



Сравнительная посегментарная молекулярно-генетическая оценка колоректального рака в содружестве эндоскопии и хирургии многопрофильной больницы

Короткевич А.Г.^{1,2}, Титов С.Е.^{3,5,6}, Жилина Н.М.¹, Деменков П.С.^{3,4}, Веряскина Ю.А.^{4,5}, Маринич Я.Я.⁷

¹ 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)

² Новокузнецкая городская клиническая больница им. А.А. Луцика, (пр. Советской Армии, д. 49, г. Новокузнецк, 654038, Россия)

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», (ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090, Россия)

⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (пр. Ак. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090, Россия)

⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, (пр. Ак. Лаврентьева, 8/2, Новосибирск, 630090, Россия)

⁶ АО «Вектор-Бест», (Научно-производственная зона, к. 36, р.п. Кольцово, 630559, Россия)

⁷ Новокузнецкая городская клиническая больница № 1 имени Г.П. Курбатова, (пр. Бардина, д. 28, г. Новокузнецк, 654057, Россия)

Для цитирования: Короткевич А.Г., Титов С.Е., Жилина Н.М., Деменков П.С., Веряскина Ю.А., Маринич Я.Я. Сравнительная посегментарная молекулярно-генетическая оценка колоректального рака в содружестве эндоскопии и хирургии многопрофильной больницы. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2025;(5): 79–88 doi: 10.31146/1682-8658-ecg-237-5-79-88

✉ Для переписки:

Короткевич

Алексей

Григорьевич

alkorot@mail.ru

Короткевич Алексей Григорьевич, д.м.н., профессор, профессор кафедры хирургии, урологии, эндоскопии и детской хирургии; заведующий отделением эндоскопии

Титов Сергей Евгеньевич, кандидат биол. наук, старший научный сотрудник, отдел структуры и функции хромосом

Жилина Наталья Михайловна, доктор техн. наук, доцент, заведующая кафедрой медицинской кибернетики и информатики

Деменков Павел Сергеевич, кандидат техн. наук, доцент, кафедра дискретной математики и информатики ММФ и СУНЦ; научный сотрудник; ведущий научный сотрудник Центра искусственного интеллекта

Веряскина Юлия Андреевна, кандидат биол. наук, научный сотрудник, лаборатория генной инженерии

Маринич Яна Ярославовна, к.м.н., врач эндоскопист

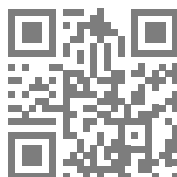
Резюме

Целью исследования явилась сравнительная оценка частоты посегментарного выявления раков толстой кишки при плановой эндоскопии с результатами хирургического лечения опухолевой кишечной непроходимости вместе с попарным молекулярно-генетическим анализом КРР и слизистой оболочки индексного сегмента толстой кишки с позиций изучения предрактовых изменений.

Материал и методы. В сплошном поперечном ретроспективном исследовании изучены результаты 3086 колоноскопий и 63 протоколов операций пациентов с опухолевой кишечной непроходимостью. В проспективном исследовании были изучены 401 клеточный образец: раков толстой кишки – 118, слизистой оболочки индексного сегмента – 114, нормальная слизистая – 169. Определяли относительные уровни экспрессии 9 мПНК-маркеров, связанных с развитием КРР: мПНК-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 ПНК U6, а также мПНК-16–5p и –191–5p. Также оценивали мПНК генов: MUC2, CDX2, NOX1, LGR5, SMAD4, MS4A12, TIMP1, Ki-67, TERT с нормировкой на гены домашнего хозяйства PGK1и PUM1.

Результаты. Общая частота выявления КРР при колоноскопии составила 4,93% (152 случая). При колоноскопии и при оперативных вмешательствах преобладали раки левой половины толстой кишки. Уровни экспрессии мПНК и белок-кодирующих генов в опухолях между сегментами толстой кишки значительно варьируют, что может скрывать некоторые закономерности, но позволяет говорить об уникальности каждого сегмента толстой кишки. Одинаковые уровни экспрессии в индексной слизистой оболочке и в раках выявлены для мПНК-200a в восходящей кишке, для мПНК-21 в прямой кишке, для мПНК-34a и LGR5 в левой половине. Опухоли разных сегментов толстой кишки оказались гетерогенны по изученным мутациям, однако, в слизистой оболочке разных сегментов толстой кишки такого разнообразия нет.

EDN: LWUWQQ



Заключение. Полученные результаты позволяют говорить о необходимости расширения поиска предраковых изменений при колоноскопии.

Ключевые слова: колоректальный рак, сегменты толстой кишки, молекулярно-генетические изменения слизистой оболочки, экспрессия мРНК, экспрессия белок-кодирующих генов, мутации генов, предраковые изменения

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Comparative segmental molecular genetic assessment of colorectal cancer in the community of endoscopy and surgery of a multidisciplinary hospital

A.G. Korotkevich^{1,2}, S.E. Titov^{3,5,6}, N.M. Zhilina¹, P.S. Demenkov^{3,4}, Yu.A. Veryaskina^{4,5}, Ya.Ya. Marinich⁷

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

² Novokuznetsk City Clinical Hospital No. 29 named after A.A. Lutsik, Russian Federation, (49, Sovetskaya Armiya Ave, Novokuznetsk, 654038, Russia)

³ Novosibirsk State University, (1, Pirogova str., Novosibirsk, 630090, Russia)

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

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

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

⁷ Novokuznetsk City Clinical Hospital No. 1 named after G.P. Kurbatov, (28, pr. Bardina, Novokuznetsk, 654057, Russia)

For citation: Korotkevich A.G., Titov S.E., Zhilina N.M., Demenkov P.S., Veryaskina Yu.A., Marinich Ya.Ya. Comparative segmental molecular genetic assessment of colorectal cancer in the community of endoscopy and surgery of a multidisciplinary hospital. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2025;(5): 79–88. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-237-5-79-88

✉ **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

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

Natalia M. Zhilina, Head of the Department of Medical Cybernetics and Informatics, Doctor of Technical Sciences, Associate Professor; ORCID: 0000–0001–7871–3885, Research ID: MBV-3779–2025, SPIN: 5468–3823

Pavel S. Demenkov, PhD, Associate Professor, Department of Discrete Mathematics and Computer Science, MMF and SSC; Researcher; leading Researcher at the Artificial Intelligence Center; 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

Yana Ya. Marinich, candidate of medical sciences, endoscopist, ORCID: 0000–0003–4522–4174

Summary

The aim of the study was to compare the frequency of segmental detection of colon cancer during routine endoscopy with the results of surgical treatment of tumor intestinal obstruction together with paired molecular genetic analysis of CRC and the mucous membrane of the index segment of the colon from the standpoint of studying precancerous changes.

