



Оригинальная статья

Анализ молекулярных фенотипов эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки в нормальной слизистой оболочке и при колоректальном раке

Гончаров С.В.¹ • Боженко В.К.¹ • Захаренко М.В.¹ • Киселева Я.Ю.¹ • Чаптыков А.А.¹ • Кулинич Т.М.¹ • Крашихина Т.В.² • Солодкий В.А.¹

Гончаров Сергей Владимирович – канд. мед. наук, заведующий отделением хирургических методов лечения и противоопухолевой лекарственной терапии абдоминальной онкологии с койками абдоминальной хирургии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7914-1882>. E-mail: svgonch@yandex.ru

Боженко Владимир Константинович – д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8351-8152>. E-mail: vbojenko@mail.ru

Захаренко Маргарита Владимировна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории иммунологии и онкоцитологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2480-4145>
✉ 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, 86, Российская Федерация. E-mail: zak-margarita@mail.ru

Киселева Яна Юрьевна – канд. мед. наук, науч. сотр. лаборатории иммунологии и онкоцитологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8352-4787>. E-mail: yana.kiseleva@gmail.com

Чаптыков Андрей Александрович – врач-хирург отделения хирургических методов лечения и противоопухолевой лекарственной терапии абдоминальной онкологии с койками абдоминальной хирургии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2120-6783>. E-mail: aachaptykov@mccrr.ru

Кулинич Татьяна Михайловна – канд. мед. наук, заведующая лабораторией иммунологии и онкоцитологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2331-5753>. E-mail: sobral@mail.ru

Крашихина Татьяна Валерьевна – канд. мед. наук, заведующая онкологическим отделением №1²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7567-8308>. E-mail: ciklogidro1@mail.ru

Солодкий Владимир Алексеевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1641-6452>. E-mail: 9015@mail.ru

Обоснование. Различия в эмбриональном развитии слизистой оболочки отделов толстой кишки (ТК) определяют физиологическую эмбрионально-анатомическую асимметрию ее строения и проявляются в молекулярных фенотипах (экспрессионных профилях) отделов ТК. Эти молекулярные характеристики, предположительно, обуславливают различия в механизмах канцерогенеза и влияют на прогноз в случае развития колоректального рака (КРР) правосторонней или левосторонней локализации. Исследование молекулярных фенотипов опухолей в зависимости от локализации может представлять интерес для оценки прогноза и выбора программы лечения КРР.

Цель – провести сравнительный анализ молекулярных фенотипов нормальной слизистой оболочки ТК и тканей аденокарциномы при КРР в зависимости от естественной эмбрионально-анатомической асимметрии ТК.

Материал и методы. Проведено ретроспективное исследование молекулярных фенотипов (уровни экспрессии мРНК 61 гена) эмбрионально-анатомических отделов ТК в норме и при КРР. В группу «Норма» включены 254 образца нормальной слизистой оболочки трех отделов ТК 74 здоровых доноров, у которых отсутствовали онкологические заболевания и органические изменения слизистой оболочки ТК, в том числе 90 образцов из правой ободочной кишки, 116 – из левой ободочной кишки, 48 – из прямой кишки. Группа «КРР» включала 154 образца аденокарциномы локализованной стадии T₁₋₄N₀₋₂M₀ от 154 пациентов, которым не проводилась неoadъювантная лучевая и химиотерапия. В группу вошли 40 образцов из правой ободочной кишки, 54 – из левой, 60 – из прямой кишки. Относительное количество мРНК 61 гена оценивали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. В группах сопоставляли полученные экспрессионные фенотипы с анатомическими отделами ТК. Статистическую обработку проводили, применяя метод дискриминантного анализа с пошаговым включением переменных.

Результаты. На основании оценки уровня мРНК исследуемых генов построена дискриминантная

модель, позволяющая классифицировать образцы из группы «Норма» по принадлежности к анатомическому отделу ТК с точностью 95,8%. Наиболее значимыми (p < 0,05) для классификации были следующие 19 генов: *CCND1*, *SCUBE2*, *TERT*, *BAG1*, *NDRG*, *IL1b*, *IL2Ra*, *IL7*, *ESR1*, *TGFb*, *IGF1*, *MMP9*, *MMP11*, *PAPPA*, *CD45*, *CD69*, *TLR2*, *TLR4*, *LIFR*. Дискриминантная модель, построенная для группы «КРР», включала 27 генов и позволяла дифференцировать образцы по принадлежности к трем отделам ТК с точностью 75,2%. Статистически значимый (p < 0,05) вклад в дифференцировку образцов дискриминантной моделью вносили гены *COX-2*, *BIRC5*, *LIFR*, *TPA*, *IL1b*, *MMP11*, *MMP7* и *P16INK4A*. При объединении в модели образцов двух групп в соответствии с эмбрионально-анатомическим делением показано четкое распределение образцов тканей опухоли и здоровой слизистой оболочки ТК в пространстве дискриминантных функций.

Заключение. Анализ экспрессионных профилей образцов колоректальной аденокарциномы с использованием дискриминантной модели показал, что генетические изменения слизистой оболочки ТК при КРР сглаживают молекулярно-фенотипические границы эмбрионально-анатомических отделов. Эти изменения являются специфическими для КРР, формируя особый «патологический» молекулярный фенотип.

Ключевые слова: аденокарцинома, толстая кишка, прямая кишка, слизистая оболочка, фенотип, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, мРНК, дискриминантный анализ

Для цитирования: Гончаров СВ, Боженко ВК, Захаренко МВ, Киселева ЯЮ, Чаптыков АА, Кулинич ТМ, Крашихина ТВ, Солодкий ВА. Анализ молекулярных фенотипов эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки в нормальной слизистой оболочке и при колоректальном раке. Альманах клинической медицины. 2023;51(8): 441–455. doi: 10.18786/2072-0505-2023-51-046.

