

## Сравнительная молекулярная оценка неизменной слизистой оболочки сегментов толстой кишки как возможной основы аденом

Короткевич А. Г.<sup>1,2</sup>, Жилина Н. М.<sup>1</sup>, Деменков П. С.<sup>3,4</sup>, Веряскина Ю. А.<sup>4,5</sup>, Титов С. Е.<sup>3,5,6</sup>

<sup>1</sup> Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», (пр. Строителей, д. 5, Новокузнецк, 654005, Россия)

<sup>2</sup> Новокузнецкая городская клиническая больница им. А. А. Луцка, (пр. Советской Армии, д. 49, г. Новокузнецк, 654038, Российская Федерация)

<sup>3</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, (ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090, Россия)

<sup>4</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Российская Федерация, (пр. Ак. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090, Россия)

<sup>5</sup> ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» СО РАН, (пр. Ак. Лаврентьева, 8/2, Новосибирск, 630090, Россия)

<sup>6</sup> Вектор-Бест, Российская Федерация, (Промзона, 36, р.п. Кольцово, 630559, Россия)

**Для цитирования:** Короткевич А. Г., Жилина Н. М., Деменков П. С., Веряскина Ю. А., Титов С. Е. Сравнительная молекулярная оценка неизменной слизистой оболочки сегментов толстой кишки как возможной основы аденом. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2024;(4): 20–29. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-224-4-20-29

✉ Для переписки:

**Короткевич**

**Алексей**

**Григорьевич**

alkorot@mail.ru

**Короткевич Алексей Григорьевич**, профессор, д.м.н.

**Жилина Наталья Михайловна**, заведующая кафедрой медицинской кибернетики и информатики, д.т.н., доцент

**Деменков Павел Сергеевич**, к.т.н., доцент, кафедра дискретной математики и информатики ММФ и СУНЦ;

научный сотрудник отделения

**Веряскина Юлия Андреевна**, к.б.н., научный сотрудник, лаборатория геномной инженерии; отдел структуры и функции хромосом федерального государственного бюджетного учреждения науки

**Титов Сергей Евгеньевич**, к.б.н., старший научный сотрудник, отдел структуры и функции хромосом

### Резюме

**Цель исследования.** Изучить частоту сопутствующих эпителиальным новообразованиям толстой кишки изменений слизистой оболочки и экспрессию потенциальных миРНК и мРНК-маркеров КРР в нормальной слизистой разных отделов толстой кишки.

**Материалы и методы.** В сплошном поперечном ретроспективном исследовании изучены результаты 3086 колоноскопий за 2019–2020 гг. Проспективное исследование образцов слизистой оболочки 25 пациентов в 2022–2023 гг.

**Результаты.** Выделена группа 980 пациентов с неоплазиями. У пациентов с пятого десятилетия жизни выявлено существенное возрастание частоты эпителиальных новообразований ( $\chi^2=38,8$ ,  $p=0,0000$ ), не различающееся в последующие десятилетия жизни. Отсутствие изменений слизистой оболочки выявлено в 27,7% случаев. В проспективном исследовании в 169 образцах анализированы молекулярные характеристики слизистой оболочки различных сегментов толстой кишки. Изучены 9 миРНК-маркеров, связанных с развитием КРР. Статистически значимые различия в экспрессии между разными отделами толстой кишки были получены для миРНК-135b, миРНК-31 и миРНК-20. Среди белок-кодирующих генов достоверные различия получены для генов MUC2, NOX1, TERT и CDX2. Оценка уровня экспрессии с использованием отношения медианных значений исследуемых показателей в разных отделах толстой кишки для миРНК-135b составила 6,5 раз, для миРНК-31–6,9 раз, для MUC2–1,9 раза, для CDX2–1,5 раза, для гена NOX1–5,1 раза.

**Заключение.** Нормальная/макроскопически неизменная слизистая оболочка толстой кишки имеет существенные молекулярно-генетические различия в разных отделах. Изменения экспрессии генов, регулирующих пролиферацию

EDN: PLQDIN



клеток, репликацию РНК и обеспечивающих равновесие оксигенации эпителия с анаэробностью внутри кишки совпадают с дистальными сегментами толстой кишки, имеющими наибольшую частоту выявления эпителиальных новообразований.

**Ключевые слова:** неизменная слизистая оболочка, колоректальные неоплазии, мРНК/мРНК

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

---

---

## Comparative molecular evaluation of unaltered mucosa of colon segments as a possible basis for adenomas

A. G. Korotkevich<sup>1,2</sup>, N. M. Zhilina<sup>1</sup>, P. S. Demenkov<sup>5,6</sup>, Yu. A. Veryaskina<sup>3,6</sup>, S. E. Titov<sup>3,4,5</sup>

<sup>1</sup> Novokuznetsk State Institute for Advanced Training of Doctors — branch of “Russian Medical Academy of Continuing Professional Education”, (5, Stroiteley Ave, Novokuznetsk, 654005, Russia)

<sup>2</sup> Novokuznetsk City Clinical Hospital named after A. A. Lutsik, Russian Federation, (49, SovetskayaArmiya Ave, Novokuznetsk, 654038, Russia)

<sup>3</sup> Novosibirsk National Research State University, (1, Pirogovastr, Novosibirsk, 630090, Russia)

<sup>4</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS Russian Federation, (10, Lavrentiev Ave, Novosibirsk, 630090, Russia)

<sup>5</sup> Institute of Molecular and Cell Biology SB RAS Russian Federation, (8/2, Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090, Russia)

<sup>6</sup> AO “Vector-Best”, (36, Industrial Zone, 630559, Koltsovo, Russia)

---

---

**For citation:** Korotkevich A. G., Zhilina N. M., Demenkov P. S., Veryaskina Yu. A., Titov S. E. Comparative molecular evaluation of unaltered mucosa of colon segments as a possible basis for adenomas. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2024;(4): 20–29. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-224-4-20-29

---

---

✉ **Corresponding author:**  
**Alexey G. Korotkevich**  
alkorot@mail.ru

**Alexey G. Korotkevich**, Dr. M. Sc, Professor; ORCID: 0000-0002-6286-8193, Researcher ID: HMD-2719-2023, SPIN: 6347-7986

**Natalia M. Zhilina**, Head of the Department of Medical Cybernetics and Informatics, Doctor of Technical Sciences, Associate Professor; ORCID: 0000-0001-7871-3885, SPIN: 5468-3823

**Pavel S. Demenkov**, Ph, Associate Professor, Department of Discrete Mathematics and Computer Science, MMF and SSC NSU; ORCID: 0000-0001-9433-8341, Researcher ID: AAC-8708-2020, SPIN: 163887

**Yulia A. Veryaskina**, Ph, Researcher, Laboratory of Genetic Engineering; Department of Chromosome Structure and Function; ORCID: 0000-0002-3799-9407; Researcher ID: N-7020-2015, SPIN: 7989-6099

**Sergey E. Titov**, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Structure and Function of Chromosomes; ORCID: 0000-0001-9401-5737, Researcher ID: O-5808-2015, SPIN: 4924-8365

### Summary

**The aim** was to investigate the frequency of mucosal changes associated with colorectal epithelial neoplasms and the expression of potential miRNA and mRNA markers of CRC in the normal mucosa of different parts of the colon.

