование проявляется, как минимум, в трех из последующих маркеров (CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3 и SSOCS) [72]. Эти опухоли чаще локализуются в правом фланге толстой кишки. По гистологическому типу это низкокодифференцированные муцинозные или персневидноклеточные опухоли. Чаще всего, их предшественниками являются зубчатые аденомы [70].

Классификация опухолей исторически основывается на различных клинических (например, проксимально расположенный рак или дистально расположенный рак), гистологических (муцинозные и немучинозные опухоли,

высокой, средней или низкой степени дифференцировки), а также на молекулярных характеристиках (статус микросателитной нестабильности или микросателитной стабильности) [134]. Прогноз выживаемости напрямую зависит от степени распространенности опухолевого процесса во время первичной диагностики.

Двумя общепринятыми и более известными классификациями являются принципы стадирования по DUKES и TNM.

По глубине инвазии КРР имеет четыре стадии по С. Dukes 1932 г. Первая – стадия А, представляет собой распространение опухолевого процесса только на слизистую оболочку с проникновением в подслизистый слой. Вторая – стадия В, характеризуется прорастанием всех слоев кишечной стенки. Третья – стадия С, к ней относятся опухоли любого размера, имеющие метастазы в регионарные лимфатические узлы. И четвертая – стадия D, это опухоли, имеющие отдаленные метастазы [83].

В настоящее время широко и повсеместно используется классификация колоректального рака, предложенная «Международным противораковым союзом» (TNM). В классификации TNM также выделяют четыре стадии, и с практической точки зрения она является более удобной для стадирования колоректального рака [192]. В 2018 г. вступил в силу восьмой пересмотр данной классификации (AJCC Cancer Staging Manual 8th Edition):

T – первичная опухоль.

Tx – опухоль не может быть оценена.

T0 – нет признаков первичной опухоли.

Tins – инвазия опухоли в собственную пластинку.

T1 – опухоль врастает в подслизистый слой.

T2 – опухоль врастает в мышечный слой.

T3 – опухоль врастает в субсерозную основу или врастает в неприкрытую брюшиной ткань вокруг кишки.

T4 – опухоль врастает в другие органы(T4b) или структуры, прорастает висцеральную брюшину(T4a).

N – регионарные лимфатические узлы.

N0 – метастазы в регионарных лимфатических узлах – отсутствуют.

N1 – метастазы в лимфатических узлах первого порядка:

N1a – метастазы в одном регионарном лимфатическом узле;

N1b – в двух – трех регионарных лимфатических узлах;

N1c – опухолевые депозиты определяются в соседних непокрытых брюшиной тканях.

N2 – метастазы в лимфатические узлы первого и второго порядка:

N2a – метастазы в 4-х-6-и лимфатических узлах;

N2b – метастазы в 7-и и более лимфатических узлах.

Nx – нет данных о наличии метастазов в регионарных лимфатических узлах.

M – отдаленные метастазы.

M0 – отдаленные метастазы отсутствуют.

M1 – имеются отдаленные метастазы:

M1a – метастазы в одном органе, без метастатического поражения брюшины;

M1b – метастазы в двух и более органах;

M1c – метастазы с вовлечением или без вовлечения других органов, но с метастатическим поражением брюшины [4].

Интеграция разноплановых молекулярных данных породила две системы классификации колоректального рака.

Первая – классификация TCGA (Cancer Genome Atlas) представляет собой опухоли с очень высокой частотой мутаций, которые подразделяются на:

1a – ультрамутирующие колоректальные опухоли ($\approx 3\%$) с мутациями домена коррекции ДНК полимеразы эpsilon.

1b – гипермутирующий колоректальный рак ($\approx 13\%$) с микросателлитной нестабильностью из-за дефектной репарации несоответствия.

И опухоли с низкой частотой мутации, но высокой частотой встречаемости ДНК-SCNAs ($\approx 84\%$).

Вторая классификация CMS (Consensus Molecular Subtype). Она описывает четыре группы CMS:

CMS1 (MSI-иммунная активация, 14%).

CMS2 (каноническая, 37%).

CMS3 (метаболическая, 13%) и

CMS4 (мезенхимальная, 23%), с остаточной неклассифицированной группой (смешанных признаков, 13%) [135].

Таким образом, все больше внимания заслуживает изучение молекулярно-генетических аспектов этиологии и патогенеза КРР, на основе которых формируются новые подходы к классификации и диагностике этой опухоли. Не является исключением и исследования эпигеномного регулирования развития КРР, в том числе посредством микроРНК.

1.3 Роль микроРНК в патогенезе колоректального рака

Приблизительно 80% генома транскрибируются в некодирующие рибонуклеиновые кислоты (РНК) (non-coding RNA): малые – длиной до 200 нуклеотидов (микроРНК) и длинные – более 200 нуклеотидов [142].

МикроРНК – это группа некодирующих РНК длиной ~18-25 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию нескольких генов на посттранскрипционном уровне, тем самым играя важную роль в пролиферации, дифференцировке, апоптозе и развитии опухоли [106]. От всего генома человека семейство генов микроРНК составляет немногим более 1%, но регулирует экспрессию почти трети всех генов на посттранскрипционном уровне. При этом являясь наиболее консервативным по последовательностям и механизмам экспрессии. Эти 21-нуклеотидные РНК участвуют в большом количестве генетических регуляторных механизмов вирусов, растений, животных и человека. В настоящее время описано более 4 000 микроРНК в 168 видах организмов [104, 117].

Образование микроРНК начинается с транскрипции кодирующих генов с помощью РНК полимеразы II. Стоит отметить, что у млекопитающих более 90%

микроРНК кодируются нуклеотидными последовательностями, которые находятся в интронах (участках ДНК, являющихся частью генов, но не содержащих информации о последовательности аминокислот кодируемого им белка). Для сравнения, только 14% микроРНК червей и мух кодируются генами, локализованными в интронах [53, 114]. Интрон, состоящий из 400 пар нуклеотидов, вырезается из первичного транскрипта и становится первичной микроРНК (п-микроРНК). Далее п-микроРНК под действием РНКазы III (Drosha) совместно с другими факторами превращается в «шпильку» (последовательность длиной в 70 нуклеотидов) и называется уже пре-микроРНК.

С помощью экспортина-5 шпилькообразная пре-микроРНК попадает в цитоплазму, где под действием другой РНКазы III (Dicer), пре-микроРНК расщепляется на короткие фрагменты, которые трансформируются в зрелые микроРНК [164]. В результате образуются двуцепочечные РНК-дуплексы.

Регуляцию экспрессии генов микроРНК осуществляет путем ингибирования трансляции или разрушения специфических транскриптов матричной РНК (мРНК). Подавление экспрессии генов на посттранскрипционном уровне происходит тогда, когда микроРНК рекрутирует белковый комплекс RISC (РНК-индуцированный сайленсинговый комплекс). Одна из цепей двуцепочечного дуплекса микроРНК (ведущая цепь) внедряется в белковый комплекс RISC. RISC – это комплекс белков, которые способствуют связи микроРНК с 3'-нетранслируемым концом соответствующей мРНК-мишени [117]. МикроРНК приводят к разрушению мРНК или подавлению трансляции с таргетной мРНК. При этом они способны подавлять трансляцию посредством различных механизмов: как на этапе инициации, так и в процессе элонгации. Механизм прекращения трансляции также зависит от степени комплементарности связывающихся областей микроРНК и мРНК. Деградация мРНК включает такие процессы, как деаденилирование, декапирование и экзонуклеарное расщепление молекулы мРНК [199]. Но до конца механизм действия микроРНК еще не изучен.

В «здоровых» клетках микроРНК являются одним из основных регуляторов экспрессии генов, который принимает участие практически во всех процессах

ее жизнедеятельности: поведении, размножении и развитии. Злокачественные опухоли характеризуются неконтролируемым делением клеток, фенотип которых определяется нарушением экспрессии различных генов. Поэтому неудивительно, что образование микроРНК часто нарушено в клетках различных опухолей [35].

В настоящее время подтверждено, что по крайней мере 400 микроРНК в геноме человека тесно связаны с опухолями [150]. Основопологающим можно считать исследование, проведенное группой Croce, которое показало, что частая делеция участка хромосомы 13q14 в клетках хронического лимфолейкоза приводит к нарушению работы двух микроРНК: микроРНК-15а, микроРНК-16-1 [93]. Эти микроРНК представляют собой первые микроРНК онкосупрессоры, которые были открыты при исследовании функций микроРНК в канцерогенезе. В дальнейшем исследования показали, что нарушение экспрессии микроРНК в опухолевых клетках является распространенным явлением по сравнению с клетками нормальных тканей [53].

Ассоциативная связь микроРНК и колоректального рака впервые была выявлена Michael et al. в 2003 году [162].

На сегодняшний день известно более двадцати исследований, изучающих экспрессию микроРНК при колоректальном раке [131]. В этих исследованиях использовались различные методы, начиная от глобального профилирования экспрессии малой ядерной РНК с помощью глубокого секвенирования [182] или микрочипов микроРНК [129], до изучения экспрессии выбранных микроРНК с помощью количественной обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Все эти исследования показали, что aberrантная экспрессия микроРНК играет определенную роль в инициации и развитии КРР.

Первоначально сообщалось о том, что уровни экспрессии микроРНК глобально снижены при раке, но в процессе изучения были выявлены 11 микроРНК, имеющих повышенную экспрессию при колоректальном раке по сравнению с теми, у кого уровень экспрессии был снижен. Недавний обзор показал, что из 164 микроРНК специфичных для опухоли толстой кишки, в 2/3 случаев экспрессия микроРНК была повышена, а в 1/3 снижена [131]. Исходя

из этого, можно утверждать, что микроРНК обладают более онкогенными свойствами, чем опухоль-супрессивными при КРР [169].

Онкогенные микроРНК, также обычно называемые онкомирами, в основном нацелены на экспрессию эндогенных генов-супрессоров опухолей, которые ускоряют канцерогенез. Повышенная регуляция онкомиров оказывает значительное влияние на прогрессирование КРР (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – МикроРНК, стимулирующие опухолевую прогрессию при КРР

МикроРНК	Прямые/ косвенные цели	Функции
микроРНК-21	PDCD4, TIAM1, SPRY2, PTEN, TGFB2, CDC25A, hMSH2	пролиферация, апоптоз, инвазия, миграция, поддержание КСК, интравазация, клеточный цикл, химиорезистентность,
микроРНК-92a	PTEN, SMAD2, SMAD4, TGFB2	ЭМТ, инвазия, венозная инвазия, метастазы, пролиферация
микроРНК -96	TP53INP1, FOXO1, FOXO3A, UBE2N, XIAP, REV1, RAD51	клеточный рост, пролиферация, лекарственная сенсбилизация, апоптоз
микроРНК -135a/b	APC, hMLH1, hMSH2	Пролиферация, эффекты дозирования генов
микроРНК -155	RTPRJ, TP53INP1, MSH2, MSH6, MLH1, FOXO3a, HuR	Пролиферация, инвазия, стволовость, ангиогенез, лекарственная устойчивость, нестабильность генома, ЕТМ
микроРНК -224	SMAD4, p21, PHLPP1, PHLPP2, GSK-3 β	Метастазирование, пролиферация, опухолевидность, химиочувствительность
микроРНК -214	PTEN, PDLIM2	Воспаление

Продолжение таблицы 1.1

МикроРНК	Прямые/ косвенные цели	Функции
микроРНК -31	RASA1	Пролиферация
микроРНК -210	RBM3	Пролиферация, митохондриальное дыхание, репарация ДНК, сосудистая биология, ангиогенез
микроРНК -182/503	FBXW7	Злокачественная трансформация
микроРНК -200с	ZEB1, ETS1, FLT1, EMT markers (E-cadherin, vimentin), PTEN	Метастазирование, пролиферация, инвазия, миграция
микроРНК -301a	TGFBR2	Метастазирование в лимфатические узлы, миграция, инвазия

Супрессивные опухоль микроРНК играют важную роль в замедлении прогрессирования опухоли через подавление регуляции онкогенов, связанных с пролиферацией, апоптозом, инвазией и миграцией (таблица 1.2).

Таблица 1.2 – МикроРНК, подавляющие опухолевую прогрессию при КРР

МикроРНК	Прямые/ косвенные цели	Функции
Let-7	КРАС	Распространение
микроРНК-194	MAP4K4, АКТ2	Пролиферация, апоптоз, инвазия, миграция, клеточный цикл
микроРНК-43/145	IGF1R, CD44, KLF5, KRAS, BRAF	Пролиферация, инвазия, миграция, апоптоз, ангиогенез, химиорезистентность,

Продолжение таблицы 1.2

МикроРНК	Прямые/ косвенные цели	Функции
микроРНК-34а	E2F1, SIRT1, FMNL2, E2F5, SNHG7	Пролиферация, инвазивность, метастазирование, апоптоз, химиорезистентность
микроРНК-126	PI3K, VCAM-1, CXCR4, VEGFA, IRS1, RhoA	Пролиферация, инвазия, миграция, клеточный цикл, ангиогенез, кровообразование
микроРНК-27б	VEGF, Rab3D	Пролиферация, колониеобразование, ангиогенез, ЭМТ
микроРНК-7	EGFR, RAF-1	Распространение
микроРНК-18а-3п	КРАС	Пролиферация, анкоридж- независимый рост
микроРНК-26б	TAF12, PTP4A1, CHFR, ALS2CR2, FUT4	Пролиферация, апоптоз, инвазивность, метастазирование, миграция, химиорезистентность
микроРНК-101	COX-2, ZEB1	Распространение, миграция
микроРНК-144	mTOR	Распространение
микроРНК-320а	β -катенин	Распространение
микроРНК-330	CDC42	Распространение
микроРНК-455	RAF1	Распространение, вторжение
микроРНК-149	FOXМ1	Распространение, миграция, вторжение

Многие микроРНК проявляли свои функции онкогена через множество мишеней. Таким образом, они могут служить потенциальным диагностическим маркером и терапевтической мишенью для пациентов с КРР. А микроРНК,

подавляющие опухолевую прогрессию, позволяют предположить применение их в прогнозировании и лечении рака [183].

1.4 Подходы к диагностике колоректального рака

Пациенты, страдающие КРР, в среднем живут меньше на 13 лет, чем «условно» здоровые лица. В большинстве случаев (66,3%) больные с КРР поступают в стационары города в экстренном порядке ввиду наличия осложнений, которые, зачастую, становятся первыми проявлениями болезни и, как правило, характеризуют позднюю стадию заболевания [21]. Учитывая данные факты, скрининговые тесты на КРР могут улучшить прогноз заболевания, выявив его на ранней стадии.

Ранняя диагностика (скрининг) – это массовое обследование населения, предназначенное для выявления лиц с определенной патологией, без имеющихся клинических симптомов [6]. Целью скрининга считается снижение смертности населения, а результатом – обнаружение заболевания до момента его клинических проявлений [10]. Учитывая тот факт, что основным прогностическим фактором при КРР является стадия заболевания на момент установки диагноза, раннее выявление имеет большое значение [180].

В настоящее время известные неинвазивные скрининговые тесты (Guaiac Fecal occult-blood test (g-FOBT) и Fecal immunochemical test (FIT)) обладают низкой чувствительностью и специфичностью, имея большой процент ложноположительных и ложноотрицательных результатов [163, 194]. А такие информативные исследования, как фиброколоноскопия (ФКС), ректороманоскопия (RRS) и ирригоскопия (IRS) в качестве скринингового теста не всегда применимы, в виду возможности осложнений, дороговизны и необходимости специальной подготовки.

С 2000 г. Консультативным комитетом по профилактике рака среди государств – членов Европейского Союза рекомендовано проведение скрининга

на КРР у лиц старше 50 лет, не имеющих никаких симптомов заболевания [160]. Несмотря на то, что в мире возрастает количество скрининговых программ, в виду развития новых технологий в области применения молекулярных маркеров, основными остаются всего три: Тест кала на скрытую кровь (FOBТ), колоноскопия, ректороманоскопия. В Японии FOBТ проводится один раз в год, в США рекомендовано ежегодное проведение FOBТ. Ректороманоскопию, ирригоскопию или КТ-колоноскопию раз в пять лет, а колоноскопию раз в десять лет. В свою очередь Европейская программа предлагает проведение FOBТ один раз в два года, а колоноскопию или ректороманоскопию в качестве подтверждающего исследования при положительном анализе FOBТ [172, 181].

Ранняя диагностика КРР, а также своевременная дифференциальная диагностика с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) в России до сих пор остается не решенной. Это связано как с отсутствием должного финансирования, так и с недостаточной разработкой критериев, позволяющих определить группу лиц, подлежащую клинико-инструментальному обследованию [10].

Все методы скрининга КРР можно разделить на две группы:

- исследования, направленные на визуализацию толстой кишки;
- исследование биологических образцов.

1.4.1 Тесты на скрытую кровь в стуле

Биохимические и иммуногистохимические тесты, которые основываются на выявлении скрытой крови в фекалиях пациентов, получили большую распространенность при скрининге КРР благодаря своей неинвазивности [187].

Тест на скрытую кровь в фекалиях (Hemocult test Greigor-Weber, Guaiac fecal occult-blood test (GFOBТ)) основан на выявлении в фекалиях гема, обладающего пероксидазноподобной активностью, используя свойства гваяковой смолы. Анализ

образцов кала исследуют в течение трех дней при соблюдении диетических ограничений. Из пищевого рациона исключаются: красное мясо из-за наличия гема, некоторые свежие фрукты и овощи с учетом активности пероксидазы, а также препараты железа и аскорбиновая кислота. Чувствительность метода варьирует от 53% до 82% [57, 103]. Ложноположительные результаты могут возникать у пациентов при кровотечениях, не связанных с онкопатологией. А так как не все колоректальные опухоли склонны к кровотечениям, ложноотрицательные результаты также имеют место [73, 195].

Также данный метод малоинформативен при выявлении КРР на ранней стадии [202]. Учитывая наличие ограничений и низкую чувствительность метода, длительные поиски привели к разработке качественных и количественных тестов, основанных на иммуноферментном анализе. Fecal immunochemical test (FIT) в отличие от FOBТ не реагирует на присутствие нечеловеческой пероксидазы и поэтому не требует соблюдения диеты. Чувствительность данного метода для выявления КРР, по многочисленным исследованиям, составляет от 47% до 69%, а специфичность от 88% до 97% [121, 195]. Широкое применение FOBТ и FIT в европейских странах для раннего выявления КРР обусловлено своей неинвазивной природой и низкой себестоимостью. В свою очередь, ложноположительные результаты нуждаются в дополнительном дообследовании, что может привести к нежелательным осложнениям. А ложноотрицательные результаты способствуют мнимому успокоению [144].

1.4.2 Инструментальные визуализирующие методы

Фиброколоноскопия (ФКС) – золотой стандарт в скрининге КРР. Это исследование направлено на выявление, проведение биопсии и удаление образований толстой кишки. Несмотря на свою высокую чувствительность и специфичность: 95-99% [144], ФКС не может широко использоваться в качестве

профилактического метода из-за своего инвазивного характера, риска осложнений и высокой себестоимости для массовых обследований [42, 69, 170].

Другим, сопоставимым с ФКС, методом диагностики является ректороманоскопия (RRS). Это исследование не требует тщательной подготовки кишечника и применения седативной поддержки при ее проведении. Однако RRS имеет один недостаток: этот метод позволяет осмотреть лишь дистальный отдел толстой кишки. По данным рандомизированных исследований RRS позволила снизить заболеваемость КРР в США до 33%, а смертность до 43%. А в Великобритании и Италии заболеваемость снизилась до 21%, а смертность до 26%. В Норвегии же снизить заболеваемость и смертность путем проведения RRS не удалось. Они так и остались на уровне 78% и 83% [61, 143].

В настоящее время существует несколько вариантов визуализации толстой кишки, которые позволяют обнаружить ее скрытые повреждения, плоские поражения, обнаружение которых при обычной ФКС затруднено. К ним относят электронную хромоэндоскопию, виртуальную колоноскопию и магнитно-резонансной томографии (МРТ) толстой кишки.

На сегодняшний день, наиболее точным методом выявления плоских форм опухолей и полипов является электронная хромоэндоскопия (I-Scan). Данный метод, суть которого заключается в подчеркивании структуры тканей, помогая обнаружить даже плоские очаги поражения и малозаметные аномалии естественных цветовых оттенков, отображает мельчайшие структуры слизистой, помогая охарактеризовать рельеф поверхности и границы очагов поражения. Показывая цветовые оттенки поверхностных структур кровеносных сосудов, протоков желез и слизистых оболочек, которые изменяются при патологии, он значительно повышает возможности обычного эндоскопического исследования в выявлении скрытых патологических морфофункциональных изменений слизистой толстой кишки [115].

Широкое распространение приобретает неинвазивный метод осмотра толстой кишки – компьютерная колоноскопия. Чувствительность метода при полипах более 1 см составляет 90%, при полипах 0,5-0,9 см – 80%, а при полипах

менее 0,5 см – 67%. Однако есть следующие недостатки: ограничение применения у пациентов с избыточной массой тела, а также то, что доза лучевой нагрузки при однократном проведении равна уровню лучевой нагрузки, полученной человеком за 20 месяцев обычной жизни [30, 177].

Еще одним методом, позволяющим визуализировать всю толстую кишку, является ирригоскопия с двойным контрастированием. Чувствительность, даже при наличии больших полипов и опухолей, составляет порядка 48% и требует проведения ФКС при выявлении какой-либо патологии. Несмотря на имеющиеся недостатки, это исследование широко распространено при отсутствии возможности проведения более точных исследований [33].

Так же, в настоящее время существуют и другие эндоскопические методы визуализации толстой кишки: широкоугольная колоноскопия, эндоскопические капсулы, системы флюоресцентной визуализации и так далее. Несмотря на их перспективность в диагностики КРР, на их изучение и распространение в широкой практике потребуется еще несколько лет [141, 154].

1.4.3 Молекулярно-генетические маркеры колоректального рака

В настоящее время большое внимание исследователи уделяют изучению молекулярно-генетических маркеров КРР. Чаще всего для диагностики КРР используют раковоэмбриональный антиген (РЭА), СА-19.9 и СА-125.

Впервые РЭА обнаружили в 1965 году P.Gold и S.Fridmand при исследовании тканей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека и аденокарциномы толстой кишки. Затем РЭА был выявлен в сыворотке крови больных КРР [99]. Первые результаты исследований показывали, что найден специфический тест для диагностики КРР. Однако далее при совершенствовании методов обнаружения РЭА и накоплении данных этот маркер был выделен при таких опухолях как рак поджелудочной железы, печени, легкого, щитовидной

железы, нейробластомы. Также со временем удалось выявить этот маркер и при неопухолевых заболеваниях (цирроз печени, язвенный колит, панкреатит, хронический бронхит, эмфизема). Специфичность РЭА для пациентов с КРР варьирует от 30% до 80%, тогда как чувствительность составляет около 40% [92]. Несмотря на то, что при выявлении РЭА у человека нельзя достоверно утверждать о наличии у больного КРР, этот маркер до сих пор остается маркером первого выбора и используется с высокой эффективностью в мониторинге заболевания. А главное внимание уделяется его количественным параметрам [24, 44].

Учитывая низкую специфичность РЭА при обследовании больных с подозрением на КРР, в качестве маркера второго выбора начали использовать СА-19.9. СА-19.9 – это гликопротеин, продуцирующийся в норме клетками ЖКТ. Его повышение у больных с КРР является плохим прогностическим признаком, а использование комплекса СА-19.9 и РЭА значительно повышает диагностическую чувствительность [178].

В 2000 г. G.Mavligit et al. обнаружили высокие уровни СА-125 у пациентов с метастатическим КРР при нормальных показателях РЭА. Учитывая данные исследования, авторы полагают, что определение СА-125 у пациентов с КРР может быть полезно в оценке распространенности опухолевого процесса [127]. Исходя из вышеизложенных данных, «идеального» опухолевого маркера с высокой чувствительностью и специфичностью в настоящее время не существует [127]. Несмотря на высокую специфичность (до 97%), белковые онкомаркеры, детектируемые в плазме/сыворотке крови при иммуноферментном анализе, не обладают достаточной чувствительностью (не более 60%) [23].

В последнее время для ранней диагностики КРР широко изучается применение ДНК маркеров в различных биологических образцах [155, 190]. Одним из таких исследований является тест на определение генетических отклонений (мутаций) в фекальной ДНК. В виду повышенного отделения опухолевых клеток, по сравнению с нормальным эпителием в момент прохождения каловых масс, количество ДНК в кале у пациентов с опухолью

кишки выше, чем у условно-здоровых пациентов [156]. Стабильную форму ДНК из колоректальных эпителиальных клеток извлекают и исследуют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный метод диагностики является современным и удобным для пациентов. С его помощью можно выявить мутации в нескольких генах, включая K-RAS, APC, TP53 и микросателлите BAT-26 [133, 139].

Исследования, направленные на определение мутации в различных генах, показали, что чувствительность метода для одного маркера составляет 50-75%, а специфичность – 95-100%.

Использование нескольких маркеров способствует увеличению чувствительности и специфичности теста, но тем самым увеличивает его стоимость и время выполнения.

В настоящее время единственным коммерчески и клинически доступным тестом по анализу фекальной ДНК является «ColoSure» (Laboratory Corporation of America). Это тест одного маркера, определяющего метилирование гена VIM с чувствительностью 72-77% и специфичностью 83-94% [138].

1.5 Подходы к скринингу колоректального рака в мировой медицинской практике

В большинстве стран скрининг на КРР проводят в возрасте 50-75 лет. В настоящее время к общепринятым методам скрининга относят ФКС и исследование кала на скрытую кровь в стуле [22].

В 2003 г. Советом Европы на основе убедительных доказательств эффективности выявления КРР на доклинической стадии рекомендовано разработать программы скрининга КРР с ежегодными или двухгодичными обследованиями на основе gFOBТ. При положительном результате неинвазивного теста рекомендовано проведение ФКС [71].

С 2015 г. в 24 странах Европы были внедрены общенациональные программы скрининга КРР. К странам, завершившим внедрение организационного скрининга, относятся Финляндия, Франция, Словения и Великобритания, тогда как в Бельгии, Нидерландах, Дании, Ирландии, Италии, Мальте, Польше и Испании программы скрининга еще продолжают разворачиваться, а в Норвегии, Португалии и Швеции программы по внедрению скрининга КРР находятся на стадии пилотных проектов. Словакия (в которой заболеваемостью КРР в Европе самая высокая), Болгария, Албания, Босния и Герцеговина, Косово, Македония, Черногория, Румыния, Сербия национальных программ скрининга КРР не имеют [62].

В Российской Федерации скрининг на КРР в национальном масштабе не проводится. По Приказу Министерства Здравоохранения Российской Федерации от 21 апреля 2021 г. № 404н «Об утверждении порядка проведения профилактического медицинского осмотра и диспансеризации определенных групп взрослого населения» для диагностики КРР в объем обследований, входящих в 1-й этап диспансеризации, входит исследование кала на скрытую кровь в стуле иммунохимическим методом (к иммунохимическим методам исследования относятся все качественные и количественные методы исследования, в которых используется иммунохимическая реакция антиген-антитело) 1 раз в 2 года у граждан в возрасте от 40 до 62 лет. Начиная с 65 лет и до 75 лет, исследование выполняют каждый год. На втором этапе диспансеризации по назначению врача должна проводиться колоноскопия и ректороманоскопия. Недостаточная информированность населения РФ в отношении КРР и методов его ранней диагностики определенно обуславливает высокую распространенность данного онкологического заболевания в нашей стране [25].

Во многих странах Европы, США и Японии государственная программа скрининга подразумевает активное привлечение населения, в том числе с помощью телефонной связи, для прохождения медицинского обследования в определенные возрастные периоды, а также работу над информированностью жителей страны в отношении КРР.

Успешным можно назвать подход к раннему выявлению КРР, осуществленный в США. Рабочая группа профилактических программ США (USPSTF) рекомендует проводить ежегодные скрининговые исследования gFOBТ лицам со средним риском КРР в возрасте от 50 до 75 лет либо периодические обследования с применением эзофагогастродуоденоскопии или колоноскопии [171].

Ввиду внедрения в США программы по скринингу КРР отмечалось снижение смертности населения на 53% с 1975 г. по 2000 г. и с 2005 г. по 2014 г. в среднем на 2,5% в год [59].

Скрининг на КРР в США в основном является оппортунистическим в связи с отсутствием как общенациональной системы медицинского страхования (за исключением государственных Medicare и Medicaid), так и государственной системы медицинского обслуживания. Однако в различных регионах США развернут организованный скрининг. Двумя основными примерами таких программ являются Kaiser Permanente в Северной Калифорнии и Veterans Health Administration [111, 146].