Material and methods. In a continuous cross-sectional retrospective study, the results of 3086 colonoscopies and 63 surgical protocols of patients with tumor intestinal obstruction were studied. In a prospective study, 401 cell samples were studied: colon cancer – 118, index segment mucosa – 114, normal mucosa – 169. The relative expression levels of 9 miRNA markers associated with the development of CRC were determined: miR-135b-5p, –141–3p, –143–3p, –200a-3p, –20a-5p, –21–5p, –31–5p, –34a-5p, –92a-3p, small nuclear RNA U6, as well as miRNA-16–5p and –191–5p. The mRNA of the following genes was also assessed: MUC2, CDX2, NOX1, LGR5, SMAD4, MS4A12, TIMP1, Ki-67, TERT with normalization to the housekeeping genes PGK1 and PUM1.

Results. The overall frequency of CRC detection during colonoscopy was 4.93% (152 cases). During colonoscopy and surgical interventions, cancers of the left half of the colon prevailed. The expression levels of miRNA and mRNA in tumors between colon segments vary significantly, which may hide some patterns, but allows us to talk about the uniqueness of each segment of the colon. The same expression levels in the index mucosa and in cancers were found for miRNA-200a in the ascending colon, for miRNA-21 in the rectum, for miRNA-34a and LGR5 in the left half. Tumors of different segments of the colon turned out to be heterogeneous in the studied mutations, however, there is no such diversity in the mucosa of different segments of the colon.

Conclusion. The obtained results allow us to speak about the necessity of searching for precancerous changes during colonoscopy.

Keywords: colorectal cancer, colon segments, molecular genetic changes in the mucous membrane, miRNA expression, gene expression, gene mutations, precancerous changes

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

Актуальность

Колоректальный рак (КРР) остается актуальной проблемой хирургической гастроэнтерологии [1, 2, 3]. Постоянный долгосрочный поиск предикторов КРР, изучение результатов хирургического и таргетного лечения, особенностей метастазирования, возрастных и гендерных особенностей позволили обосновать программы скрининговой колоноскопии с удалением всех новообразований [4, 5, 6]. Такая тактика позволила существенно снизить в популяции риск возникновения КРР, однако, индивидуальные прогностические модели для конкретного пациента до сих пор оказываются несостоятельными [2, 7]. Углубленный поиск на молекулярно-генетическом уровне выявляет параметры уже возникших КРР [1, 8]. Гетерогенность как уже известных результатов оценки КРР, так и результатов лечения КРР разной локализации вместе с разной частотой поражения правой и левой половины толстой кишки (ТК) поднимают вопрос дальнейшего углубленного исследования раков разной локализации и предикторов их возникновения [9, 10].

Очевидно, что все скрининговые тесты и разнообразные молекулярно-генетические исследования направлены на оценку уже возникших опухолей.

Материал и методы

Сплошное поперечное ретроспективное исследование результатов 3086 колоноскопий в отделении эндоскопии и 63 протоколов операций пациентов с опухолевой кишечной непроходимостью отделения общей хирургии НГКБ № 29 им. А.А. Луцка в 2019–2020 гг. Проспективное исследование (2022–2023 гг.) СО ТК у 152 пациентов с раками ТК. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НГКБ № 29 от 19.04.2022 и НГИУВа от 24.02.2024. Материал был получен в соответствии с Хельсинкской 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 деперсонализированы. Использовали эндоскопы высокого разрешения с функцией виртуальной хромоскопии. Биоптаты из каждого отдела толстой кишки помещали на предметное стекло, делали мазок, высушивали. Биоптат СО брали не ближе 10 см от рака из индексного сегмента. В мазках определяли относительные уровни экспрессии мРНК

Поиск предраковых предикторов, особенно в посегментарной оценке ТК продолжается [8]. До сих пор, принятые разными обществами рекомендации по профилактике и раннему выявлению КРР выделяют возможные факторы риска появления КРР, общие для популяции, но не для конкретного пациента, а рекомендованные скрининговые тесты для выявления раннего КРР замыкаются на визуальной диагностике при колоноскопии [11, 12]. К тому же, разная интерпретация гистологической картины при эндоскопической резекции слизистой оболочки (СО) толстой кишки (ТК) подтверждает ведущую роль оценки визуальных изменений СО в своевременной диагностике раннего КРР [13]. Однако, не встретилось работ, направленных на изучение неизменной СО ТК в поисках предикторов КРР или оценки риска появления КРР.

Целью исследования явилась сравнительная оценка частоты посегментарного выявления раков ТК при плановой эндоскопии с результатами хирургического лечения опухолевой кишечной непроходимости вместе с попарным молекулярно-генетическим анализом КРР и слизистой оболочки (СО) индексного сегмента ТК с позиций изучения предраковых изменений.

и белок-кодирующих генов, всего в рамках данной работы был исследован 401 клеточный образец: раков ТК – 118, СО индексного сегмента (СО(рак+)) – 114, нормальная слизистая (СО(рак–)) – 169.

Для некоторых сравнений (при отсутствии различий меж сегментами) образцы поперечной, нисходящей и сигмовидной ободочной кишки объединяли под аббревиатурой ПНС.

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 [14].