Поступила 07.12.2023; доработана 25.12.2023; принята к публикации 29.12.2023

¹ ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России; 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, 86, Российская Федерация

² ООО «Московский центр восстановительного лечения»; 121552, г. Москва, ул. Оршанская, 16–1, Российская Федерация

Проксимальный (правый) и дистальный (левый) отделы толстой кишки (ТК) имеют как анатомо-физиологические, так и эмбриогенетические особенности [1, 2]. В эмбриогенезе правая половина ТК формируется из средней кишки эмбриона. Ее производными являются слепая кишка, восходящая кишка, правая половина, или две трети поперечной ободочной кишки. Левая половина ТК происходит из задней кишки. Она дает начало левой половине, или одной трети поперечной ободочной кишки, нисходящей кишке, ободочной кишке, сигмовидной и прямой кишке. Процессы формирования контролируются различными сигнальными путями (Wnt, Notch, BMP/TGF β , Hedgehog), физиологическое функционирование которых имеет решающее значение для нормального развития кишечника [3, 4]. Следовательно, левый и правый отделы ТК – не просто анатомические, но эмбрионально-анатомические отделы, характеризующиеся различными молекулярными фенотипами (экспрессионными профилями панели определенных генов) [5].

Ранее нами была показана принципиальная возможность идентификации анатомических отделов ТК здоровых людей на основе молекулярного фенотипа образцов слизистой оболочки различной локализации (прямая кишка (ПК) и основные анатомические отделы ободочной кишки) [5]. При этом молекулярный фенотип ткани ПК наиболее достоверно отличался от других отделов ТК, позволяя в дискриминантном анализе классифицировать образцы ПК со 100% точностью [5]. Это дало основание выделить ПК в отдельную группу в дальнейших исследованиях молекулярных фенотипов отделов ТК. Различия данных молекулярных фенотипов ставят важный вопрос о том, могут ли они влиять на молекулярный фенотип колоректального рака (КРР) в зависимости от его локализации.

КРР – одно из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований с высокой смертностью. Большинство случаев (до 95%) относятся к спорадическим [6]. В настоящее время предпринимаются попытки разработки консенсусных молекулярных фенотипов КРР, которые бы учитывали в том числе локализацию опухоли в определенном анатомическом отделе [7–9]. Известно, что эмбриональные клетки человека могут демонстрировать фенотипическое сходство с раковыми клетками [10, 11]. В связи с этим представляется теоретически обоснованным учитывать локализацию опухоли не просто

в определенном анатомическом отделе, а, скорее, в эмбрионально-анатомическом.

Цель – провести сравнительный анализ молекулярных фенотипов нормальной слизистой оболочки ТК и тканей аденокарциномы при КРР в зависимости от естественной эмбрионально-анатомической асимметрии ТК.

Материал и методы

Дизайн исследования

Проведено экспериментальное ретроспективное исследование молекулярных фенотипов (уровни экспрессии мРНК определенных генов) эмбрионально-анатомических отделов ТК в норме и при КРР (образцы нормальной слизистой оболочки ТК и аденокарциномы). Всего в исследовании использовано 408 образцов, полученных от 228 человек, которые проходили обследование или лечение в ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России (РНЦРР) с 2012 по 2020 г. Информация для формирования базы медицинских данных участников исследования получена из информационной системы РНЦРР. Критерием включения образцов нормальной ткани в исследование было отсутствие онкологических заболеваний любой локализации и органических изменений слизистой ТК (условно здоровые доноры). Критерием включения образцов аденокарциномы было наличие локализованной стадии T₁₋₄N₀₋₂M₀ аденокарциномы ободочной или прямой кишки в отсутствие неoadъювантной лучевой и химиотерапии (пациенты). Критерием невключения служили стадии T_{любая}N_{любая}M₁ или T₁₋₄N₀₋₂M₀ в случае получения неoadъювантной лучевой или химиотерапии.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали добровольное информированное согласие на участие в нем. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике РНЦРР (протокол № 4 от 26.04.2018).

Дизайн исследования включал сбор образцов биологического материала (образцы от здоровых лиц – группа «Норма», образцы ткани аденокарциномы ТК – группа «КРР»), выделение мРНК из образцов биологического материала и постановку полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, формирование электронной базы медицинских данных и показателей экспрессии мРНК генов для сравнительного анализа, статистическую обработку результатов анализа, сравнение результатов с данными литературы. Схема исследования представлена на рис. 1.



Группы и подгруппы

Группа «Норма» включала 254 образца биоптата неизменной слизистой оболочки ТК условно здоровых доноров (n = 74, из них 9 мужчин и 65 женщин, медианный возраст 56 [47; 69] лет). Биоптаты слизистой оболочки были получены из разных отделов ТК при проведении видеокolonоскопии путем щипцовой биопсии. Всего получено 90 образцов из правой половины ободочной кишки (ПОК), 116 – из левой половины ободочной кишки (ЛОК) и 48 – из прямой кишки (ПК). Эндоскопическое исследование подтвердило отсутствие органической патологии ТК в этой группе.

Образцы группы «КРР» получены из разных отделов ТК от 154 пациентов с впервые выявленным и морфологически подтвержденным диагнозом рака ободочной или прямой кишки (аденокарцинома) разной степени злокачественности. Образцы были взяты на этапе макроскопического патоморфологического исследования операционного препарата после хирургического лечения. Группа «КРР» включала 40 образцов из ПОК, 54 – из ЛОК и 60 – из ПК. Медианный возраст пациентов составил 66 [59; 74] лет, мужчин было 81, женщин – 73.

Каждая группа была разделена на 3 подгруппы, соответствующие отделу ТК (образцы из ПОК, ЛОК и ПК).

Выделение РНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени

Каждый образец ткани немедленно помещали в раствор солей Ever Fresh RNA («Клоноген», Россия), стабилизирующий РНК. Образцы использовали для анализа сразу или хранили при -70 °С. мРНК выделяли с помощью коммерческих наборов RNeasy mini («Qiagen», Германия) в соответствии с протоколом компании-производителя. Относительное количество мРНК оценивали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, используя реактивы, оборудование и протокол НПО «ДНК-Технология» (Россия). Оценивали экспрессию 61 гена (панель генов) [5, 12]. В их число входили гены, вовлеченные в различные биологические процессы: пролиферацию (*KI67*, *CCND1*, *CCNB1*, *PTEN*, *HER2(C-erbB2)*, *STK-15(AURKA)*, *P16INK4A*, *P14ARF*, *TERT*), апоптоз (*BCL2*, *BAX*, *BAG1*, *BIRC5(SURVIVIN)*, *NDRG1*), транскрипцию (*C-MYC*, *MYBL2*), дифференцировку (*ESR*, *PGR*, *CYP19A1*, *GRB7*), межклеточные взаимодействия (*MMP2*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP9*, *MMP11*, *CTSL2*, *PAPPA*, *TPA*). Кроме того, панель включала гены, кодирующие факторы роста (*VEGFa 121*, *VEGFa 165*, *VEGFa 189*, *SCUBE2*, *IGF-1*, *IGF-2*, *TGFb*), цитокины и их рецепторы (*IL1β*, *IL2*, *IL2Ra*, *IL6*, *IL7*, *IL8*, *IL10*, *IL12a*, *IL15*, *COX-2*, *TNFa*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR7*, *IFNγ*, *GNLY*,