В мае 2018 года Американское онкологическое общество (ACS) инициировало квалифицированную рекомендацию для взрослых со средним риском начать скрининг в 45 лет [84]. А проведение скрининга в возрасте от 76 до 85 лет должно быть индивидуальным на основе общего состояния здоровья, предыдущего скрининга, готовности пройти лечение по поводу КРР, если оно будет обнаружено, и сопутствующих заболеваний [122].

В Англии национальная программа скрининга КРР для населения в возрасте от 60 до 69 лет началась с 2006 г. Тестирование на основе gFOBТ проводилось с интервалом в 2 года. В 2010 г. был завершен первый этап тестирования. Из 2 млн. приглашенных в программу охват составил 52%. Из всех обследуемых положительный результат теста был получен у 2% участников. Из них 83% прошли колоноскопию, по итогам которой у 10,1% был выявлен КРР [149].

Чуть позже, в 2008 г., подобная национальная программа скрининга КРР на основе gFOBТ была эффективно реализована во Франции. Она проводилась для

населения в возрасте от 50 до 74 лет. Охват населения был 34,3%. Положительные результаты получили у 2,8% участников скрининга, из которых 88% прошли колоноскопию, КРР был диагностирован у 7,5% [64].

В Италии скрининг КРР был организован в Ломбардии, где отмечалась самая высокая в стране заболеваемость КРР. Программа скрининга началась в 2005 г. и проводилась для населения в возрасте от 50 до 69 лет. Скрининг включал в себя применение иммунохимического исследования кала на скрытую кровь (FIT) с пороговым уровнем 20 пг/г. Второй этап программы завершился в 2009 г. Частота выявления КРР на первом и втором этапах составила 2,5 и 1,6 на 1 000 участников соответственно [148].

В Испании во всех ее областях программы скрининга КРР были реализованы для населения в возрасте от 50 до 69 лет. В этих программах в основном использовался FIT. В 2014 г. в среднем охват населения составил 49,2%. Положительный результат теста был у 6,56%. Частота выявления КРР составляла 2,75 на 1 000 человек, участвовавших в скрининге [161].

В Нидерландах национальная программа скрининга КРР на основе FIT начала разворачиваться в 2014 г. Охват населения достиг 68,2% целевой популяции. Пороговый уровень 15 пг/г, установленный изначально, пришлось увеличить до 47 пг/г, поскольку количество людей с положительным результатом оказалось выше, чем ожидалось (12%), что привело к большому количеству ложноположительных результатов и невозможности обеспечить всех колоноскопией. При первоначальном пороговом уровне положительный результат FIT был получен у 10,1% женщин и у 14,5% мужчин. Колоноскопию выполнили у 74,3% от числа этих пациентов. Среди них КРР был обнаружен у 6,7%. Частота выявления КРР составила 5,9 на 1 000 человек, принявших участие в скрининге [105].

В Литве национальная программа скрининга КРР на основе FIT началась в 2009 г. для населения в возрасте от 50 до 74 лет. За 3 года охват целевой популяции составил 46%. Положительные результаты FIT выявлены у 7,2%

участников скрининга, из них 66,1% прошли колоноскопию, и у 3,1% прошедших колоноскопию пациентов с положительным FIT выявлен КРР [62].

В Словении скрининг КРР начали проводить с 2009 г. С 2014 г. программа скрининга начала включать FIT с интервалом в 2 года для населения в возрасте от 50 до 69 лет. Охват целевой популяции составил 57,8%. Положительный результат FIT был получен у 6% участников скрининга. Проводимая колоноскопия у обследуемых с положительным FIT выявила КРР в 2,12% случаев [62].

В Канаде в основном внедрены организованные программы скрининга КРР. В качестве скринингового теста большинство провинций используют FIT у населения в возрасте от 50 до 74 лет со средним риском КРР [65]. В 2013 г. охват целевой популяции скринингом КРР всеми методами обследования составил 58% [66].

Также в большинстве провинций Канады, наряду с организованным скринингом, доступен и оппортунистический скрининг с применением колоноскопии.

В странах Латинской Америки в основном программы популяционного скрининга КРР, но и они находятся в стадии пилотных проектов и охватывают только городские районы [62].

Программа организованного скрининга КРР для лиц в возрасте от 50 до 74 лет в Израиле реализуется четырьмя поставщиками медицинских услуг, а правительство осуществляет надзор над их деятельностью и качеством услуг. По направлению врачей общей практики застрахованные лица проходят ежегодный скрининг на основе FIT [62].

На Ближнем Востоке, в странах, которые приняли западный образ жизни, существуют некоторые оппортунистические программы. В Объединенных Арабских Эмиратах, несмотря на призывы врачей к общенациональному скринингу, только в Абу-Даби проводится скрининг КРР, где органом здравоохранения рекомендуется проводить колоноскопию для людей старше 40 лет [48].

По результатам пилотного исследования оппортунистического скрининга КРР на основе FIT в Катаре, только у 56% с положительным FIT была выполнена колоноскопия [112].

В странах Азиатско-Тихоокеанского региона заболеваемость КРР варьирует.

В Индии показатели заболеваемости и смертности от КРР (6 на 100 тыс. населения) остаются низкими по сравнению с их ростом в Восточной Азии (Южная Корея – 45 на 100 тыс. населения, Сингапур – 34 на 100 тыс. населения и Япония – 32 на 100 тыс. населения) [188].

Рабочая группа по борьбе с онкологическими заболеваниями толстой кишки Азиатско-Тихоокеанского региона разработала рекомендации по скринингу КРР, которые включают [41] использование количественного FIT в качестве предпочтительного метода у лиц от 50 до 75 лет со средним риском. Лица с положительным результатом теста направляются на колоноскопию. Основным препятствием для проведения скрининга КРР в Азиатско-Тихоокеанском регионе является плохое знание критериев скрининга и диагностики КРР, а также отсутствие финансовой поддержки и медицинского страхования [45, 116, 140].

В Китае лицам в возрасте от 40 до 74 лет проводят скрининг на основе gFOBТ и при положительных результатах направляют на пальцевое ректальное исследование и колоноскопию. Но отслеживание клинических исходов при проведении этой программы для всего населения охватывает лишь 13% целевой популяции [51].

В Японии для лиц, застрахованных в системе национального медицинского страхования, программа скрининга КРР действует с 1992 г. и предназначена для людей в возрасте от 40 до 69 лет с использованием FIT. В 2013 г. охват целевого контингента составлял 41,4% среди мужчин и 34,5% среди женщин [49].

В Южной Корее общенациональный скрининг населения старше 50 лет на КРР был введен в 2004 г. Программа скрининга основана на ежегодном выполнении FIT, а пациентам с положительным результатом предлагают пройти колоноскопию или ирригоскопию с двойным контрастированием [34, 39].

Пилотный проект скрининга КРР в Новой Зеландии стартовал в конце 2011 г. Его целью было определение целесообразности развертывания программы скрининга КРР на общенациональном уровне. Результаты проекта, опубликованные в начале 2017 г., подтвердили не только его целесообразность, но и экономическую эффективность исследования [145].

В Австралии пилотный проект стартовал в 2002 г., а в 2006 г. в рамках Национальной программы скрининга на КРР обследования с применением FIT проводились для лиц от 55 до 65 лет с интервалом 1 раз в 2 года. В интервале с 2014 г. по 2015 г. из 2,6 млн. человек, приглашенных на скрининг КРР, 39% приняли участие в программе скрининга. У 8% участников скрининг-тест оказался положительным. Из них 70% в последующем прошли колоноскопию [77].

Краткие рекомендации по скринингу КРР в мире за последние 10 лет представлены в таблице 1.3 [26].

Проанализировав стоимость скрининговых программ и их эффективность при КРР, можно сделать вывод, что при относительно небольших для общества затратах эти проекты достигают больших успехов. По данным G.S. Gazelle, год продления жизни больным с КРР благодаря программам по выявлению скрытой крови в кале, по различным источникам, составляет от 2 000 до 15 000 долларов. А при скрининговой программе, основанной на проведении ФКС 1 раз в 10 лет, стоимость составляет от 9 000 до 22 000 долларов за один год продления жизни пациента [94].

В Европе один год продления жизни пациентов с КРР приблизительно обходится в 5 000 долларов [58]. В Дании стоимость продления года жизни больным КРР благодаря программе исследования скрытой крови в кале составляет от 2 100 до 5 300 долларов [102]. В Австралии, где в скрининговой программе по КРР участвовали 24 000 пациентов, примерная стоимость составила 740 000 долларов в год [100]. В Японии при проведении программы скрининга на КРР иммунохимическим методом (FIT) стоимость 1 теста составила 10,91 доллар, а дальнейшее обследование при положительном результате обходилось в 136,36 долларов [137].

Таблица 1.3 – Рекомендации по скринингу КРР в странах мира

Параметр	Страна						
	Российская Федерация	Европа	Германия	Канада	США	Юго-Восточная Азия	Китай
Год публикации	2021	2013	2014	2016	2018	2015	2014
Общество принявшее рекомендации	МЗ РФ	ESMO (European Society for Medical Oncology)	GGPO (German Guideline Program in Oncology)	CTFPHC (Canadian Task Force on Preventive Health Care)	ACSCRC (National Comprehensive Cancer Network)	Asia Pacific Consensus Recommendation	Chinese Society of Gastroenterology
Возраст пациентов	40-75	50-74	≥50	50-74	45-75	50-75	50-74
gFOBT	1 раз в 2 года	1 раз в 2 года	1 раз в год	1 раз в 2 года	1 раз в год	Не рекомендован	1 раз в 3 года
FIT	1 раз в 2 года	1 раз в 2 года	Не рекомендован	1 раз в 2 года	1 раз в год	Рекомендован. Интервал не указан	1 раз в 3 года

Продолжение таблицы 1.3

Параметр	Страна						
	Российская Федерация	Европа	Германия	Канада	США	Юго-Восточная Азия	Китай
Колоноскопия	по направлению хирурга как второй этап диспансеризации	1 раз в 10-20 лет	Предпочтительно	1 раз в 10 лет	1 раз в 10 лет	Рекомендован. Интервал не указан	Рекомендован при + тесте на скрытую кровь
Сигмоскопия		1 раз в 10-20 лет	1 раз в 5 лет	1 раз в 10 лет	1 раз в 5 лет	Рекомендован. Интервал не указан	Рекомендован при + тесте на скрытую кровь и при отказе от колоноскопии
ДНК тест в стуле	—	Не рекомендован	—	—	Не рекомендован	—	—

Продолжение таблицы 1.3

Параметр	Страна						
	Российская Федерация	Европа	Германия	Канада	США	Юго-Восточная Азия	Китай
КТ-колонография	Не рекомендован	Не рекомендован	Не рекомендован	–	1 раз в 5 лет	–	–
Капсульная колоноскопия	–	–	Не рекомендован	–	–	–	–

Следует отметить, что любой метод имеющегося на данный момент неинвазивного скрининга КРР связан со значительным числом ложноположительных результатов, которые приводят к необходимости выполнения колоноскопии.

Неоспоримым остается тот факт, что скрининг населения для выявления КРР экономически обоснован и необходим. В настоящее время поиск наиболее эффективного и экономически выгодного способа проведения скрининга КРР остается актуальной задачей, в том числе и для РФ. Постоянно разрабатываются и апробируются как новые виды тестов, так и алгоритмы проведения скрининга, что и явилось одной из задач настоящего научного исследования.

1.6 МикроРНК как один из методов ранней диагностики колоректального рака

Одной из приоритетных задач современной онкологии является поиск биомаркеров, позволяющих проводить минимально инвазивную раннюю диагностику злокачественных новообразований, а также прогнозировать течение заболевания и эффективность проводимой терапии.

Ранее считалось, что микроРНК содержится только внутри клетки. Но в 1993 г. R.C.Lee et al. показали, что значительная доля микроРНК присутствует вне клеток – так называемая циркулирующая микроРНК [118]. Эти циркулирующие микроРНК были выявлены в различных биологических жидкостях (кровь, моча, слюна, амниотическая жидкость, грудное молоко) [55, 128, 189]. Они устойчивы к эндогенным рибонуклеазам и неблагоприятным физическим условиям, а также высокостабильны в сыворотке и плазме. Это позволяет эффективно выделить циркулирующие микроРНК из биологических жидкостей, измерить их количество с высокой чувствительностью и специфичностью при помощи ПЦР диагностики в реальном времени, ДНК-микрочипов и метода РНК секвестрирования. Первые

работы, указывающие на потенциальную возможность использования молекул микроРНК в качестве биомаркеров, появились в 2006 году [126]. А в 2008 году появились работы, указывающие на перспективность использования циркулирующих микроРНК в качестве потенциальных биомаркеров онкологических заболеваний [54, 76, 95].

В процессах канцерогенеза описано как усиление, так и подавление экспрессии микроРНК при КРР [200]. J. Wang et al. провели тестирование десяти микроРНК, экспрессия которых изменяется у пациентов с КРР. Сравнительный анализ 30 пациентов с КРР и 30 условно-здоровых пациентов позволил выделить шесть микро РНК с повышенной экспрессией (микроРНК-21 и let-7g) и пониженной экспрессией (микроРНК-31, микроРНК-92a, микроРНК-181b, микроРНК-203) при КРР. Составленная панель микроРНК позволяет выявлять КРР с чувствительностью 93% и специфичностью 91% [110]. В 2015 S. Wang et al. предложил панель из трех микроРНК (микроРНК-409-3p, микроРНК-7 и микроРНК-93), позволяющую дифференцировать пациентов с КРР и условно здоровых индивидуумов с чувствительностью 82% и специфичностью 89% [110]. С. You et al. исследовали влияние микроРНК-21 и микроРНК-138 на пролиферацию раковых клеток толстой кишки и их связь с прогнозом заболевания. Результаты этого исследования показали, что уровень экспрессии микроРНК-21 в тканях опухоли толстой кишки был значительно выше, чем в соседних здоровых тканях, а уровень экспрессии микроРНК-138 был ниже в тканях опухоли толстой кишки, чем в соседних здоровых тканях. Также было доказано, что микроРНК-21 может способствовать пролиферации клеток, тогда как микроРНК-138, наоборот, ее ингибировало [89]. Высокая экспрессия микроРНК-21 связана с такими признаками опухоли, как высокий потенциал инвазии, способность к интравазации и метастазированию [200]. В других же исследованиях авторы показали, что уровень экспрессии микроРНК повышается с увеличением стадии заболевания, тем самым уменьшая продолжительность жизни больных КРР [132].

На сегодняшний день выявленные панели микроРНК для разных типов опухолей благодаря экспериментальным данным обладают высокой диагностической чувствительностью и специфичностью. Если брать во внимание, что микроРНК стабильны в биологических жидкостях и устойчивы в условиях, связанных с проведением молекулярно-биологических тестов, а их количественная представленность может быть измерена с высокой чувствительностью при помощи недорогих методов, основанных на ПЦР-диагностике, то разработка диагностических панелей биомаркеров злокачественных новообразований на их основе является перспективной задачей. Впоследствии после успешного проведения клинических испытаний микроРНК могут быть внедрены в медицинскую практику в качестве востребованных неинвазивных и минимально инвазивных клинических тестов. В отношении КРР таковым маркером может стать микроРНК-21, определяемая в слюне и крови. Изучению роли микроРНК-21 в диагностике КРР посвящено настоящее исследование.

Глава 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее проспективное научное исследование было выполнено на базе НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России. Материалом для исследования послужили группы пациентов с колоректальным раком, немелкоклеточным раком легкого, глиальными церебральными опухолями и здоровые добровольцы, проходившие обследование и лечение в отделениях НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России в период с 2016 по 2022 год. Работа была одобрена на заседании локального этического комитета (выписка из протокола № 185 заседания Этического комитета ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России от 30.06.2016 г.) и выполнена в соответствии с темой государственного задания ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России «Значение феномена коэкспрессии генов микроРНК и факторов транскрипции сигнальных путей NFκB и KLF в реализации патологических процессов» (2021-2023гг. 121060800166-9).

2.1 Дизайн исследования

Исследование включало в себя следующие этапы:

1 этап: При помощи метода обратной транскрипции (ОТ) с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени определить уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне (С-21) и плазме (П-21) крови, а также произвести сравнительный анализ полученных результатов у пациентов с колоректальным раком (основная группа (ОГ)), немелкоклеточным раком легкого

(РЛ (ГС-1)), глиальными церебральными опухолями (ГЦО (ГС-2)) и здоровых добровольцев (КГ).

2 этап: Статистический анализ полученных результатов ОТ-ПЦР диагностики у пациентов с колоректальным раком (ОГ) с последующим выявлением связей между повышением уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме и другими клинико-патологическими характеристиками больных, а также определение наиболее значимых предикторов наличия колоректального рака.

3 этап: Разработка диагностического алгоритма прогнозирования колоректального рака, основанного на комбинации влияющих факторов с последующим построением диаграммы дерева решений и ранжированием классов по уровню риска.

4 этап: Сравнительный анализ предложенного диагностического алгоритма с используемым в настоящее время методом неинвазивной диагностики колоректального рака иммунохроматографическим тестом (FOB). Дизайн исследования представлен на рисунке 2.1.

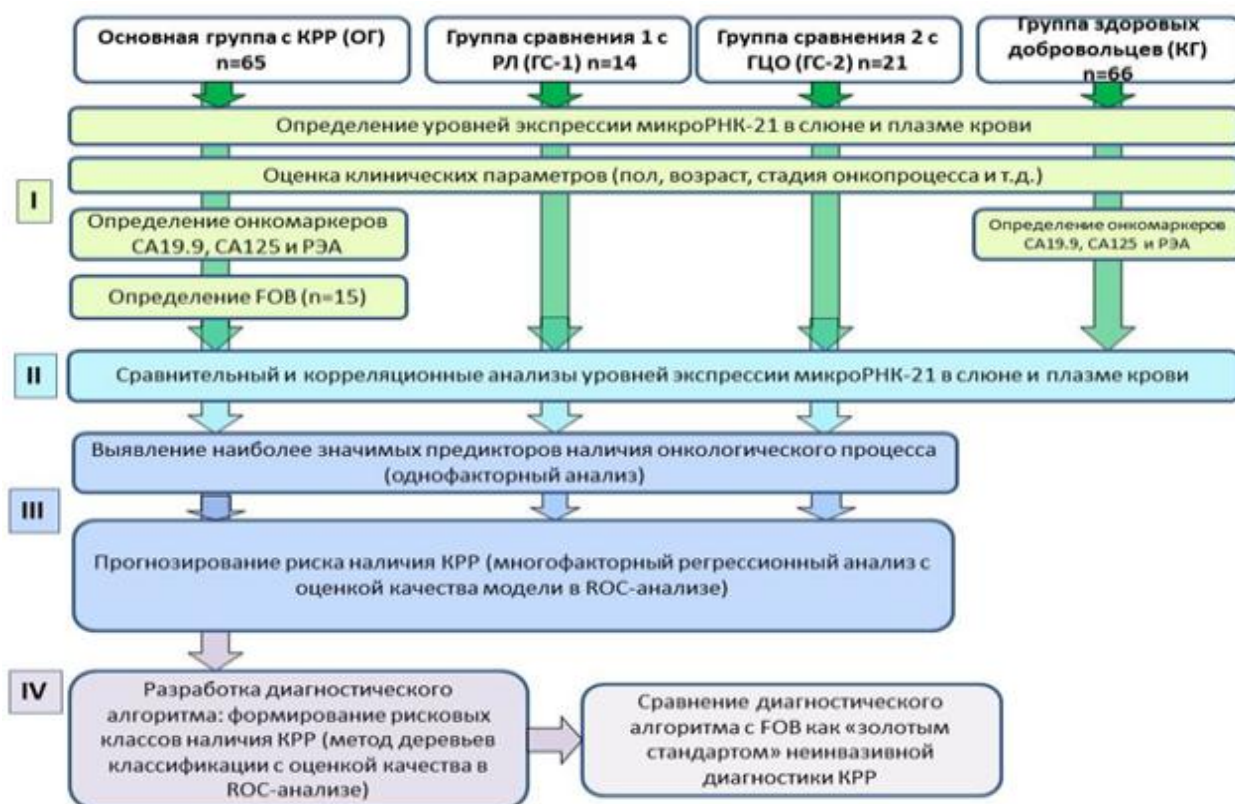


Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

В исследование были включены мужчины и женщины, жители Российской Федерации, не связанные узами родства. Все пациенты, принявшие участие в исследовании, подписали информированное добровольное согласие на участие. Всего для решения поставленных задач было обследовано 166 человек. В исследуемую группу пациентов с колоректальным раком (Основная группа (ОГ)) были включены 65 человек, в группу здоровых добровольцев, пациентов без онкологического заболевания (Контрольная группа (КГ)) – 66 пациентов. Также дополнительно были отобраны в качестве групп сравнения пациенты с другими формами рака: немелкоклеточный рак легкого (Группа сравнения – 1 (ГС-1)) – 14 пациентов и глиальные церебральные опухоли (Группа сравнения – 2 (ГС-2)) – 21 пациент.

2.2 Критерии включения/невключения

Критериями включения в исследование были:

- возраст пациентов старше 18 лет;
- первичный патоморфологически верифицированный колоректальный рак или немелкоклеточный рак легкого или глиальные церебральные опухоли;
- добровольно подписанное пациентом информированное согласие на участие в научном исследовании.

Критериями исключения из исследования были:

- наличие хронических воспалительных заболеваний толстой кишки, органов ЖКТ, грудной клетки и гематологических патологий;
- хирургическое вмешательство по поводу онкологической патологии, химиотерапии и лучевой терапии в анамнезе;
- наличие заболеваний ротоглотки;
- наличие декомпенсации сопутствующей хронической патологии (гипертонической болезни, сахарного диабета, подагры, хронической болезни почек и т.д.).

2.3 Обследование пациентов

Всем пациентам проводилось комплексное клинико-лабораторное и инструментальное обследование. Дополнительно у всех пациентов, принявших участие в исследовании, был произведен визуальный осмотр полости рта врачом оториноларингологом с целью исключения воспалительных патологий органов ротоглотки.

Обследование пациентов базировалось на Национальных клинических рекомендациях онкологов России (Ассоциация онкологов России (АОР), 2011 г.) и рекомендациях Российского общества клинической онкологии РФ (RUSSCO, 2013 г.).

Всем пациентам было выполнено исследование уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне (С-21) и плазме крови (П-21) методом ОТ-ПЦР в реальном времени по протоколу 2 – $\Delta\Delta C_t$.

Лабораторная диагностика включала в себя развернутые клинический и биохимические анализы крови, общий анализ мочи, исследование свертывающей системы крови, а также онкомаркеров, специфичных для КРР (РЭА, СА-19.9, СА-125).

У всех пациентов ОГ и КГ были определены онкомаркеры, специфичные для КРР – РЭА, СА-19.9, СА-125. Определение онкомаркеров осуществлялось методом иммуноферментного анализа с использованием тест систем. Исследование проводилось на автоматизированной ИФА-системе АІА-360 (производитель: КІТVІА). Основным достоинством данного метода является его полная автоматизация, что обеспечивает высокую точность, достоверность и воспроизводимость получаемых результатов.

Нормативные показатели для онкомаркеров РЭА, СА-19.9 и СА-125 представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Нормативные показатели онкомаркеров РЭА, СА-19.9, СА-125

Онкомаркер	Показатель нормы (N)
РЭА	Некурящие: 0,00-4,00 нг/мл Курящие: 0,00-10,0 нг/мл
СА-19.9	0,00-37,0 Е/мл
СА-125	0,00-35,0 Е/мл

При дальнейшем анализе полученных результатов было принято решение использовать показатель больше нормы (1) и меньше нормы (0).

Из инструментальных методов обследования всем пациентам выполнялась электрокардиография (аппарат Fukuda Cardiomax FX-3010, Япония).

Видеоэзофагогастродуоденоскопия (ВЭГДС) (процессор Olympus EVIS EXERA II, аппарат Olympus GIF-Q180, Япония).

Тотальная видеокOLONOSКОПИЯ (ВКС) (процессор Olympus CF-V701, Япония) с биопсией (с целью визуализации опухоли, оценки размеров опухоли, определения локализации и макроскопического типа опухоли, оценки угрозы осложнений (кровотечение, стеноз, риск перфорации), получения материала для морфологического исследования).

Ультразвуковое исследование органов брюшной полости (аппарат Mindray DC N6, Китай) с целью исключения сопутствующей патологии органов брюшной полости.

Рентгенография грудной клетки выполнялась в 2 проекциях. Для определения наличия легочной и иной патологии, стороны и распространенности поражения.

Так же всем пациентам для верификации опухолевого процесса и оценки степени распространенности выполнялась:

- мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) (на аппарате GE Optima 660, США) брюшной полости с контрастированием, с целью оценки границ опухоли, связи с соседними органами, исключения отдаленного метастазирования, а также оценки регионарных лимфоузлов;

– мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) (на аппарате GE Optima 660, США) грудной клетки для исключения метастазов в легких и лимфоузлах средостения, оценки размеров и локализации опухолевого процесса при немелкоклеточном раке легкого.

Для оценки локализации опухоли и для оценки отдаленного метастазирования, а также при наличии противопоказаний к введению йодсодержащих контрастных препаратов выполнялась магнитно-резонансная томография (МРТ) (на аппарате «GE Signa HDxt», США) с внутривенным контрастированием и многофазным сканированием как брюшной полости, так и головного мозга.

Гистологическое исследование проводилось в отделении патологической анатомии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России.

Также рандомизировано из группы пациентов, страдающих КРР, были выбраны 15 человек, которым был произведен анализ кала на определение скрытой крови в стуле.

Анализ кала на скрытую кровь проводился при помощи экспресс-теста «FOB» для выявления скрытой крови в кале методом иммунохроматографического анализа. Производитель ООО «БИОХИТ» (рисунок 2.2).



Рисунок 2.2 – FOB тест

Экспресс-тест представляет собой набор, состоящий из: тест-кассеты – 1 шт.; пробирки для отбора образцов – 1 шт.; бумаги для сбора кала – 1 шт.;

инструкции по применению – 1 шт. Один набор рассчитан на выполнение одного экспресс-анализа.

Тест проводился пациентам спустя 7 дней после выполнения инвазивных методов исследования. Специальная подготовка для выполнения данного теста не проводилась. Сбор образцов проводился пациентами в условиях стационара однократно. Образцы кала специальным аппликатором помещались в пробирку для отбора образцов, представляющую собой флакон-капельницу, содержащую 2 мл солевого (натрий-фосфатного) буферного раствора. Подробные инструкции выдавались каждому пациенту. Собранные образцы хранились до начала исследования при температуре 2-8°C, далее контейнер с материалом доставлялся в лабораторию ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, где проводилась обработка образцов и интерпретация результатов.

Время от взятия материала до начала исследования не превышало 24 ч.

Иммунохроматографический экспресс-анализ заключается в том, что 2-3 капли пробы из пробирки выдавливают в лунку, расположенную на тест-кассете. Далее проба движется по тест-полоске через подушечку (с нанесенными частицами золота, мышинными IgG и подвижными моноклональными мышинными антителами к гемоглобину человека) к тестовой зоне (с нанесенными моноклональными мышинными антителами к гемоглобину человека). Появление цветной полоски в тестовой зоне указывает на положительный результат экспресс-анализа, в то время как ее отсутствие указывает на отрицательный результат.

2.4 Общая характеристика обследуемых групп пациентов

Всего было включено 91 женщина и 75 мужчин. Все исследуемые пациенты были в возрасте от 20 до 88 лет. Средний возраст пациентов исследуемой выборки составил $58,66 \pm 16,14$ лет. Демографические характеристики представлены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Распределение пациентов исследуемых групп по возрасту и полу

Показатель		ОГ (n=65)	КГ (n=66)	ГС-1 (n=14)	ГС-2 (n=21)	р
Пол	женский	34 (52,31%)	41 (62,12%)	7 (50,00%)	9 (42,86%)	p=0,4024
	мужской	31 (47,69%)	25 (37,88%)	7 (50,00%)	12 (57,14%)	
Возраст, лет	M±S	66,55±12,19	52,61±16,66	65,57±10,70	48,67±15,37	p<0,0001

По полу исследуемые 4 группы не отличались. При попарном сравнении достоверных отличий по полу также выявлено не было. Включенные в исследование группы отличались по возрасту. При попарном сравнении по возрасту достоверно отличались ОГ и КГ ($p<0,001$), ОГ и ГС-1 ($p<0,001$), ГС-1 и ГС-2 ($p=0,017$), ГС-1 и КГ ($p=0,049$).