Первичный отбор набора мРНК для анализа был осуществлен на основании анализа литературы. В итоге был сформирован список из 9 мРНК-маркеров, связанных с развитием КРР: miP-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 (мяРНК) U6, а также мРНК-16-5p и -191-5p. Помимо мРНК, 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 мРНК U6 использовали метод, предложенный Chen C. с 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) [12]. Для каждой миРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ. Нормировку содержания миРНК проводили на среднее содержание мРНК U6, а также миРНК-16 и -191 в образце с помощью метода $2^{-\Delta Cq}$ [15]. 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 в качестве нормализатора. Уровень относительной экспрессии рассчитывали с помощью метода $2^{-\Delta Cq}$.

Детекцию соматических мутаций проводили с помощью аллель-специфичной ПЦР с гидролизом зондом. Протокол ПЦР: предварительный прогрев при 95°C – 2 мин, 50 циклов: денатурация при 94°C – 10 сек, отжиг и элонгация: 60°C – 15 сек.

Статистический анализ проведен с использованием пакета IBM SPSS Statistics-22 и STATISTICA 10 (TIBCO Software, США). По результатам исследования создана база данных, выполнен ее первичный анализ. Сравнение двух независимых выборок по количественному признаку проводили при помощи критерия Манна-Уитни, качественных признаков при помощи критерия χ^2 . Коррекция уровня значимости для устранения эффекта множественных сравнений производилась с помощью поправки Бонферрони.

Результаты

Общая частота выявления КРР при колоноскопии составила 152 случая (4,93%) и 15,5% от всех выявленных эпителиальных новообразований в ТК. Доля хирургических пособий для пациентов с опухолевой непроходимостью составила в структуре операций при кишечной непроходимости 74% (63 случая).

Оценка частоты как посегментарного выявления при колоноскопии раков ТК, так и локализации раков ТК как причины для оперативного пособия не выявили значимых различий. Частота КРР по локализации при эндоскопии и хирургических пособиях представлена на рис. 1.

И при колоноскопии, и при оперативных вмешательствах преобладали раки левой половины ТК (рис. 2).

С левой (дистальной) локализацией рака был связан объем первичного хирургического пособия – для раков сигмовидной и прямой кишки было использование колостомии, а для раков правой половины – первичные резецирующие операции с восстановлением проходимости ($\chi^2=15,07$, $p=0,000231$).

С помощью ОТ-ПЦР-РВ была определена относительная экспрессия 9 миРНК и 9 белок-кодирующих генов, связанных с развитием КРР. В табл. 1 приведены данные по статистической значимости

различий между экспрессией миРНК/генов в образцах КРР, относящихся к разным отделам ТК.

С учетом поправки на множественные сравнения, различия, для которых p -значения оказались меньше $1,85E-04$, считались статистически значимыми. Такие различия были получены для миРНК-135b при сравнении уровней экспрессии в восходящей кишке со слепой, сигмовидной и прямой кишкой. А также для экспрессии гена TIMP1 при сравнении слепой и восходящей кишки.

Уровни экспрессии миРНК и генов в опухолях между сегментами ТК варьируют, что может скрывать некоторые закономерности, но позволяет говорить об уникальности каждого сегмента ТК (рис. 3, 4).

Далее мы определили статистическую значимость различий между экспрессией миРНК/генов в образцах, относящихся к разным типам и разным отделам толстой кишки, данные приведены в табл. 2 и 3.

С точки зрения идеи существования предраковых изменений в слизистой нам интересны случаи, когда между раком и СО(рак+) нет достоверной разницы, а между СО(рак+) и СО(рак-), а также раками и СО(рак-) такая разница есть. Несколько таких случаев есть: с некоторыми оговорками для миРНК-200a в восходящей кишке, для миРНК-21 в прямой кишке, для миРНК-34a и LGR5 в ПНС.

Рисунок 1.

Распределение КРР по сегментам ТК по результатам плановой колоноскопии и хирургических пособий.

Figure 1.

Distribution of CRC by colon segments based on the results of routine colonoscopy and surgical interventions.

Рисунок 2.

Частота поражения раком правой и левой половины ТК.

Figure 2.

Frequency of cancer lesions in the right and left halves of the colon.

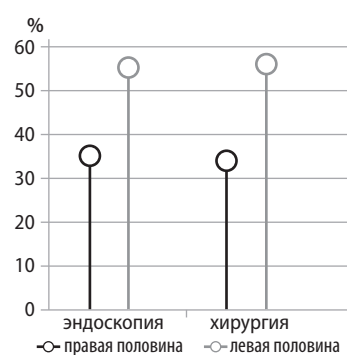
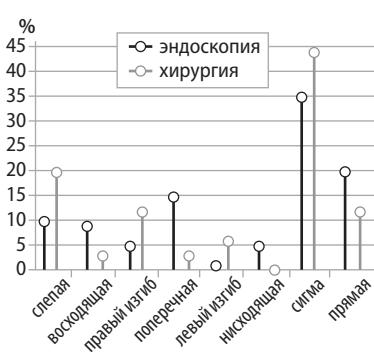


Таблица 1.
Уровень значимо-
сти статистических
различий при по-
парном сравнении
экспрессии миРНК/
генов в образцах
КРР, относящихся
к разным отде-
лам ТК

Примечание.
Жирным шрифтом
выделены значи-
мые ($p < 1,85E-04$)
различия.

Table 1.
Level of significance
of statistical differ-
ences in pairwise
comparison of miR-
NA/gene expression
in CRC samples
from different parts
of the colon

Note:
Significant
($p < 1,85E-04$)
differences are
highlighted in bold.