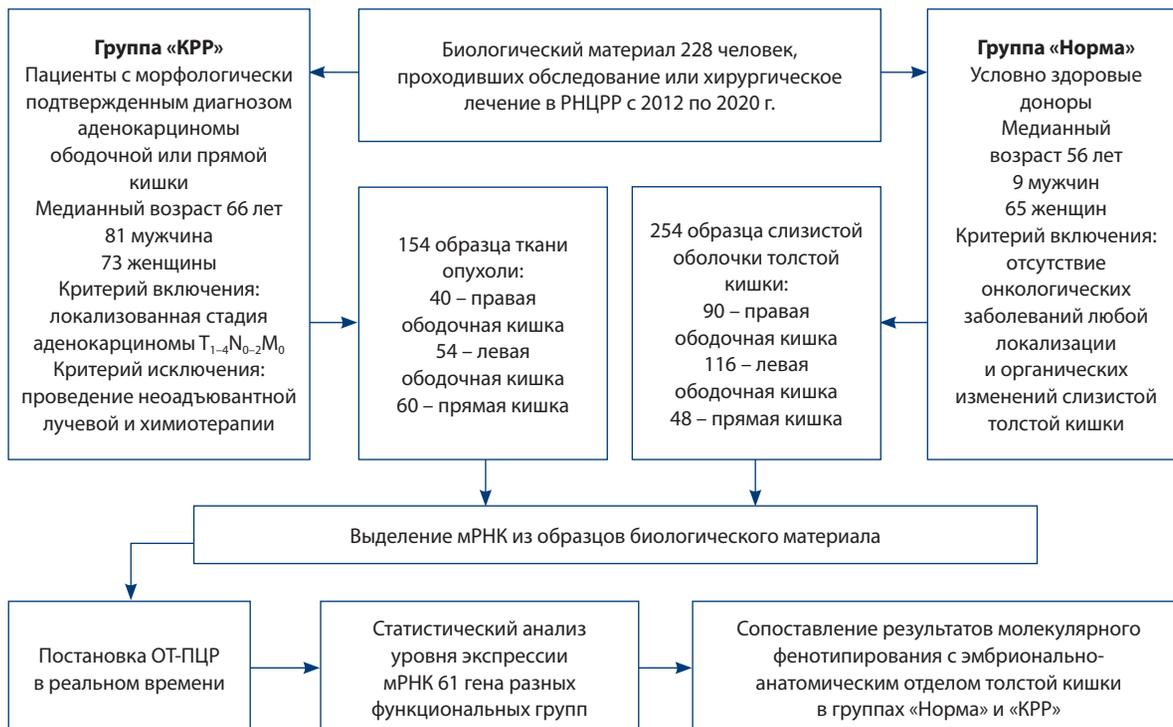


Рис. 1. Схематическое представление дизайна исследования; КРР – колоректальный рак, ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

HLA-G5, LIF, LIFR, LGALS1, GATA3, GREM1), а также CD-антигены (*CD45, CD56, CD68, CD69*). Уровень мРНК определяли относительно экспрессии референсных генов (*GUSB, B2M и HPRT1*). Методика пробоподготовки, реагенты, оборудование и способ оценки относительного уровня мРНК изучаемой панели генов подробно описаны в нашей работе [12].

Статистический анализ

Размер выборки предварительно не рассчитывался. Значения уровня экспрессии мРНК генов были лог-трансформированы по основанию 2. Статистический анализ полученных данных проводили с применением программного статистического пакета Statistica v10 (США). До статистического анализа данные представлялись в формате относительного количества мРНК для каждого гена и каждого образца во всех сформированных группах и подгруппах. Сравнение подгрупп в группах и групп в подгруппах осуществляли с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни (U-критерий), поскольку, согласно критерию Колмогорова – Смирнова, распределение полученных значений уровня экспрессии мРНК отличалось от нормального. В ходе анализа уровней экспрессии 61 гена с использованием U-критерия были выявлены гены, дифференциальная экспрессия которых была статистически значимой (р-значения от $< 0,05$ до $< 0,001$) и, соответственно, профиль экспрессии которых может служить маркером принадлежности образца к исследуемым группам или подгруппам. Поправка на множественные сравнения не применялась, поскольку попарные сравнения в группах и подгруппах были использованы не для формирования выводов, а для отбора генов-предикторов.

Сравнительный анализ категориальных значений по возрасту и полу между группами пациентов «Норма» и «КРР» для оценки сопоставимости групп показал, что они сопоставимы по возрасту. В группе «Норма» преобладали женщины. В этой группе статистически значимые различия в зависимости от пола получены только для маркера активности рецептора эстрогена *ESR1* ($p < 0,05$) и маркера макрофагов *CD68* ($p < 0,05$). Эти гены не были отобраны программой в дискриминантном анализе в качестве значимых при построении модели классификации для образцов тканей опухоли. Дискриминантный анализ данных выполняли с пошаговым включением переменных с использованием многомерного F-критерия Фишера (при уровне значимости $p < 0,05$). При проведении дискриминантного анализа с помощью программы Statistica v10 использовали опцию исключения «неполных образцов», то есть образцов, у которых отсутствуют

данные одного или нескольких исследованных параметров. По этой причине общее количество образцов в приводимых таблицах может отличаться от суммарного количества исследованных.

В ходе дискриминантного анализа применяли следующие критерии: 1) лямбда Уилкса (λ) – для оценки значимости различий средних значений дискриминантной функции в исследуемых группах и подгруппах; 2) частная лямбда – для характеристики вклада единичной переменной в дисперсию («разделительная сила» модели); 3) F-критерий (критерий Фишера) – для оценки значимости различия дисперсий выборок и проверки, являются ли все переменные-предикторы совместно значимыми; 4) толерантность – мера оценки избыточности переменных в модели.