Распределение пациентов в зависимости от пола и возраста в исследуемых группах представлено в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Распределение пациентов в группах в зависимости от пола и возраста

Возраст, лет	Пол	Группы сравнения (n=166)									
		абс.					%				
		ОГ	КГ	ГС-1	ГС-2	Всего	ОГ	КГ	ГС-1	ГС-2	Всего
Молодой (18-44)	женский	1	13	0	3	32	0,61	7,83	0	1,81	19,28
	мужской	2	8	0	5		1,20	4,82	0	3,01	
Средний (45-59)	женский	6	14	1	2	44	3,61	8,43	0,61	1,20	26,50
	мужской	5	7	3	6		3,01	4,22	1,81	3,61	
Пожилой (60-74)	женский	18	10	5	3	62	10,84	6,02	3,01	1,81	37,34
	мужской	16	7	2	1		9,64	4,21	1,20	0,61	
Старческий (75-90)	женский	9	4	1	1	28	5,42	2,41	0,61	0,61	16,88
	мужской	8	3	2	0		4,82	1,81	1,20	0	

2.4.1 Характеристика основной группы пациентов с колоректальным раком

Группа пациентов с КРР (ОГ) составила 65 человек. Всего было включено 34 женщины и 31 мужчина. Средний возраст исследуемой группы составил $66,55 \pm 12,19$ лет. В основном в группе преобладали пациенты пожилого возраста (52,3%). Распределение пациентов по полу и возрасту в основной группе представлено в таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Распределение пациентов основной группы по полу и возрасту

Возраст, лет	Пол	Основная группа			
		абс.	всего	%	всего
Молодой (18-44)	женский	1	3	1,5	4,6
	мужской	2		3,1	
Средний (45-59)	женский	6	11	9,2	16,9
	мужской	5		7,7	
Пожилой (60-74)	женский	18	34	27,7	52,3
	мужской	16		24,6	
Старческий (75-90)	женский	9	17	13,9	26,2
	мужской	8		12,3	

Учитывая данные лабораторных и инструментальных исследований, у всех пациентов с КРР были определены: локализация патологического процесса, гистологический тип опухоли, стадия заболевания, в соответствии с Международной классификацией опухолей по системе TNM- 8-е издание, опубликованное в 2018 году. Полученные данные и их процентное распределение согласно возрасту представлены в таблице 2.5.

Таблица 2.5 – Распределение показателей в основной группе по возрасту, n=65

Показатель	Возраст, лет абс. %					p
	молодой возраст (n=3)	средний возраст (n=11)	пожилой возраст (n=34)	старческий возраст (n=17)	всего (n=65)	
Т						0,4225
In situ	1 (33,33%)	0	2 (5,88%)	1 (5,88%)	4	
2	0	2 (18,18%)	4 (11,76%)	2 (11,76%)	8	
3	1 (33,33%)	15 (44,12%)	15 (44,12%)	4 (17,65%)	22	
4	1 (33,33%)	13 (38,24%)	13 (38,24%)	10 (23,53%)	31	
N						0,7867
0	2 (66,67%)	4 (36,36%)	17 (50,0%)	6 (35,29%)	29	
1	1 (33,33%)	4 (36,36%)	12 (35,29%)	6 (35,29%)	23	
2	0	3 (27,27%)	5 (14,71%)	5 (29,41%)	13	
M						0,7781
0	3 (100%)	8 (72,72%)	27 (79,41%)	13 (76,47%)	51	
1	0	3 (27,27%)	7 (20,59%)	4 (23,53%)	14	

Продолжение таблицы 2.5

Показатель	Возраст, лет абс. %					р
	молодой возраст (n=3)	средний возраст (n=11)	пожилой возраст (n=34)	старческий возраст (n=17)	всего (n=65)	
Стадия						0,9097
0	1 (33,33%)	0	2 (5,88%)	1 (5,88%)	4	
I	0	1 (9,09%)	4 (11,76%)	2 (11,76%)	7	
II	1 (33,33%)	2 (18,18%)	8 (23,53%)	3 (17,65%)	14	
III	1 (33,33%)	5 (45,45%)	13 (38,24%)	7 (41,18%)	26	
IV	0	3 (27,27%)	7 (20,59%)	4 (23,53%)	14	
Локализация						0,2213
Восходящая кишка	0	0	9 (26,47%)	2 (11,76%)	11	
Поперечно- ободочная кишка	0	0	1 (2,94%)	2 (11,76%)	3	
Нисходящая кишка	2 (67,67%)	8 (72,73%)	20 (58,82%)	7 (41,18%)	37	
Прямая кишка	1 (33,33%)	3 (27,27%)	4 (11,76%)	6 (35,29%)	14	

Продолжение таблицы 2.5

Показатель	Возраст, лет абс. %					p
	молодой возраст (n=3)	средний возраст (n=11)	пожилой возраст (n=34)	старческий возраст (n=17)	всего (n=65)	
Гистологическая характеристика опухоли						0,3242
Высоко- дифференцированная аденокарцинома	1 (33,33%)	2 (18,18%)	3 (8,82%)	1 (5,88%)	7	
Умеренно- дифференцированная аденокарцинома	1 (33,33%)	9 (81,82%)	26 (76,47%)	15 (88,24%)	51	
Низко- дифференцированная аденокарцинома	1 (33,33%)	0	5 (14,71%)	1 (5,88%)	7	

2.4.2 Характеристика контрольной группы, здоровых добровольцев

В контрольную группу здоровых добровольцев (КГ) вошли пациенты старше 18 лет, не имеющие в анамнезе и не страдающие онкологическими и гематологическими заболеваниями, с отсутствием заболеваний ротоглотки, острых воспалительных заболеваний и компенсированные по сопутствующей патологии. Все пациенты КГ проходили обследование в клиниках ФГБОУ ВО ПСПБГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, где им выполнялись различные

лабораторные и инструментальные методы исследования, в том числе КТ органов грудной клетки и брюшной полости, УЗИ малого таза, ФЭГДС и ФКС.

Всего в контрольную группу вошло 66 человек. Женщин оказалось больше, чем мужчин (41 и 25 соответственно). В основном преобладали пациенты молодого (31,8%) и среднего (31,8%) возрастов. Распределение пациентов по полу и возрасту в группе контроль представлено в таблице 2.6.

Таблица 2.6 – Распределение пациентов в группе контроль по полу и возрасту

Возраст, лет	Пол	Контрольная группа			
		абс.	всего	%	всего
Молодой (18-44)	женский	13	21	19,7	31,8
	мужской	8		12,1	
Средний (45-59)	женский	14	21	21,2	31,8
	мужской	7		10,6	
Пожилой (60-74)	женский	10	17	15,2	25,8
	мужской	7		10,6	
Старческий (75-90)	женский	4	7	6,1	10,6
	мужской	3		4,5	

Средний возраст исследуемой группы составил $52,61 \pm 16,66$ лет.

2.4.3 Характеристика групп пациентов

с немелкоклеточным раком легкого (группа сравнения – 1)

и глиальными церебральными опухолями (группа сравнения – 2)

Дополнительно в исследование были включены пациенты с немелкоклеточным раком легкого (ГС-1) (n=14). Женщин и мужчин было равное

соотношение (7 и 7 соответственно). А также пациенты с глиальными церебральными опухолями (ГС-2) (n=21). Всего было включено 9 женщин и 12 мужчин. Средний возраст в ГС-1 составил $65,67 \pm 10,70$ лет, а в ГС-2 – $48,67 \pm 15,37$ лет соответственно. Сравнительная характеристика групп по полу и возрасту представлена в таблице 2.7.

Таблица 2.7 – Сравнительная характеристика ГС-1 и ГС-2 по полу и возрасту

Показатель	Абс. %		
	ГС-1	ГС-2	p
Пол			
Женский	7 (50,0%)	9 (42,9%)	0,678
Мужской	7 (50,0%)	12 (57,1%)	
Возраст, лет			p
Молодой (18-44)	0	8 (38,1%)	0,017
Средний (45-59)	4 (28,6%)	8 (38,1%)	
Пожилой (60-74)	7 (50,0%)	4 (19,0%)	
Старческий (75-90)	3 (21,4%)	1 (4,8%)	

2.5 Молекулярно-генетическое исследование

Помимо стандартных лабораторно-инструментальных методов исследования всем пациентам, принявшим участие в исследовании, выполняли забор плазмы крови и слюны для определения уровня экспрессии микроРНК-21.

Молекулярно-генетическое исследование выполнялось на базе ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России на кафедре клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины под руководством д.м.н., профессора М.И. Зарайского. В соответствии с поставленными задачами, произведен анализ уровня экспрессии микроРНК-21 в образцах периферической крови и слюны у пациентов исследуемых групп: ГК (n=66), ОГ (n=65), ГС-1

(n=14), ГС-2 (n=21). Все пациенты проходили обследование и лечение на базе онкологического отделения № 1, отделения торакальной онкологии, нейрохирургического отделения № 1 и отделения неотложной хирургии НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России под руководством д.м.н., доцента А.А. Захаренко.

Экспрессия микроРНК определялась методом обратной транскрипции (ОТ) с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени.

Метод ОТ микроРНК с помощью праймера, формирующего так называемую петлю (stem-loop primer), предложен в 2005 г. [159]. В результате реакции ОТ была получена ДНК длиной 50-60 оснований, что позволило использовать ее в качестве матрицы для последующей ПЦР.

В течение нескольких лет метод ОТ оптимизирован, и его широкое использование позволяет получать достоверные результаты [196]. Важной особенностью проведения реакции ОТ является молекулярная специфичность: для каждого типа детектируемых микроРНК синтезирован и использован соответствующий ОТ-праймер. В настоящее время метод ОТ-ПЦР является наиболее часто используемым в силу надёжности и относительно низкой стоимости.

При проведении молекулярно-генетического исследования были использованы реагенты отечественного производства: спирт этиловый 70%, рег. № ЛСР-009481 (ООО «Гиппократ», г. Самара, РФ); фенольный реактив, реагент ExtractRNA кат. # BC032 (лот # 0321111171) («Евроген», г. Москва, РФ); хлороформ ТУ 2631-066-44493179-01 (ЗАО «Вектон», г. Санкт-Петербург, РФ); изопропанол ГОСТ 9605-84 (ООО «Экспит» г. Санкт-Петербург, РФ); набор реагентов «ОТ-1» для обратной транскрипции (компания «Синтол» Москва, РФ); реакционная смесь «ПЦР-микс» для проведения ПЦР в реальном времени № М-439 (компания «Синтол» Москва, РФ). Также сотрудниками кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины под руководством д.м.н. профессора М.И. Зарайского был разработан дизайн праймеров, синтез которых произведен на фирме «Синтол» (Москва, РФ). Таким

образом, методика определения уровня экспрессии микроРНК (микроРНК-21) в периферической крови и в слюне была адаптирована для лабораторной практики Российской Федерации с учетом стратегии импортозамещения.

2.5.1 Выделение микроРНК-21 и проведение обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции

2.5.1.1 Забор и подготовка клинических образцов

Забор слюны осуществлялся с утра, натощак, после легкой гигиенической обработки полости рта 100 мл стерильной воды в стерильную пробирку в объеме 2 мл.

Забор крови осуществлялся с утра, натощак, из локтевой вены при помощи системы Vacuette (Greiner Bio-One, США) в пробирку объемом 5 мл с ЭДТА. После забора материал в течение часа был доставлен в молекулярно-генетическую лабораторию ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, где образцы предварительно центрифугировали 2 мин при 12 000 оборотах в минуту в Центрифуге СМ-50 (Рига, Латвия) для осаждения осадка и клеточного детрита. Полученный надосадок забирали для проведения дальнейшей реакции в объеме 300 мкл.

2.5.1.2 Выделение тотальной рибонуклеиновой кислоты

Тотальную РНК выделяли при помощи фенольно-хлороформного метода. Экстракция нуклеиновых кислот (НК) с помощью смеси фенол-хлороформа является самым старым из известных методов выделения РНК и широко используемым из-за своей относительной дешевизны.

Для проведения данного метода нами использовался ExtractRNA (Евроген, Москва) – монофазный водный раствор фенола и гуанидин-изо-тиоцианата, предназначенный для быстрого выделения суммарной РНК высокого качества из широкого круга объектов. Добавленный к образцу реагент моментально лизирует клетки, при этом целостность РНК сохраняется за счет высокоэффективного ингибирования активности РНКаз.

К полученному объему материала добавляли 1 мл фенольного реактива ExtractRNA (Евроген, Москва). После интенсивного вортексирования на вортексе Biosan MicroSpin (Рига, Латвия) суспензию инкубировали при комнатной температуре 30 минут для лизиса белковых структур. В процессе инкубации пробирку неоднократно подвергали интенсивному вортексированию на вортексе Biosan MicroSpin (Рига, Латвия). После инкубации в пробирку добавляли 200 мкл хлороформа («Вектон», Санкт-Петербург). Пробирку вортексировали на вортексе Biosan MicroSpin (Рига, Латвия) в течение 15 секунд до получения однородной суспензии. Последующую инкубацию проводили при +4 °С в течение 30 минут в бытовом холодильнике Атлант (Минск, Беларусь). После этого пробирку центрифугировали в режиме 20 минут при 13 000 оборотах в минуту с охлаждением +4°С на центрифуге Fresco-17 (Thermo, Германия). После центрифугирования в пробирке образовывалось три фазы. Верхнюю водную фазу в объеме 400 мкл, содержащую РНК, переносили в другую пробирку и добавляли 500 мкл изопропанола (Экспит, Россия). После вортексирования на вортексе Biosan MicroSpin (Рига, Латвия) пробирку инкубировали при -20 °С не менее 12 часов в бытовом холодильнике Атлант (Минск, Беларусь). После этого пробирку центрифугировали в течение 20 минут при 13 000 оборотов в минуту с охлаждением +4 °С на центрифуге Fresco-17 (Thermo, Германия). Надосадок отбрасывали, а осадок промывали однократно 1 мл раствора 70% этанола (Гиппократ, Россия) при тех же режимах центрифугирования. Надосадок полностью отбрасывали, а осадок высушивали в течение 5 минут при +65 °С на термостате DB-2A (Techne, США). К полученному осадку добавляли стерильную дистиллированную воду в объёме 15 мкл. Полученный раствор РНК использовали сразу же в реакции обратной транскрипции.

2.5.1.3 Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции для приготовления «копийной» ДНК проводили по технологии «Stem Loop» [40] отдельно для микроРНК и референц-гена U6 со следующими праймерами (таблица 2.8):

Таблица 2.8 – Последовательности праймеров для обратной транскрипции

Праймер	Последовательность
микроРНК-21	5-gtcgtatccagtgcaggggccgaggtattcgactggatacgaactcaac-3
РНК U-6	5-gtcgtatccagtgcaggggccgaggtattcgactggatacgcacaaaaaatatg-3

В качестве реактива использовали набор ОТ-1 фирмы Синтол (Москва). Для каждой пробы крови и слюны готовились по 2 отдельные реакционные смеси для детекции гена интереса микроРНК-21 и референц-гена U6.

Каждая реакционная смесь состояла из буфера для обратной транскрипции – 5 мкл, 1 мкл праймера (U6 или МикроРНК-21) в концентрации 1 пмоль, 0,5 мкл фермента обратной транскриптазы фирмы Синтол (Москва) и 3 мкл раствора тотальной РНК, полученном на предыдущем этапе.

Температурный профиль реакции состоял из 30 минут при температуре +16 °С, 30 минут при температуре +42 °С, 5 минут при температуре +85 °С с последующим охлаждением.

Данный этап проводили на амплификаторе ДТ-Lite (ДНК-Технология, Москва).

2.5.1.4 Методика полимеразной цепной реакции

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе ДТ-Lite (ДНК-Технология, Москва) в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen с использованием набора М-439 (Синтол, Москва) для реализации протокола учета результатов в режиме реального времени.

Для каждой пробы крови и слюны готовились по 2 отдельные реакционные смеси для детекции гена интереса микроРНК-21 и референц-гена U6.

Каждая реакционная смесь состояла из 10 мкл воды, 10 мкл буфера (Синтол, Москва), 1 мкл прямого праймера (U6 или МикроРНК-21) в концентрации 1 пмоль и 1 мкл общего обратного праймера в концентрации 1 пмоль (таблица 2.9).

Таблица 2.9 – Последовательности праймеров для ПЦР

Праймер	Последовательность
микроРНК-21(прямой)	5-gcccgctagcttatcagactgatg-3
РНК U-6(прямой)	5-gcgcgctcgtgaagcggtc-3
Общий обратный	gtgcaggggtccgaggt

Температурный профиль реакция состоял из предпрогрева 10 минут при температуре +95 °С, и 45 циклов, состоящих из 15 сек. при температуре +95 °С и 1 минуте при температуре +60 °С.

Данный этап проводили на амплификаторе ДТ-Lite (ДНК-Технология, Москва)

2.5.2 Расчёты

При расчётах использовали полуколичественную оценку уровней экспрессии микроРНК, которую выражали в условных единицах экспрессии (УЕ), по протоколу $2^{-\Delta\Delta C_t}$, где C_t – цикл «выхода» сигнала накопления красителя на экспоненциальный уровень, по геометрическому протоколу, а $\Delta\Delta$ – разница между уровнями C_t для исследуемой микроРНК и гена сравнения U6 (рисунок 2.3).

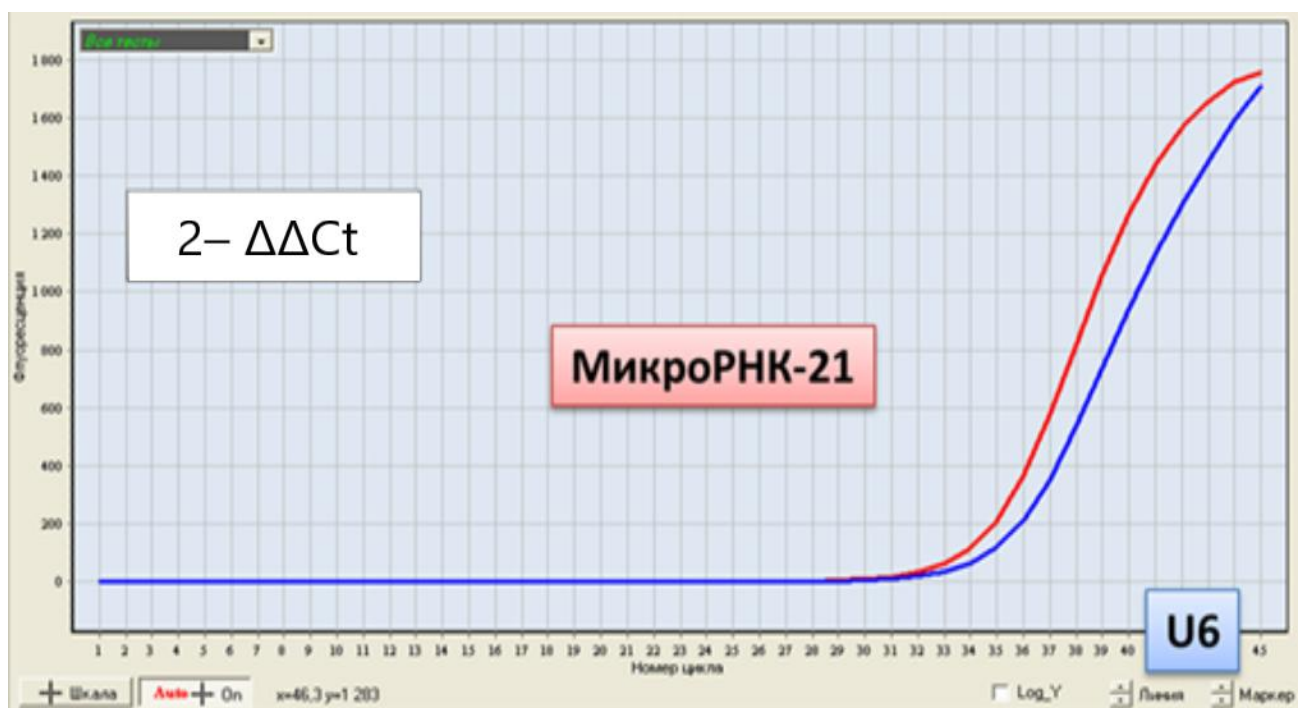


Рисунок 2.3 – Кривые накопления флуоресцентного сигнала

Полученные из амплификатора значения C_t вносили в таблицу Microsoft Office Excel 2007, где и производились все расчеты.

2.6 Статистическая обработка данных

Для описания количественных переменных применялись среднее значение и стандартное отклонение в виде « $M \pm S$ ». Для описания качественных переменных использовали доли (%). Сопоставления двух групп по количественным переменным осуществлялись с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Сравнения трех и более групп по количественным показателям проводились на основе непараметрического критерия Краскела-Уоллеса. Статистическая достоверность различий групп для бинарных и номинальных шкал определялась с использованием метода Хи-квадрат Пирсона в случае независимых выборок. Анализ взаимосвязей осуществлялся при помощи непараметрической ранговой корреляции по Спирмену. Для изучения влияния сразу нескольких независимых переменных на зависимую использовался многофакторный дисперсионный анализ (MANOVA).

Статистическая значимость влияния факторов на бинарную целевую переменную осуществлялась с помощью критерия Хи-квадрат Пирсона. Для выявления предикторов КРР, РЛ и ГЦО применяли однофакторный анализ. Для построения модели прогнозирования КРР, РЛ и ГЦО использовали логистическую множественную регрессию с пошаговым последовательным методом включения факторов в модель. Для оценки качества построенных моделей применялась оценка площади под ROC-кривой (AuROC).

Для формирования рискованных классов целевого события с помощью комбинации влияющих факторов и дальнейшего ранжирования на классы по уровню риска КРР был применен метод деревьев классификации.

Для оценки качества построенного дерева-решений применялся ROC-анализ.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10 и SAS JMP 11 [3, 7, 20, 29].

Глава 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

АНАЛИЗ УРОВНЕЙ ОНКОМАРКЕРОВ

РАКОВОЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА, СА-19.9, СА-125,

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТЕСТА

НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКРЫТОЙ КРОВИ В СТУЛЕ (Fecal Occult Blood Test)

И ЭКСПРЕССИИ микроРНК-21 В СЛЮНЕ И В ПЛАЗМЕ КРОВИ

В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

3.1 Характеристика основной группы (пациенты с колоректальным раком)

и контрольной группы (здоровые добровольцы)

по онкомаркерам раковоэмбриональному антигену, СА-19.9, СА-125

Распределение показателей онкомаркеров в группе пациентов с КРР (n=65) (ОГ) представлено в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Распределение онкомаркеров РЭА, СА-19.9, СА-125 в ОГ по основным показателям

Показатель	Онкомаркер, абс., %			
		СА-19.9, абс., %	РЭА, абс., %	СА-125, абс., %
Пол				
Женский	0	28 (53,85%)	27 (57,45%)	31 (50,82%)
	I	6 (46,15%)	7 (38,89%)	3 (75,0%)
Мужской	0	24 (46,15%)	20 (42,55%)	30 (49,18%)
	I	7 (53,85%)	11 (61,11%)	1 (25,0%)
Возраст, лет				
Молодой (18-44)	0	3 (5,77%)	2 (4,26%)	3 (4,92%)
	I	0	1 (5,56%)	0

Продолжение таблицы 3.1

Показатель	Онкомаркер, абс., %			
	СА-19.9, абс., %	РЭА, абс., %	СА-125, абс., %	
Средний (45-59)	0	8 (15,38%)	6 (12,77%)	11 (18,03%)
	I	3 (23,08%)	5 (27,78%)	0
Пожилой (60-74)	0	27 (51,92%)	26 (55,32%)	34 (55,74%)
	I	7 (53,85%)	8 (44,44%)	0
Старческий (75-90)	0	14 (26,92%)	13 (27,66%)	13 (21,31%)
	I	3 (23,08%)	4 (22,22%)	4 (100%)
T				
T in situ	0	4 (7,69%)	4 (8,51%)	4 (6,56%)
	I	0	0	0
T2	0	8 (15,38%)	5 (10,64%)	7 (11,48%)
	I	0	3 (16,67%)	1 (25,0%)
T3	0	18 (34,62%)	16 (34,04%)	22 (36,07%)
	I	4 (30,77%)	6 (33,33%)	0
T4	0	22 (42,31%)	22 (46,81%)	28 (45,90%)
	I	9 (69,23%)	9 (50,0%)	3 (75,0%)
N				
N0	0	27 (51,92%)	23 (48,94%)	28 (15,90%)
	I	2 (15,38%)	6 (33,33%)	1 (25,0%)
N1	0	15 (28,85%)	16 (34,04%)	21 (34,43%)
	I	8 (6,54%)	7 (38,89%)	2 (50,0%)
N2	0	10 (19,23%)	8 (17,02%)	12 (19,67%)
	I	3 (23,08%)	5 (27,78%)	1 (25,0%)
M				
M0	0	43 (82,69%)	39 (82,98%)	49 (80,33%)
	I	8 (61,54%)	12 (66,66%)	2 (50,0%)
M1	0	9 (17,31%)	8 (17,02%)	12 (19,67%)
	I	5 (38,46%)	6 (33,33%)	2 (50,0%)

Продолжение таблицы 3.1

Показатель	Онкомаркер, абс., %			
	СА-19.9, абс., %	РЭА, абс., %	СА-125, абс., %	
Стадия				
0	0	4 (7,69%)	4 (8,51%)	4 (6,56%)
	I	0	0	0
I	0	7 (13,46%)	4 (8,51%)	6 (9,84%)
	I	0	3 (16,67%)	1 (25,0%)
II	0	13 (25,0%)	11 (23,40%)	14 (22,95%)
	I	1 (7,69%)	3 (16,67%)	0
III	0	9 (17,31%)	20 (42,55%)	25 (40,98%)
	I	5 (38,46%)	6 (33,33%)	1 (25,0%)
IV	0	19 (36,54%)	8 (17,02%)	12 (19,67%)
	I	7 (53,85%)	6 (33,33%)	2 (50,0%)
Гистологический тип опухоли				
Высокодифференцированная аденокарцинома	0	5 (9,62%)	5 (10,64%)	7 (11,48%)
	I	2 (15,38%)	2 (11,11%)	0
Умереннодифференцированная аденокарцинома	0	42 (80,77%)	36 (76,60%)	47 (77,05%)
	I	9 (69,23%)	15 (83,33%)	4 (100%)
Низкодифференцированная аденокарцинома	0	5 (9,62%)	6 (12,77%)	7 (11,48%)
	I	2 (15,38%)	1 (5,56%)	0
Локализация опухолевого процесса				
Восходящая кишка	0	9 (17,31%)	9 (19,15%)	11 (18,03%)
	I	2 (15,38%)	2 (11,11%)	0
Поперечноободочная кишка	0	3 (5,77%)	2 (4,26%)	3 (4,92%)
	I	0	1 (5,56%)	0
Нисходящая кишка	0	28 (53,85%)	25 (53,19%)	35 (57,38%)
	I	9 (69,23%)	12 (66,67%)	2 (50,0%)
Прямая кишка	0	12 (23,08%)	11 (23,40%)	12 (19,67%)
	I	2 (15,38%)	3 (16,67%)	2 (50,0%)

У 26 пациентов ОГ определялся ($>N$) хотя бы один онкомаркер из трех. Пациентов, имеющих все три онкомаркера выше нормы, выявлено не было. Статистически значимые различия наблюдались в группе возраст по онкомаркеру СА-125 ($p=0,008$) и по показателям онкомаркера СА-19.9 в зависимости от распространенности опухолевого процесса. Наибольшее различие наблюдалось у пациентов с поражением более 7 лимфатических узлов (N2 статус) ($p=0,042$).

Так как основными онкомаркерами при КРР являются СА-19.9 и РЭА, мы определили количество пациентов в ОГ с показателями СА-19.9 и РЭА, значение которых было выше нормы ($n=8$). В основном это были пациенты среднего ($n=3$) и пожилого ($n=5$) возраста, с распространенным опухолевым процессом T3 ($n=3$), T4 ($n=5$), N1 ($n=4$), N2 ($n=3$), M1 ($n=4$), III ($n=3$) и IV ($n=4$) стадиями заболевания. В большинстве случаев опухоль располагалась в нисходящем отделе толстой кишки ($n=5$) и имела умеренную степень дифференцировки.

Также, как и пациентам ОГ, всем пациентам КГ ($n=66$) был выполнен анализ крови на онкомаркеры. Распределение показателей онкомаркеров СА-19.9, РЭА и СА-125 в группе здоровых добровольцев (КГ) по полу и возрасту представлено в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Распределение показателей онкомаркеров СА-19.9, РЭА и СА-125 в группе здоровых добровольцев по полу и возрасту

Показатель	Онкомаркер, абс., %		
	СА-19.9, абс., %	РЭА, абс., %	СА-125, абс., %
Пол			
Женский	0	25 (100%)	23 (92,0%)
	I	0	2 (8,0%)
Мужской	0	41 (100%)	37 (90,2%)
	I	0	4 (9,8%)
Возраст, лет			
Молодой (18-44)	0	21 (31,8%)	18 (27,3%)
	I	0	3 (4,5%)

Продолжение таблицы 3.2

Показатель	Онкомаркер, абс., %			
	СА-19.9, абс., %	РЭА, абс., %	СА-125, абс., %	
Средний (45-59)	0	21 (31,8%)	21 (31,8%)	19 (28,8%)
	I	0	0	2 (3,0%)
Пожилой (60-74)	0	17 (25,8%)	17 (25,8%)	17 (25,8%)
	I	0	0	0
Старческий (75-90)	0	7 (10,6%)	7 (10,6%)	6 (9,1%)
	I	0	0	1 (1,5%)

По повышенному уровню онкомаркера СА-125 в ОГ и КГ значимых различий выявлено не было ($p=0,52$). Выше нормы показатель определялся в 6,1% ($n=4$) и 9,1% ($n=6$) случаев, соответственно.