**Materials and Methods.** In a continuous cross-sectional retrospective study, we examined the results of 3086 colonoscopies from 2019–2020. A prospective study of mucosal samples from 25 patients in 2022–2023

**Results.** A cohort of 980 patients with neoplasia was identified. A significant increase in the incidence of epithelial neoplasia was found in patients from the fifth decade of life ( $\chi^2=38.8$ ,  $p=0.0000$ ), not differing in subsequent decades of life. Absence of mucosal changes was found in 27.7% of cases. In a prospective study, molecular characteristics of the mucosa of different segments of the colon were analyzed in 169 samples. Nine miRNA markers associated with the development of CRC were studied. Statistically significant differences in expression between different parts of the colon were obtained for miRNA-135b, miRNA-31, and miRNA-20. Among protein-coding genes, significant differences were obtained for MUC2, NOX1, TERT and CDX2 genes. Expression level estimation using the ratio of median values of the studied parameters in different colon sections was 6.5-fold for miRNA-135b, 6.9-fold for miRNA-31, 1.9-fold for MUC2, 1.5-fold for CDX2, and 5.1-fold for the NOX1 gene.

**Conclusion.** Normal/macroscopically unchanged colonic mucosa has significant molecular genetic differences in different sections. Changes in the expression of genes regulating cell proliferation, RNA replication and ensuring the balance of epithelial oxygenation with anaerobicity within the intestine coincide with the distal segments of the colon having the highest frequency of epithelial neoplasia detection.

**Keywords:** unchanged mucosa, colorectal neoplasia, miRNA/mRNAs

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

## Введение

Высокая частота колоректального рака (КРР) остается проблемой современного здравоохранения и основанием для поиска как эффективных приемов профилактики болезни, так и ранней своевременной диагностики КРР для его эффективного лечения [1, 2, 3].

Многолетние исследования частоты и связи возникновения аденом в толстой кишке (ТК) с особенностями питания, этносом, регионом, частотой КРР, его метастазированием и эффективностью лечения позволили определить аденомы как фактор риска появления КРР и объединить локализации болезни по правой/левой половине толстой кишки [1, 2, 4, 5, 6]. Таким образом, размер и количество полипов являются основным надежным предикторам развития КРР, однако далеким от идеала [7]. Однако, нередко аденомы возникают на неизменной/нормальной слизистой оболочке (СО) ТК [8]. Это вызывает вопросы об оценке нормальности СО ТК, подтверждения ее одинаковости в разных отделах ТК и возможной роли макроскопически нормальной слизистой в генезе и частоте выявления новообразований ТК [8]. Возможен также цитологический анализ слизистой, но этот метод является субъективным и его эффективность зависит от специалиста-морфолога. Поэтому в дополнение к цитологическому анализу мазков слизистой ТК имеет смысл добавить изучение объективных маркеров злокачественности – молекулярных. Подобный скрининг, направленный на выявление пациентов с предраковыми поражениями или пациентов с операбельным КРР стадий 0, I и II, у которых прогноз в целом лучше, позволил бы значительно увеличить общую выживаемость пациентов.

Для КРР на данный момент выявлено большое разнообразие молекулярных маркеров – хромосомная и микросателлитная нестабильность, метилирование, соматические мутации, aberrantная экспрессия белок-кодирующих генов и мРНК [3, 6, 9,10]. Исходя из комбинации этих молекулярных маркеров выделяют разные подтипы КРР [11]. Однако, с практической точки зрения, для

скрининга КРР желательно иметь не очень большое количество маркеров, желательно одного типа. В этом отношении хорошо подходят экспрессионные панели белок-кодирующих генов или мРНК. И в самом деле, на сегодняшний момент уже доступны и коммерческие прогностические генные панели (ColoPrint, OncotypeDX, OncoDefender) и научные (предложено более 20) [12, 13].

Проблема в том, что они мало совпадают друг с другом и имеют ограниченную прогностическую ценность. С одной стороны, это может быть связано с тем, что КРР не однороден с точки зрения путей формирования рака, что отражается в наличии нескольких молекулярных подтипов, упомянутых ранее. С другой стороны, неоднородна сама ТК – проксимальный отдел ободочной кишки, дистальный отдел ободочной кишки и прямая кишка имеют различное эмбриологическое происхождение. На самом деле, уже давно известно, что правосторонние опухоли имеют худший прогноз, чем левосторонние, и, по-видимому, левосторонние и правосторонние опухоли имеют разные пути метастазирования [5, 6, 14]. Фактически, характер экспрессии генов позволяет отличить опухоли правой части толстой кишки от опухолей левой стороны, а единственный ген PRAC1 может предсказать сторону опухоли с точностью 85% [15].

Как правило, при изучении профилей экспрессии генов при КРР этому аспекту не уделяется достаточного внимания, либо рассматривается разница только между правой и левой половинами толстой кишки, иногда выделяют прямую кишку [16, 17]. Поэтому, имея целью подобрать диагностическую мРНК/мРНК экспрессионную панель, мы решили на первом этапе работы подробно изучить экспрессию потенциальных мРНК и мРНК-маркеров КРР в нормальной слизистой разных отделов ТК. Если получится, что различий нет (для выбранных нами маркеров), это позволит рассматривать опухоли разных отделов ТК как одну группу, если же различия есть уже на уровне нормальной слизистой, это нужно будет учитывать при создании диагностических классификаторов.