	Слепая					Восходящая			
	Восходящая	Поперечная	Нисходящая	Сигмовидная	Прямая	Поперечная	Нисходящая	Сигмовидная	Прямая
миР-135b	1,79E-04	0,487	0,419	0,980	0,251	0,002	0,018	4,66E-05	1,33E-04
миР-141	0,112	0,934	0,187	0,120	0,101	0,097	0,585	0,595	0,642
миР-143	0,341	0,760	0,640	0,342	0,666	0,203	0,431	0,077	0,497
миР-200a	0,009	0,598	0,898	0,073	0,001	0,097	0,130	0,115	0,385
миР-20a	0,916	0,523	0,160	0,900	0,762	0,464	0,363	0,957	0,991
миР-21	0,012	0,255	0,019	0,007	0,183	0,375	0,505	0,508	0,694
миР-31	0,079	0,049	0,328	0,071	0,876	0,010	0,203	0,001	0,044
миР-34a	0,409	0,049	0,250	0,018	0,005	0,263	0,952	0,580	0,372
миР-92a	0,434	0,934	0,831	0,769	0,847	0,671	0,303	0,161	0,335
MUC2	0,341	0,978	0,766	0,585	0,104	0,232	0,163	0,356	0,372
CDX2	6,55E-04	0,192	0,831	0,199	0,028	0,004	0,025	8,57E-04	0,069
NOX1	0,019	0,560	0,640	0,187	0,275	0,153	0,203	6,77E-04	0,513
LGR5	0,024	0,157	0,966	0,913	0,414	0,263	0,249	0,057	0,179
SMAD	0,280	0,487	0,160	0,223	0,515	0,114	0,431	0,820	0,730
MS4	0,007	0,279	0,523	0,085	0,016	0,298	0,034	0,015	0,398
TIMP1	5,28E-05	0,598	0,217	9,58E-04	0,002	0,001	0,025	0,006	0,028
Ki-67	0,244	0,211	0,217	0,171	0,283	0,969	0,856	0,672	0,039
TERT	0,849	0,978	0,898	0,693	0,267	0,969	0,952	0,896	0,411
	Поперечная			Нисходящая		Сигмовидная			
	Нисходящая	Сигмовидная	Прямая	Сигмовидная	Прямая	Прямая			
миР-135b	0,051	0,354	0,616	0,380	0,068	0,106			
миР-141	0,149	0,162	0,124	0,527	0,543	0,938			
миР-143	0,932	0,668	0,594	0,698	0,485	0,162			
миР-200a	0,932	0,516	0,140	0,450	0,091	0,122			
миР-20a	0,799	0,481	0,456	0,228	0,332	0,658			
миР-21	0,270	0,571	0,726	0,951	0,604	0,147			
миР-31	0,149	0,857	0,043	0,475	0,485	0,083			
миР-34a	0,932	0,354	0,616	0,729	0,839	0,444			
миР-92a	0,932	0,814	0,867	0,951	0,910	0,930			
MUC2	0,203	0,967	0,104	0,639	0,332	0,056			
CDX2	0,445	0,006	0,010	0,136	0,131	0,175			
NOX1	0,552	0,534	0,369	0,298	0,636	0,011			
LGR5	0,445	0,263	0,616	0,951	0,769	0,489			
SMAD	0,051	0,074	0,166	0,337	0,232	0,607			
MS4	0,270	0,463	0,594	0,450	0,109	0,024			
TIMP1	0,350	0,028	0,046	0,279	0,355	0,720			
Ki-67	0,932	0,628	0,016	0,527	0,018	0,001			
TERT	0,932	0,750	0,267	0,759	0,543	0,135			

Таблица 2.

Уровень значимости статистических различий при попарном сравнении экспрессии миРНК/генов в разных типах образцов, относящихся к слепой и восходящей ободочной кишке

Примечание.

Жирным шрифтом выделены значимые ($p < 0,000231$) различия. СО (рак-) – нормальная слизистая ТК пациентов без рака; СО (рак+) – нормальная слизистая ТК пациентов с раками.

Table 2.

Level of significance of statistical differences in pairwise comparison of miRNA/gene expression in different types of samples related to the cecum and ascending colon

Note.

Significant differences ($p < 0.000231$) are highlighted in bold. СО (cancer-) – normal colon mucosa of patients without cancer; СО (cancer+) – normal colon mucosa of patients with cancer.

Маркер	Слепая кишка			Восходящая кишка		
	Рак	Рак	СО(рак+)	Рак	Рак	СО(рак+)
	СО(рак+)	СО(рак-)	СО(рак-)	СО(рак+)	СО(рак-)	СО(рак-)
миР-135b	5,49E-05	6,71E-05	0,266	5,68E-05	4,50E-07	3,39E-07
миР-141	0,987	0,266	0,317	0,180	1,64E-03	0,031
миР-143	2,79E-03	1,35E-04	0,118	0,001	1,52E-06	0,515
миР-200a	0,669	0,989	0,583	0,393	4,35E-04	2,82E-05
миР-20a	9,46E-04	8,50E-05	0,190	0,012	0,063	2,30E-05
миР-21	8,44E-04	7,14E-03	0,254	4,61E-05	4,67E-05	0,089
миР-31	1,64E-06	0,027	3,68E-07	1,56E-04	1,46E-05	0,299
миР-34a	0,887	0,545	0,526	0,421	0,137	0,515
миР-92a	4,19E-04	8,43E-04	0,989	5,84E-03	0,392	3,80E-05
MUC2	0,248	0,989	0,050	4,04E-04	0,014	7,31E-06
CDX2	0,110	0,038	0,662	8,57E-05	4,83E-06	0,240
NOX1	0,304	8,43E-04	0,002	0,004	0,175	9,08E-05
LGR5	1,64E-03	2,04E-03	0,375	0,449	0,683	0,022
SMAD	0,017	7,61E-04	0,526	8,57E-05	0,018	0,008
MS4	0,002	0,155	1,53E-03	1,26E-05	4,50E-07	8,26E-05
TIMP1	2,79E-03	1,20E-04	0,662	1,26E-05	4,50E-07	0,113
Ki-67	0,692	0,147	0,345	0,124	2,62E-04	0,007
TERT	0,189	0,061	1,07E-04	0,449	0,392	0,608

Таблица 3.

Уровень значимости статистических различий при попарном сравнении экспрессии миРНК/генов в разных типах образцов, относящихся к поперечной/нисходящей/сигмовидной ободочной и прямой кишке.

Примечание:

Жирным шрифтом выделены значимые ($p < 0,000231$) различия. СО (рак-) – нормальная слизистая ТК пациентов без рака; СО (рак+) – нормальная слизистая ТК пациентов с раками.

Table 3.

Level of significance of statistical differences in pairwise comparison of miRNA/gene expression in different types of samples related to the transverse/descending/sigmoid colon and rectum.