В КГ онкомаркер СА-125 был повышен у пациентов молодого ($n=3$), среднего ($n=2$) и старческого ($n=1$) возраста. Объективных причин, влияющих на повышение уровня СА-125, у данных пациентов не было. Из сопутствующей патологии у пациентов молодого возраста был диагностирован хронический гастрит. У пациентов среднего и старческого возраста преобладала контролируемая артериальная гипертензия.

Таким образом, онкомаркеры СА-19.9, РЭА были повышены только в группе КРР, а СА-125 как в ОГ, так и в КГ.

3.2 Характеристика основной группы (пациенты с колоректальным раком) по иммунохроматографическому тесту определения скрытой крови в стуле (Fecal Occult Blood Test)

Рандомизировано, из группы пациентов, страдающих КРР, были выбраны 15 человек, которым был произведен анализ кала на определение скрытой крови

в стуле. Положительный FOB-тест был выявлен у 11 (73,3%) пациентов с верифицированным и морфологически подтвержденным КРР; 4 пациента (26,7%) с КРР имели ложноотрицательный результат. Достоверных различий по полу и возрасту между группами выявлено не было. Распределение пациентов с выполненным тестом FOB по полу и возрасту представлено в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Распределение пациентов с выполненным FOB тестом по полу и возрасту

Показатель	FOB, абс. %		
	FOB + (n=11)	FOB – (n=4)	p
Пол			
Женский	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0,634
Мужской	7 (77,8%)	2 (22,2%)	
Возраст, лет			p
Молодой (18-44)	2 (100%)	0	0,572
Средний (45-59)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Пожилой (60-74)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	
Старческий (75-90)	2 (100%)	0	

По данным FOB (n=11) скрытая кровь в стуле преобладала в основном у мужчин пожилого (n=5) и старческого (n=3) возраста, имеющих большой размер опухоли T3 (n=5), T4 (n=4) и умеренную степень дифференцировки.

Всего у двух пациентов в ОГ было отмечено повышение СА-19.9, РЭА и FOB. Это были женщины среднего (49 л.) и пожилого (72 г.) возраста с III и IV стадией опухолевого процесса и умеренной степенью дифференцировки опухоли.

Таким образом, положительный тест FOB определялся у более чем половины пациентов в ОГ (n=15) нашего исследования, что подтверждает его специфичность для КРР.

3.3 Уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови в исследуемой когорте

Уровень экспрессии С-21 и П-21 был определен у всех 166 пациентов, включенных в исследование, и составил $5,66 \pm 13,12$ УЕ и $2,8 \pm 5,5$ УЕ, соответственно. Интересно, что максимальные и минимальные значения как уровня экспрессии С-21, так и П-21 в изучаемой когорте были зарегистрированы у пациентов с КРР (ОГ). Максимальное значение уровня экспрессии С-21 в исследуемой группе было $137,19$ УЕ у женщины 60 лет с умеренно дифференцированной опухолью 0 стадии T_{in situ} N0M0 в области нисходящего отдела толстой кишки. Минимальное – $0,0032$ УЕ также у пациента из ОГ: у женщины 64 лет с низко дифференцированной опухолью 2 стадии T3N0M0, локализованной в восходящей части толстой кишки. Наибольший зарегистрированный уровень экспрессии П-21 в изучаемой когорте был определен как $51,98$ УЕ у мужчины старческого возраста при высоко дифференцированной опухоли нисходящего отдела 3 стадии T3N1M0, а наименьший – $0,0096$ УЕ также у пациентки из ОГ: у женщины 55 лет, имеющей умеренно дифференцированную опухоль 3 стадии T4N1M0 в прямой кишке.

3.3.1 Уровень экспрессия микроРНК-21 в слюне и плазме крови в контрольной группе (здоровые добровольцы)

Уровень экспрессии С-21 в КГ (n=66) составил $1,3 \pm 2,4$ УЕ, а уровень экспрессии П-21 – $0,84 \pm 0,64$ УЕ. Уровень экспрессии С-21 и П-21 в различных возрастных группах, а также среди мужчин и женщин КГ представлен в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Уровень экспрессии С-21 и П-21 у пациентов КГ при различных клинических характеристиках

Клиническая характеристика	С-21, УЕ	П-21, УЕ
Возраст, лет		
Молодой (18-44) (n=21)	1,15±1,5	0,75±0,49
Средний (45-59) (n=21)	1,76±3,73	1,07±0,75
Пожилой (60-74) (n=18)	0,89±1,44	0,74±0,69
Старческий (75-90) (n=6)	1,45±1,95	0,66±0,35
Пол		
Мужской (n=25)	1,41±2,79	0,78±0,68
Женский (n=41)	1,12±1,77	0,88±0,61

Уровень экспрессии С-21 в подгруппах КГ по возрасту не отличался ($p=0,89$), как и уровень экспрессии П-21 ($p=0,35$), включая попарное сравнение.

Уровень экспрессии С-21 у мужчин и женщин КГ так же не отличался ($p=0,38$), как и уровень экспрессии П-21 ($p=0,27$).

Таким образом, уровень экспрессии С-21 и П-21 в группе контроля не отличался между мужчинами и женщинами, как и между пациентами различного возраста.

3.3.2 Анализ взаимосвязи экспрессии микроРНК-21 в плазме крови и слюне с некоторыми характеристиками контрольной группы (здоровые добровольцы)

Для оценки ассоциаций уровня экспрессии С-21 и П-21 у пациентов КГ ($n=66$) с такой клинической характеристикой, как возраст, а также между собой, был выполнен корреляционный анализ, результаты которого представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Корреляционный анализ уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне, плазме и возраста в КГ

Показатель	С-21, УЕ	П-21, УЕ
Возраст, лет	-0,1	-0,06
С-21 (УЕ)	1	0,45*
П-21 (УЕ)	0,45*	1
Примечание – * – статистическая значимость на уровне $p \leq 0,01$.		

В КГ была выявлена прямая корреляция уровней экспрессии П-21 и С-21, в то время как между этими показателями и возрастом ассоциации показано не было.

3.3.3 Уровень экспрессия микроРНК-21 в слюне и плазме крови у пациентов основной группы (пациенты с колоректальным раком)

У пациентов ОГ (n=65) уровень экспрессии С-21 составил $9,67 \pm 18,5$ УЕ, а П-21 – $3,71 \pm 7,38$ УЕ. Максимальное и минимальное значения уровня экспрессии С-21 в ОГ были зафиксированы у женщины 60 лет с умеренно дифференцированной опухолью 0 стадии T1N0M0 в области нисходящего отдела толстой кишки и у женщины 64 лет с низко дифференцированной опухолью 2 стадии T3N0M0, локализованной в восходящей части толстой кишки, и составили 137,19 УЕ и 0,0032 УЕ, соответственно. Наибольшее значение уровня экспрессии П-21 составило 51,98 УЕ у мужчины старческого возраста при высоко дифференцированной опухоли нисходящего отдела 3 стадии T3N1M0, а наименьшее – 0,0096 УЕ у женщины 55 лет, имеющей умеренно дифференцированную опухоль 3 стадии T4N1M0 в прямой кишке. Значения уровня экспрессии С-21 и П-21 у пациентов ОГ по возрасту, полу, локализации

опухоли и ее гистологическом типе, стадии, в том числе по классификации TMN представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Экспрессия С-21 и П-21 у пациентов с колоректальным раком при различных клинических характеристиках

Клиническая характеристика	С-21, УЕ	П-21, УЕ
Возраст		
Молодой (18-44) (n=4)	6,17±5,6	6,32±7,61
Средний (45-59) (n=10)	7,8±13,5	3,98±6,03
Пожилой (60-74) (n=35)	12,22±22,41	2,69±3,22
Старческий (75-90) (n=16)	6,14±8,5	5,12±13,0
Пол		
Мужской (n=31)	6,84±9,05	4,89±10,06
Женский (n=34)	12,24±24,01	2,64±3,33
Локализация опухоли		
Восходящая (n=11)	6,03±7,11	3,48±4,53
Поперечно-ободочная (n=3)	18,95±15,66	0,37±0,22
Нисходящая (n=37)	12,66±23,18	4,96±9,24
Прямая (n=14)	2,64±3,82	1,33±1,71
Стадия онкологического процесса		
0 (n=4)	43,86±62,93	2,94±2,99
1 (n=7)	11,26±11,63	6,15±7,53
2 (n=14)	5,31±8,77	2,37±2,50
3 (n=26)	6,84±8,40	4,69±10,61
4 (n=14)	8,72±10,10	2,25±2,75
По классификации TMN		
T in situ (n=4)	43,86±62,93	2,94±2,99
T2 (n=8)	13,85±13,03	6,70±7,15

Продолжение таблицы 3.6

Клиническая характеристика	С-21, УЕ	П-21, УЕ
T3 (n=22)	8,07±8,06	5,00±11,13
T4 (n=31)	5,32±8,31	2,13±3,23
N0 (n=29)	13,92±25,97	3,63±4,55
N1 (n=23)	5,55±6,50	4,73±10,94
N2 (n=13)	7,49±9,86	2,11±4,26
M0 (n=51)	9,9±20,3	4,1±8,2
M1 (n=14)	8,7±10,1	2,3±2,8
По гистологическому типу		
Высокодифференцированная аденокарцинома	6,29±5,14	8,60±19,19
Умереннодифференцированная аденокарцинома	10,29±20,65	2,94±4,24
Низкодифференцированная аденокарцинома	8,49±7,78	4,51±5,40

Статистически значимых различий уровней экспрессии С-21 и П-21 у пациентов разных возрастных групп выявлено не было ($p=0,33$ и $p=0,61$, соответственно). При попарном сравнении в четырех подгруппах ОГ по возрасту уровень экспрессии С-21 также не отличался, как и уровень экспрессии П-21. При сравнении мужчин и женщин в ОГ значимых различий также не было выявлено ни по уровню экспрессии С-21 ($p=0,54$), ни по уровню экспрессии П-21 ($p=0,98$).

Уровень экспрессии С-21 у пациентов с разной локализацией КРР – в прямой кишке, нисходящей, восходящей и поперечно-ободочной – значимо отличался ($p=0,048$). При попарном сравнении достоверно выше был уровень экспрессии С-21 при локализации опухоли в нисходящем отделе толстой кишки, чем при ее нахождении в прямой кишке ($p=0,012$). Уровень экспрессии С-21 в остальных подгруппах по локализации КРР при попарном сравнении

не отличался. Уровень экспрессии П-21 у пациентов с разной локализацией онкологического процесса не отличался ($p=0,09$). Различия в уровне экспрессии П-21 были получены только при сравнении подгрупп с локализацией опухоли в прямой и нисходящей кишке ($p=0,042$).

При анализе уровней экспрессии С-21 и П-21 у пациентов с разными стадиями (0-4) КРР в ОГ достоверных различий выявлено не было ($p=0,097$ и $p=0,89$). При попарном сравнении по стадиям (0-4) уровень экспрессии С-21 достоверно отличался только в подгруппах «0» и «2» ($p=0,026$), а достоверных различий уровня экспрессии П-21 зарегистрировано не было.

При анализе уровня экспрессии С-21 в ОГ согласно классификации TNM, были выявлены различия между критериями T in situ, T2, T3, T4 ($p=0,017$). При попарном сравнении уровень экспрессии С-21 в группе критерия T4 был достоверно ниже, чем в T in situ, T2, T3 (рисунок 3.1).

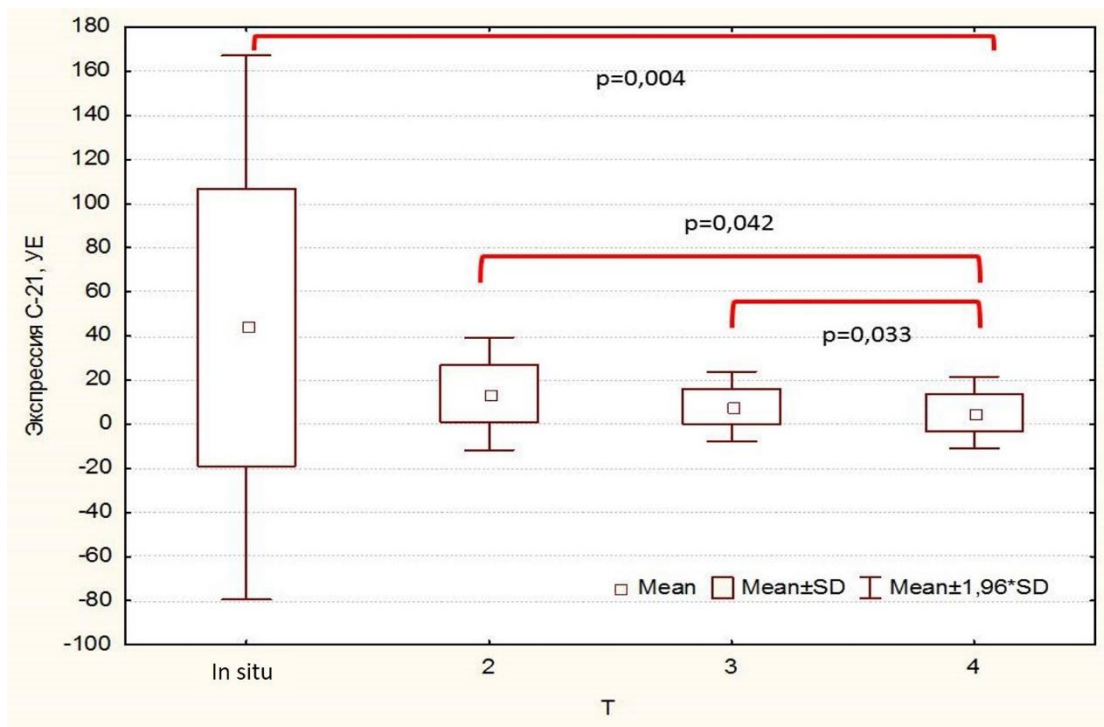


Рисунок 3.1 – Экспрессия С-21 при различных критериях «Т» у пациентов с КРР

Уровень экспрессии П-21 при различных критериях «Т» опухоли толстой кишки при сравнении в четырех группах значимо не отличался ($p=0,85$). При

попарном сравнении уровней экспрессии П-21 для критерия «Т» различия не были получены ни для одной пары.

Уровень экспрессии С-21, как и уровень экспрессии П-21 в группах критерия N0, N1 и N2 не отличался, включая попарное сравнение. Между группами критериев M0 и M1 различий уровней экспрессии С-21 и П-21 также выявлено не было ($p=0,59$ и $p=0,74$, соответственно).

Уровни экспрессии С-21, как и П-21 были сравнимы в подгруппах ОГ по гистологическому типу опухоли, в том числе при попарном сравнении подгрупп. Достоверных различий выявлено не было ($p=0,66$ и $p=0,51$ соответственно).

Уровни экспрессии С-21 и П-21 в ОГ при повышенных и нормальных значениях СА-19.9, РЭА и СА 125 представлены в таблице 3.7. При попарном сравнении как С-21, так и П-21 ни при повышенном, ни при нормальном значении СА-19.9, СА 125 и РЭА достоверно не отличались.

Таблица 3.7 – Уровни экспрессии С-21 и П-21 в ОГ при повышенном и нормальном уровне онкомаркеров СА-19.9, РЭА и СА-125

Уровень экспрессии	СА-19.9 (1) (n=13)	СА-19.9 (0) (n=52)	СА-125 (1) (n=4)	СА-125 (0) (n=61)	РЭА (1) (n=18)	РЭА (0) (n=47)
С-21, УЕ	4,2±5,9	11±20,3	6,4±6,0	9,9±19,1	6,2±9,7	10,9±20,9
П-21, УЕ	1,93±1,94	4,2±8,1	5±6,7	3,6±7,4	3,4±5,7	3,8±7,9

Уровень экспрессии С-21 в подгруппе пациентов с хотя бы одним повышенным онкомаркером из трех ($n=26$) составил $6,2±8,5$ УЕ и не отличался от уровня экспрессии С-21 в подгруппе пациентов с нормальным значением онкомаркеров ($n=39$), $11,9±22,7$ УЕ ($p=0,29$). У пациентов подгруппы повышенного значения онкомаркеров, уровень экспрессии П-21 составил $3,6±5,3$ УЕ и был сравним с таковым при отсутствии повышенного значения онкомаркера ($3,8±8,5$ УЕ, $p=0,95$).

В подгруппе двух онкомаркеров со значением $>N$, СА-19.9+РЭА ($n=8$), уровень экспрессии С-21 составил $3,82\pm 6,74$ УЕ, а уровень экспрессии П-21 – $1,54\pm 1,84$ УЕ. У пациентов без сочетания этих онкомаркеров ($n=57$) уровень экспрессии С-21 был $10,49\pm 19,51$ УЕ, а П-21 – $4,02\pm 7,81$ УЕ. Достоверно ни уровень экспрессии С-21, ни уровень экспрессии П-21 в этих подгруппах не отличался.

В подгруппе двух онкомаркеров со значением $>N$ из трех (СА-19.9, СА125 и РЭА) ($n=9$) уровень экспрессии С-21 составил $3,46\pm 6,39$ УЕ, что было достоверно меньше, чем у пациентов с отсутствием двух онкомаркеров $>N$ из трех ($n=56$) $10,67\pm 19,65$ УЕ ($p=0,048$). Уровень экспрессии П-21 в подгруппе двух онкомаркеров со значением $>N$ из трех (СА-19.9, СА125 и РЭА) ($n=9$) составил $1,4\pm 1,77$ УЕ, а в подгруппе без онкомаркеров ($n=56$) – $4,09\pm 7,87$ УЕ. Достоверно уровень экспрессии П-21 в этих подгруппах не отличался.

Как и в КГ, в ОГ не было выявлено различий между уровнем экспрессии П-21 и С-21 по полу, так и в разных возрастных группах. Уровни экспрессии П-21 и С-21 были значимо выше при КРР, локализованном в нисходящем отделе толстой кишки при сравнении с КРР в прямой кишке, где уровни экспрессии П-21 и С-21 были наиболее низкими. Интересно, что наиболее высокий уровень экспрессии С-21 был зарегистрирован при 0 стадии КРР, а самый низкий при 2 стадии. Однако следует сказать, что количество пациентов в подгруппе с 0 стадией КРР было небольшим ($n=4$). Достоверных различий уровней экспрессии П-21 выявлено не было. Также стоит отметить, что уровень экспрессии С-21 в ОГ согласно классификации TNM был значимо ниже при Т4 чем при Т in situ, Т2 и Т3. Отличий уровня экспрессии П-21 согласно классификации TNM выявлено не было. Повышения уровня экспрессии как С-21, так и П-21 при наличии хотя бы одного онкомаркера (СА-19.9, РЭА, СА-125) $>N$ из трех, выявлено не было.

3.3.4 Анализ взаимосвязи экспрессии микроРНК-21 в плазме крови и слюне с некоторыми характеристиками опухолевого процесса в основной группе (пациенты с колоректальным раком)

Для дальнейшей оценки ассоциаций уровня экспрессии С-21 и П-21 у пациентов ОГ (n=65) с некоторыми клинико-патологическими признаками опухолевого процесса был выполнен корреляционный анализ, результаты которого представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Корреляционный анализ уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме и некоторых клинических показателей в ОГ

Показатель	С-21, УЕ	П-21, УЕ
Возраст, лет	-0,03	-0,15
Локализация	-0,24	-0,03
Стадия	-0,06	-0,11
T	-0,41*	-0,2
СА19.9 >N	-0,21	-0,1
РЭА >N	-0,16	-0,11
С-21 (УЕ)	1	0,31*
П-21 (УЕ)	0,31*	1
Примечание – * – статистическая значимость на уровне $p \leq 0,05$.		

В исследуемой группе пациентов ОГ корреляции уровня экспрессии С-21 и П-21 с возрастом, полом, стадией и локализацией опухолевого процесса, а также онкомаркерами СА-19.9 и РЭА >N отмечено не было. Но отмечалась умеренная положительная корреляция между показателями уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме ($R_s=0,31$, $p \leq 0,05$). Чем больше был уровень экспрессии П-21, тем выше был уровень экспрессии С-21. Кроме того, отрицательная взаимосвязь была выявлена между показателем T классификации TNM и С-21 ($R_s=-0,41$,

$p \leq 0,05$). Чем меньше был показатель T классификации TNM, тем выше был уровень экспрессии С-21.

3.3.5 Уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (группа сравнения – 1) и глиальными церебральными опухолями (группа сравнения – 2) и анализ взаимосвязи с клиническими характеристиками групп

У пациентов ГС-1 (n=14) уровень экспрессии С-21 составил $12,27 \pm 14,78$ УЕ, а уровень экспрессии П-21 – $8,69 \pm 6,76$ УЕ. Значения уровня экспрессии С-21 и П-21 у пациентов ГС-1 по возрасту, полу, стадии, в том числе по классификации TNM представлены в таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Уровень экспрессии С-21 и П-21 у пациентов с раком легкого при различных клинических характеристиках

Клиническая характеристика	С-21, УЕ	П-21, УЕ
Возраст, лет		
Молодой (18-44) (n=0)	0	0
Средний (44-59) (n=4)	$4,67 \pm 5,77$	$7,23 \pm 5,87$
Пожилой (60-74) (n=7)	$12,19 \pm 16,04$	$8,61 \pm 7,29$
Старческий (75-90) (n=3)	$18,1 \pm 19,85$	$10,39 \pm 9,95$
Пол		
Мужской (n=7)	$11,67 \pm 15,82$	$8,47 \pm 7,21$
Женский (n=7)	$12,27 \pm 14,78$	$8,69 \pm 6,76$
Стадия онкологического процесса		
0 (n=0)	0	0
1 (n=4)	$10,59 \pm 15,66$	$10,70 \pm 7,35$

Продолжение таблицы 3.9

Клиническая характеристика	С-21, УЕ	П-21, УЕ
2 (n=4)	15,72±17,22	10,39±7,33
3 (n=3)	6,25±13,44	8,30±8,60
4 (n=3)	4,21±5,49	6,41±5,91
По классификации ТМN		
T 1 (n=5)	9,27±13,20	8,76±7,06
T2 (n=6)	12,19±16,04	8,61±7,29
T3 (n=1)	0	0
T4 (n=2)	5,32±8,32	4,22±6,15
N0 (n=6)	14,52±16,67	10,20±6,94
N1 (n=6)	7,22±12,90	8,64±8,11
N2 (n=2)	8,70±7,33	6,28±5,40
M0 (n=12)	12,19±16,04	8,61±7,29
M1 (n=2)	4,21±5,49	6,41±5,91

Значимых различий в уровне экспрессии С-21 и П-21 по подгруппам возраста получено не было ($p=0,7$ и $p=0,4$, соответственно). При попарном сравнении уровней экспрессии С-21 в подгруппах возраста в ГС-1 достоверных различий получено не было, как и для уровня экспрессии П-21. Уровень экспрессии П-21 и С-21 у мужчин и женщин не отличался. При разных стадиях РЛ значимых различий уровней экспрессии С-21 и П-21 выявлено не было ($p=0,81$ и $p=0,27$, соответственно), в том числе при попарном сравнении. При разных значениях Т классификации TNM уровни экспрессии С-21 и П-21 в подгруппах ГС-1 не отличались ($p=0,36$ и $p=0,6$, соответственно), в том числе при попарном сравнении. При разных значениях N уровни экспрессии С-21 и П-21 в подгруппах ГС-1 не отличался ($p=0,25$ и $p=0,28$, соответственно), в том числе при попарном сравнении. Так же значимых различий уровней экспрессии С-21 и П-21 у пациентов с M0 и M1 выявлено не было ($p=0,78$ и $p=0,58$, соответственно).

При корреляционном анализе достоверных взаимосвязей уровней экспрессии П-21 и С-21 с клиническими параметрами и между собой получено не было (таблица 3.10).

Таблица 3.10 – Корреляционный анализ уровня экспрессии С-21 и П-21 и некоторых клинических показателей в ГС-1

Показатель	С-21, УЕ	П-21, УЕ
Возраст, лет	0,28	0,09
Пол	0,11	-0,48
Стадия	-0,15	-0,47
Т (TNM)	-0,11	-0,25
С-21 (УЕ)	1	0,34
П-21 (УЕ)	0,34	1

Уровень экспрессии как П-21, так и С-21 в ГС-1 был повышен. Отличий уровня экспрессии как П-21, так и С-21 по полу, возрастным группам, стадии онкологического процесса и TNM классификации опухолевого процесса выявлено не было. Интересно, что при корреляционном анализе не было выявлено достоверной взаимосвязи даже между П-21 и С-21.

У пациентов ГС-2 (n=21) уровень экспрессии С-21 составил $2,51 \pm 2,39$ УЕ, а уровень экспрессии П-21 – $2,17 \pm 2,05$ УЕ. Значения уровня экспрессии С-21 и П-21 у пациентов ГС-2 по возрасту и полу представлены в таблице 3.11.

По возрастным группам в ГС-2 уровень экспрессии С-21 отличался ($p=0,045$). Уровень экспрессии С-21 при молодом и среднем возрасте был достоверно меньше, чем при пожилом возрасте ($p=0,006$ и $p=0,017$, соответственно). Различий в уровне экспрессии П-21 по возрастным группам в ГС-2 получено не было ($p=0,86$). При попарном сравнении уровней экспрессии П-21 в возрастных группах в ГС-2 достоверных различий получено не было. Уровень экспрессии П-21 и С-21 у мужчин и женщин не отличался ($p=0,62$ и $p=0,18$, соответственно).

Таблица 3.11 – Уровень экспрессии С-21 и П-21 у пациентов с ГЦО при различных клинических характеристиках

Клиническая характеристика	С-21, УЕ	П-21, УЕ
Возраст, лет		
Молодой (18-44) (n=8)	2,67±2,48	2,47±2,08
Средний (45-59) (n=8)	2,46±2,44	2,26±2,07
Пожилой (60-74) (n=4)	4,00±3,05	1,21±0,93
Старческий (74-90) (n=1)	0	0
Пол		
Мужской (n=12)	2,51±2,39	2,17±2,05
Женский (n=9)	2,96±2,758	2,90±2,01

При корреляционном анализе достоверных взаимосвязей уровней экспрессии П-21 и С-21 с клиническими параметрами и между собой получено не было (таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Корреляционный анализ уровня экспрессии С-21 и П-21 и некоторых клинических показателей в ГС-2

Показатель	С-21, УЕ	П-21, УЕ
Возраст, лет	-0,24	-0,15
Пол	-0,3	-0,11
С-21 (УЕ)	1	0,12
П-21 (УЕ)	0,12	1

Уровень экспрессии П-21 и С-21 в ГС-2 был повышен. Различий уровня экспрессии П-21 и С-21 по полу и возрастным группам выявлено не было. При корреляционном анализе также не было выявлено достоверной взаимосвязи даже между П-21 и С-21.

3.4. Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-21 в исследуемых группах

Уровни экспрессии С-21 в ОГ (n=65) ($9,67 \pm 18,52$), КГ (n=66) ($1,30 \pm 2,45$), ГС-1 (n=14) ($12,27 \pm 14,78$) и ГС-2 (n=21) ($2,51 \pm 2,39$) достоверно отличались ($p < 0,001$). При попарном сравнении достоверно различались уровни экспрессии С-21 между ОГ и КГ ($p < 0,001$), КГ и ГС-1 ($p < 0,001$), КГ и ГС-2 ($p < 0,001$). Различий между ОГ и ГС-1 и ОГ и ГС-2 выявлено не было ($p = 0,38$ и $p = 0,08$, соответственно). Уровни экспрессии С-21 в ГС-1 и ГС-2 не различались ($p = 0,69$) (рисунок 3.2).