## Материал и методы

В сплошном поперечном ретроспективном исследовании результатов 3086 колоноскопий в отделении эндоскопии НГКБ № 29 им. А. А. Луцка в 2019–2020 гг. изучены частота выявления эпителиальных новообразований и сопутствующих им изменений слизистой. Проспективное исследование (2022–2023 гг.) СО ТК у 25 пациентов, не имевших визуальных признаков патологических изменений слизистой оболочки в белом свете и при хромоскопии, не имевших клинических и лабораторных признаков заболеваний толстой кишки, без анамнеза онкологических заболеваний любой локализации и родственников первой линии, имевших КРР. Мужчин – 7, женщин – 18. Средний возраст составил у мужчин  $67,00 \pm 15,45$  лет, у женщин –  $85,00 \pm 13,97$  лет. Все пациенты, включенные

в исследование, подписывали добровольное информированное согласие. Использовали эндоскопы высокого разрешения с функцией виртуальной хромоскопии. Биоптаты из каждого отдела толстой кишки помещали на предметное стекло, делали мазок, высушивали. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НГКБ № 29 от 19.04.2022. Материал был получен в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации, принятой на 18-й Генеральной Ассамблее ВМА, (Хельсинки, Финляндия, июнь 1964 г.) с последующими редакциями и положениями действующего законодательства РФ, от каждого пациента было получено информированное добровольное согласие, все данные были депersonализованы. В мазках определяли относительные

уровни экспрессии миРНК и мРНК, всего в рамках данной работы было исследовано 169 клеточных образцов: 21 образец слепой кишки, 32 образца восходящей ободочной кишки, 31 образец поперечной ободочной кишки, 31 образец нисходящей ободочной кишки, 30 образцов сигмовидной ободочной кишки и 24 образца прямой кишки.

**Выделение РНК.** Цитологический препарат соскребали со стекла в пробирку и добавляли 600 мкл лизирующего буфера (4 М гуанидинизотиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,3% саркозил, 3% ДТТ). Далее выделение проводили как описано в статье В. В. Анищенко [18].

**Выбор набора молекулярных маркеров.** Первичный отбор набора миРНК для анализа был осуществлен на основании анализа литературы. В итоге был сформирован список из 9 миРНК-маркеров, связанных с развитием КРП: miR-135b-5p, -141-3p, -143-3p, -200a-3p, -20a-5p, -21-5p, -31-5p, -34a-5p, -92a-3p, в качестве референса для них использовалась малая ядерная РНК U6, а также miРНК-16-5p и -191-5p. Помимо миРНК, в данной работе в качестве маркеров были использованы мРНК следующих генов: MUC2, CDX2, NOX1, LGR5, SMAD4, MS4A12, TIMP1, Ki-67, TERT с нормировкой на гены домашнего хозяйства PGK1 и PUM1.

**Детекция миРНК и мРНК с помощью ОТ-ПЦР-РВ.** Для выявления зрелых миРНК и малой РНК U6 использовали метод, предложенный Chen С. и соавторами в 2005 году. Метод включает в себя обратную транскрипцию зрелой миРНК с помощью длинного праймера со шпилькой, с последующей детекцией

полученной кДНК с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) [19]. Для каждой миРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ. Нормировку содержания миРНК проводили на среднее содержание малой ядерной РНК U6, а также miРНК-16 и -191 в образце с помощью метода  $2^{-\Delta Cq}$  [20]. Выявление мРНК U6 проводилось по той же схеме stem-loop ОТ-ПЦР, которая использовалась для миРНК. Полуколичественную оценку содержания мРНК проводили методом ОТ-ПЦР-РВ со специфическими праймерами и флуоресцентно-мечеными зондами для выявления мРНК соответствующих генов и генов домашнего хозяйства PGK1 и PUM1, используемых для нормировки данных. Уровень относительной экспрессии рассчитывали с помощью метода  $2^{-\Delta Cq}$ .

Статистический анализ проведен с использованием пакета IBMSPSSStatistics-22 и STATISTICA 10 (TIBCO Software, США). По результатам исследования создана база данных, выполнен ее первичный анализ. Сравнение групп проведено по возрастным интервалам с шагом 10 лет, по локализациям опухолей и по их количеству, факту и характеру изменений слизистой оболочки. Различия в независимых группах качественных признаков проанализированы с помощью критерия хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Критический уровень значимости различия  $p=0,05$ . Сравнение двух независимых выборок по количественному признаку проводили при помощи критерия Манна-Уитни. Критический уровень значимости был принят равным 0.000173 с учетом поправки Бонферрони.

## Результаты

Общая частота выявленных новообразований составила 31,8% (980 человек). У пациентов с пятого десятилетия жизни выявлено существенное возрастание частоты эпителиальных новообразований ( $\chi^2=38,8$ ,  $p=0,0000$ ), не различающееся в последующие десятилетия жизни.

В оценке новообразований также учитывали наличие явных признаков хронического неспецифического воспаления – хронического колита, неравномерно усиленного сосудистого рисунка, дивертикулов, низкого тонуса толстой кишки, подтвержденных результатами гистологического исследования (атрофия, плазмоцитарная

инфильтрация, изменение плотности сосудистого русла). Более 2/3 пациентов с эпителиальными новообразованиями имели явные изменения слизистой оболочки (рисунок 1).

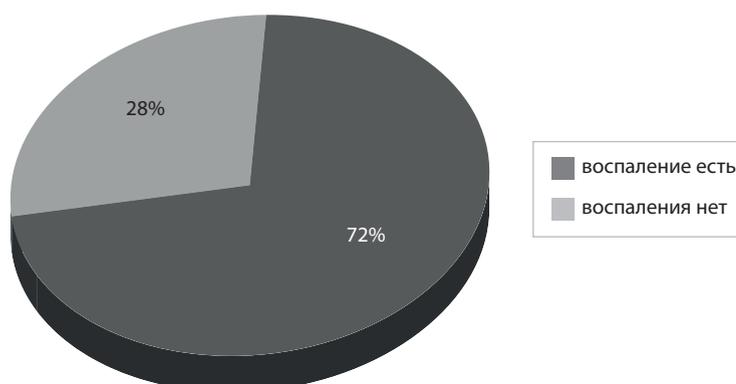
Тем не менее, более четверти пациентов не имели визуальных изменений сосудистого рисунка и тонуса кишки, характерных для хронического колита/дивертикулярной болезни.

Частота хронического колита отчетливо увеличивалась с возрастом ( $\chi^2=48,654$ ,  $p=0,0000$ ) (рисунок 2).