Note.

Significant differences ($p < 0.000231$) are highlighted in bold. СО (cancer-) – normal colon mucosa of patients without cancer; СО (cancer+) – normal colon mucosa of patients with cancer.

Маркер	ПНС (Поперечная-нисходящая-сигма)			Прямая кишка		
	Рак	Рак	СО(рак+)	Рак	Рак	СО(рак+)
	СО(рак+)	СО(рак-)	СО(рак-)	СО(рак+)	СО(рак-)	СО(рак-)
миР-135b	1,47E-11	1,01E-20	3,20E-04	9,09E-07	1,54E-06	0,297
миР-141	1,08E-05	1,40E-05	0,490	1,22E-04	2,41E-06	0,018
миР-143	1,65E-05	1,17E-08	0,406	1,78E-03	4,03E-04	0,183
миР-200a	0,018	7,44E-03	0,721	5,57E-04	2,48E-03	0,980
миР-20a	8,75E-09	3,21E-08	0,019	3,64E-04	1,65E-03	0,313
миР-21	6,47E-08	1,38E-15	9,39E-05	0,006	1,43E-06	4,16E-05
миР-31	1,77E-11	3,04E-14	0,610	2,00E-07	9,04E-07	0,926
миР-34a	7,33E-04	9,45E-12	7,23E-06	1,70E-03	1,54E-06	0,109
миР-92a	2,18E-06	1,90E-07	0,380	0,003	0,016	0,617
MUC2	4,81E-09	2,65E-08	1,50E-06	1,71E-06	0,002	2,29E-05
CDX2	3,83E-07	2,03E-09	0,981	5,57E-04	3,68E-03	0,926
NOX1	4,58E-03	0,972	4,65E-05	4,57E-03	1,74E-03	0,503
LGR5	2,74E-03	1,57E-10	4,83E-06	0,039	0,001	0,060
SMAD	4,73E-07	4,15E-05	0,019	0,001	0,003	0,779
MS4	2,89E-13	6,49E-18	0,616	1,47E-08	1,34E-07	0,593
TIMP1	2,14E-12	1,44E-17	0,186	2,90E-05	1,76E-05	0,391
Ki-67	9,75E-07	1,58E-15	5,04E-04	0,031	0,037	0,558
TERT	0,523	4,65E-04	1,12E-04	0,019	0,003	0,149

Медианные значения экспрессии этих миРНК и генов в разных отделах ТК в раках, СО(рак+) и СО(рак-) приведены на рис. 5.

Из рисунка 5 следует, что хотя в некоторых случаях есть достоверные различия в экспрессии миРНК или генов между СО(рак+) и СО(рак-), а также раками и СО(рак-), но без достоверной разницы между раком и СО(рак+), профили экспрессии СО(рак+) и СО(рак-) ближе друг к другу, чем СО(рак+) к раку. Это указывает на то, что явных предраковых изменений СО ТК нам обнаружить не удалось.

Оценка частоты мутаций в генах представлена на рис. 5. Встречаемость мутаций была максимальной в самих КРР, но минимальна в СО индексных сегментов (рис. 6).

Как видно, неизменная СО и СО индексного сегмента при КРР не имеют значимых различий, в остальных сегментах ТК мутации СО не встречались. Опухоли разных сегментов ТК гетерогенны по изученным мутациям, однако, в СО разных сегментов ТК такого разнообразия нет.

Рисунок 3. Медианные значения экспрессии миРНК при раках ТК в разных сегментах, данные нормализованы.
Figure 3. Median values of miRNA expression in colon cancers in different segments, data are normalized.

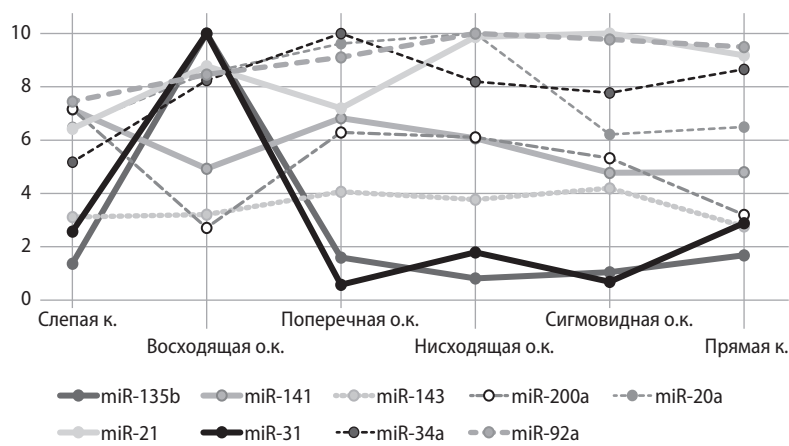


Рисунок 4. Медианные значения экспрессии генов при раках ТК в разных сегментах, данные нормализованы.
Figure 4. Median gene expression values in colon cancers in different segments, data are normalized.

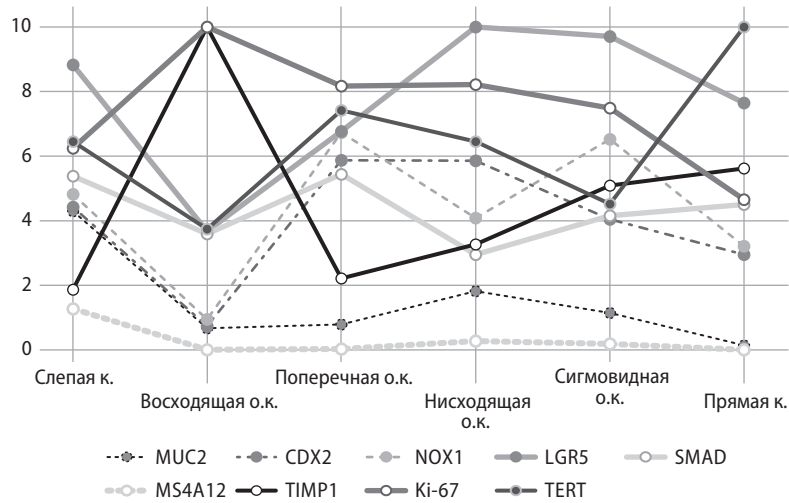


Рисунок 5. Медианные значения экспрессии миРНК-200a, -21 и -34a и гена LGR5 в разных отделах ТК в раках, СО ТК с раками (рак+) и СО ТК без раков (рак-), данные нормализованы.
Figure 5. Median expression values of miRNA-200a, -21 and -34a and the LGR5 gene in different parts of the colon in cancers, colon mucosa with cancers (cancer+) and colon mucosa without cancers (cancer-), data are normalized.