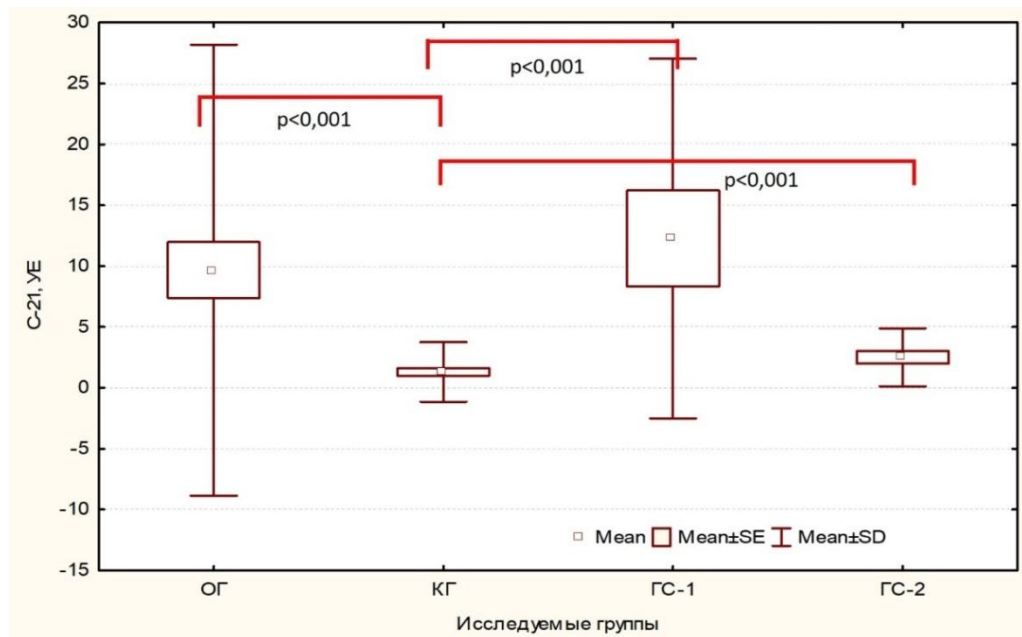


Рисунок 3.2 – Уровень экспрессии С-21 в исследуемых группах

Уровень экспрессии П-21 в ОГ ($3,71 \pm 7,38$), КГ ($0,84 \pm 0,64$), ГС-1 ($8,69 \pm 6,76$) и ГС-2 ($2,17 \pm 2,05$) достоверно отличался ($p < 0,001$). При попарном сравнении достоверно различались уровни экспрессии П-21 между ОГ и КГ ($p = 0,009$), КГ и ГС-1 ($p < 0,001$), КГ и ГС-2 ($p = 0,022$). Также были выявлены различия уровней экспрессии П-21 между ОГ и ГС-1 ($p = 0,001$) и ГС-1 и ГС-2 ($p = 0,001$). Различий уровней экспрессии П-21 между ОГ и ГС-2 выявлено не было ($p = 0,82$) (рисунок 3.3).

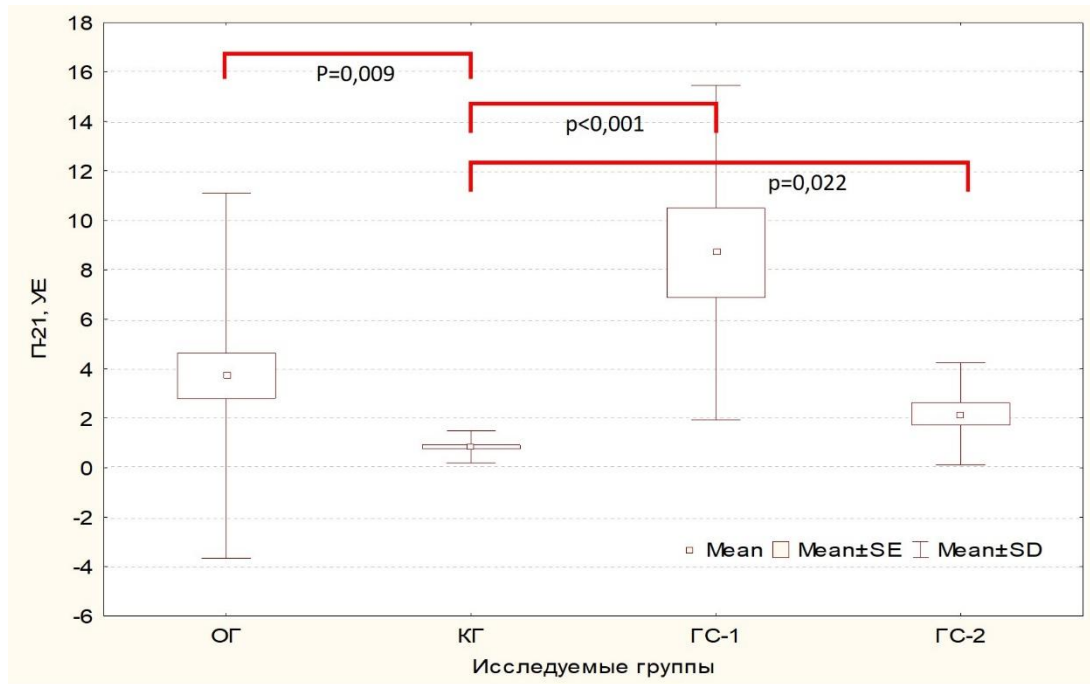


Рисунок 3.3 – Уровень экспрессии П-21 в исследуемых группах

Таким образом, уровни экспрессии С-21 и П-21 были высокими при онкологическом процессе (КРР, РЛ и ГЦО) при сравнении с группой здоровых добровольцев. Наибольший уровень экспрессии П-21 был зарегистрирован в ГС-1 и достоверно отличался от уровня экспрессии П-21 КРР и ГЦО.

3.4.1 Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-21 в подгруппе возраст исследуемых групп

Уровень экспрессии С-21 в возрастных группах исследуемых групп достоверно отличался в группе пожилого возраста ($p < 0,001$) и молодого возраста ($p = 0,014$). При попарном сравнении в подгруппе пожилого возраста отмечены значимые различия между КГ и ОГ ($p < 0,001$), КГ и ГС-1 ($p = 0,0036$), КГ и ГС-2 ($p = 0,0038$). В группе молодого возраста значимые различия отмечались между КГ и ОГ ($p = 0,026$), КГ и ГС-2 ($p = 0,028$). В группах среднего и старческого возраста

различий выявлено не было ($p=0,17$ и $p=0,18$, соответственно). При попарном сравнении различий в этих группах также выявлено не было.

Уровень экспрессии П-21 в возрастных группах достоверно отличался лишь в группе пожилого возраста ($p=0,0013$), тогда как в остальных группах достоверных различий выявлено не было (молодой возраст $p=0,13$, средний возраст $p=0,14$, старческий возраст $p=0,4$). При попарном сравнении в группе пожилого возраста отмечались значимые различия между КГ и ОГ ($p=0,017$), КГ и ГС-1 ($p=0,0012$), ОГ и ГС-1 ($p=0,004$), ГС-2 и ГС-1 ($p=0,0038$). Несмотря на отсутствие отличий по уровню экспрессии П-21 в остальных возрастных группах, в группе среднего возраста отмечалось значимое различие при попарном сравнении между КГ и ГС-1 ($p=0,026$).

Таким образом, уровень экспрессии С-21 у пациентов пожилого и молодого возраста в ОГ, ГС-1 и ГС-2 был значимо выше, чем в КГ, тогда как уровень экспрессии П-21 в ОГ, ГС-1 и ГС-2 был значимо выше, чем в КГ только у пациентов пожилого возраста.

3.4.2 Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-21 в подгруппе пол исследуемых групп

При сравнительном анализе уровня экспрессии С-21 по полу в исследуемых группах значимые различия были отмечены как среди женщин ($p<0,001$), так и среди мужчин ($p=0,0002$). При попарном сравнении у женщин достоверно различались уровни экспрессии между КГ и ОГ ($p<0,001$), КГ и ГС-1 ($p=0,003$), КГ и ГС-2 ($p=0,003$), а у мужчин между КГ и ОГ ($p<0,001$), КГ и ГС-1 ($p=0,008$), КГ и ГС-2 ($p=0,035$).

Уровень экспрессии П-21 по полу в исследуемых группах достоверно различался ($p=0,003$ и $p=0,03$, соответственно). При попарном сравнении достоверно различались уровни экспрессии П-21 у женщин между КГ и ОГ

($p=0,037$), КГ и ГС-1 ($p<0,001$), КГ и ГС-2 ($p=0,015$), ОГ и ГС-1 ($p=0,0018$) и у мужчин между КГ и ГС-1 ($p=0,0035$). Интересно, что различий между остальными группами при попарном сравнении у мужчин выявлено не было.

Зависимости повышения уровня экспрессии П-21 и С-21 от пола пациента выявлено не было, несмотря на их высокий уровень, как у мужчин, так и у женщин в ОГ, ГС-1 и ГС-2.

**3.4.3 Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-21
в подгруппе *T in situ* – T2 классификации TNM основной группы
(пациенты с колоректальным раком) и группы сравнения – 1
(пациенты с немелкоклеточным раком легкого)**

Уровень экспрессии С-21 при первичных опухолях Т как в ОГ так и в ГС-1 при небольших размерах и небольшой инвазии опухоли был выше, чем при более распространенных процессах. При объединении *T in situ* и T2 в ОГ ($n=12$) и T1 и T2 ГС-1 ($n=11$), уровень экспрессии С-21 составил $23,8\pm 37,5$ УЕ и $10,6\pm 13,9$ УЕ соответственно. Достоверных различий в исследуемых группах выявлено не было ($p=0,17$).

Уровень экспрессии П-21 в исследуемых группах составил $5,4\pm 6,2$ УЕ и $9,1\pm 7,3$ УЕ соответственно. Различий уровней экспрессии П-21 между ОГ и ГС-1 выявлено не было ($p=0,1$).

Исходя из полученных результатов уровни экспрессии С-21 и П-21 были высокими при КРР, РЛ и ГЦО по сравнению с КГ. При этом уровень экспрессии С-21 при КРР был выше при начальных стадиях онкологического процесса и отличался от такового при ГЦО и РЛ. Уровень экспрессии П-21 при КРР не различался с ГС-2, а в ГС-1 был достоверно выше.

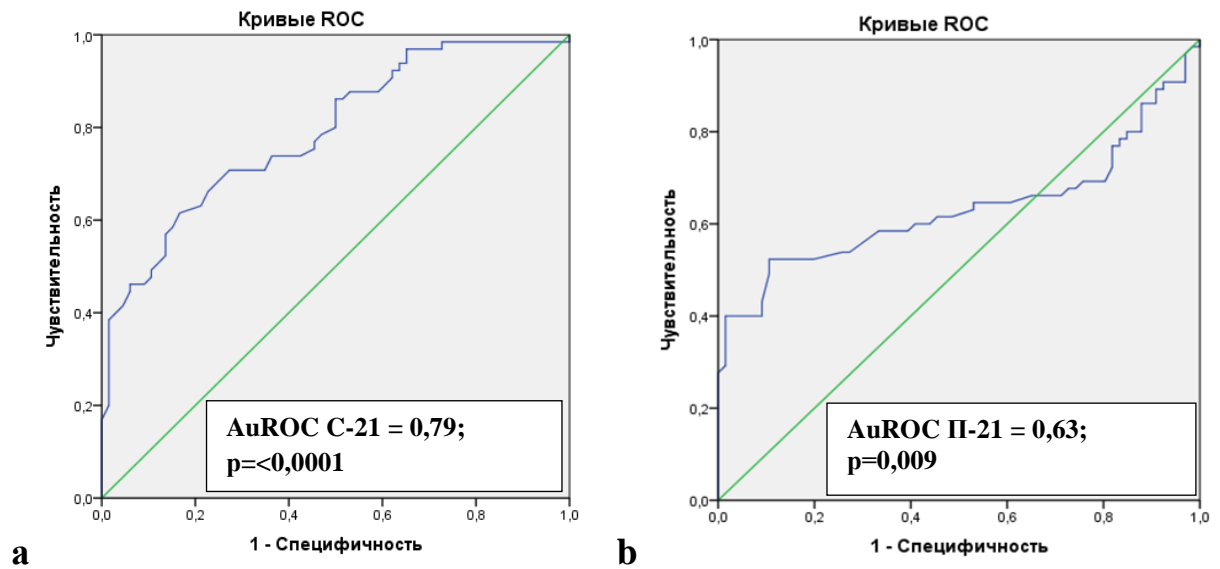
Глава 4

ЭКСПРЕССИЯ микроРНК-21 В СЛЮНЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ КАК МЕТОД ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НАЛИЧИЯ ОПУХОЛИ (КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК, НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫЙ РАК ЛЕГКОГО, ГЛИАЛЬНЫЕ ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ)

4.1 Экспрессия микроРНК-21 в слюне и плазме крови как метод диагностики опухоли (колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, глиальные церебральные опухоли)

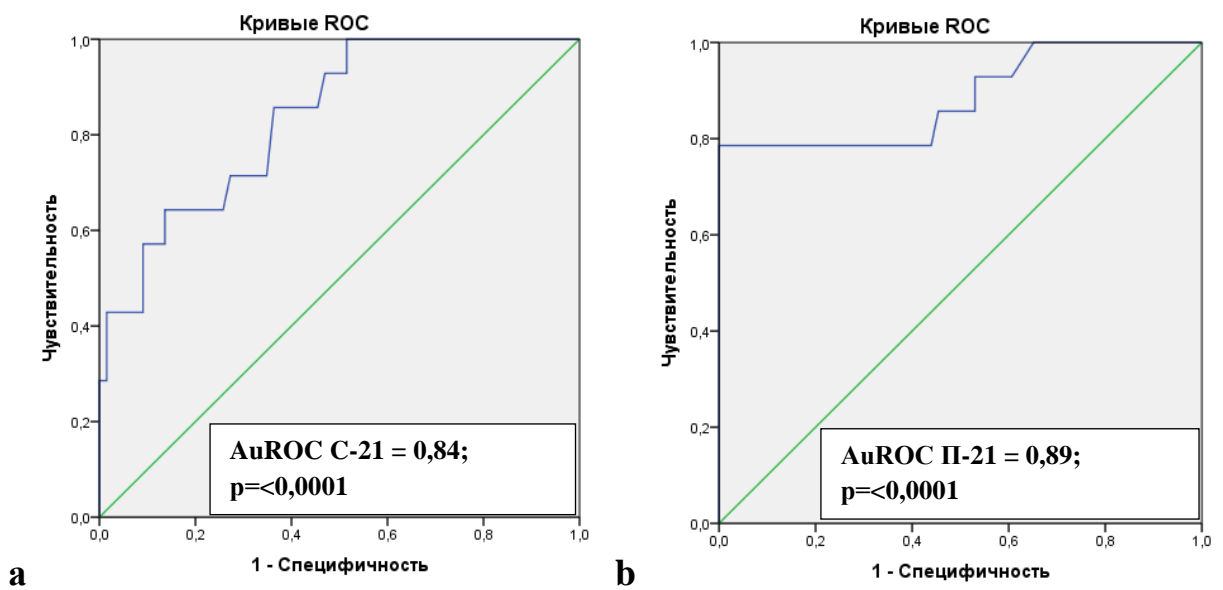
С целью оценки качества уровней экспрессии С-21 и П-21 как метода диагностики колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого и глиальных церебральных опухолей был выполнен ROC-анализ. Чувствительность и специфичность уровня экспрессии П-21 $\geq 1,6$ УЕ и С-21 $\geq 2,0$ УЕ в качестве маркера колоректального рака составила 52% и 61% и 89% и 83%, соответственно. Прогностическая ценность положительного результата (ПЦП) для С-21 $\geq 2,0$ УЕ составила 73%, а для П-21 $\geq 1,6$ УЕ – 83%. Прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦО) для С-21 $\geq 2,0$ УЕ была 31%, а для П-21 $\geq 1,6$ УЕ – 34,5%. ROC-кривые, характеризующие С-21 и П-21 как диагностический метод КРР, представлены на рисунке 4.1, а, б, соответственно.

Чувствительность и специфичность уровня экспрессии П-21 $\geq 3,5$ УЕ и С-21 $\geq 2,5$ УЕ в качестве маркера немелкоклеточного рака легкого составила 78% и 64% и 100% и 86%, соответственно. ПЦП для С-21 $\geq 2,5$ УЕ составила 50%, а для П-21 $\geq 3,5$ УЕ – 100%. ПЦО для С-21 $\geq 2,5$ УЕ была 8%, а для П-21 $\geq 3,5$ УЕ – 4,4%. ROC-кривые, характеризующие С-21 и П-21 как диагностический метод РЛ, представлены на рисунке 4.2, а, б соответственно.



а – прогнозные показатели маркера С-21 в ОГ; б – прогнозные показатели маркера П-21 в ОГ.

Рисунок 4.1 – ROC-кривые, характеризующие уровень экспрессии С-21 и П-21 как диагностический метод КРР



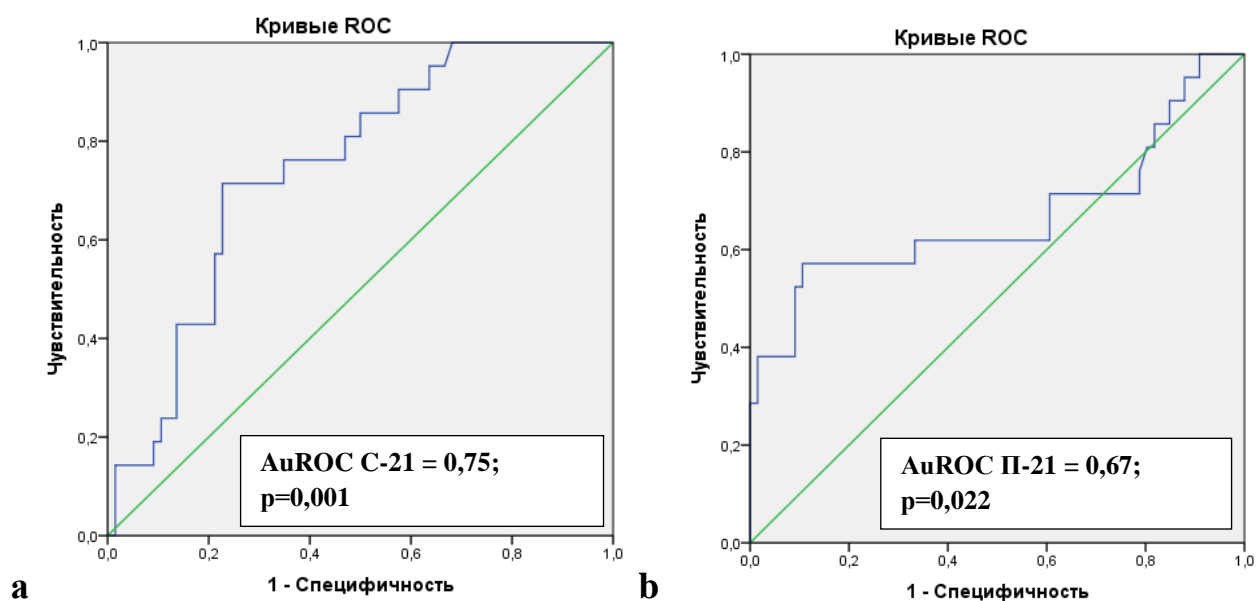
а – прогнозные показатели маркера С-21 в ГС-1;

б – прогнозные показатели маркера П-21 в ГС-1.

Рисунок 4.2 – ROC-кривые, характеризующие уровень экспрессии С-21 и П-21 как диагностический метод РЛ

Чувствительность и специфичность уровня экспрессии П-21 $\geq 1,5$ УЕ и С-21 $\geq 1,6$ УЕ в качестве маркера глиальных церебральных опухолей составила 57% и 71% и 88% и 77% соответственно. ПЦП для С-21 $\geq 1,6$ УЕ составила 50%, а для

П-21 $\geq 1,5$ УЕ – 60%. ПЦО для С-21 $\geq 1,6$ УЕ была 11%, а для П-21 $\geq 1,5$ УЕ – 14%. ROC-кривые, характеризующие С-21 и П-21 как диагностический метод ГЦО, представлены на рисунке 4.3, а, б соответственно.



а – прогностические показатели маркера С-21 в ГС-2;

б – прогностические показатели маркера П-21 в ГС-2.

Рисунок 4.3 – ROC-кривые, характеризующие уровень экспрессии С-21 и П-21 как диагностический метод ГЦО

Таким образом, определение уровня экспрессии С-21 может быть хорошим диагностическим маркером при колоректальном раке, раке легкого и глиальных церебральных опухолях, обладая достаточными чувствительностью и специфичностью, ПЦП и ПЦО

4.2 Однофакторный анализ прогнозирования колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого, глиальных церебральных опухолей

Для выделения наиболее значимых предикторов наличия колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого и глиальных церебральных опухолей был выполнен однофакторный анализ (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Результаты однофакторного анализа

Локализация	Предиктор	Относительный риск (95%; ДИ)	p
КРР	C-21 $\geq 2,0$ УЕ	2,51 (1,76; 3,58)	<0,0001
	П-21 $\geq 1,6$ УЕ	2,41 (1,75; 3,35)	<0,0001
	Возраст, лет $\geq 61,0$	2,65 (1,67; 4,25)	<0,0001
	РЭА >N	2,4 (1,93; 2,99)	<0,0001
	СА-19.9 >N	2,27 (1,85; 2,78)	0,0001
РЛ	C-21 $\geq 2,5$ УЕ	6,2 (2,38; 16,18)	<0,0001
	П-21 $\geq 3,5$ УЕ	23 (7,60; 69,56)	<0,0001
	Возраст, лет $\geq 54,0$	9,61 (1,32; 69,95)	0,0032
ГЦО	C-21 $\geq 1,6$ УЕ	4,75 (2,06; 10,97)	<0,0001
	П-21 $\geq 1,5$ УЕ	4,77 (2,37; 9,60)	<0,0001

Наиболее значимыми факторами при КРР оказались возраст $>61,0$ лет, уровень экспрессии C-21 $\geq 2,0$ УЕ и П-21 $\geq 1,6$ УЕ, при РЛ уровень экспрессии П-21 $\geq 3,5$ УЕ, Возраст, лет $\geq 54,0$, уровень экспрессии C-21 $\geq 2,5$ УЕ, при ГЦО уровень экспрессии П-21 $\geq 1,5$ УЕ и C-21 $\geq 1,6$ УЕ.

4.3 Регрессионный анализ прогнозирования колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого, глиальных церебральных опухолей на основе уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне

Для определения наличия онкологического процесса (КРР, РЛ, ГЦО) была построена логистическая регрессия, основой которой стал уровень экспрессии C-21.

При КРР пошаговое включение факторов приводит к повышению качества построенной регрессионной модели таблица 4.2.

Таблица 4.2 – Регрессионная модель колоректального рака

Фактор	Среднее удельное/максимальное изменение риска, %	Отношение шансов (ДИ 95%)	Коэфф. регрессии	p
Константа	–	–	-4,7609	<0,0001
С-21, УЕ	6,1% / 71,4%	1,30 (1,11; 1,53)	0,2636	0,0014
Возраст, лет	1,5% / 76,4%	1,07 (1,03; 1,10)	0,0655	<0,0001

Основным фактором является возраст, при его включении качество регрессионной модели становится средним AuROC =0,79. Показатели качества и формула логистической модели представлены в таблице 4.3 и подтверждены ROC-анализом (рисунок 4.4).

Таблица 4.3 – Показатели качества и формула логистической регрессионной модели для колоректального рака

Значимость регрессии	AuROC =0,789, n=131, p<0,0001
Формула регрессии	Риск = $1 / (1 + \text{Exp}(-(-4,761 + 0,264 \times \text{Слюна 2-deltaCt} + 0,065 \times \text{Возраст})))$, (1)

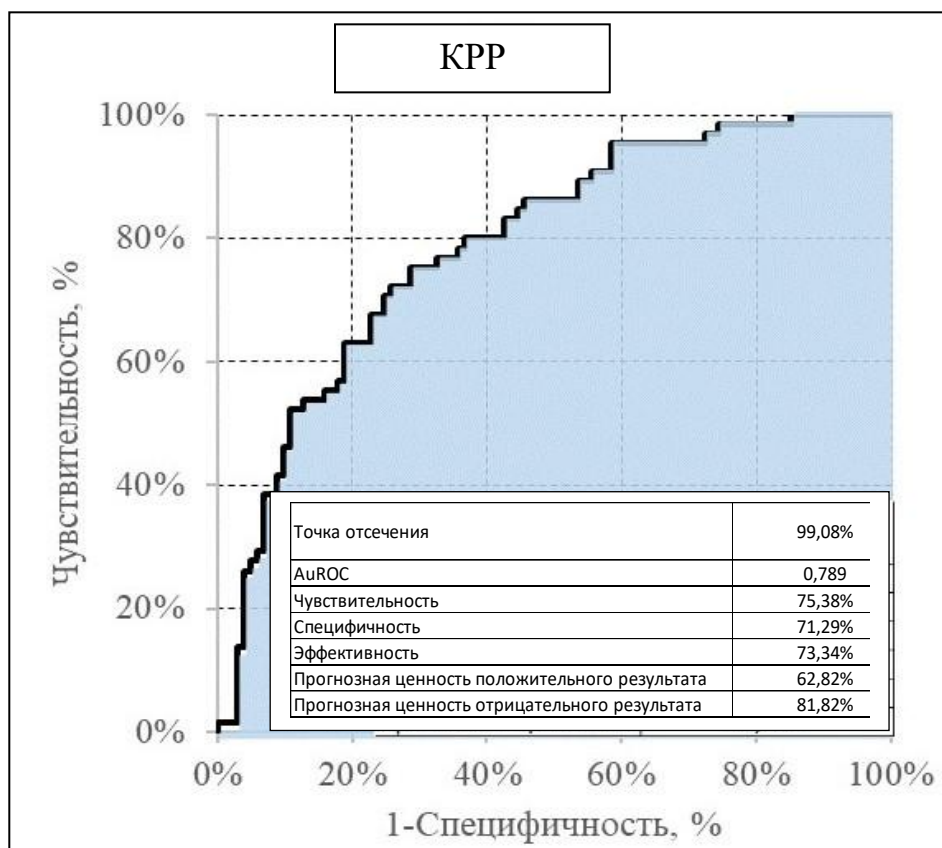


Рисунок 4.4 – ROC-кривая логистической модели для колоректального рака

Структура модели регрессии для немелкоклеточного рака легкого представлена в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Регрессионная модель немелкоклеточного рака легкого

Фактор	Среднее удельное/максимальное изменение риска, %	Отношение шансов (ДИ 95%)	Кoeff. регрессии	p
Константа	–	–	-2,3646	<0,0001
C-21, УЕ	4,0% / 90,4%	1,24 (1,06; 1,45)	0,2169	0,0069

Прогнозные показатели качества построенной логистической модели для РЛ представлены в таблице 4.5 и подтверждены ROC-анализом (рисунок 4.5).

Таблица 4.5 – Показатели качества и формула логистической регрессионной модели для немелкоклеточного рака легкого

Значимость регрессии	AuROC =0,702, n=80, p<0,0001
Формула регрессии	Риск = $1 / (1 + \text{Exp}(-(-2,365 + 0,217 \times \text{Слюна } 2\text{-deltaCt})))$, (2)

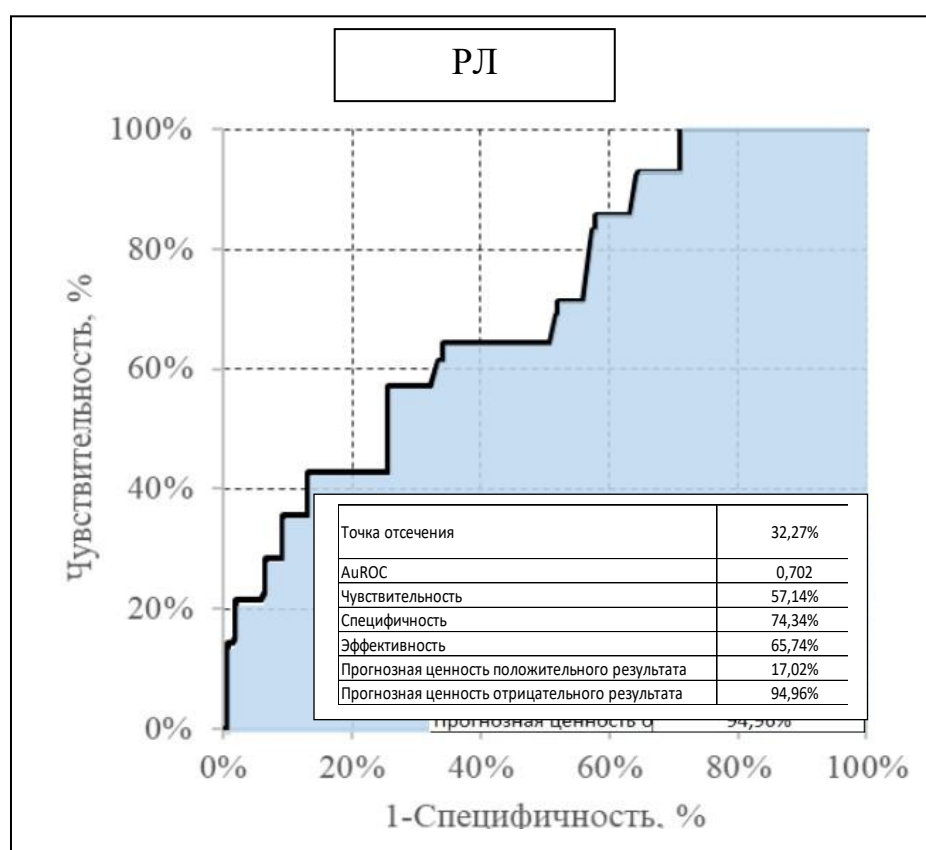


Рисунок 4.5 – ROC-кривая логистической модели для рака легкого

Учитывая низкое качество модели AuROC =0,70, последующее включение фактора «Возраст» существенно не повлияло на ее качество.