С помощью ОТ-ПЦР-РВ мы определили относительную экспрессию 9 миРНК и 9 белок-кодирующих

**Рисунок 1.** Доля выявленных хронических неспецифических колитов у пациентов с новообразованиями толстой кишки (%).

**Figure 1.** Proportion of detected chronic nonspecific colitis in patients with colorectal neoplasms (%).

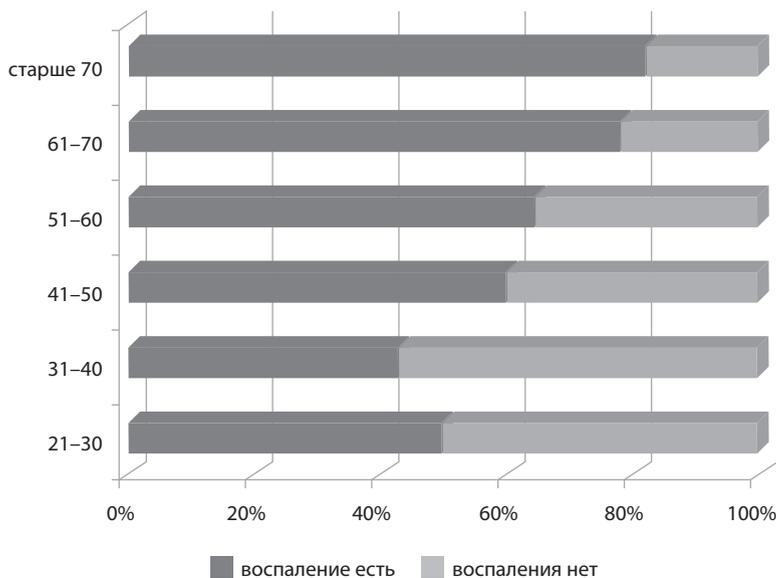


генов, связанных с развитием КРР. В таблице 1 приведены данные по статистической значимости различий между экспрессией миРНК/мРНК в образцах, относящихся к разным отделам толстой кишки. Поскольку

количество образцов было невелико, то, чтобы не делать предположений о том, распределению какого типа соответствуют наши выборки, мы воспользовались непараметрическим критерием Манна-Уитни.

**Рисунок 2.** Частота хронического колита у пациентов с новообразованиями толстой кишки (%).

**Figure 2.** Frequency of chronic colitis in patients with colorectal neoplasms (%).



**Таблица 1.** Уровень значимости статистических различий при попарном сравнении экспрессии миРНК/мРНК в разных отделах толстой кишки

**Примечание.** Полу жирным шрифтом выделены значимые ( $p < 0.000173$ ) различия.

**Table 1.** Level of Statistical Significance of Pairwise Comparisons of miRNA/mRNA Expression in Different Parts of the Colon

уровень 1	Правая	слепая	слепая	слепая	слепая	слепая	восходящая ободочная	восходящая ободочная	
уровень 2	Левая	восходящая ободочная	поперечная ободочная	нисходящая ободочная	сигмовидная ободочная	прямая	поперечная ободочная	нисходящая ободочная	
миР-135b	2.73*10 <sup>-14</sup>	0.018527	0.751215	0.001428	0.001538	2.05*10 <sup>-8</sup>	0.002665	3.04*10 <sup>-7</sup>	miR-135b
миР-141	0.147638	0.472573	0.955383	0.588626	0.977097	0.007513	0.655009	0.906972	miR-141
миР-143	0.476358	0.495283	0.881400	0.925708	0.262872	0.811196	0.559021	0.778068	miR-143
миР-200a	0.045699	0.295734	0.896135	0.681598	0.639138	0.311343	0.121944	0.077290	miR-200a
миР-20a	0.145888	<b>0.000083</b>	0.002518	0.003412	0.094002	0.487746	0.118662	0.053408	miR-20a
миР-21	0.001012	0.682424	0.204745	0.126206	0.054422	0.004619	0.056895	0.036030	miR-21
миР-31	<b>3.1*10<sup>-7</sup></b>	<b>0.000161</b>	<b>2.17*10<sup>-7</sup></b>	<b>2.74*10<sup>-8</sup></b>	<b>1.74*10<sup>-8</sup></b>	<b>2.27*10<sup>-7</sup></b>	0.037266	0.000775	miR-31
миР-34a	0.008535	0.629879	0.654455	0.271199	0.019052	0.724361	0.228991	0.050100	miR-34a
миР-92a	0.447652	0.010620	0.096958	0.112924	0.183467	0.300595	0.043999	0.034830	miR-92a
MUC2	<b>5.69*10<sup>-10</sup></b>	0.963739	0.073402	0.001175	<b>0.000044</b>	<b>0.000139</b>	0.058709	0.000400	MUC2
CDX2	0.007215	0.848572	0.723087	0.490180	0.333786	0.044069	0.478927	0.256702	CDX2
NOX1	<b>6.24*10<sup>-15</sup></b>	0.034131	<b>0.000018</b>	<b>1.07*10<sup>-7</sup></b>	<b>9.81*10<sup>-8</sup></b>	<b>5.07*10<sup>-8</sup></b>	0.001391	<b>0.000001</b>	NOX1
LGR5	0.001137	0.028433	0.005457	0.000368	0.001995	0.004456	0.405543	0.050100	LGR5
SMAD	0.492072	0.070391	0.052438	0.014564	0.045499	0.473591	0.809871	0.767547	SMAD
MS4	0.328922	0.169768	0.001523	0.009031	0.011844	0.502127	0.060570	0.167068	MS4
TIMP1	0.008456	0.050599	0.232653	0.140673	0.008499	0.000617	0.531616	0.809871	TIMP1
Ki-67	0.966142	0.004688	0.000395	0.008093	0.013194	0.124618	0.332423	0.577664	Ki-67
TERT	0.129242	<b>0.000111</b>	<b>0.000002</b>	<b>1.45*10<sup>-7</sup></b>	<b>0.000001</b>	0.406311	0.027344	0.000702	TERT
	Left	ascending colon	transverse colon	descending colon	sigmoid colon	rectum	transverse colon	descending colon	Level 2
	Right	Secum	Secum	Secum	Secum	Secum	ascending colon	ascending colon	Level 1

Таблица 1  
(продолжение)