Результаты

Анализ выбора значимых генов в группах «Норма» и «КРР»

В ходе проведенного исследования получены значения уровней экспрессии 61 гена для 254 образцов нормальной слизистой ТК условно здоровых доноров (группа «Норма») и 154 образцов тканей аденокарциномы ТК (группа «КРР»). В каждой группе в подгруппах, соответствующих отделам ПОК, ЛОК и ПК, для каждого гена были определены значения медианы экспрессии (Me) и интерквартильный размах [25-й; 75-й процентиля]. Эти показатели суммированы в табличном виде и доступны в дополнительных материалах к статье (Приложение 1).

Парный сравнительный анализ данных с использованием U-теста Манна – Уитни позволил определить в группе «Норма» статистически значимые (р-значения от $< 0,05$ до $< 0,001$) различия уровня экспрессии мРНК между подгруппами «ЛОК», «ПОК» и «ПК» по 49 генам (табл. 1). В группе «КРР» статистически значимые различия были получены по 6 генам: *BCL2, TERT, MMP7, IL2, IFNg, CD69*. При сравнении в парах здоровых тканей и тканей опухоли, полученных из одного анатомического отдела ТК, были определены статистически значимые ($p < 0,05$) различия 55 генов разных функциональных групп (см. табл. 1).

Таким образом, на основании теста Манна – Уитни были выделены наиболее значимые гены, которые в дальнейшем послужили маркерами оценки вероятности принадлежности образца к группе/подгруппе в дискриминантном анализе.

Дискриминантный анализ в группе «Норма»

Объектами первого этапа исследования были 254 образца биоптата неизменной слизистой оболочки ТК условно здоровых доноров, которые не имели



Таблица 1. Статистическая значимость различий уровня экспрессии мРНК исследованных генов при парном сравнении эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки в тканях, полученных от условно здоровых доноров («Норма»), и ткани опухоли («КРР»)

Ген	Норма			КРР			ПОК	ЛОК	ПК
	ПОК/ЛОК	ПОК/ПК	ЛОК/ПК	ПОК/ЛОК	ПОК/ПК	ЛОК/ПК	Норма/КРР	Норма/КРР	Норма/КРР
<i>CTSL2</i>	–	–	0,005	–	–	–	0,022	< 0,001	< 0,001
<i>BCL2</i>	–	–	–	0,043	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>MYC</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>BIRC5</i>	–	–	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	0,023
<i>CCND1</i>	0,007	< 0,001	< 0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>NDRG1</i>	0,005	0,003	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>CD68</i>	0,004	–	0,001	–	–	–	–	–	–
<i>KI67</i>	–	–	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>TERT</i>	< 0,001	–	< 0,001	0,007	–	–	–	< 0,001	–
<i>HER2</i>	0,026	–	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>PTEN</i>	–	–	0,046	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>BAG1</i>	–	< 0,001	0,002	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>PGR</i>	–	0,005	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>CCNB1</i>	–	–	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>ESR1</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	0,027	< 0,001	< 0,001
<i>GRB7</i>	–	–	–	–	–	–	0,016	< 0,001	< 0,001
<i>MMP11</i>	–	0,029	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>STK15</i>	–	–	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>MYBL2</i>	–	–	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>P16INK4A</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>SCUBE2</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	0,001
<i>MMP9</i>	–	–	0,013	–	–	–	0,003	0,036	–
<i>GNLY</i>	–	–	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>P14ARF</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	0,001
<i>IGF1</i>	0,029	–	0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>COX-2</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	0,018	0,014	–
<i>IGF2</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	–	–	–
<i>CYP19A</i>	–	0,001	0,007	–	–	–	0,007	–	–
<i>GREM1</i>	–	< 0,001	0,000	–	–	–	0,017	0,001	–
<i>MMP2</i>	–	0,003	0,014	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>PAPPA</i>	0,049	0,003	–	–	–	–	0,015	–	–
<i>MMP7</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	0,041	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>IL2</i>	–	< 0,001	< 0,001	0,041	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>MMP8</i>	–	–	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>IL2Ra</i>	< 0,001	0,008	–	–	–	–	–	–	–
<i>IL6</i>	–	0,002	< 0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001

<i>IL12a</i>	0,006	0,001	< 0,001	–	–	–	< 0,001	–	< 0,001
<i>IL7</i>	0,010	–	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>IL15</i>	–	0,029	0,008	–	–	–	–	< 0,001	–
<i>IL8</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>IL1b</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>IL10</i>	0,021	0,007	< 0,001	–	–	–	–	–	0,002
<i>TPA</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>IFNg</i>	–	–	–	0,013	–	0,030	< 0,001	0,042	0,001
<i>CD45</i>	0,033	0,042	0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>TNFa</i>	0,010	–	0,000	–	–	–	0,010	< 0,001	< 0,001
<i>CD56</i>	–	–	–	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>TGFb</i>	0,018	0,011	0,000	–	–	–	0,040	–	0,001
<i>CD69</i>	0,025	–	–	0,002	–	–	–	0,001	–
<i>VEGFA121</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>BAX</i>	–	–	0,011	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>VEGFA165</i>	0,024	< 0,001	–	–	–	–	–	–	0,041
<i>TLR2</i>	–	–	0,012	–	–	–	–	–	–
<i>VEGFA189</i>	0,000	0,014	–	–	–	–	0,025	–	0,035
<i>TLR4</i>	0,003	0,014	–	–	–	–	< 0,001	0,005	0,024
<i>TLR7</i>	–	0,001	< 0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>HLA-G5</i>	–	0,005	0,006	–	–	–	0,001	0,001	< 0,001
<i>GATA3</i>	–	0,001	< 0,001	–	–	–	–	0,008	< 0,001
<i>LGALS1</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	–	–	–
<i>LIF</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	–	–	0,003
<i>LIFR</i>	–	< 0,001	< 0,001	–	–	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001

KPP – колоректальный рак, ЛОК – левая ободочная кишка, ПК – прямая кишка, ПОК – правая ободочная кишка

В таблице указаны значения $p < 0,05$, знаком «–» отмечены статистически незначимые различия

онкологических заболеваний любой локализации и органических изменений слизистой ТК (см. рис. 1). Гены (всего 49), имеющие статистически значимые различия (p -значения от $< 0,05$ до $< 0,001$) в уровне экспрессии мРНК при попарном сравнении отделов ТК, были включены в дискриминантный анализ с пошаговым включением переменных в модель.