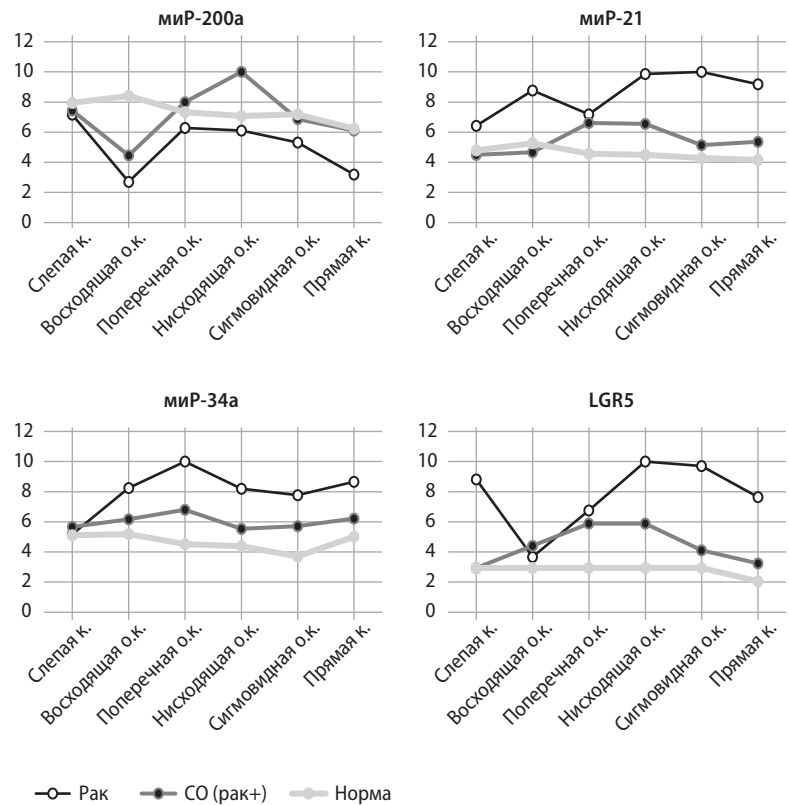
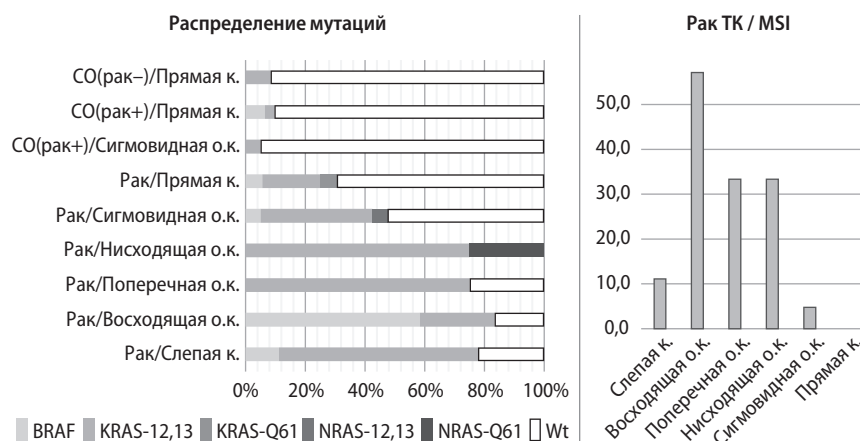


Рисунок 6.

Оценка распределения мутаций в СО и микросателлитной нестабильности при раке ТК. СО (рак-) – нормальная слизистая ТК пациентов без рака; СО (рак+) – нормальная слизистая ТК пациентов с раками; к. – кишка; о.к. – ободочная кишка.

Figure 6.

Evaluation of the distribution of mutations in the mucosa and microsatellite instability in colon cancer. mucosa (cancer-) – normal colon mucosa of patients without cancer; mucosa (cancer+) – normal colon mucosa of patients with cancer; k. – intestine; o.c. – colon.



Обсуждение

Скрининговые программы и тесты всех видов для выявления КРР – колоноскопия, определение скрытой крови в кале, «жидкая биопсия» – направлены на выявление ранних, но уже возникших форм КРР [3, 7]. Обилие ежегодных публикаций по проблеме предупреждения и ранней диагностики КРР свидетельствует о необходимости поиска иных путей в формировании групп риска по КРР, например. Все больше доказательств показывают тесную корреляцию между aberrантной экспрессией длинных некодирующих РНК (днРНК), миРНК и возникновением, развитием КРР, однако, основные молекулярные механизмы взаимодействия между днРНК, миРНК и мРНК в развитии, росте, метастазировании и терапевтическом потенциале КРР по-прежнему остаются неясными [1].

Молекулярно-генетические исследования выявляют все больше показателей для изучения, но применяются при уже имеющихся КРР. Такие исследования сегодня концентрируются на создании таргетных препаратов и улучшении результатов комплексного лечения КРР [9]. Выявление предраковых изменений, т.е. состояний СО с высокой вероятностью появления эпителиальных новообразований, является перспективной моделью для скрининговых программ и формированию групп риска пациентов с близкой к 100% вероятностью возникновения КРР. Решение этой задачи очень заманчиво, но не реализовано [10]. Наше исследование изменений уровня мРНК/миРНК показали, что, возможно, существуют отдельные маркеры диагностики риска развития КРР – мРНК-200a, -21 и -34a, экспрессия гена LGR5. Однако гетерогенность самих КРР в разных сегментах ТК создает препятствия для такой простой схемы определения риска КРР по молекулярно-генетическим изменениям в СО.