уровень 1	восходящая ободочная	восходящая ободочная	поперечная ободочная	поперечная ободочная	поперечная ободочная	нисходящая ободочная	нисходящая ободочная	нисходящая ободочная	сигмовидная ободочная	
уровень 2	сигмовидная ободочная	прямая	нисходящая ободочная	сигмовидная ободочная	прямая	сигмовидная ободочная	прямая	прямая	прямая	
миР-135b	0.000001	4.56*10 <sup>-10</sup>	0.006585	0.002880	1.84*10 <sup>-8</sup>	0.745491	0.000001	0.000004	миR-135b	
миР-141	0.626993	0.024870	0.582962	0.971444	0.002741	0.628898	0.012307	0.005796	миR-141	
миР-143	0.056309	0.993395	0.810845	0.409528	0.818784	0.295607	0.993230	0.408312	миR-143	
миР-200a	0.060045	0.017508	0.662521	0.693639	0.194189	0.994245	0.372939	0.470035	миR-200a	
миР-20a	0.013972	0.001281	0.724865	0.304667	0.026779	0.484132	0.044318	0.213259	миR-20a	
миР-21	0.010571	0.000754	0.767498	0.284715	0.084968	0.578614	0.133113	0.470035	миR-21	
миР-31	0.000956	0.092861	0.057354	0.084742	0.604725	0.959730	0.023474	0.028913	миR-31	
миР-34a	0.000822	0.375736	0.447110	0.019047	0.831999	0.117526	0.355005	0.019215	миR-34a	
миР-92a	0.089631	0.113842	0.778272	0.736427	0.640711	0.845585	0.925633	0.721197	миR-92a	
MUC2	0.000002	0.000017	0.044091	0.000535	0.002451	0.107721	0.266308	0.760644	MUC2	
CDX2	0.233946	0.000145	0.554320	0.339903	0.004020	0.702242	0.011729	0.046242	CDX2	
NOX1	3.82*10 <sup>-7</sup>	1.42*10 <sup>-8</sup>	0.014868	0.002880	0.000105	0.484132	0.076150	0.276602	NOX1	
LGR5	0.113044	0.067324	0.310747	0.542450	0.212260	0.734597	0.581250	0.369986	LGR5	
SMAD	0.971909	0.308567	0.422277	0.960029	0.212260	0.670418	0.088084	0.239986	SMAD	
MS4	0.207422	0.914299	0.683069	0.451572	0.116456	0.994245	0.231517	0.213259	MS4	
TIMP1	0.293995	0.012131	0.899172	0.193151	0.006792	0.367249	0.013538	0.048180	TIMP1	
Ki-67	0.549406	0.914299	0.195242	0.118038	0.569674	0.767430	0.898716	0.937562	Ki-67	
TERT	0.003315	0.000013	0.430463	0.651793	2.59*10 <sup>-7</sup>	0.431733	5.35*10 <sup>-8</sup>	2.95*10 <sup>-7</sup>	TERT	
	sigmoid colon	rectum	descending colon	sigmoid colon	rectum	sigmoid colon	rectum	rectum	Level 2	
	ascending colon	ascending colon	transverse colon	transverse colon	transverse colon	descending colon	descending colon	sigmoid colon	Level 1	

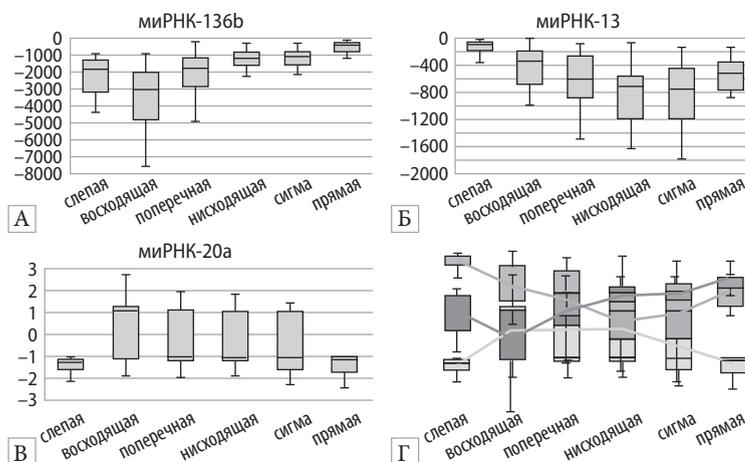
Статистически значимые различия в экспрессии между разными отделами были получены для миРНК-135b, миРНК-31 и миРНК-20. Среди белок-кодирующих генов достоверные различие получились для генов MUC2, NOX1, TERT и CDX2. Относительная экспрессия этих миРНК и генов в разных отделах толстой кишки представлена на ри-

сунках 3 и 4. К списку вышеприведённых генов был добавлен еще ген LGR5, поскольку для него тоже был получен явный тренд в изменении экспрессии между отделами, хотя отличия не статистически значимы.

Для оценки уровня экспрессии использовали отношение медианных значений исследуемых показателей (таблица 2).

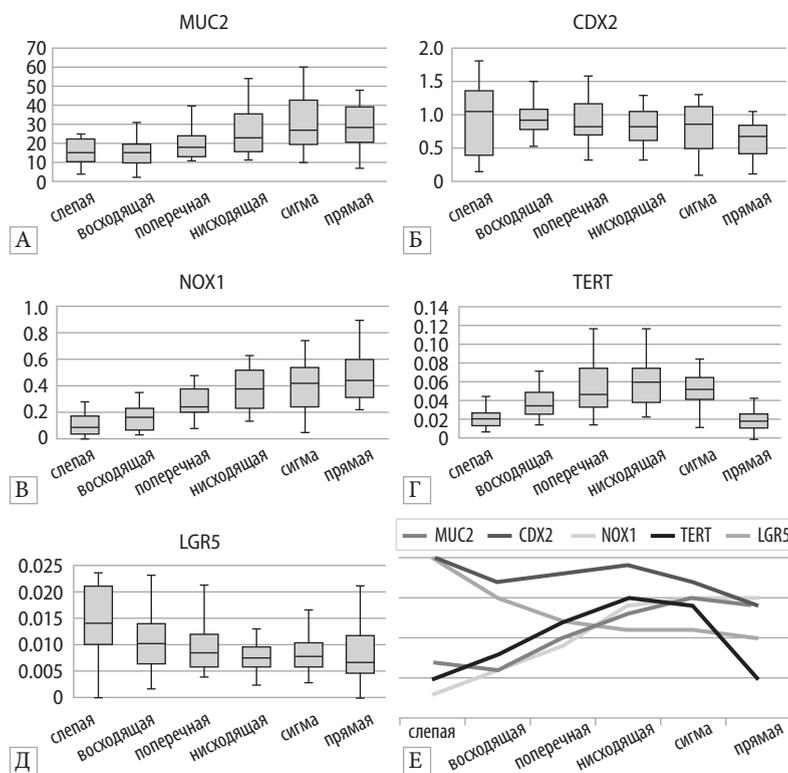
Рисунок 3. Относительный уровень экспрессии миРНК в разных отделах толстой кишки.