Результаты анализа отражены на рис. 2 как распределение образцов нормальной слизистой оболочки здоровых людей, полученных из трех отделов ТК, в пространстве дискриминантных функций 1 и 2. Дискриминантные функции представляют собой линейные комбинации признаков объектов (в данном случае – экспрессии генов), позволяющие уменьшить размерность 49-мерного пространства до двухмерного с целью предоставления возможности визуального анализа

распределения образцов по группам (кластеризация). Можно видеть, что образцы из подгруппы ПК образуют отдельный кластер. Образцы из подгруппы ПОК и ЛОК также образуют хорошо видимые кластеры, которые, однако, в определенной степени перекрываются (см. рис. 2).

Следующим шагом дискриминантного анализа наших данных было определение генов, различие экспрессии которых в наибольшей степени обуславливает кластеризацию образцов по их принадлежности подгруппам в пространстве дискриминантных функций 1 и 2. Выбор таких генов проходил в программном пакете Statistica v10, основываясь на критерии «частная лямбда», характеризующем вклад (вес) каждого признака (в нашем случае – гена) в значение дискриминантной функции, и на F -критерии. Пошаговый дискриминантный

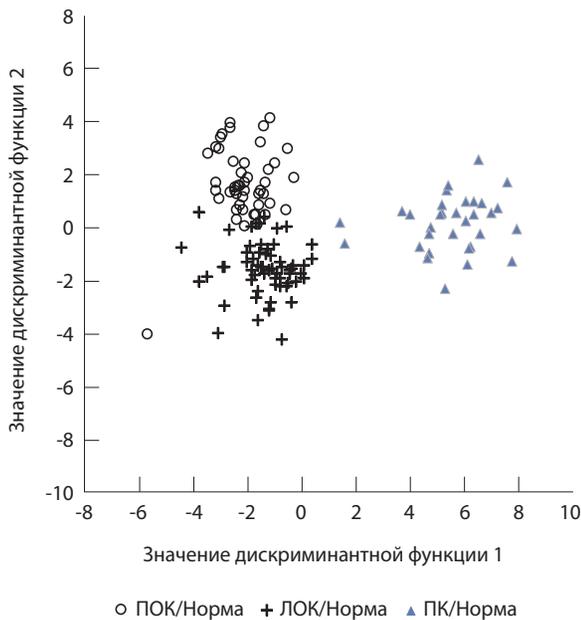


Рис. 2. Распределение образцов в пространстве дискриминантных функций 1 и 2. Образцы нормальной слизистой оболочки толстой кишки здоровых людей из правой ободочной кишки (ПОК), левой ободочной кишки (ЛОК) и прямой кишки (ПК)

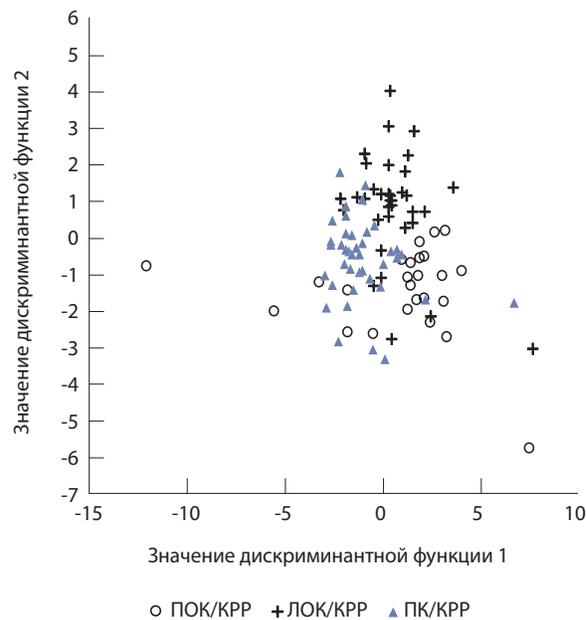


Рис. 3. Распределение образцов в пространстве дискриминантных функций 1 и 2. Образцы колоректальной аденокарциномы из правой ободочной кишки (ПОК), левой ободочной кишки (ЛОК) и прямой кишки (ПК); KPP – колоректальный рак

анализ выявил 19 генов разных функциональных групп, экспрессия которых в наиболее значительной степени определяет молекулярный фенотип нормальной слизистой оболочки трех отделов ТК. В табл. 2 они приведены по возрастанию критерия «частная лямбда». Чем меньше полученные значения данного критерия, тем больший единичный вклад вносит ген в общую дискриминацию.

Как можно видеть из табл. 2, гены *SCUBE2*, *IL2Ra*, *CCND1* являются наиболее важными в модели ($p < 0,001$). Значения F-критерия для этих генов также самые высокие. Оценка толерантности имеет наибольшие значения для генов *CCND1*, *BAG1*, *TERT*, *LIFR*, *SCUBE2*, *PAPPA*, *IL7*, *IL1b*, что показывает их существенный совместный вклад в созданную модель для дифференцировки исследуемых образцов по их принадлежности к отделам ТК.

В табл. 3 представлена матрица классификации полученной дискриминантной модели, которая содержит информацию о количестве и проценте корректно классифицированных случаев в каждой группе. Общая точность классификации образцов слизистой оболочки ТК у здоровых людей составила 95,8%.