Изучение свойств СО и сравнение их по сегментам ТК встречается в единичных работах, но могло бы расширить наши представления о возникновении КРР, найти пути профилактики и ранней диагностики именно предраковых изменений СО вне связи с аденомами [16–18]. Оценка встречаемости мутаций в СО, на наш взгляд, исключает этот путь для оценки именно предраковых изменений

в неизменной СО. Вместе с тем, стоимость как колоноскопии, так и комплексного лечения запущенных КРР заставляет продолжать поиск альтернативных молекулярно-генетических тестов, в том числе с использованием искусственного интеллекта [2].

Наши результаты сравнения эндоскопически и хирургически выявленных КРР показали их одинаковость. Это позволяет доверять результатам колоноскопии в оценке частоты поражения разных сегментов ТК. Однако, молекулярно-генетическая оценка КРР разных сегментов ТК выявила некоторые различия в уровнях экспрессии мРНК/миРНК (миРНК-135b, TIMP1). Косвенно это может быть подтверждением молекулярных различий СО разных сегментов ТК, что может быть индикатором или фактором разного риска появления разных типов КРР в разных сегментах ТК.

С другой стороны, посегментный анализ молекулярно-генетических изменений показал, что в некоторых случаях есть достоверные различия в экспрессии миРНК или генов между СО(рак+) и СО(рак-), а также раками и СО(рак-), при том, что между раком и СО(рак+) достоверной разницы нет. Содружественные изменения удалось выявить с некоторыми оговорками для миРНК-200a в восходящей кишке, для миРНК-21 в прямой кишке, для миРНК-34a и LGR5 в ПНС (поперечноободочная, нисходящая и сигмовидная кишки). Это дает надежду на выявление мРНК/миРНК, экспрессия которых будет одинакова в СО и самом КРР. Такие параллели позволили бы создать доступную для анализа панель. Конечно, с учетом наших данных, для анализа СО нужно получать биоптаты из слепой кишки, восходящей кишки, отдела ПНС и прямой кишки. Все же, по-видимому, для возникновения КРР помимо предраковых изменений нужны какие-то локальные механизмы – триггеры, часть которых уже представлена в литературе [10, 19].

Тем не менее, диффузные молекулярно-генетические изменения в СО сегмента ТК могли бы повысить внимание к такому сегменту ТК и обосновать увеличение частоты осмотров, например при колоноскопии или альтернативных молекулярно-генетических тестах [2]. Конечно,

строение СО ТК, крипты, стволовые клетки говорят больше в пользу очаговых изменений, но наши данные по изменениям СО индексного сегмента ТК при КРР позволяют говорить именно о диффузных изменениях СО.

КРР, как правило, развивается длительно и для того, чтобы нормальная СО ТК переросла в метастатическую карциному, требуется более 20 лет [20]. Усилия профессиональных сообществ и правительств сталкиваются как с низкой комплаентностью граждан, так и с высокой стоимостью эндоскопии и довольно низкой выявляемостью КРР при скрининге – до 30% [21, 22]. Возможно поэтому, совершенствуются методы неинвазивного скрининга – модифицированные тесты на скрытую кровь, линейка «жидкой биопсии», включая элементы микробиома ТК [20, 23, 24]. Следует подчеркнуть, что в процесс изучения связей с КРР включается все более широкая линейка целей – например, порядка 1600 аннотированных РНК для жидкой биопсии [20]. Однако, поиск предикторов КРР в среде разнообразных мРНК

концентрируется на путях преобразования аденом ТК [20, 24, 25]. Тем не менее, в литературе встречаются единичные упоминания оценки мРНК в нормальной СО ТК, но лишь как иллюстрация изменений мРНК при появлении аденом и КРР [22]. Мы считаем, поскольку предсказать место появления аденомы или КРР у конкретного пациента невозможно, поскольку существуют медленно и быстрорастущие/возникшие КРР, поскольку мы выявили сегментарные различия уровней экспрессии генов в неизменной СО и СО индексного сегмента ТК и КРР, поскольку колоноскопия сегодня позволяет оценить микроструктуру СО и обладает дополнительными возможностями усиления визуализации, следует изменить вектор исследований на уровень неизменной СО ТК в поиске предикторов КРР.

Наши исследования отдельных мРНК/миРНК позволили исключить некоторые из них для дальнейшей оценки, но открыли перспективу изучения других маркеров в поиске предикторов КРР в неизменной СО разных сегментов ТК.

Выводы

1. Совпадение результатов оценки локализации КРР по данным колоноскопии и оперативных пособий при острой кишечной непроходимости позволяют говорить о превалировании КРР в левой половине ТК.
2. Некоторые мРНК/миРНК в СО индексного сегмента имеют экспрессию аналогичную КРР, что позволяет говорить о возможности исследования неизменной СО для выявления предраковых состояний.
3. Необходимо дальнейшее молекулярно-генетическое сравнение параметров СО разных сегментов ТК с КРР в этих сегментах.
4. КРР разной локализации могут различаться по профилю и степени молекулярно-генетических изменений.
5. Необходимо раздельное посегментарное изучение СО ТК с позиций предраковых изменений.