Figure 3. Relative expression level of miRNAs in different parts of the colon.



**Рисунок 4.** Относительный уровень экспрессии 5 генов в разных отделах толстой кишки.

**Figure 4.** Relative expression level of 5 genes in different parts of the colon.



**Таблица 2.** Отношение медианных значений уровней экспрессии миРНК и мРНК для которых была показана статистически значимая разница экспрессии по крайней мере между двумя отделами ТК.

**Примечание:** Полу жирным шрифтом выделены отношения >2.  
**Table 2.** Ratio of median expression levels of miRNA and mRNA showing statistically significant differences in expression between at least two sections of the colon.

**Note:** Ratios >2 are in semibold.

уровень 1	уровень 2	миР-135b	миР-20a	миР-31	MUC2	CDX2	NOX1	TERT		
слепая	восходящая ободочная	1.64	1.39	3.18	1.03	1.15	1.93	1.67	ascending colon	cecum
слепая	поперечная ободочная	1.03	1.25	5.59	1.18	1.28	2.79	2.19	transverse colon	cecum
слепая	нисходящая ободочная	1.50	1.24	6.51	1.53	1.28	4.42	2.82	descending colon	cecum
слепая	сигмовидная ободочная	1.63	1.20	6.93	1.80	1.22	4.88	2.46	sigmoid colon	cecum
слепая	прямая	3.97	1.10	4.75	1.91	1.54	5.09	1.17	rectum	cecum
восходящая ободочная	поперечная ободочная	1.69	1.12	1.76	1.15	1.12	1.45	1.32	transverse colon	ascending colon
восходящая ободочная	нисходящая ободочная	2.46	1.13	2.05	1.48	1.12	2.29	1.69	descending colon	ascending colon
восходящая ободочная	сигмовидная ободочная	2.67	1.16	2.18	1.75	1.06	2.53	1.47	sigmoid colon	ascending colon
восходящая ободочная	прямая	6.51	1.27	1.49	1.85	1.34	2.64	1.95	rectum	ascending colon
поперечная ободочная	нисходящая ободочная	1.46	1.01	1.16	1.29	1.00	1.58	1.29	descending colon	transverse colon
поперечная ободочная	сигмовидная ободочная	1.58	1.04	1.24	1.53	1.06	1.75	1.12	sigmoid colon	transverse colon
поперечная ободочная	прямая	3.85	1.13	1.18	1.62	1.20	1.82	2.56	rectum	transverse colon
нисходящая ободочная	сигмовидная ободочная	1.08	1.03	1.06	1.18	1.05	1.10	1.15	sigmoid colon	descending colon
нисходящая ободочная	прямая	2.64	1.13	1.37	1.25	1.20	1.15	3.30	rectum	descending colon
сигмовидная ободочная	прямая	2.44	1.10	1.46	1.06	1.27	1.04	2.87	rectum	sigmoid colon
		<b>миР-135b</b>	<b>миР-20a</b>	<b>миР-31</b>	<b>MUC2</b>	<b>CDX2</b>	<b>NOX1</b>	<b>TERT</b>	<b>Level 2</b>	<b>Level 1</b>

## Обсуждение

Удаление всех выявленных эпителиальных новообразований толстой кишки позволяет существенно сократить частоту КРР [21, 22]. Вместе с тем, удаление аденом не всегда предупреждает развитие КРР [23]. Интервальные раки – опухоли, возникающие в период между скрининговыми исследованиями, в том числе после удаления выявленных аденом – не находят логичного объяснения, поскольку найденные аденомы уже удалены [21, 24].

Некоторые исследователи считают, что спорадические изменения свойств нормальной слизистой оболочки, особенно в местах физиологических сфинктеров, может объяснить быстрое развитие КРР на фоне нормальной слизистой оболочки [8, 25]. С другой стороны, доказана связь хронического колита и дивертикулярной болезни с КРР [26, 27]. Вместе с тем, при микроскопическом колите выявляется снижение риска развития аденом [28]. По нашим данным, более 70% случаев новообразований сочетались с признаками хронического неспецифического воспаления. Тем не менее, 27% случаев новообразований не имели явных изменений слизистой оболочки и клинических проявлений заболеваний толстой кишки. Учитывая возрастание частоты и числа эпителиальных новообразований с возрастом, частоты выявления хронического неспецифического колита с возрастом, для исследования нормальной слизистой оболочки были отобраны пациенты преимущественно старших возрастных групп. Конечно, КРР в возрасте до 40 лет имеют место быть [29], но наши результаты анализа эпителиальных новообразований выделяют все же проблемы старших возрастных групп.

В своей работе мы провели исследование профилей экспрессии ряда миРНК и белок-кодирующих генов, связанных с развитием или прогнозом КРР, в нормальной слизистой оболочке разных отделов толстой кишки. Из 9 миРНК для трех была обнаружена статистически достоверная разница экспрессии между, по крайней мере, двумя отделами ТК: миРНК-135b, миРНК-31 и миРНК-20.

Для миРНК-135b есть данные, что уменьшение ее экспрессии снижает пролиферацию и миграцию клеток слизистой ТК и желудка [30, 31], в нашем исследовании минимальная экспрессия этой миРНК была зафиксирована в восходящей, а максимальная – в прямой кишке, а разница между этими крайними точками (по медианам) составила 6.5 раз (Таблица 2).

МиРНК-31 является одновременно онкогенной и онкосупрессорной, поскольку она может ингибировать онкогенез и индуцировать апоптоз при раке яичников, раке простаты, раке желудка, глиоме и т.д., но, в то же время, усиливать развитие и прогрессирование опухоли при раке поджелудочной железы, колоректальном раке, раке пищевода и т.д. [32]. Механизм, лежащий в основе такого разнонаправленного действия, пока не ясен, однако известно, что миРНК-31 может взаимодействовать с рядом сигнальных путей, включая RAS/MARK, PI3K/AKT и RB/E2F. В нашем исследовании, экспрессия миРНК-31 последовательно снижалась от слепой к сигмовидной кишке (в отличие от миРНК-135b,

для которой экспрессия повышалась от восходящей к прямой кишке), разница между крайними значениями экспрессии (по медианам) составила 6.9 раз (Таблица 2).