Дискриминантный анализ в группе «KPP» объектами второго этапа исследования были образцы ткани опухоли 154 пациентов

с морфологически подтвержденным диагнозом аденокарциномы разной степени злокачественности одного из отделов ТК в локализованной стадии $T_{1-4}N_{0-2}M_0$. Данные образцы были использованы для оценки возможности молекулярного фенотипирования колоректальной аденокарциномы в зависимости от локализации опухоли в правом, левом отделе ТК или в ПК. Применение разработанной для группы «Норма» дискриминантной модели, включающей 19 генов, к экспрессионным профилям группы «KPP» привело к значительному снижению точности классификации образцов опухоли по отделам ТК, составившей 62,0% в среднем для всех отделов, по сравнению с 95,8% при классификации образцов группы «Норма». Это также привело к тому, что образцы не формировали отдельных кластеров на диаграмме рассеяния в пространстве дискриминантных функций для этих генов. Именно поэтому мы провели пошаговый дискриминантный анализ экспрессии всех генов нашей панели (всего 61 ген) для образцов группы «KPP». Он позволил определить 27 генов (*COX-2*, *BIRC5*, *LIFR*, *TPA*, *IL1b*, *MMP11*, *MMP7*, *P16INK4A*, *CD56*, *TLR4*, *IL2Ra*, *TLR2*, *CCND1*, *GREM1*, *GATA3*, *GNLY*, *PAPPA*, *TERT*, *IL2*, *PTEN*, *CD69*, *BAX*, *CD45*, *CYP19A*, *GRB7*, *IFNg*, *IL8*), которые сформировали модель классификации образцов колоректальной карциномы.

**Таблица 2.** Итоги дискриминантного анализа определения принадлежности исследуемых образцов нормальной слизистой оболочки к отделам толстой кишки

Ген	Лямбда Уилкса	Частная лямбда	Значение F-критерия	Уровень значимости F-критерия (p)	Толерантность
SCUBE2	0,038	0,775	12,903	0,000*	0,245
IL2Ra	0,035	0,83	9,088	0,000**	0,182
CCND1	0,035	0,831	9,021	0,000**	0,577
TERT	0,035	0,849	7,896	0,001	0,328
IGF1	0,034	0,866	6,856	0,002	0,101
LIFR	0,034	0,869	6,681	0,002	0,263
NDRG1	0,034	0,875	6,358	0,003	0,119
CD45	0,033	0,883	5,883	0,004	0,043
CD69	0,033	0,884	5,84	0,004	0,104
IL1b	0,033	0,895	5,247	0,007	0,197
MMP11	0,033	0,895	5,223	0,007	0,096
TLR2	0,032	0,91	4,381	0,015	0,112
IL7	0,032	0,911	4,349	0,016	0,197
ESR1	0,032	0,912	4,287	0,017	0,18
TGFb	0,032	0,914	4,167	0,019	0,047
TLR4	0,032	0,92	3,883	0,024	0,13
BAG1	0,032	0,927	3,495	0,035	0,473
MMP9	0,031	0,932	3,251	0,043	0,155
PAPPA	0,031	0,934	3,142	0,048	0,208

Уровень статистической значимости различий: * p < 0,0001; ** p < 0,001. Гены, вносящие наибольший вклад в правильность классификации, выделены жирным шрифтом

Таблица 3. Соответствие наблюдаемой и прогнозируемой классификации образцов по молекулярному фенотипу для трех отделов толстой кишки в группе «Норма»

Отдел толстой кишки	Частота совпадения классификации, %	Распределение образцов по отделам толстой кишки согласно дискриминантной модели, n		
		ПОК (Норма)	ЛОК (Норма)	ПК (Норма)
ПОК (Норма)	95,7	45	2	0
ЛОК (Норма)	96,8	2	60	0
ПК (Норма)	93,0	0	2	31
Всего	95,8	47	64	31

ЛОК – левая ободочная кишка, ПК – прямая кишка, ПОК – правая ободочная кишка

На диагонали таблицы (выделено серым цветом) представлено число корректно классифицированных случаев принадлежности к исследуемому отделу толстой кишки. В остальных ячейках указано число образцов, которые были классифицированы ошибочно



На рис. 3 дана диаграмма рассеяния значений дискриминантных функций 1 и 2, построенная на показателях экспрессии мРНК данных 27 генов для образцов тканей опухоли. Кластеризация образцов ткани опухоли по принадлежности к отделам ТК оказалась хуже, чем в случае образцов нормальной ткани (см. рис. 2). Тем не менее построенная дискриминантная модель позволяет дифференцировать образцы группы «КРР» по принадлежности к отделам ТК.

Как видно из табл. 4, общая точность модели увеличилась с 62,0 до 75,2%, однако осталась ниже, чем для группы «Норма» (95,8%). Стоит отметить, что среди 27 генов дискриминантной модели только гены *COX-2*, *BIRC5*, *LIFR*, *TPA*, *IL1b*, *MMP11*, *MMP7* и *P16INK4A* вносили статистически значимый ($p < 0,05$) вклад в дифференцировку образцов.

Сравнение групп «Норма» и «КРР»

На завершающем этапе работы мы провели сравнительный анализ групп «Норма» и «КРР». Образцы левой ободочной и прямой кишки были объединены в одну группу в соответствии с эмбрионально-анатомическим делением ТК на правый (правая сторона) и левый (левая сторона) отделы. Рис. 4 демонстрирует, что все образцы из группы «КРР» кластеризуются в правой части диаграммы, а из группы «Норма» – в ее левой части. Значения дискриминантной функции 2 дифференцируют правую и левую сторону кишечника в группе «Норма», но соответствующие кластеры перекрываются. При этом практически не наблюдалось дифференцировки для образцов группы «КРР».

Обсуждение

Проведенная работа показала, что образцы нормальной слизистой ТК могут быть дифференцированы по молекулярному фенотипу по трем отделам

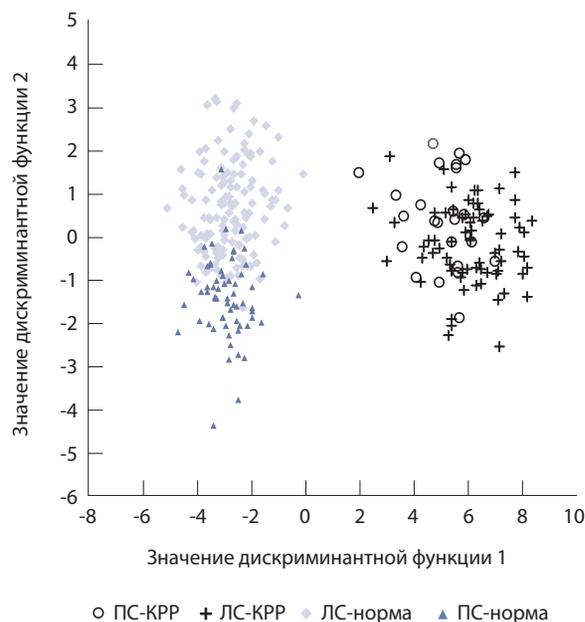


Рис. 4. Распределение образцов в пространстве дискриминантных функций 1 и 2. Образцы слизистой оболочки толстой кишки (ТК) здоровых людей и колоректальной аденокарциномы из двух эмбрионально-анатомических отделов; ЛС-КРР – колоректальный рак левой стороны ТК, ЛС-норма – слизистая оболочка левой стороны ТК здоровых людей, ПС-КРР – колоректальный рак правой стороны ТК, ПС-норма – слизистая оболочка правой стороны ТК здоровых людей