В случае глиальных церебральных опухолей уровень экспрессии С-21 не вписывается в регрессионную модель ($p=0,067$). Основой логистической регрессии для ГЦО стал уровень экспрессии П-21. Структура модели регрессии для ГЦО представлена в таблице 4.6.

Прогнозные показатели качества построенной логистической модели для ГЦО представлены в таблице 4.7 и подтверждены ROC-анализом (рисунок 4.6).

Таблица 4.6 – Регрессионная модель глиальных церебральных опухолей

Фактор	Среднее удельное/максимальное изменение риска, %	Отношение шансов (ДИ95%)	Коэфф. регрессии	p
Константа	–	–	-2,2905	<0,0001
П-21, УЕ	21,6% / 90,6%	2,42 (1,43; 4,10)	0,8829	0,0010

Таблица 4.7 – Показатели качества и формула логистической регрессионной модели для глиальных церебральных опухолей

Значимость регрессии	AuROC =0,552, n=87, p<0,0001
Формула регрессии	$\text{Риск} = 1 / (1 + \text{Exp} (- (-2,29 + 0,883 \times \times \text{Плазма } 2\text{-deltaCt}))), \quad (3)$

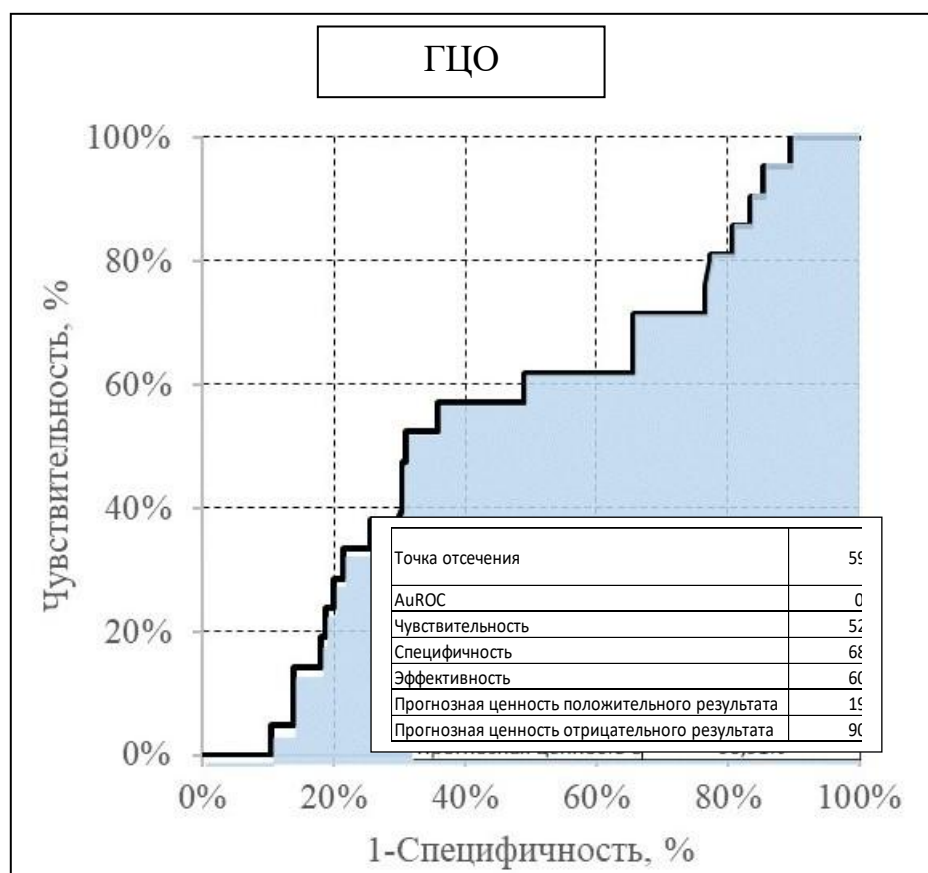


Рисунок 4.6 – ROC-кривая логистической модели для глиальных церебральных опухолей

Учитывая низкое значение $AuROC = 0,55$, качество построенной модели – сомнительное.

Таким образом, модель прогнозирования наличия онкологического процесса на основе уровня экспрессии С-21 хорошо показала себя при КРР, тогда как при раке легкого качество построенной модели оказалось низким, а при глиальных церебральных опухолях основой логистической регрессии и вовсе стал уровень экспрессии П-21 с сомнительным качеством построенной модели.

4.4 Формирование рискованных классов и модель прогнозирования колоректального рака, основанная на определении уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови (диагностический алгоритм колоректального рака)

Для оценки влияния уровня экспрессии С-21, П-21 и возраста, как основных факторов влияющих на развитие КРР, был произведен анализ рисков. Наиболее высокий риск (Риск =100,0%, n=21) развития КРР наблюдается у пациентов со следующей комбинацией факторов: «С-21 $\geq 2,0$ » и «П-21 $\geq 2,6$ ». Наименьший уровень риска (Риск =16,3%, n=43) развития КРР наблюдается для следующей комбинации факторов: «С-21 $< 2,0$ » и «Возраст, лет $< 62,0$ ». Самым крупным классом с n=43 и уровнем риска в 16,3% является следующая комбинация факторов: «С-21 $< 2,0$ » и «Возраст, лет $< 62,0$ » (рисунок 4.7).

Прогностическая ценность построенной диаграммы принятия решений была проверена при ROC-анализе (рисунок 4.8). $AuROC$ составила 0,86, что говорит о высоком прогнозном качестве смоделированного дерева решений.

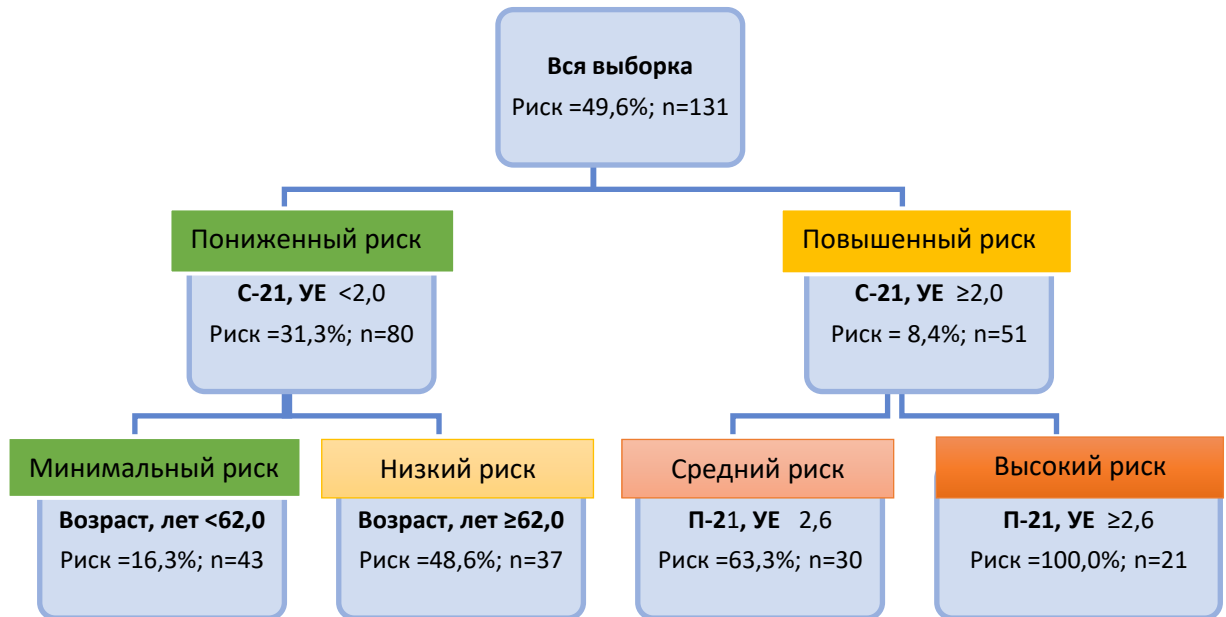


Рисунок 4.7 – Диаграмма дерева решений для показателя КРР на основе комбинации 3-х влияющих факторов (диагностический алгоритм)

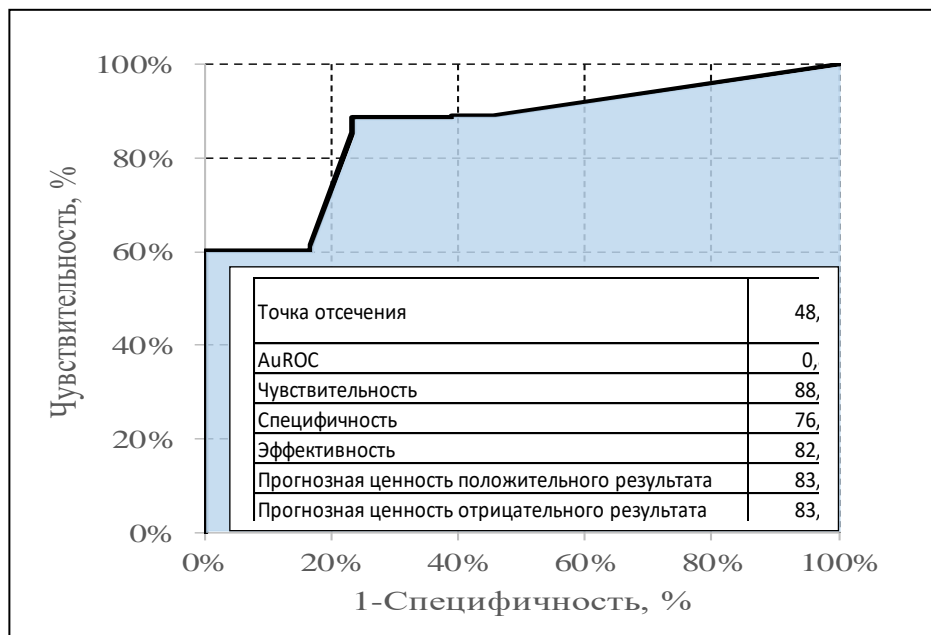


Рисунок 4.8 – ROC-кривая для дерева решений

Таким образом, минимальный риск развития КРР наблюдается у пациентов моложе 62 лет и уровнем экспрессии C-21 <2,0 УЕ, тогда как высокий риск развития онкологического процесса был выявлен у пациентов с уровнем экспрессии C-21 ≥2,0 УЕ и P-21 ≥2,6 УЕ без участия возраста.

**4.5 Сравнительный анализ предложенного диагностического алгоритма
колоректального рака с используемым в практике
иммунохроматографическим тестом на определение скрытой крови в стуле
(Fecal Occult Blood Test)**

При проведении сравнительного анализа из группы пациентов с подтвержденным КРР случайно были выбраны 15 человек. У этих пациентов был произведен забор кала, для выполнения анализа на выявление скрытой крови в стуле (FOB), который используется в качестве скринингового теста на КРР в амбулаторных условиях, а также осуществлен забор слюны и плазмы крови для определения уровня экспрессии микроРНК-21. При проведении теста «FOB» было определено наличие (+) или отсутствие (-) скрытой крови в стуле. Для С-21 и П-21 прогнозирования КРР были взяты точки отсечения уровня экспрессии из таблицы 4.1. Таким образом, считалось, что пациент получил положительный тест, если у него результаты тестов С-21 $\geq 2,0$ УЕ или П-21 $\geq 1,6$ УЕ. Сравнительный анализ методов представлен в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Сравнение трёх методов диагностики КРР

Показатель, период	Группа			Всего	p
	С-21 (n=15)	П-21 (n=15)	FOB (n=15)		
Положительный исход	10 (66,7%)	15 (100,0%)	11 (73,3%)	36	0,0541

Из 15 человек с пониженным риском оказалось 5 человек (33,3%), тогда как с повышенным риском было 10 человек (66,7%). Среди пациентов пониженного риска минимальный риск 13,3% (n=2) и низкий риск 20% (n=3), что соответствовало положительному тесту FOB 18,2% (n=2 и n=2 соответственно). В группе пациентов повышенного риска средний риск наблюдался у 13,3% (n=2),

что также соответствовало положительному тесту FOB. При этом группа высокого риска составила 53,4% (n=8), из которых только у 45,5% (n=5) был положительный тест FOB. Сравнительный анализ предложенного диагностического алгоритма и теста FOB представлены на рисунке 4.9.

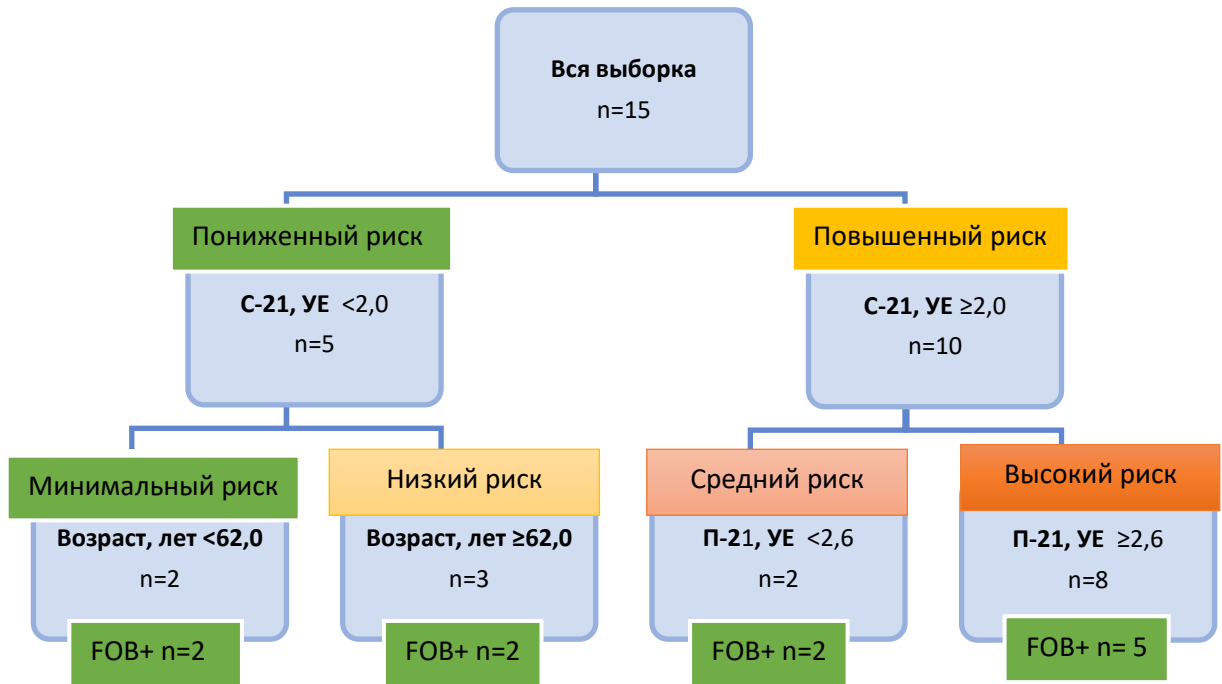


Рисунок 4.9 – Сравнительный анализ предложенного диагностического алгоритма КРР с тестом FOB

Учитывая полученные данные, диагностический алгоритм КРР, основанный на определении уровня экспрессии микро РНК-21 в слюне и плазме крови, сопоставим с используемым в настоящее время методом неинвазивной диагностики КРР иммунохроматографическим тестом FOB, а в группе пациентов с высоким риском превосходит его практически в 2 раза.

Исследование уровня экспрессии С-21 ввиду доступности биоматериала, может проводиться при всех видах исследуемых опухолей и быть ассоциировано с риском наличия опухолевого процесса. Однако более надежная ассоциация показана для КРР.

Уровни экспрессии как С-21, так и П-21 могут быть применены в рамках алгоритма диагностики КРР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на применяемые в настоящее время программы ранней диагностики и скрининга КРР, это заболевание продолжает занимать ведущие позиции по показателям заболеваемости и смертности. Это обусловлено изменением в образе жизни и диете (увеличение потребления продуктов животного происхождения, малоподвижный образ жизни, снижение физической активности и увеличению избыточной массы тела, чрезмерное употребление алкоголя и курение сигарет) в странах с низким и средним уровнем жизни, которые независимо связаны с риском колоректального рака. Стабилизация или снижение данных показателей наблюдается в высокоразвитых странах, где, тем не менее, они остаются в числе наиболее высоких в мире. Ожидается, что к 2030 году заболеваемость КРР увеличится на 60%, что будет соответствовать более 2,2 миллионов новых случаев и 1,1 миллиону летальных исходов [97]. В настоящее время используемые неинвазивные методы диагностики КРР обладают недостаточной чувствительностью и специфичностью [87, 157], а инвазивные методы в виду риска осложнений имеют ограничения в применении в рутинной практике. Таким образом, исследовательские усилия в современной онкологии направлены на поиск менее инвазивных биомаркеров с более высокой точностью для выявления пациентов с КРР.

В качестве потенциальных биомаркеров онкологического процесса в последние годы активно изучают микроРНК в различных биологических средах, включая слюну [128, 189]. Научные данные в области исследований слюны усиливают интерес к этой биологической жидкости как к источнику потенциальных биомаркеров, идентифицированных в различных слюнных «омиках», включая геном, микробиом, эпигеном, транскриптом, протеом и метаболом [185]. У слюны есть большое преимущество в качестве диагностического материала по сравнению с кровью или тканью. Сбор образцов менее инвазивен, его легко хранить и транспортировать [119]. Кроме того, слюну

можно собирать с более короткими интервалами, чтобы обеспечить динамическое наблюдение за пациентом без какого-либо дискомфорта.

Аберрантные профили экспрессии микроРНК слюнных желез были обнаружены при различных типах рака, что делает их перспективными неинвазивными диагностическими биомаркерами [107].

Одной из главных задач настоящего исследования являлась оценка уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови у пациентов с КРР. Известно, что микроРНК является онкогенной, в том числе при КРР, ранее были показаны повышенная экспрессия в ткани опухоли [132, 165] и в плазме крови [152, 174]. Однако анализ экспрессии микроРНК-21 в слюне при данной локализации опухоли и сопоставление с уровнем экспрессии в плазме в данном исследовании проведен впервые. Также для понимания значений уровня маркеров в зависимости от органной принадлежности впервые выполнен сравнительный анализ уровней экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме при таких онкологических процессах как немелкоклеточный рак легкого и глиальные церебральные опухоли.

Проспективно были отобраны 65 пациентов с верифицированным КРР, 14 пациентов с РЛ и 21 пациент с ГЦО с разными характеристиками опухолевого процесса и стадиями заболевания согласно классификации TNM. Всем больным выполнялся стандартный объем исследований согласно рекомендациям AOP (2011), RUSSCO (2013). Дополнительно выполняли анализ ПЦР для определения уровня экспрессии С-21 и П-21. В исследование не включали пациентов с ранее перенесенными хирургическими вмешательствами по поводу онкологической патологии, химиотерапии и лучевой терапии в анамнезе, а также воспалительными заболеваниями толстой кишки и органов ЖКТ. Группа сравнения, состоящая из здоровых добровольцев, составила 66 человек.

В группе пациентов с КРР в основном преобладали пациенты пожилого (38,9%) и среднего возраста (24,4%), что соответствует другим данным, описывающим популяцию больных с КРР [68]. По локализации опухолевого процесса пациенты распределились следующим образом: у 11 (16,9%) больных

опухоль определялась в восходящей ободочной кишке, в поперечной ободочной кишке – у 3 (4,6%), в нисходящей ободочной кишке – у 37 (56,9%), в прямой кишке – у 14 (21,5%) пациентов. Таким образом, основная масса опухолей приходилась на левые отделы толстой кишки, включая прямую кишку, что также не противоречит данным литературы [27].

В группе пациентов с РЛ в основном преобладали пациенты пожилого (50%) и старческого возраста (21,4%), тогда как среди пациентов КГ и пациентов с ГЦО в основном были пациенты молодого (31,8% и 38,1%) и среднего возраста (31,8% и 38,1%), что также было описано и в других работах [18, 136].

Дополнительно у пациентов с КРР и пациентов КГ был выполнен анализ на онкомаркеры (РЭА, СА-19.9, СА-125), которые стандартно используются при диагностике КРР в рутинной практике. По данным нашего исследования, онкомаркер СА-19.9 с показателем выше нормы определялся у пациентов с КРР низкой степени дифференцировки на поздних стадиях заболевания с лимфогенным метастазированием и локализацией опухолевого процесса в нисходящем отделе толстой кишки в сочетании с повышенным уровнем онкомаркера РЭА, что не противоречит данным мировой литературы [120, 153, 173]. Онкомаркер СА-125 (n=4) определялся у лиц старческого возраста с распространенным опухолевым процессом. В КГ онкомаркер СА-125 был выявлен у пациентов молодого (n=3), среднего (n=2) и старческого (n=1) возраста. Объективных причин, влияющих на повышение уровня СА-125, у данных пациентов не было. Из сопутствующей патологии у пациентов молодого возраста был диагностирован хронический гастрит. У пациентов среднего и старческого возраста преобладала контролируемая артериальная гипертензия. Таким образом, СА-125 не является специфичным маркером КРР, хотя в последние годы появились исследования, которые продемонстрировали его диагностическое значение при перитонеальной инвазии при КРР [88, 123].

Так же в ОГ пациентов с КРР рандомно выбрано 15 человек, которым был выполнен анализ кала на скрытую кровь в стуле (FOB). Положительный тест

(+FOB) был у 11-и пациентов пожилого и старческого возраста с распространенным опухолевым процессом.

При проведении сравнения уровня экспрессии С-21 ($9,67 \pm 18,52$ УЕ) и П-21 ($3,71 \pm 7,38$ УЕ) у пациентов с КРР (ОГ) и у здоровых добровольцев (КГ) С-21 ($1,30 \pm 2,45$ УЕ) и П-21 ($0,84 \pm 0,64$ УЕ) нам удалось выявить, что уровень экспрессии микроРНК-21 у пациентов с КРР выше, чем у здоровых добровольцев, что подтверждает данные мировой литературы [85, 109, 152, 175]. Также нами было отмечено, что уровень экспрессии С-21 превышает П-21 у пациентов с КРР, а в сравнении с уровнем экспрессии С-21 у контрольной группы этот показатель у пациентов с КРР значительно выше. При дальнейшем сравнении уровня экспрессии С-21 и П-21 в группе контроль было отмечено, что уровень экспрессии С-21 несколько преобладает над П-21 (таблица 3.4). Полученный результат свидетельствует о том, что появление молекул микроРНК в кровотоке, вероятнее всего, связано с их секрецией из клеток и/или выходом в кровоток из разрушенных клеток ткани или крови. Более высокий уровень экспрессии микроРНК в слюне может быть обусловлен не только ее локальным образованием в результате апоптоза или некроза клеток [167], но и попаданием в секрет слюнных желез микроРНК из кровотока, путем активного или пассивного транспорта в виду известного хорошего кровоснабжения железы [158, 166].

Так как ОГ и КГ отличались по возрасту, мы провели анализ уровня экспрессии С-21 и П-21 в отдельных возрастных группах. Уровень экспрессии С-21 у пациентов пожилого и молодого возраста в ОГ, ГС-1 и ГС-2 был значимо выше, чем в КГ, тогда как уровень экспрессии П-21 в ОГ, ГС-1 и ГС-2 был значимо выше, чем в КГ только у пациентов пожилого возраста.

Это может быть обусловлено большой численностью пациентов в группе пожилого возраста (ОГ, $n=34$; КГ, $n=17$), а вот повышение уровня экспрессии С-21 у пациентов молодого возраста требует дальнейшего изучения на большем материале.

Зависимости повышения уровня экспрессии П-21 и С-21 от пола пациента выявлено не было, несмотря на их высокий уровень, как у мужчин, так и у женщин в ОГ, ГС-1 и ГС-2.

Учитывая данные многочисленных исследований о повышенной экспрессии микроРНК-21 в плазме и сыворотке крови у пациентов с КРР, что было обусловлено глубиной инвазии опухоли, отдаленным метастазированием и продвинутой стадией заболевания (TNM) [85, 174, 175], мы провели сравнительный анализ уровня экспрессии С-21 и П-21 в зависимости от стадии онкологического процесса и распространенности опухолевого процесса согласно классификации TNM (8-е издание 2018 г.). Было показано, что уровень экспрессии П-21 на разных стадиях и при разной степени инвазии онкологического процесса не отличался. При этом уровень экспрессии С-21 на ранних стадиях онкологического процесса (0-II стадия) и при небольшой глубине инвазии опухоли (T in situ – T2) был значительно выше, чем на более поздних стадиях заболевания и при большей локальной инвазии опухоли (рисунок 3.1) в отличие от РЭА и СА19.9, которые были повышены в основном при 3 и 4 стадиях онкологического процесса (таблица 3.1).

Повышение уровня экспрессии С-21 на начальных стадиях КРР было подтверждено и корреляционным анализом, который показал обратную взаимосвязь между категорией Т и уровнем экспрессии С-21 (таблица 3.8). Подобная особенность экспрессии микроРНК21 в слюне при КРР, продемонстрированная нами впервые, указывая на возможный потенциал этой молекулы как раннего маркера КРР, что требует дальнейших исследований.

Так как более однородными по клиническим характеристикам были ОГ и ГС-1, а уровни экспрессии С-21 при минимальной инвазии опухоли были выше, чем при большей глубине инвазии, мы сравнили данные групп по уровню экспрессии, объединив T in situ и T2 в ОГ (n=12) и T1 и T2 в ГС-1 (n=11). Достоверных различий в исследуемых группах по уровню экспрессии как С-21, так и П-21 выявлено не было ($p=0,17$ и $p=0,1$ соответственно), что может говорить о том, что при небольшом размере опухолевой массы любого онкологического

процесса уровень экспрессии С-21 повышен. Однако это требует дальнейшего более детального изучения. Корреляции повышения уровня экспрессии С-21 у пациентов с РЛ на начальных стадиях заболевания выявлено не было (таблица 3.10).

Другой интересной особенностью экспрессии С-21 в изучаемой когорте больных с КРР был ее более высокий уровень при локализации в нисходящем отделе толстой кишки при сравнении с прямой кишкой. Нельзя исключить, что С-21 может дополнительно обладать топической специфичностью при диагностике КРР, однако это требует изучения на большем количестве пациентов.

Помимо распространения опухолевого процесса по категории Т нами был проведен корреляционный анализ в ОГ пациентов, включивший анализ ассоциаций уровня экспрессии П-21 и С-21 с некоторыми другими клинико-патологическими признаками опухоли. Корреляции экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме с возрастом, полом, стадией и локализацией онкологического процесса отмечено не было. В этой связи отличия по возрасту между контрольной группой и группой пациентов с КРР малозначимы для общей оценки исследуемых маркеров. Отсутствие корреляции уровня экспрессии С-21 со стадией заболевания, вероятнее всего, обусловлено небольшой выборкой исследуемых групп и требует дальнейшего изучения. Также это можно объяснить и тем, что участие микроРНК-21 в онкогенезе имеет, скорее всего, качественную роль.

Выявленная умеренная положительная корреляция между уровнями экспрессии С-21 и П-21 в группе КРР ($p \leq 0,05$) и КГ ($p \leq 0,01$) нам представляется закономерной, так как молекулы микроРНК попадают в слюну не только из крови посредством различных клеточных механизмов, таких как трансцеллюлярные (пассивная внутриклеточная диффузия и активный транспорт) или парацеллюлярные пути (внеклеточная ультрафильтрация), но и образуются локально в результате апоптоза или некроза клеток. Следует отметить, что высокий уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне указывает на огромную ценность слюны как диагностической биожидкости [80, 168].