Относительно белок-кодирующих генов, статистически достоверная разница экспрессии между, по крайней мере, двумя отделами ТК была обнаружена для 4 генов: MUC2, NOX1, TERT и CDX2. Некоторые из этих генов связаны именно с эпителием кишечника: MUC2 кодирует один из вариантов муцина, высокомолекулярного гликопротеина, продуцируемого многими эпителиальными тканями. Белок, кодируемый этим геном, характерен именно для ТК, он секретируется и образует нерастворимый слизистый барьер, защищающий просвет кишечника. CDX2, в свою очередь, представляет собой фактор транскрипции, который является регулятором генов, специфичных для кишечника, участвующих в росте и дифференцировке клеток. Хотя для них были зафиксированы статистически значимые отличия в экспрессии между отделами, размах этих отличий невелик, для MUC2 он составляет 1.9 раза, для CDX2 – 1.5 раза (Таблица 2), что, возможно, просто отражает разное количество стволовых клеток в разных отделах ТК или особенностями криптогенеза в недиспластической СО [25].

Наибольший разброс значений экспрессии в разных отделах ТК был обнаружен для гена NOX1 – между слепой и прямой кишкой – в 5.1 раз (Таблица 2). Ген NOX1 кодирует члена семейства ферментов НАДФН-оксидазы, ответственных за каталитический одноэлектронный перенос кислорода с образованием супероксида или перекиси водорода, активно экспрессируется в эпителии толстой кишки. Эти процессы важны для сохранения анаэробной среды в кишке и относительной гипоксии эпителия в нормальной слизистой оболочке.

Ген TERT кодирует теломеразу – рибонуклеопротеиновый фермент, необходимый для репликации концов хромосом у большинства эукариот. Активен в стволовых и раковых клетках. В нормальных соматических клетках неактивен или имеет очень низкую активность. В нашей работе разброс значений экспрессии этого гена между отделами толстой кишки составил 3.3 раза (Таблица 2), создавая условия для рисков неоплазий в крайних отделах толстой кишки. Это соответствует сведениям, что частота аденом нисходящей, сигмовидной и прямой кишки является преобладающей над правыми отделами [5].

Сравнение динамики изменений (рисунок 3Г-4Е) поэтажных значений экспрессии показывает наибольший разброс показателей экспрессии в начале (слепой кишке) и конце (прямая кишка) ТК. С практической точки зрения можно считать, что следует учитывать те случаи, когда отношение экспрессии маркеров между отделами ТК больше 2. Этому критерию соответствуют две миРНК: –135b и 31, и две мРНК: NOX1 и TERT. Их использование для диагностики КРР требует учета того, в каком отделе расположена опухоль. Например, можно исключить из рассмотрения рак слепой кишки,

поскольку он составляет в структуре КРР лишь около 5% [33], а это уберет большой разброс экспрессии между отделами для миРНК-31 и NOX1,

и отдельно рассматривать опухоли восходящей ободочной, поперечной/нисходящей/сигмовидной ободочной и прямой кишки.

## Выводы

1. Частота хронических неспецифических колитов увеличивается с возрастом и сопровождается эпителиальные новообразования толстой кишки в 72,3% случаев.
2. 27,7% пациентов с эпителиальными новообразованиями толстой кишки не имеют явных изменений слизистой оболочки
3. нормальная/макроскопически неизменная СО имеет существенные молекулярно-генетические различия в разных отделах
4. Из изученных 9 миРНК и 9 мРНК-маркеров существенная разница в экспрессии в неизменной слизистой разных отделов ТК была зафиксирована для 2 миРНК: -135b и 31, и 2 мРНК: NOX1 и TERT.
5. Использование этих миРНК и мРНК в качестве диагностических или прогностических маркеров КРР требует рассматривать отдельно опухоли слепой кишки, восходящей ободочной, поперечной/нисходящей/сигмовидной ободочной и прямой кишки.
6. Изменения экспрессии генов, регулирующих пролиферацию клеток, репликацию РНК и обеспечивающих равновесие оксигенации эпителия с анаэробностью внутри кишки совпадают с дистальными сегментами толстой кишки, имеющими наибольшую частоту выявления эпителиальных новообразований

## Литература | References

1. Sullivan B. A., Redding T. S. 4th, Qin X. et al. Ten or More Cumulative Lifetime Adenomas Are Associated with Increased Risk for Advanced Neoplasia and Colorectal Cancer. *Dig Dis Sci.* 2022 Jun;67(6):2526–2534. doi: 10.1007/s10620-021-07069-0.
2. Jeon S. A., Ha Y. J., Kim J. H. et al. Genomic and transcriptomic analysis of Korean colorectal cancer patients. *Genes Genomics.* 2022 Aug;44(8):967–979. doi: 10.1007/s13258-022-01275-4.
3. Fernandez-Rozadilla C., Timofeeva M., Chen Z. et al. Deciphering colorectal cancer genetics through multi-omic analysis of 100,204 cases and 154,587 controls of European and east Asian ancestries. *Nat Genet.* 2023 Jan;55(1):89–99. doi: 10.1038/s41588-022-01222-9.
4. Liang P. S., Williams J. L., Dominitz J. A. et al. Age-Stratified Prevalence and Predictors of Neoplasia Among U.S. Adults Undergoing Screening Colonoscopy in a National Endoscopy Registry. *Gastroenterology.* 2022 Sep;163(3):742–753.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2022.05.036.
5. Koyuncuer A., Zen T. New Classification of Benign Epithelial Tumors: Colorectal Polyps and Synchronous Neoplasms: An Update and Critical Assessment: An Analysis of 678 Consecutive Cases and 1137 Polyps. *Medeni Med J.* 2023 Mar 28;38(1):39–44. doi: 10.4274/MMJ.galenos.2023.22755.
6. Cannon E., Buechler S. Colon Cancer Tumor Location Defined by Gene Expression May Disagree With Anatomic Tumor Location. *Clin Colorectal Cancer.* 2019 Jun;18(2):149–158. doi: 10.1016/j.clcc.2019.02.002.
7. Rosser R., Corfe B. M., Chapple K. S. Metachronous Colorectal Adenomas Occur Close to the Index Lesion. *J Clin Gastroenterol.* 2023 Oct 1;57(9):937–944. doi: 10.1097/MCG.0000000000001758.
8. Lee-Six H., Olafsson S., Ellis P. et al. The landscape of somatic mutation in normal colorectal epithelial cells. *Nature.* 2019 Oct;574(7779):532–537. doi: 10.1038/s41586-019-1672-7.
9. Siskova A., Cervena K., Kral J., Hucl T., Vodicka P., Vymetalkova V. Colorectal Adenomas-Genetics and Searching for New Molecular Screening Biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2020 May 5;21(9):3260. doi: 10.3390/ijms21093260.
10. Buikhuisen J. Y., Torang A., Medema J. P. Exploring and modelling colon cancer inter-tumour heterogeneity: opportunities and challenges. *Oncogenesis.* 2020 Jul 9;9(7):66. doi: 10.1038/s41389-020-00250-6.
11. Dunne P. D., Arends M. J. Molecular pathological classification of colorectal cancer – an update. *Virchows Arch.* 2024 Feb;484(2):273–285. doi: 10.1007/s00428-024-03746-3..
12. Koncina E., Haan S., Rauh S., Letellier E. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers for Colorectal Cancer: Updates and Challenges. *Cancers (Basel).* 2020 Jan 30;12(2):319. doi: 10.3390/cancers12020319.
13. Lascorz J., Chen B., Hemminki K., Försti A. Consensus pathways implicated in prognosis of colorectal cancer identified through systematic enrichment analysis of gene expression profiling studies. *PLoS One.* 2011 Apr 25;6(4): e18867. doi: 10.1371/journal.pone.0018867.
14. Kim K., Kim Y. W., Shim H. et al. Differences in clinical features and oncologic outcomes between metastatic right and left colon cancer. *J BUON.* 2018 Dec;23(7):11–18. PMID: 30722106
15. Bauer K. M., Hummon A. B., Buechler S. Right-side and left-side colon cancer follow different pathways to relapse. *Mol Carcinog.* 2012 May;51(5):411–21. doi: 10.1002/mc.20804.
16. Fontana E., Eason K., Cervantes A., Salazar R., Sadanandam A. Context matters-consensus molecular subtypes of colorectal cancer as biomarkers for clinical trials. *Ann Oncol.* 2019 Apr 1;30(4):520–527. doi: 10.1093/annonc/mdz052.
17. Baran B., MertOzupek N., YerliTetik N., Acar E., Bekcioglu O., Baskin Y. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Res.* 2018 Aug;11(4):264–273. doi: 10.14740/gr1062w.
18. Anischenko V. V., Arkhipova A. A., Titov S. E., Poloz T. L., Bubnov I. V. Analysis of expression of mirna and mrna in the cellular material of the stomach lining obtained by esophagogastroduodenoscopy in order to detect dysplasia and stomach cancer. *Surgical practice (Russia).* 2021;(4):53–60. (In Russ.) doi: 10.38181/2223-2427-2021-4-53-60.