ТК с точностью 95,8%, тогда как образцы аденокарциномы – с точностью 75,2%. Образцы нормальной ткани и КРР формируют хорошо разделенные кластеры в дискриминантном анализе на основе их молекулярного фенотипа. Множественные генетические изменения слизистой оболочки ТК при КРР сглаживают молекулярно-фенотипические границы эмбрионально-анатомических отделов.

В эмбриогенезе, начиная с гаструляции, зародышевые листки энтодермы, мезодермы и эктодермы,

Таблица 4. Соответствие наблюдаемой и прогнозируемой классификации образцов по молекулярному фенотипу для трех отделов толстой кишки в группе «КРР» (матрица классификаций дискриминантного анализа включала 27 генов)

Отдел толстой кишки	Частота совпадения классификации, %	Распределение образцов по отделам толстой кишки согласно дискриминантной модели, n		
		ПОК (КРР)	ЛОК (КРР)	ПК (КРР)
ПОК (КРР)	76,0	19	0	6
ЛОК (КРР)	71,4	4	25	6
ПК (КРР)	78,0	3	6	32
Всего	75,2	26	31	44

КРР – колоректальный рак, ЛОК – левая ободочная кишка, ПК – прямая кишка, ПОК – правая ободочная кишка

На диагонали таблицы (выделено серым цветом) представлено число корректно классифицированных случаев принадлежности к исследуемому отделу толстой кишки. В остальных ячейках указано число образцов, которые были классифицированы ошибочно

формирующие стенку ТК, развиваются одновременно, непрерывно передавая друг другу молекулярные сигналы до окончательного формирования ТК как единого органа. Образовавшаяся примитивная кишечная трубка затем продолжает формироваться вдоль передне-задней и радиальной оси эмбриона, а непосредственно сама ТК – из среднего и заднего ее отделов. Такое нормальное асимметричное строение ТК обусловлено паттерном неоднородно экспрессируемых генов в эмбриональном периоде в различных отделах [1]. Все это позволяет дифференцировать отделы ТК у взрослого здорового человека по молекулярно-генетическому профилю. Однако остается неясным, как эти закономерности изменяются при развитии КРР. Известно также, что опухоли ТК разной локализации могут иметь свой молекулярно-генетический профиль и, как следствие, характеризоваться особенностями канцерогенеза, прогноза заболевания, лечения и ответа на него [2, 13]. Предпринимаются попытки создать молекулярно-генетическую классификацию, в основе которой лежат наличие и частота патогенных мутаций, микросателлитная нестабильность, патологическое метилирование [8, 9, 13]. Наряду с этим проводятся исследования экспрессионных профилей в опухолевых тканях с целью описания характерных признаков молекулярного фенотипа на основе изучения экспрессии определенных наборов генов [14, 15]. В настоящей работе мы исследовали молекулярные фенотипы КРР различной локализации, используя панель из 61 гена, отобранного ранее [5].

Как первый шаг мы сравнили молекулярный фенотип образцов слизистой ТК трех локализаций у здоровых доноров. Эмбрионально-анатомическая асимметрия, характерная для ТК, легла в основу деления ободочной кишки на правую и левую половины, для которых мы ожидали получить различные молекулярные фенотипы. Действительно, разработанная нами дискриминантная модель позволяет с высокой точностью дифференцировать образцы группы «Норма» по трем отделам ТК.

Молекулярный фенотип злокачественных клеток (опухолей) служит объектом интенсивных исследований [7–9]. Прямое применение дискриминантной модели группы «Норма» для деления образцов группы «КРР» по трем отделам показало значительно более низкую эффективность классификации, чем новая дискриминантная модель, построенная с использованием набора генов, полученного при анализе опухолевых образцов. Вместе с тем, хотя точность классификации и выросла, она оставалась хуже, чем у дискриминантной модели для группы «Норма». По-видимому, в случае

КРР доминирует молекулярный фенотип опухоли. Очевидно, что опухоли разной локализации более сходны, чем исходные нормальные ткани. Тем не менее среди 19 и 27 генов, лежащих в основе дискриминантных моделей для групп «Норма» и «КРР» соответственно, 11 генов (*MMP11, IL1b, LIFR, TERT, CD69, CD45, CCND1, PAPP, TLR2, TLR4, IL2Ra*) совпадают. Такое перекрытие выявленных наборов генов может указывать на то, что молекулярный фенотип нормальной ткани, отражающий эмбрионально-анатомическую асимметрию ТК, вносит свой вклад в слабо выраженную, но существующую зависимость молекулярного фенотипа КРР от его локализации.

Ограничения исследования

Данное исследование имеет ограничения, к которым относится лимитированная панель исследуемых генов. Вместе с тем ограниченное количество генов позволяет проводить анализ их экспрессии с разумными время- и трудозатратами. Мы минимизировали риск уменьшения дискриминантной эффективности модели путем исключения образцов, для которых отсутствовали данные одного или нескольких исследованных параметров, чтобы при проведении анализа статистическая программа не заменяла их средними значениями. При обработке данных использовали линейный дискриминантный анализ с пошаговым включением переменных. Применение более сложных алгоритмов обработки данных и увеличение объема выборки, возможно, могли бы выявить дополнительные закономерности.