Литература | References

1. Tang X.J., Wang W., Hann S.S. Interactions among lncRNAs, miRNAs and mRNA in colorectal cancer. *Biochimie*. 2019;163:58–72. doi: 10.1016/j.biochi.2019.05.010.
2. Brito-Rocha T., Constâncio V., Henrique R., Jerónimo C. Shifting the Cancer Screening Paradigm: The Rising Potential of Blood-Based Multi-Cancer Early Detection Tests. *Cells*. 2023;12(6):935. doi: 10.3390/cells12060935.
3. Chung D.C., Gray D.M. 2nd, Singh H. et al. A Cell-free DNA Blood-Based Test for Colorectal Cancer Screening. *N Engl J Med*. 2024;390(11):973–983. doi: 10.1056/NEJMoa2304714.
4. Ivashkin V.T., Maev I.V., Kaprin A.D. et al. Early detection of oncological diseases of the digestive organs (methodological guidelines of the Russian Gastroenterological Association and the Association of Oncologists of Russia for primary care physicians). *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, coloproctology*. 2019; 29(5): 53–74. (in Russ.)
Ивашкин В.Т., Маев И.В., Каприн А.Д., и др. Раннее выявление онкологических заболеваний органов пищеварения (методическое руководство Российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации онкологов России для врачей первичного звена здравоохранения). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2019; 29(5): 53–74.
5. Kanth P., Inadomi J.M. Screening and prevention of colorectal cancer. *BMJ*. 2021;374: n1855. doi: 10.1136/bmj.n1855.
6. Kaltenbach T., Anderson J.C., Burke C.A. et al. Endoscopic Removal of Colorectal Lesions-Recommendations by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2020;158(4):1095–1129. doi: 10.1053/j.gastro.2019.12.018
7. Petersen M.M., Kleif J., Liggett J. et al. Development of an algorithm combining blood-based biomarkers, fecal immunochemical test, and age for population-based colorectal cancer screening. *Gastrointest Endosc*. 2024;100(6):1061–1069.e3. doi: 10.1016/j.gie.2024.06.015.
8. Li Y., Li B., Jiang R. et al. A novel screening method of DNA methylation biomarkers helps to improve the detection of colorectal cancer and precancerous lesions. *Cancer Med*. 2023;12(21):20626–20638. doi: 10.1002/cam4.6511.
9. Wu S., Yun J., Tang W. et al. Therapeutic m(6) A Eraser ALKBH5 mRNA-Loaded Exosome-Liposome Hybrid Nanoparticles Inhibit Progression of Colorectal Cancer in Preclinical Tumor Models. *ACS Nano*. 2023;17(12):11838–11854. doi: 10.1021/acsnano.3c03050.
10. Jiang C., Zhou Q., Yi K., Yuan Y., Xie X. Colorectal cancer initiation: Understanding early-stage disease for intervention. *Cancer Lett*. 2024;589:216831. doi: 10.1016/j.canlet.2024.216831.

11. Zhang Y., Wang Y., Zhang B., Li P., Zhao Y. Methods and biomarkers for early detection, prediction, and diagnosis of colorectal cancer. *Biomed Pharmacother.* 2023;163:114786. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114786.
12. Patel S.G., Karlitz J.J., Yen T., Lieu C.H., Boland C.R. The rising tide of early-onset colorectal cancer: a comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention, and early detection. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2022;7(3):262–274. doi: 10.1016/S2468-1253(21)00426-X.
13. Medawar E., Djinbachian R., Rex D.K. et al. Clinical management of patients with colorectal intramucosal carcinoma compared to high-grade dysplasia and T1 colorectal cancer. *Gastrointest Endosc.* 2024. (Epub ahead of print) doi: 10.1016/j.gie.2024.11.021.
14. Anishchenko V.V., Arkhipova A.A., Titov S.E. et al. Analysis of the expression of miRNA and mRNA in the cellular material of the gastric mucosa obtained during esophagogastroduodenoscopy to detect dysplasia and gastric cancer. *Surgical practice.* 2021;(4):53–60. (in Russ.)
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.
15. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCt method. *Methods.* 2001;25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
16. Jiao L., Kourkoumpetis T., Hutchinson D. et al. Spatial Characteristics of Colonic Mucosa-Associated Gut Microbiota in Humans. *Microb Ecol.* 2022;83(3):811–821. doi: 10.1007/s00248-021-01789-6.
17. Zhu H., Zhang Y., Du S., Wang H., Zheng Y. Colonic mucosal biopsy location can not affect the results of mucosal metabolomics and mucosal microbiota analysis in IBS. *Front Med (Lausanne).* 2023;10:1183484. doi: 10.3389/fmed.2023.1183484.
18. Zhu Q., Zhu C., Zhang X., Zhu X., Chen Z., Gu D., He Y., Jin C. Comprehension of rectosigmoid junction cancer molecular features by comparison to the rectum or sigmoid colon cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2023;14(3):1307–1319. doi: 10.21037/jgo-23-120.
19. Yao B., Zhang Q., Yang Z. et al. CircEZH2/miR-133b/IGF2BP2 aggravates colorectal cancer progression via enhancing the stability of m(6) A-modified CREB1 mRNA. *Mol Cancer.* 2022;21(1):140. doi: 10.1186/s12943-022-01608-7.
20. Min L., Bu F., Meng J., Liu X., Guo Q., Zhao L., Li Z., Li X., Zhu S., Zhang S. Circulating small extracellular vesicle RNA profiling for the detection of T1a stage colorectal cancer and precancerous advanced adenoma. *Elife.* 2024;12: RP88675. doi: 10.7554/eLife.88675.
21. Cardoso R., Guo F., Heisser T. et al. Proportion and stage distribution of screen-detected and non-screen-detected colorectal cancer in nine European countries: an international, population-based study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2022;7(8):711–723. doi: 10.1016/S2468-1253(22)00084-X.
22. Liu G., Li B. Role of miRNA in transformation from normal tissue to colorectal adenoma and cancer. *J Cancer Res Ther.* 2019;15(2):278–285. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_135_18.
23. Gao W., Gao X., Zhu L., Gao S., Sun R., Feng Z., Wu D., Liu Z., Zhu R., Jiao N. Multimodal metagenomic analysis reveals microbial single nucleotide variants as superior biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Gut Microbes.* 2023;15(2):2245562. doi: 10.1080/19490976.2023.2245562.
24. Gagrut Z.D., Krockenberger M., Bhattacharya A. et al. Next-generation Multi-target Stool DNA Panel Accurately Detects Colorectal Cancer and Advanced Precancerous Lesions. *Cancer Prev Res (Phila).* 2024;17(3):119–126. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-23-0285.
25. Mohammadpour S., Noukabadi F.N., Esfahani A.T. et al. Non-coding RNAs in Precursor Lesions of Colorectal Cancer: Their Role in Cancer Initiation and Formation. *Curr Mol Med.* 2024;24(5):565–575. doi: 10.2174/1566524023666230523155719.