При дальнейшем определении уровня экспрессии С-21 и П-21 у пациентов с РЛ выявлено, что достоверных различий по различным клиническим характеристикам группы выявлено не было, как и не отмечалось достоверных взаимосвязей уровней экспрессии П-21 и С-21 с клиническими параметрами и между собой (таблица 3.10). Тогда как у пациентов с ГЦО (ГС-2) выявлено, что уровень экспрессии С-21 при молодом и среднем возрасте был достоверно меньше, чем при пожилом возрасте ($p=0,006$ и $p=0,017$, соответственно). Достоверных различий в уровне экспрессии П-21 по возрастным группам при ГЦО получено не было ($p=0,86$). Также не отмечалось различий уровня экспрессии С-21 и П-21 по полу ($p=0,62$ и $p=0,18$, соответственно). Так как ГЦО не классифицируются по TNM, сравнительный анализ по степени распространенности опухолевого процесса не проводился. Полученные в группах РЛ и ГЦО результаты могут быть обусловлены малыми выборками пациентов и требуют дальнейшей валидации.

Нами впервые было продемонстрировано, что при КРР, как и при РЛ и ГЦО, уровень экспрессии С-21 и П-21 был достоверно выше, чем в КГ (рисунки 3.2, 3.3), что позволяет применять С-21 и П-21 в качестве онкомаркера.

При дальнейшем анализе уровней экспрессии С-21 и П-21 как диагностического метода таких онкологических патологий, как КРР, РЛ и ГЦО, было отмечено, что уровень экспрессии С-21 при КРР $\geq 2,0$ УЕ (ПЦП – 73%; ПЦО – 31%), при РЛ $\geq 2,5$ (ПЦП – 50%; ПЦО – 8%), при ГЦО $\geq 1,6$ УЕ (ПЦП – 50%; ПЦО – 11%), и П-21 при КРР $\geq 1,6$ УЕ (ПЦП – 83%; ПЦО – 34,5%), РЛ $\geq 3,5$ УЕ (ПЦП – 100%; ПЦО – 4,4%) и ГЦО $\geq 1,5$ УЕ (ПЦП – 60%; ПЦО – 14%) обладают достаточно хорошими показателями AuROC и могут быть надежными маркерами диагностики данных онкологических процессов, обладая достаточными чувствительностью и специфичностью (таблица 4.1, рисунки 4.1-4.3).

При проведении в группах пациентов с КРР, РЛ и ГЦО однофакторного анализа (таблица 4.1) для выделения наиболее значимых предикторов наличия онкологического процесса ключевыми статистически значимыми факторами, которые указывают на наличие КРР, стали уровень экспрессии С-21 $\geq 2,0$ УЕ,

П-21 $\geq 1,6$ УЕ, возраст старше 61 года, РЭА и СА-19.9 $> N$, для РЛ уровень экспрессии С-21 $\geq 2,5$ УЕ, П-21 $\geq 3,5$ УЕ, возраст ≥ 54 лет, а для ГЦО С-21 $\geq 1,6$ УЕ, П-21 $\geq 1,5$ УЕ. Значение возраста, РЭА и СА-19.9 в отношении КРР хорошо известно и описано [10, 178]. Следует подчеркнуть, что роль микроРНК-21 в основном в плазме, в качестве предиктора как КРР, так и РЛ и ГЦО, также была показана в ряде исследований [13, 78, 152], тогда как прогностическое значение С-21 для данных онкологических процессов нами продемонстрировано в представленном исследовании впервые.

Таким образом, при построении логистической регрессии, которая показывает наличие риска онкологического процесса на основе уровня экспрессии С-21, и пошаговым включением наиболее значимых факторов было выявлено: при РЛ в регрессионной модели мы использовали только уровень экспрессии С-21 и показали AuROC = 0,7, что говорит об относительно низком качестве модели. Добавление возраста существенно не повлияло на качество данной модели. В случае ГЦО уровень экспрессии С-21 не вписывается в регрессионную модель в отличие от уровня экспрессии П-21. Модель показала AuROC = 0,55, что говорит о сомнительном ее качестве. При КРР добавление к уровню экспрессии С-21 возраста повышает качество модели AuROC $> 0,75$, что явилось наилучшей полученной регрессионной моделью прогнозирования рака в нашем исследовании с высокой чувствительностью (75,4%) и специфичностью (71,3%) и достаточными ПЦП 62,8% и ПЦО 81,8% для скринингового теста.

Представленный регрессионный анализ свидетельствует о том, что С-21 хорошо рекомендует себя при КРР. Уровень экспрессии С-21 $\geq 2,0$ УЕ может быть еще одним, новым, высокочувствительным и высокоспецифичным биомаркером КРР, который также может быть использован у пациентов старше 60 лет.

В качестве доступного и быстрого метода выявления КРР в клинической практике, основываясь на трех наиболее значимых и легко определяемых маркерах – возраста, П-21 и С-21, произведено формирование рискованных классов и их ранжирование по уровню риска наличия опухолевого процесса. Построенная диаграмма дерева решений (рисунок 4.7) обладает высокой чувствительностью и

специфичностью (89% и 77%). Прогнозная ценность данной модели проверена ROC-анализом и говорит о ее высоком качестве (рисунок 4.8). На основе выполненного анализа впервые предложен диагностический алгоритм оценки риска наличия КРР, позволяющий отнести пациента к группе риска по наличию КРР на основании уровня экспрессии С-21 и П-21. Так, к повышенному риску относятся пациенты, у которых уровень экспрессии С-21 более 2,0 УЕ. Группа повышенного риска на основании уровня экспрессии П-21 подразделяется на средний и высокий риск при П-21 более 2,6 УЕ. Эффективность данного алгоритма в рутинной практике, в том числе при скрининге злокачественного процесса в толстой кишке, требует дальнейшего исследования.

В нашем исследовании мы сравнили результаты применения разработанного алгоритма диагностики КРР с основным методом неинвазивной диагностики КРР, тестом, основанным на определении скрытой крови в стуле методом иммунохроматографического анализа (FOBT) [176]. Данный метод диагностики хоть и является неинвазивным, но требует от пациентов выполнения подготовительных мероприятий перед непосредственным проведением анализа, а его положительный результат может свидетельствовать не только о наличии онкологической патологии колоректальной зоны. Так как настоящее исследование определило, что С-21 ≥ 2 УЕ а П-21 $\geq 1,6$ УЕ обладают достаточными чувствительностью и специфичностью, чтобы использовать их в качестве неинвазивных маркеров диагностики КРР, мы провели сравнительный анализ между тремя методами неинвазивной диагностики КРР. Статистически значимых различий в группах отмечено не было (таблица 4.8). Таким образом, применение данного алгоритма, основанного на определении уровня экспрессии С-21 и П-21, в качестве скрининга КРР в клинической практике не уступает используемым во всем мире тестам, а забор материала не требует подготовки, прост и легок в исполнении.

Разработанный нами алгоритм диагностики КРР показал себя более надежным методом, чем FOB (рисунок 4.9). Так, «золотой» стандарт диагностики КРР, тест на определение скрытой крови в стуле методом

иммунохроматографического анализа, оказался отрицательным у трех пациентов с КРР, которые, согласно предложенному нами алгоритму, были отнесены в группу высокого риска.

Так как забор слюны для проведения исследования не требует специальной подготовки, безопасен и неинвазивен, интерес к определению уровней экспрессии микроРНК в ней быстро растет [46, 107, 130]. Полученные данные свидетельствуют о перспективности исследования уровня экспрессии микроРНК-21 как в слюне, так и в плазме крови. А определение его нормативного показателя при различных онкологических процессах является актуальной задачей и требует дальнейшего изучения. С этой целью следует оценить большую группу пациентов и контрольную группу, а в последующем построить модель прогнозирования для каждой онкологической патологии, которая будет легко и свободно использоваться в качестве инструмента скрининга и мониторинга.

ВЫВОДЫ

1. Уровень экспрессии С-21 и П-21 в группе пациентов с колоректальным раком ($9,67 \pm 18,52$ УЕ и $3,71 \pm 7,38$ УЕ) был выше, чем в группе здоровых добровольцев ($1,3 \pm 2,4$ УЕ и $0,84 \pm 0,64$ УЕ) и не зависел от пола и возраста. Также отмечалось повышение уровня экспрессии С-21 при ранних стадиях колоректального рака.
2. Уровень экспрессии С-21 $\geq 2,0$ УЕ (чувствительность – 61% и специфичность – 83%, прогностическая ценность положительного результата – 73%; прогностическая ценность отрицательного результата – 31%) и П-21 $\geq 1,6$ УЕ (чувствительность – 52% и специфичность – 89%, прогностическая ценность положительного результата – 83%; прогностическая ценность отрицательного результата – 34,5%) обладают хорошими показателями AuROC (0,75 и 0,63 соответственно), что делает их надежными маркерами диагностики колоректального рака. Значимыми факторами риска наличия колоректального рака, при однофакторном анализе, оказались возраст $>61,0$ лет ($p < 0,0001$), уровень экспрессии С-21 $\geq 2,0$ УЕ и П-21 $\geq 1,6$ УЕ ($p < 0,0001$).
3. Модель прогнозирования наличия онкологического процесса на основе уровня экспрессии С-21 хорошо показала себя при КРР (AuROC = 0,79) в отличие от немелкоклеточного рака легкого (AuROC = 0,70) и глиальных церебральных опухолей (AuROC = 0,50), а предложенный алгоритм диагностики КРР в виде модели дерева решений, основанный на трех наиболее значимых факторах, С-21, П-21 и возраста, позволяет стратифицировать пациентов по риску наличия КРР и обладает высокими чувствительностью (88,7%) и специфичностью (76,6%) при AuROC = 0,86.
4. Сравнительный анализ между предложенным диагностическим алгоритмом (С-21 ≥ 2 УЕ, П-21 $\geq 1,6$ и возраст $>61,0$) и используемым в настоящее время методом неинвазивной диагностики колоректального рака на основе

иммунохроматографического теста определения скрытой крови в стуле (FOB) показал отсутствие статистически значимого различия между сравниваемыми маркерами ($p=0,0541$), что говорит о возможности его применения с целью скрининга.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью повышения эффективности диагностики колоректального рака целесообразно определять уровень экспрессии С-21 и П-21 методом ОТ-ПЦР.
2. Всех пациентов при значениях уровня экспрессии С-21 ≥ 2 УЕ необходимо отнести к группе повышенного риска наличия колоректального рака и рекомендовать выполнение фиброколоноскопии.
3. Разработанный алгоритм неинвазивной диагностики колоректального рака является безопасным, простым в исполнении, не требует предварительной подготовки и стимуляции, что позволяет рекомендовать его для ранней диагностики после валидации.
4. Использование микроРНК-21 в диагностике таких солидных опухолей как немелкоклеточный рак легкого (П-21 $\geq 3,5$ УЕ и С-21 $\geq 2,5$ УЕ) и глиальные церебральные опухоли (П-21 $\geq 1,5$ УЕ и С-21 $\geq 1,6$ УЕ), обладающих низким уровнем доказательности модели (AuROC при РЛ=0,70, при ГЦО=0,55), требует дальнейшего изучения на большей выборке пациентов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Оценка эпигенетических биомаркеров – это развивающаяся область в онкологии, которая может помочь в скрининге рака, диагностике, идентификации подтипов опухолей, а также в прогнозировании ответа на терапию. Настоящее исследование продемонстрировало перспективность использования слюны в качестве материала для проведения неинвазивной диагностики колоректального рака, заложив основу для последующего валидационного исследования. В дальнейшем целесообразно оценить потенциальное использование микроРНК-21 слюны для скрининга ранних стадий колоректального рака, определения прогноза и мониторинга заболевания. Также необходимо выявление других специфических для колоректального рака микроРНК слюны, которые могут быть использованы для разработки персонализированного подхода к диагностике и лечению колоректального рака.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЗК	– воспалительные заболевания кишечника
ВКС	– видеокOLONоскопия
ВЭГДС	– видеоэзофагогастродуоденоскопия
ГС-1	– группа сравнения 1 (пациенты с немелкоклеточным раком легкого)
ГС-2	– группа сравнения 2 (пациенты с глиальными церебральными опухолями)
ГЦО	– глиальные церебральные опухоли
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
КГ	– контрольная группа (здоровые добровольцы)
КРР	– колоректальный рак
КТ	– компьютерная томография
МикроРНК	– малая неcodирующая белок молекула РНК
мРНК	– матричная РНК
МРТ	– магнитно-резонансная томография
МСКТ	– мультиспиральная компьютерная томография
НК	– нуклеиновые кислоты
ОГ	– основная группа (пациенты с колоректальным раком)
ОТ-ПЦР	– обратная транскриптазная полимеразная цепная реакция
П-микроРНК	– первичная микроРНК
П-21	– микроРНК-21 в плазме крови
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РЛ	– немелкоклеточный рак легкого
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РЭА	– раковый эмбриональный антиген
С-21	– микроРНК-21 в слюне
УЕ	– условные единицы экспрессии

ФКС	– фиброколоноскопия
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
CIMP	– CpG island methylator phenotype
CMS	– Consensus Molecular Subtype
FIT	– Fecal immunochemical test – иммунохимический тест на определение скрытой крови в стуле
FOBT (FOB)	– Fecal Occult Blood Test – тест на определение скрытой крови в стуле
IRS	– ирригоскопия
RISC	– РНК-индуцированный сайленсинговый комплекс
RRS	– ректороманоскопия
RUSSCO	– Russian Society of Clinical Oncology – Российское общество клинических онкологов
TCGA	– Cancer Genome Atlas
TNM	– классификация Tumour, Node, Metastasis – Международная классификация злокачественных опухолей

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян, А.С. Непосредственные результаты субтотальной колэктомии при острой кишечной непроходимости с левосторонней локализацией опухоли / А.С. Акопян, Т.Г. Багдасарян // Актуальные проблемы колопроктологии : материалы научно-практической конференции. – Москва: ИД МЕДПРАКТИКА-М, 2005. – С. 155-156.
2. Беляев, А.М. Возможности нестандартных подходов к лечению острой толстокишечной непроходимости / А.М. Беляев, С.Ю. Дворецкий // Достижения и перспективы лечения и реабилитации в колопроктологии : материалы научно-практической конференции. – Санкт-Петербург: Аграф+, 2007. – С. 63-64.
3. Боровиков, В. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере (с CD-ROM) / В. Боровиков. – 2 издание. – Санкт-Петербург: Питер, 2003. – 687 с.
4. Брайерм, Дж.Д. TNM классификация злокачественных опухолей / Дж.Д. Брайерм, М.К. Господарович, В. Вибгекинд. – 2-е издание на русском языке. – Москва: Логосфера, 2018. – 344 с.
5. Брюсов, П.Г. Проблемы лечения рака ободочной кишки, осложненного острой кишечной непроходимостью / П.Г. Брюсов, Ю.П. Малахов // Совершенствование специализированной медицинской помощи в многопрофильном стационаре : Всероссийская конференция хирургов, посвященная 80-летию юбилею проф. В.П. Петрова. – Красногорск, 2004. – С. 65-67.
6. Воробьев, А.В. Общие вопросы скрининга / А.В. Воробьев // Практическая онкология. – 2010. – Т. 11, № 2. – С. 53-59.
7. Вуколов, Э.А. Основы статистического анализа. Практикум по статистическим методам и исследованию операций с использованием пакетов "Statistica" и "Excel" / Э.А. Вуколов. – Москва: Форум, 2004. – 464 с.

8. Глобальное бремя колоректального рака: эпидемиология, факторы риска / Е.А. Медведева, Г.Г. Марьин, А.А. Лещенко [и др.] // Res. Practical Med. J. – 2022. – Т. 9, № 4. – С. 134-146.
9. Давыдов, М.И. Злокачественные ново-образования в России и странах СНГ в 2000 г. / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель. – Москва, 2002. – С. 14-32.
10. Егоренков, В.В. Скрининг рака толстой кишки / В.В. Егоренков, Ф.В. Моисеенко // Практическая онкология. – 2010. – Т. 11, № 2. – С. 81-87.
11. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. – 252 с.
12. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 г. / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова – Москва, 2015. – 250 с.
13. Киселева, Я.Ю. Циркулирующие микроРНК как диагностические маркеры онкологических заболеваний / Я.Ю. Киселева, С.П. Радько, Н.В. Бодоев // Вестник РАЕН. – 2015. – № 5. – С. 79-85.
14. Колоректальный рак в Тамбовской области: некоторые аспекты эпидемиологии / Н.А. Огнерубов, А.А. Иванников, В.В. Милованов, В.Л. Чанг // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. – 2015. – № 6. – С. 1679-1684.
15. Колоректальный рак и рак прямой кишки : учебное пособие / под ред. С.М. Демидова. – Екатеринбург: Издательство УГМУ, 2016. – 56 с.
16. Колоректальный рак: эпидемиология и факторы риска / Р.А. Старостин, Б.И. Гатауллин, Б.Р. Валитов, И.Г. Гатауллин // Поволжский онкологический вестник. – 2021. – Т. 12, № 4. – С. 52-59.
17. Местно-распространенный рак ободочной кишки / Г.И. Воробьев, К.Н. Саламов, А.П. Жученко [и др.] // Вопросы онкологии. – 1991. – Т. 37, № 7- 8. – С. 864-869.

18. Олюшин, В.Е. Глиальные опухоли головного мозга: краткий обзор литературы и протокол лечения больных / В.Е. Олюшин // *Нейрохирургия.* – 2005. – № 4. – С. 41-47.
19. Поиск новых микроРНК-маркеров для дифференциальной диагностики глиом головного мозга различной степени злокачественности / Е.В. Ступак, С.Е. Титов, Ю.А. Веряскина [и др.] // *Сибирский научный медицинский журнал.* – 2018. – Т. 38, № 6. – С. 85-93. <https://doi.org/10.15372/SSMJ20180613>.
20. Реброва, О. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Реброва. – МедиаСфера: Москва, 2002. – 312 с.
21. Результаты хирургического лечения больных колоректальным раком, осложненным кишечной непроходимостью и кровотечением / В.А. Осипов, М.А. Абдулаев, А.М. Авдеев [и др.] // *Вестник СПбГУ. Серия 11. Медицина.* – 2014. – № 3. – С. 104-117.
22. Сергеев, М.Н. Научные и практические аспекты скрининга / М.Н. Сергеев // *Практическая онкология.* – 2014. – Т. 15, № 1. – С. 37-42.
23. Сергеева, Н.С. Общие представления о серологических биомаркерах и их месте в онкологии / Н.С. Сергеева, Н.В. Маршутина // *Практическая онкология.* – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 147-154.
24. Скворцов, С.В. Опухолевые маркеры в оценке степени распространенности опухолевого процесса при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта / С.В. Скворцов, И.М. Храмченко, Н.Е. Кушлицкий // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 1999. – № 9. – С. 26.
25. Скрининг колоректального рака: общая ситуация в мире и рекомендованные стандарты качества колоноскопии / С.В. Кашин, Н.В. Нехайкова, Д.В. Завьялов [и др.] // *Доказательная гастроэнтерология.* – 2017. – Т. 6, № 4. – С. 32-52. – <https://doi.org/10.17116/dokgastro20176432-52>.
26. Скрининг рака толстой кишки: достижения и перспективы / Е.А. Полянская, М.Ю. Федянин, А.А. Трякин, С.А. Тюлядин // *Онкологическая колопроктология.* – 2018. – Т. 8, № 4. – С. 11-29.

27. Сулимов, Е.П. Оценка степени распространенности колоректального рака, его морфологическая характеристика и тактика оперативного лечения / Е.П. Сулимов, А.А. Кива // Медицинский вестник Юга России. – 2014. – № 2. – С. 83-87.
28. Факторы риска и профилактика колоректального рака / М.Д. Ханевич, А.В. Хазов, Г.Н. Хрыков, О.А. Меджидов // Профилактическая медицина. – 2019. – Т. 22, № 3. – С. 107-111.
29. Халафян, А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных / А.А. Халафян. – 3-е издание. – Москва: ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с.
30. Хомутова, Е.Ю. Мультиспиральная компьютерная виртуальная колоноскопия в диагностике патологии толстой кишки (Обзор литературы) // Е.Ю. Хомутова, Ю.Т. Игнатъев // Медицинская визуализация. – 2008. – № 6. – С. 73.
31. Чиссов, В.И. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) / В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – Москва, 2012. – 260 с.
32. Эпидемиология колоректального рака: мировые и региональные тенденции / Ф.Ш. Алиев, Е.Н. Десятов, А.Г. Крутских [и др.] // Медицинская наука и образование Урала. – 2016. – № 4. – С. 125-128.
33. A comparison of colonoscopy and double-contrast barium enema for surveillance after polypectomy / S.J. Winawer, E.T. Stewart, A.G. Zauber [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 342. – P. 1766-1772.
34. A higher detection rate for colorectal cancer and advanced adenomatous polyp for screening with immunochemical fecal occult blood test than guaiac fecal occult blood test, despite lower compliance rate. A prospective, controlled, feasibility study / Z. Levi, S. Birkenfeld, A. Vilkin [et al.] // Int. J. Cancer. – 2011. – Vol. 128, № 10. – P. 2415-2424. – <https://doi.org/10.1002/ijc.25574>.
35. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis / A. Lujambio, G.A. Calin, A. Villanueva [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105. – P. 13556-13561.

36. A Novel Saliva-Based miRNA Signature for Colorectal Cancer Diagnosis / Ó. Rapado-González, B. Majem, A. Álvarez-Castro [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2019. – Vol. 8, № 12. – P. 2029. – doi: 10.3390/jcm8122029.
37. A plasma microRNA panel for early detection of colorectal cancer / S. Wang, J. Xiang, Z. Li [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2015. – Vol. 136, № 1. – P. 152-161.
38. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer / V. Piñol, A. Castells, M. Andreu [et al.] // *JAMA.* – 2005. – Vol. 293. – P. 1986-1994.
39. Adherence to followup after a positive fecal occult blood test in an organized colorectal cancer screening program in Korea, 2004-2008 / K.S. Choi, H.Y. Lee, J.K. Jun [et al.] // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2012. – Vol. 27, № 6. – P. 1070-1077. – <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06944.x>.
40. An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis / X. Rao, X. Huang, Z. Zhou, X. Lin // *Biostat Bioinforma Biomath.* – 2013. – Vol. 3, № 3. – P. 71-85.
41. An updated Asia Pacific Consensus Recommendations on colorectal cancer screening / J.J. Sung, S.C. Ng, F.K. Chan [et al.] // *Gut.* – 2015. – Vol. 64, № 1. – P. 121-132. – <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306503>.
42. Analysis of air contrast barium enema, computed tomographic colonography, and colonoscopy: prospective comparison / D.C. Rockey, E. Paulson, D. Niedzwiecki [et al.] // *Lancet.* – 2005. – Vol. 365. – P. 305-311.
43. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics / S.J. Henley, E.M. Ward, S. Scott [et al.] // *Cancer.* – 2020. – Vol. 126. – P. 2225.
44. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer / G.Y. Locker, S. Hamilton, J. Harris [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24, № 33. – P. 5313-5327. – doi: 10.1200/JCO.2006.08.2644.

45. Asia Pacific consensus recommendations for colorectal cancer screening / J.J. Sung, J.Y. Lau, G.P. Young [et al.] // *Gut*. – 2008. – Vol. 57, № 8. – P. 1166-1176. – <https://doi.org/10.1136/gut.2007.146316>.
46. Cancer Epigenetic Biomarkers in Liquid Biopsy for High Incidence Malignancies / C. Palanca-Ballester, A. Rodriguez-Casanova, S. Torres [et al.] // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – P. 3016. – <https://doi.org/10.3390/cancers13123016>.
47. Cancer mortality in the European Union, 1988-1997: The fall may approach 80000 deaths a year / F. Levi, F. Lucchini, E. Negri [et al.] // *J. Cancer*. – 2002. – Vol. 98. – P. 636-637.
48. Cancer screening recommendations / Health Authority Abu Dhabi // HAAD. – 2015. – URL: <https://www.haad.ae/haad/tabid/58/ctl/Details/Mid/417/ItemID/471/Default.aspx> (accessed September 12, 2017).
49. Cancer statistics in Japan '13. Japan: foundation for promotion of cancer research / Center for cancer control and information services NCC. – 2013. – URL: <http://www.ncc.go.jp/en/cis/index.html> (accessed September 12, 2017).
50. Cancer Statistics, 2021 / R.L. Siegel, K.D. Miller, H.E. Fuchs, A. Jemal // *CA Cancer J. Clin.* – 2021. – Vol. 71. – P. 7.
51. Challenges to effective cancer control in China, India, and Russia / P.E. Goss, K. Strasser-Weippl, B.L. Lee-Bychkovsky [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2014. – Vol. 15, № 5. – P. 489-538. – <https://doi.org/10.1016/s1>.
52. Characterization of extracellular circulating microRNA / A. Turchinovich, L. Weiz, A. Langheinz, B. Burwinkel // *Nucleic. Acids Res.* – 2011. – Vol. 39, № 16. – P. 7223-7233. – doi: 10.1093/nar/gkr254.
53. Ciafrè, S.A. microRNAs and RNA-binding proteins: a complex network of interactions and reciprocal regulations in cancer / S.A. Ciafrè, S. Galardi // *RNA Biol.* – 2013. – Vol. 10. – P. 935-942.
54. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection / P.S. Mitchell, R.K. Parkin, E.M. Kroh [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105, № 30. – P. 10513-10518.

55. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review) / A. Allegra, A. Alonci, S. Campo [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2012. – Vol. 41, № 6. – P. 1897-1912.
56. Clinical significance of microRNA-21 as biomarker in each Dukes' stage of colorectal cancer / Y. Fukusima, H. Linuma, M. Tsukamoto [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2015. – Vol. 33, № 2. – P. 573-582. – doi:10.3892/or.2014.3614.
57. Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (Hemoccult): an update / P. Hewitson, P. Glasziou, E. Watson [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 103, № 6. – P. 1541-1549. – doi: 10.1111/j.1572-0241.2008.01875.x.
58. Coebergh, J.W.W. Challenges and pitfalls of mass screening in the European Union / J.W.W. Coebergh // *Europ. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 36. – P. 1469-1472.
59. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019. – Atlanta: American Cancer Society, 2017. – URL: https://www.google.ru/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwiV1vHug6LWAhVPL1AKHcJkD_sQFggnMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.cancer.org%2Fcontent%2Fdam%2Fcancer-org%2Fresearch%2Fcancer-facts-andstatistics%2Fcolorectal-cancer-facts-and-figures%2Fcolorectal-cancerfacts-and-figures-2017-2019.pdf&usg=AFQjCNH9sVbZIVb70choNxnLmXzjAEA4Q.
60. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine / G. Binefa, F. Rodriguez-Moranta, A. Teule, M. Medina-Hayas // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20. – P. 6786-808.
61. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy / R.E. Schoen, P.F. Pinsky, J.L. Weissfeld [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 366. – P. 2345-2357.
62. Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: An update / M. Navarro, A. Nicolas, A. Ferrandez, A. Lanás // *World J. Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 23, № 20. – P. 3632-3642. – <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i20.3632>.

63. Colorectal cancer prevention and treatment / C.R. Boland, F.A. Sinicrope, D.E. Brenner, J.M. Carethers // *Gastroenterology*. – 2000. – Vol. 118. – P. S115-S128.
64. Colorectal cancer screening by guaiac faecal occult blood test in France: Evaluation of the programme two years after launching / K. Leuraud, D. Jezewski-Serra, J. Viguier [et al.] // *Cancer Epidemiol.* – 2013. – Vol. 37, № 6. – P. 959-967. – <https://doi.org/10.1016/j.canep.2013.07.008>.
65. Colorectal cancer screening in Canada / Canadian Partnership Against Cancer // Program performance results, January 2009-December 2011. – Toronto, 2013. URL: http://www.google.ru/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0ahUKEwjHovnw_qHWAhUNYVAKHQwSB8cQFggzMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.getcheckedmanitoba.ca%2Ffiles%2Fc-rep-perform-09-11.pdf&usg=AFQjCNEC5PaauOvOH9SOzDYftXmv1b5zg (accessed September 12, 2017).
66. Colorectal cancer screening in Canada: results from the first round of screening for five provincial programs / D. Major, H. Bryant, M. Delaney [et al.] // *Curr. Oncol.* – 2013. – Vol. 20, № 5. – P. 252-257. – <https://doi.org/10.3747/co.20.1646>.
67. Colorectal Cancer Screening Methods and Molecular Markers for Early Detection / Z. Wu, Y. Li, Y. Zhang [et al.] // *Technol. Cancer Res. Treat.* – 2020. – Vol. 19. – P. 1533033820980426. – doi: 10.1177/1533033820980426.
68. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer / I. Mármol, C. Sánchez-de-Diego, A. Pradilla Dieste [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, № 1. – P. 197.
69. Comparison of CT colonography, colonoscopy, sigmoidoscopy and faecal occult blood tests for the detection of advanced adenoma in an average risk population / A. Graser, P. Stieber, D. Nagel [et al.] // *Gut*. – 2009. – Vol. 58. – P. 241-248.
70. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample / K. Nosho, N. Irahara, K. Shima [et al.] // *PLoS One*. – 2008. – Vol. 3. – P. e3698.