- Анищенко В.В., Архипова А.А., Титов С.Е., Полоз Т.Л., Бубнов И.В. Анализ экспрессии мРНК и мРНК в клеточном материале слизистой оболочки желудка, полученного при эзофагогастродуоденоскопии, для выявления дисплазии и рака желудка. Хирургическая практика. 2021;(4):53–60. doi: 10.38181/2223–2427–2021–4–53–60.
19. Chen C., Ridzon D. A., Broomer A. J. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33: e179. doi: 10.1093/nar/gni178.
  20. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods*. 2001;25:402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
  21. Harewood R., Wooldrage K., Robbins E. C. et al. Adenoma characteristics associated with post-polypectomy proximal colon cancer incidence: a retrospective cohort study. *British Journal of Cancer* (2022) 126:1744–1754; doi: 10.1038/s41416–022–01719–4.
  22. Shimada S., Hotta K., Takada K. et al. Complete endoscopic removal rate of detected colorectal polyps in a real world out-patient practical setting. *Scand J Gastroenterol*. 2023 Apr;58(4):422–428. doi: 10.1080/00365521.2022.2132533.
  23. Mouchli M. A., Ouk L., Scheitel M. R. et al. Colonoscopy surveillance for high risk polyps does not always prevent colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2018 Feb 28;24(8):905–916. doi: 10.3748/wjg.v24.i8.905.
  24. Tollivoro T. A., Jensen C. D., Marks A. R. et al. Index colonoscopy-related risk factors for postcolonoscopy colorectal cancers. *Gastrointest Endosc*. 2019 Jan;89(1):168–176.e3. doi: 10.1016/j.gie.2018.08.023.
  25. Rubio C. A., Schmidt P. T. Nondysplastic Crypts in Fission in Nonpolypoid Adenomas and in the Adjacent Mucosa Support Field Cancerization in the Colon. *Anticancer Res*. 2021 Mar;41(3):1515–1521. doi: 10.21873/anticancer.14910.
  26. Aceto G. M., Catalano T., Curia M. C. Molecular Aspects of Colorectal Adenomas: The Interplay among Microenvironment, Oxidative Stress, and Predisposition. *Biomed Res Int*. 2020 Mar 16;2020:1726309. doi: 10.1155/2020/1726309.
  27. Viscido A., Ciccone F., Vernia F. et al. Association of Colonic Diverticula with Colorectal Adenomas and Cancer. *Medicina* 2021, 57, 108. doi: 10.3390/medicina57020108.
  28. Kamboj A.K., Zylberberg H.M., Lane C.M. et al. Microscopic Colitis and Risk of Colon Adenomas: A Multicenter Retrospective Cohort Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022 Apr;20(4): e902–e904. doi: 10.1016/j.cgh.2021.05.050.
  29. McClelland P.H., Liu T., Ozuner G. Early-Onset Colorectal Cancer in Patients under 50 Years of Age: Demographics, Disease Characteristics, and Survival. *Clin Colorectal Cancer*. 2022 Jun;21(2): e135–e144. doi: 10.1016/j.clcc.2021.11.003.
  30. Zhang Y., Zhang W., Xia W. et al. Downregulation of hsa-miR-135b-5p Inhibits Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Colon Adenocarcinoma. *Genet Res (Camb)*. 2022 Oct 21;2022:2907554. doi: 10.1155/2022/2907554.
  31. Chen Z., Gao Y., Gao S. et al. MiR-135b-5p promotes viability, proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting Krüppel-like factor 4 (KLF4). *Archives of Medical Science*. 2020;16(1):167–176. doi: 10.5114/aoms.2019.87761.
  32. Yu.T., Ma.P., Wu.D. et al. Functions and mechanisms of microRNA-31 in human cancers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018, V. 108: 1162–1169. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.132.
  33. Burtsev D. V. Efficiency of screening of colorectal tumors on the basis of regional consultative and diagnostic center. *Practical Medicine*. 2012;(57):214–217. (in Russ.)  
Бурцев Д.В. Эффективность скрининга опухолей толстой кишки на базе регионального консультативно-диагностического центра. *Практическая медицина*. 2012;2(57): 214–217.