71. Council Recommendation of 2 December 2003 on Cancer Screening (2003/878/EC) 878 // Off. J. Eur. Union. – 2003. – P 327/34-327/37. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:327:0034:0038:EN:PDF>.
72. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer / D.J. Weisenberger, K.D. Siegmund, M. Campan [et al.] // Nat. Genet. – 2006. – Vol. 38. – P. 787-793.
73. Davies, R.J. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis / R.J.Davies, R. Miller, N. Coleman // Nat. Rev. Cancer. – 2005. – Vol. 5. – P. 199-209.
74. Derivation and validation of a scoring system to stratify risk for advanced colorectal neoplasia in asymptomatic adults: a cross-sectional study / T.F. Imperiale, P.O. Monahan, T.E. Stump [et al.] // Ann. Intern. Med. – 2015. – Vol. 163. – P. 339-346.
75. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma / S.S. Chim, T.K. Shing, E.C. Hung [et al.] // Clin. Chem. – 2008. – Vol. 54. – P. 482-490. – <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.097972>.
76. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma / C.H. Lawrie, S. Gal, H.M. Dunlop [et al.] // Br. J. Haematol. – 2008. – Vol. 141, № 5. – P. 672-675.
77. Dey, S. Cancer in the global health era: opportunities for the Middle East and Asia / S. Dey, A.S. Soliman // Asia Pac. J. Public. Health. – 2010. – Vol. 22, № 3, Suppl. – P. 75S-82S. – <https://doi.org/10.1177/1010539510372846>.
78. Diagnostic and prognostic value of circulating miR-21 for cancer: a systematic review and meta-analysis / Y. Wang, X. Gao, F. Wei [et al.] // Gene. – 2014. – Vol. 533. – P. 389-397.
79. Diagnostic role of circulating MiR-21 in colorectal cancer: a update meta-analysis / T. Liu, D. Liu, S. Guan, M. Dong // Ann. Med. – 2021. – Vol. 53, № 1. – P. 87-102. – doi: 10.1080/07853890.2020.1828617.

80. Discovery and Validation of Salivary Extracellular RNA Biomarkers for Noninvasive Detection of Gastric Cancer / F. Li, J.M. Yoshizawa, K.M. Kim [et al.] // *Clin. Chem.* – 2018. – Vol. 64, № 10. – P. 1513-1521.
81. Discovery of common and rare genetic risk variants for colorectal cancer / J.R. Huyghe, S.A. Bien, T.A. Harrison, H.M. Kang // *Nat. Genetics.* – 2019. – Vol. 51. – P. 76. – doi: 10.1038/s41588-018-0286-6.
82. Duffy, M.J. Use of biomarkers in screening for cancer / M.J. Duffy // *Tumor Biol.* – 2011. – Vol. 32, Suppl. 1. – P. 5-56.
83. Dukes, C.E. The classification of cancer of the rectum / C.E. Dukes // *J. Pathol.* – 1932. – Vol. 35. – P. 323-330.
84. Early-onset colorectal cancer: a separate subset of colorectal cancer / I.O. Silla, D. Rueda, Y. Rodríguez [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20. – P. 17288-17296.
85. Elevated level of microRNA-21 in the serum of patients with colorectal cancer / G. Basati, A. Emami Razavi, S. Abdi [et al.] // *Med. Oncol.* – 2014. – Vol. 31, № 10. – P. 205.
86. Ellis, L. Racial and Ethnic Disparities in Cancer Survival: The Contribution of Tumor, Sociodemographic, Institutional, and Neighborhood Characteristics / L. Ellis, A.J. Canchola, D. Spiegel // *J. Clin. Oncol.* – 2018. – Vol. 36, № 1. – P. 25-33.
87. Estimation of Benefits, Burden, and Harms of Colorectal Cancer Screening Strategies: Modeling Study for the US Preventive Services Task Force / A.B. Knudsen, A.G. Zauber, C.M. Rutter [et al.] // *JAMA.* – 2016. – Vol. 315, № 23. – P. 2595-609. – doi: 10.1001/jama.2016.6828.
88. Evaluation of Serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal Cancer / Y. Gao, J. Wang, Y. Zhou [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 2732. – doi: 10.1038/s41598-018-21048-y.

89. Expression of miR-21 and miR-138 in colon cancer and its effect on cell proliferation and prognosis / C. You, L. Jin, Q. Xu [et al.] // *Oncol Lett.* – 2019. – Vol. 17, № 2. – P. 2271-2277. – doi: 10.3892/ol.2018.9864.
90. False-positive results from colorectal cancer screening in Catalonia (Spain), 2000-2010 / M. Garcia, N. Milà, G. Binefa [et al.] // *J. Med. Screen.* – 2012. – Vol. 19. – P. 77-82.
91. Fearon, E.R. A genetic model for colorectal tumorigenesis / E.R. Fearon, B. Vogelstein // *Cell.* – 1990. – Vol. 61. – P. 759-767.
92. Fletcher, R.H. Canceroembryonic antigen / R.H. Fletcher // *Ann. Intern. Med.* – 1986. – Vol. 104, № 1. – P. 66-73.
93. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia / G.A. Calin, C.D. Dumitru, M. Shimizu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* – 2002. – Vol. 99. – P. 15524-15529.
94. Gazelle, G.S. Screening for colorectal cancer / G.S. Gazelle, P.M. McMahon, F.J. Scholz // *Radiology.* – 2000. – Vol. 215. – № 2. – P. 327-335.
95. Glioblastoma blastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers / J. Skog, T. Wurdinger, S. van Rijn [et al.] // *Nat. Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 10, № 12. – P. 1470-1476.
96. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2020. – Vol. 68, № 6. – P. 394-424.
97. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality / M. Arnold, M.S. Sierra, M. Laversanne [et al.] // *Gut.* – 2017. – Vol. 66. – P. 683-691.
98. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study / C. Fitzmaurice, D. Abate, N. Abbasi [et al.] // *JAMA Oncol.* – 2019. – Vol. 5, № 12. – P. 1749-1768. – doi: 10.1001/jamaoncol.2019.2996.

99. Gold, P. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system / P. Gold, S. Freedman // *J. Exp. Med.* – 1965. – Vol. 122. – P. 467-481.
100. Gow, J. Costs of screening for colorectal cancer: An Australian programme / J. Gow // *Health Economics.* – 1999. – Vol. 8. – № 6. – P. 531-540.
101. Gupta, S. Screening for Colorectal Cancer / S. Gupta // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* – 2022. – Vol. 36, № 3. – P. 393-414. – doi: 10.1016/j.hoc.2022.02.001.
102. Gyrd Hansen, D. Colorectal cancer screening: efficiency and effectiveness / D. Gyrd Hansen, J. Sogaard, O. Kronborg // *Health Econ.* – 1998. – Vol. 7. – P. 9-20.
103. Halloran, S. Faecal occult blood testing / S. Halloran, G. Launoy, M. Zappa // *European Guidelines for Quality Assurance in Colorectal Cancer Screening and Diagnosis* / N. Segnan, J. Patnick, L. von Karsa. – First Edition. – Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2010. – P. 103e44.
104. Hatfield, S. MicroRNA and stem cell function / S. Hatfield, H. Ruohola-Baker // *Cell. Tissue Res.* – 2008. – Vol. 331. – P. 57-66.
105. Heijnen, M.L. CRC Screening in the Netherlands. From pilot to National Programme / M.L. Heijnen, I. Landsdorp-Vogelaar. – 2014. – URL: http://www.rivm.nl/en/Topics/B/Bowel_cancer_screening_programme (accessed September 12, 2017).
106. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores / D.R. Garalde, E.A. Snell, D. Jachimowicz [et al.] // *Nat. Methods.* – 2018. – Vol. 15. – P. 201-206. – doi: 10.1038/nmeth.4577.
107. Human salivary microRNAs in Cancer / Ó. Rapado-González, B. Majem, L. Muínelo-Romay [et al.] // *J. Cancer.* – 2018. – Vol. 9, № 4. – P. 638-649. – doi:10.7150/jca.21180.
108. Iacopetta, B. Are there two sides to colorectal cancer? / B. Iacopetta // *Int. J. Cancer.* – 2002. – Vol. 101, № 5. – P. 403-408. – doi: 10.1002/ijc.10635.
109. Identification and evaluation of plasma microRNAs for early detection of colorectal cancer / X. Luo, C. Stock, B. Burwinkel [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 5. – P. e62880.

110. Identification of a circulating microRNA signature for colorectal cancer detection / J. Wang, S.K. Huang, M. Zhao [et al.] // *PLoS One*. – 2014 – Vol. 9, № 4. – P. e87451.
111. Improving colorectal cancer screening and care in the Veterans Affairs Healthcare system / H.H. Chao, A.R. Schwartz, J. Hersh [et al.] // *Clin. Colorectal. Cancer*. – 2009. – Vol. 8, № 1. – P. 22-28. – <https://doi.org/10.3816/ccr.2009.n.004>.
112. John, A. Emerging role for colorectal cancer screening in Asian countries / A. John, S. Al Kaabi, N.L. Dweik // *Trop. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 35, № 1. – P. 21-24. – <https://doi.org/10.7869/tg.159>.
113. Kang, G.H. Four molecular subtypes of colorectal cancer and their precursor lesions / G.H. Kang // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2011. – Vol. 135, № 6. – P. 698-703.
114. Kim, Y.K. Processing of intronic microRNAs / Y.K. Kim, V.N. Kim // *EMBO J.* – 2007. – Vol. 26. – P. 775-783.
115. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study / H.J. Andreyev, A.R. Norman, D. Cunningham [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2001. – Vol. 85. – P. 692-696. – doi: 10.1054/bjoc.2001.1964.
116. Knowledge of, attitudes toward, and barriers to participation of colorectal cancer screening tests in the Asia-Pacific region: a multicenter study / J.H. Koo, R.W. Leong, J. Ching [et al.] // *Gastrointest Endosc.* – 2012. – Vol. 76, № 1. – P. 126-135. – <https://doi.org/10.1016/j.gie.2012.03.168>.
117. Kutter, C. Meeting report: miRNA, siRNA, piRNA. Knowns of the unknown / C. Kutter, P. Svoboda // *RNA Biology*. – 2008. – Vol. 5, № 4. – P. 181-188.
118. Lee, R.C. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* / R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros // *Cell*. – 1993. – Vol. 75, № 5. – P. 843-854.
119. Lee, Y.H. An emerging biofluid for early detection of diseases / Y.H. Lee, D.T. Wong // *Am. J. Dent.* – 2009. – Vol. 22. – P. 241-248.

120. Liang, S. Serum matrix metalloproteinase-9 level as a biomarker for colorectal cancer: a diagnostic meta-analysis / S. Liang, L. Chang // *Biomark Med.* – 2018. – Vol. 12, № 4. – P. 393-402. – doi: 10.2217/bmm-2017-0206.
121. Lieberman, D. Colon cancer screening and surveillance controversies / D. Lieberman // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 25, № 5. – P. 422-427.
122. Low-fat dietary pattern and cancer incidence in the Women's Health Initiative Dietary Modification Randomized Controlled Trial / R.L. Prentice, C.A. Thomson, B. Caan [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2007. – Vol. 99, № 20. – P. 1534-1543.
123. Lower serum CA125 level, negative vascular invasion, and wild BRAF were strongly associated with better 2-year disease-free survival in patients with stage III colorectal cancer who received adjuvant chemotherapy / S.J. Chang, X.S. Ge, Z.Y. Xu [et al.] // *Cancer Biomark.* – 2018. – Vol. 22, № 1. – P. 161-168. – doi: 10.3233/CBM-181179.
124. Macrae, F.A. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Protective Factors / F.A. Macrae. – URL: <https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors> (accessed on 24 December 2018).
125. Malvezzi, M. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer / M. Malvezzi, G. Carioli, P. Bertuccio // *Ann.Oncol.* – 2018. – Vol. 29, № 4. – P. 1016-1022.
126. Martin, C.M. Molecular profiling of cervical neoplasia / C.M. Martin, K. Astbury, J.J. O'Leary // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2006. – Vol. 6, № 2. – P. 217-229.
127. Mavligit, G.M. CA 125: a clinically useful tumor marker in the management of colorectal carcinoma metastatic to the liver in patients with normal carcinoembryonic antigen / G.M. Mavligit, Z. Estrov // *Am. J. Clin. Oncol.* – 2000. – Vol. 23, № 2. – P. 213-215. – doi: 10.1097/00000421-200004000-00021.
128. MicroRNA detection in feces, sputum, pleural effusion and urine: novel tools for cancer screening (Review) / Y.F. Xiao, X. Yong, Y.H. Fan [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2013. – Vol. 30, № 2. – P. 535-544.

129. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma / A.J. Schetter, S.Y. Leung, J.J. Sohn [et al.] // *Jama.* – 2008. – Vol. 299, № 4. – P. 425-436. – doi: 10.1001/jama.299.4.425.
130. MicroRNA for Diagnosis of Cancer and Systemic Diseases: A Systematic Review / G. Setti, M.E. Pezzi, M.V. Viani [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 907. – <https://doi.org/10.3390/ijms21030907>.
131. MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer / X. Luo, B. Burwinkel, S. Tao, H. Brenner // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2011. – Vol. 20, № 7. – P. 1272-1286. – doi: 10.1158/1055-9965.EPI-11-0035.
132. MicroRNA-21 is expressed in stroma of colorectal cancers and high levels identified by image analysis predict short disease-free survival in stage II colon cancer patients / B.S. Nielsen, S. Jorgensen, J. Fog [et al.] // *EJC.* – 2010. – Suppl. 8. – P. 5-81.
133. Microsatellite analysis of fecal DNA for colorectal cancer detection / M. Koshiji, Y. Yonekura, T. Saito, K. Yoshioka // *J. Surg. Oncol.* – 2002. – Vol. 80, № 1. – P. 34-40.
134. Molecular classification and correlates in colorectal cancer / S. Ogino, A. Goel, S. Ogino, A. Goel // *J. Mol. Diagn.* – 2008. – Vol. 10, № 1. – P. 13-27. – doi: 10.2353/jmoldx.2008.070082.
135. Müller, M.F. Molecular pathological classification of colorectal cancer / M.F. Müller, A.E. Ibrahim, M.J. Arends // *Virchows Arch.* – 2016. – Vol. 469, № 2. – P. 125-134. – doi: 10.1007/s00428-016-1956-3.
136. Myers, D.J. Lung Adenocarcinoma / D.J. Myers, J.M. Wallen // *StatPearls.* – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519578>.
137. Nakama, H. A costeffective analysis of the optimum number of stool specimens collected for immunochemical occult blood screening for colorectal cancer / H. Nakama, B. Zhang, A.S.M.A. Fattah // *Eur. J. of Cancer.* – 2000. – Vol. 36. – P. 647-650.

138. Ned, R.M. Fecal DNA testing for colorectal cancer screening: The colosure test / R.M. Ned, S. Melillo, M. Marrone // *PLoS Curr.* – 2011. – Vol. 3. – P. RRN1220. – doi: 10.1371/currents.RRN1220.
139. Next generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas / D.A. Ahlquist, H. Zou, M. Domanico [et al.] // *Gastroenterology.* – 2012. – Vol. 142, № 2. – P. 248-256.
140. Obstacles to colorectal cancer screening in Chinese: a study based on the health belief model / J.J. Sung, S.Y. Choi, F.K. Chan [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 103, № 4. – P. 974-981. – <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01649.x>.
141. Obstein, K.L. Advanced endoscopic technologies for colorectal cancer screening / K.L. Obstein, P. Valdastrri // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 19. – P. 431-439.
142. Okugawa, Y. Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers / Y. Okugawa, W.M. Grady, A. Goel // *Gastroenterology.* – 2015. – Vol. 149, № 5. – P. 1204-1225. – doi: 10.1053/j. gastro.2015.07.011.
143. Once-only sigmoidoscopy in colorectal cancer screening: follow-up findings of the Italian Randomized Controlled Trial – SCORE / N. Segnan, P. Armaroli, L. Bonelli [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2011. – Vol. 103. – P. 1310-1322.
144. Optimal Strategies for Colorectal Cancer Screening / S. Jain, J. Maque, A. Galoosian [et al.] // *Curr. Treat Options Oncol.* – 2022. – Vol. 23, № 4. – P. 474-493. – doi: 10.1007/s11864-022-00962-4.
145. Organised colorectal cancer screening in Lampang Province, Thailand: preliminary results from a pilot implementation programme / T. Khuhaprema, S. Sangrajrang, S. Lalitwongsa [et al.] // *BMJ Open.* – 2014. – Vol. 4, № 1. – P. e003671. – <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003671>.
146. Organized Colorectal Cancer Screening in Integrated Health Care Systems / T.R. Levin, L. Jamieson, D.A. Burley [et al.] // *Epidemiol. Rev.* – 2011. – Vol. 33, № 1. – P. 101-110. – <https://doi.org/10.1093/epirev/mxr007>.

147. Outcome comparis on following colorectal cancer surgeryinan equal access system / M. De Barros, M.W. Causey, E.K. Johnson [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2013. – Vol. 184. – P. 507-513.
148. Outcomes and cost evaluation of the first two rounds of a colorectal cancer screening program based on immunochemical fecal occult blood test in northern Italy / F. Parente, C. Boemo, A. Ardizzoia [et al.] // *Endoscopy.* – 2012. – Vol. 45, № 01. – P. 27-34. – <https://doi.org/10.1055/s-0032-1325800>.
149. Outcomes of the Bowel Cancer Screening Programme (BCSP) in England after the first 1 million tests / R.F. Logan, J. Patnick, C. Nickerson [et al.] // *Gut.* – 2012. – Vol. 61, № 10. – P. 1439-1446. – <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300843>.
150. Pillai, R.S. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? / R.S. Pillai // *RNA.* – 2005. – Vol. 11. – P. 1753-1761. – doi: 10.1261/rna.2248605.
151. Plasma and saliva miR-21 expression in colorectal cancer patients / A.A. Sazanov, E.V. Kiselyova, A.A. Zakharenko [et al.] // *J. Appl. Genet.* – 2017. – Vol. 58. – P. 231-237.
152. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer / Z. Kanaan, S.N. Rai, M.R. Eichenberger [et al.] // *Ann. Surg.* – 2013. – Vol. 258, № 3. – P. 400-408. – doi: 10.1097/SLA.0b013e3182a15bcc.
153. Prognostic value of pretreatment serum carbohydrate antigen 19-9 level in patients with colorectal cancer: A meta-analysis / Y. Zhan, Zh. Chen, J. Wu [et al.] // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, № 11. – P. e0188139.
154. Progress and challenges in colorectal cancer screening / E. Quintero, C. Hassan, C. Senore, Y. Saito // *Gastroenterol. Res. Pract.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 846985.
155. Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry / D.B. Friedman, S. Hill, J.W. Keller [et al.] // *Proteomics.* – 2004. – Vol. 4. – P. 793-811.
156. Quantification of human DNA in feces as a diagnostic test for the presence of colorectal cancer / C.H. Klaassen, M.A. Jeunink, C.F. Prinsen [et al.] // *Clin. Chem.* – 2003. – Vol. 49, № 7. – P. 1185-1187.

157. Ransohoff, D.F. Clinical Practice Guidelines for Colorectal Cancer Screening: New Recommendations and New Challenges / D.F. Ransohoff, H.C. Sox // *JAMA*. – 2016. – Vol. 315, № 23. – P. 2529-2531. – doi: 10.1001/jama.2016.7990.
158. Rapid assessment of salivary MMP-8 and periodontal disease using lateral flow immunoassay / N. Johnson, J.L. Ebersole, R.J. Kryscio [et al.] // *Oral Dis*. – 2016. – Vol. 22, № 7. – P. 681-687.
159. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RTPCR / C. Chen, D.A. Ridzon, A.J. Broomer [et al.] // *Nucleic Acids Res*. – 2005. – Vol. 33, № 20. – P. e179.
160. Recommendations on cancer screening in the European union. Advisory Committee on Cancer Prevention // *Eur. J. Cancer*. – 2000. – Vol. 36. – P. 1473-1478. – doi: 10.1016/s0959-8049(00)00122-2.
161. Red de programas de cribado de cancer. – URL: <http://www.cribadocancer.com> (accessed September 12, 2017).
162. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia / M.Z. Michael, S.M. O'Connor, N.G. van Holst Pellekaan [et al.] // *Mol. Cancer Res*. – 2003. – Vol. 1. – P. 882-891.
163. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study / J.S. Mandel, J.H. Bond, T.R. Church [et al.] // *N. Engl. J. Med*. – 1993. – Vol. 328. – P. 1365-1371.
164. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer / Z. Ali Syeda, S.S.S. Langden, C. Munkhzul [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. – 2020. – Vol. 21, № 5. – P. 1723. – doi: 10.3390/ijms21051723.
165. Role of microRNA in the pathogenesis of colorectal cancer: possible involvement of miRNA-143 and miRNA-21. Abstracts / G. Biscaglia, A. Panza, A.M. Gentile [et al.] // *Digestive Liver Disease*. – 2009. – Vol. 41S. – P. S1-S167.
166. Saliva sampling method affects performance of a salivary α -amylase biosensor / T.F. Robles, R. Sharma, L. Harrell [et al.] // *Am. J. Hum. Biol*. – 2013. – Vol. 25, № 6. – P. 719-724.

167. Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities / J.M. Yoshizawa, C.A. Schafer, J.J. Schafer [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2013. – Vol. 26. – P. 781-791.
168. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of ovarian cancer: for serous papillary adenocarcinoma / Y.H. Lee, J.H. Kim, H. Zhou [et al.] // *J. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 90, № 4. – P. 427-434.
169. Schetter, A.J. The role of microRNAs in colorectal cancer / A.J. Schetter, H. Okayama, C.C. Harris // *Cancer J.* – 2012. – Vol. 18. – P. 244-252. – doi: 10.1097/PPO.0b013e318258b78f.
170. Screening for colorectal cancer in Chinese: comparison of fecal occult blood test, flexible sigmoidoscopy, and colonoscopy / J.J. Sung, F.K. Chan, W.K. Leung [et al.] // *Gastroenterology.* – 2003. – Vol. 124. – P. 608-614.
171. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement / K. Bibbins-Domingo, D.C. Grossman, S.J. Curry [et al.] // *JAMA.* – 2016. – Vol. 315, № 23. – P. 2564-2575. – <https://doi.org/10.1001/jama.2016.5989>.
172. Segnan, N. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis / N. Segnan, J. Patnick, L. von Karsa. – First edition. – Luxembourg: European Commission, Publications Office of the European Union, 2010. – 450 p.
173. Serum CEA and CA 19-9 Levels are Associated with the Presence and Severity of Colorectal Neoplasia / N.H. Kim, M.Y. Lee, J.H. Park [et al.] // *Yonsei Med. J.* – 2017. – Vol. 58, № 5. – P. 918-924.
174. Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer / Y. Toiyama, M. Takahashi, K. Hur [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2013. – Vol. 105, № 12. – P. 849-859. – doi: 10.1093/jnci/djt101.
175. Serum miR-21, miR-29a, and miR-125b are promising biomarkers for the early detection of colorectal neoplasia / A. Yamada, T. Horimatsu, Y. Okugawa [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2015. – Vol. 21, № 18. – P. 4234-4242.

176. Song, L.-L. Current noninvasive tests for colorectal cancer screening: An overview of colorectal cancer screening tests / L.-L. Song, Y.-M. Li // *World J. Gastrointest. Oncol.* – 2016. – Vol. 8. – P. 793-800.
177. Sonnenberg, A. Is virtual colonoscopy a cost effective option to screen for colorectal cancer? / A. Sonnenberg, F. Delco, P. Bauerfeind // *Am. J. Gastroenterol.* – 1999. – Vol. 94. – P. 2268-2274.
178. Stikma, J. CA 19-9 as a marker in addition to CEA to monitor colorectal cancer / J. Stikma, D.C. Grootendorst, P.W. van der Linden // *Clin. Colorectal. Cancer.* – 2014. – Vol. 13, № 4. – P. 239-244. – doi: 10.1016/j.clcc.2014.09.004.
179. Stool DNA testing for screening detection of colorectal neoplasia in Alaska Native people / D.G. Redwood, E.D. Asay, I.D. Blake [et al.] // *Mayo Clin. Proc.* – 2016. – Vol. 91. – P. 61-70.
180. Survival differences between European and US patients with colorectal cancer: role of stage at diagnosis and surgery / L. Ciccolallo, R. Capocaccia, M.P. Coleman [et al.] // *Gut.* – 2005. – Vol. 54. – P. 268-273.
181. Swan, H. International Colorectal Cancer Screening Programs: Population Contact Strategies, Testing Methods and Screening Rates / H. Swan, A.A. Siddiqui, R.E. Myers // *Pract. Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 36. – P. 8.
182. The colorectal microRNAome / J.M. Cummins, Y. He, R.J. Leary [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103, № 10. – P. 3687-3692. – doi: 10.1073/pnas.0511155103.
183. The Dual Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer Progression / L. Ding, Z. Lan, X. Xiong [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 9. – P. 2791. – doi: 10.3390/ijms19092791.
184. The editorial board of the cancer statistics in Japan. *Cancer statistics in Japan.* – 2015. – 129 p.
185. The emerging landscape of salivary diagnostics / Y. Zhang, J. Sun, C.C. Lin [et al.] // *Periodontology 2000.* – 2016. – Vol. 70. – P. 38-52.
186. The Global Cancer Observatory / World Health Organization. – 2020. – URL: <https://gco.iarc.fr>.

187. The immunologic faecal occult blood test for the detection of significant colorectal neoplasia / J.M. Auge, M. Sasot, J.M. Escudero [et al.] // *Tumor Biology*. – 2011. – Vol. 32, Suppl. 1. – P. 17.
188. The incidence and survival rates of colorectal cancer in India remain low compared with rising rates in East Asia / S. Pathy, R. Lambert, C. Sauvaget, R. Sankaranarayanan // *Dis. Colon Rectum*. – 2012. – Vol. 55, № 8. – P. 900-906. – <https://doi.org/10.1097/dcr.0b013e31825afc4e>.
189. The microRNA spectrum in 12 body fluids / J.A. Weber, D.H. Baxter, S. Zhang [et al.] // *Clin. Chem*. – 2010. – Vol. 56. – P. 1733-1741. – <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>.
190. Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays / D.A. Notterman, U. Alon, A.J. Sierk, A.J. Levine // *Cancer Res*. – 2001. – Vol. 61. – P. 3124-3130.
191. Transcriptome and Gene Fusion Analysis of Synchronous Lesions Reveals IncMRPS31P5 as a Novel Transcript Involved in Colorectal Cancer / A. Panza, S. Castellana, G. Biscaglia [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. – 2020. – Vol. 21. – P. 7120. – <https://doi.org/10.3390/ijms21197120>.
192. Tumours of the colon and rectum / S.R. Hamilton, B. Vogelstein, S. Kudo [et al.] // *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System* / S.R. Hamilton, L.A. Aaltonen eds. – Lyon, France: IARC Press, 2000. – Chapter 6. – P. 103-142.
193. Turchinovich, A. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma / A. Turchinovich, B. Burwinkel // *RNA Biol*. – 2012. – Vol. 9, № 8. – P. 1066-1075.
194. Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380 / D.A. Lieberman, D.G. Weiss, J.H. Bond [et al.] // *N. Engl. J. Med*. – 2000. – № 343. – P. 162-168. – doi: 10.1056/NEJM200007203430301.

195. Van Dam, L. Performance improvements of stoolbased screening tests / L. Van Dam, E.J. Kuipers, M.E. van Leerdam // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 24, № 4. – P. 479-492.
196. Varkonyi-Gasic, E. Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs / E. Varkonyi-Gasic, R.P. Hellens // *Methods in molecular biology.* – 2011. – Vol. 744. – P. 145-157.
197. Where Can Colorectal Cancer Screening Interventions Have the Most Impact? / R.L. Siegel, L. Sahar, A. Robbins, A. Jemal // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2015. – Vol. 24, № 8. – 1151-1156. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0082.
198. Winavver, S.J. Colorectal cancer scrining: clinical guidelines and rational / S.J. Winavver, P.H. Fletcher, L. Miller [et al.] // *Gastroenterology.* – 1997. – Vol. 112. – P. 59.
199. Wu, L. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA / L. Wu, J. Fan, J.G. Belasco // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 4034-4039.
200. Yan, H. Non-coding RNA in cancer / H. Yan, P. Bu // *Essays Biochem.* – 2021. – Vol. 65, № 4. – P. 625-639. – doi: 10.1042/EBC20200032.
201. Yee, J. Virtual colonoscopy / J. Yee; ed. G. Galdino. – 2008. – 219 p.
202. Young, G.P. Fecal tests: From blood to molecular markers / G.P. Young, L.J. Bosch // *Curr. Colorectal. Cancer Rep.* – 2011. – Vol. 7, № 1. – P. 62-70.