Заключение

Проведенное нами исследование показало, что при колоректальной аденокарциноме, в отличие от нормальной ткани здоровых доноров, отсутствует четкая дифференцировка отделов ПОК, ЛОК и ПК по молекулярному фенотипу. Молекулярный фенотип опухоли доминирует, формируя особый «молекулярно-патологический» фенотип. Таким образом, полученные результаты подтверждают имеющуюся научную парадигму. С одной стороны, КРР следует рассматривать как системное заболевание, а саму ТК – как единый орган, вовлеченный в его канцерогенез. С другой – биологические свойства опухоли индивидуальны и в определенной степени зависят от ее локализации в эмбрионально-анатомическом отделе. Эти обстоятельства побуждают продолжать дальнейшие исследования, направленные на совершенствование молекулярно-генетических технологий в диагностике, классификации и системном лечении КРР. ©



Приложение 1

Значения относительного уровня экспрессии мРНК исследуемых генов в группах «Норма» и «КРР» в зависимости от отдела толстой кишки

Ген	ПОК		ЛОК		ПК	
	Норма (n = 90)	КРР (n = 40)	Норма (n = 116)	КРР (n = 54)	Норма (n = 48)	КРР (n = 60)
CTSL2	6,58 [6,13; 6,97]	7,05 [6,03; 8,45]	6,47 [5,97; 6,9]	8,13 [6,82; 8,83]	6,86 [6,25; 7,23]	7,82 [6,75; 8,43]
BCL2	8,85 [8,35; 9,18]	6,47 [5,55; 7,82]	8,77 [8,13; 9,15]	5,78 [4,95; 6,98]	8,93 [8,32; 9,13]	6,17 [4,8; 7,2]
MYC	4,57 [4,37; 4,77]	7,05 [6,48; 7,59]	4,63 [4,37; 4,9]	7,57 [6,73; 8,2]	4,94 [4,6; 5,18]	7,23 [6,61; 7,78]
BIRC5	7,78 [7,43; 8,17]	8,78 [7,75; 9,35]	7,78 [7,43; 8,17]	8,4 [7,83; 9,38]	7,84 [7,35; 8,11]	8,52 [7,57; 9,13]
CCND1	8,13 [7,9; 8,4]	9,22 [8,72; 10,3]	7,97 [7,68; 8,28]	9,63 [8,95; 10,17]	8,93 [8,58; 9,28]	9,38 [8,93; 9,85]
NDRG1	13,9 [12,82; 14,65]	9,15 [6,95; 11,2]	13,45 [11,92; 14,3]	8,83 [6,13; 10,42]	13,33 [12,58; 13,95]	8,88 [5,58; 10,29]
CD68	5,96 [5,68; 6,25]	6,08 [5,45; 6,4]	5,81 [5,5; 6,12]	5,68 [5,2; 6,28]	5,99 [5,85; 6,25]	5,85 [5,4; 6,35]
KI67	8,58 [8,23; 8,77]	9,55 [8,77; 10,03]	8,53 [8,27; 8,83]	9,68 [8,93; 10,1]	8,43 [8,07; 8,78]	9,63 [9; 10,22]
TERT	9,38 [8,58; 10,05]	9,38 [8,63; 10,1]	9,88 [9,23; 10,48]	8,6 [7,75; 9,27]	8,95 [8,6; 9,54]	9,21 [7,87; 10,17]
HER2	7,83 [7,47; 8,1]	6,87 [6,3; 7,37]	7,7 [7,32; 8,01]	7,15 [6,4; 7,6]	7,63 [7,37; 7,98]	6,91 [6,3; 7,58]
PTEN	17,64 [17,4; 17,9]	17,32 [16,83; 17,55]	17,7 [17,43; 17,89]	17,36 [16,9; 17,88]	17,52 [17,27; 17,83]	17,12 [16,77; 17,5]
BAG1	3,8 [3,47; 4,08]	3,25 [2,68; 3,9]	3,93 [3,59; 4,22]	3,25 [2,58; 3,9]	4,23 [3,79; 4,48]	3,17 [2,53; 3,7]
PGR	10,08 [9,63; 10,53]	8,48 [7,45; 10,15]	10,22 [9,7; 10,87]	8,83 [7,75; 10,1]	10,68 [9,96; 11,02]	8,78 [7,28; 10,26]
CCNB1	9,83 [9,5; 10,37]	10,83 [10,03; 11,49]	9,78 [9,43; 10,17]	10,9 [10,17; 11,55]	9,71 [9,44; 10,3]	10,71 [9,85; 11,41]
ESR1	5,56 [5,12; 5,88]	4,92 [3,55; 6,27]	5,38 [4,9; 5,77]	4,14 [3,15; 5,35]	6,53 [5,97; 6,92]	4,2 [3,28; 6,08]
GRB7	15,61 [15,28; 15,82]	15,83 [15,3; 16,18]	15,62 [15,36; 15,85]	16,08 [15,48; 16,63]	15,47 [15,33; 15,77]	15,98 [15,57; 6,67]
MMP11	12,03 [11,47; 12,8]	13,85 [12,23; 15,17]	12,05 [10,56; 12,77]	13,83 [11,77; 15,92]	11,68 [10,93; 12,39]	14,39 [12,65; 16,33]
STK15	3,9 [3,75; 4,12]	5 [4; 5,42]	3,95 [3,73; 4,15]	4,69 [4,2; 5,52]	4 [3,79; 4,13]	4,62 [3,88; 5,52]



<i>MYBL2</i>	7,43 [7,2; 7,8]	9,03 [8,48; 9,97]	7,51 [7,15; 7,87]	9,27 [8,35; 10,3]	7,5 [6,97; 7,84]	9,62 [8,67; 10,15]
<i>P16INK4A</i>	6,43 [6,07; 6,93]	9,33 [8,3; 10,42]	6,53 [6,25; 6,9]	8,88 [8,13; 10,07]	7,28 [6,84; 7,55]	8,98 [7,73; 9,9]
<i>SCUBE2</i>	11,37 [10,73; 12,03]	8,13 [5,63; 9,93]	11,23 [10,5; 11,8]	7,8 [6,63; 8,67]	9,65 [8,8; 10,17]	7,83 [6,6; 9,8]
<i>MMP9</i>	12,95 [12,07; 13,63]	13,72 [12,43; 15,63]	12,6 [11,42; 13,59]	13,2 [11,53; 14,8]	13,37 [11,98; 14,22]	13,38 [12,45; 14,58]
<i>GNLY</i>	15,83 [14,78; 17,37]	13,17 [10,37; 15,85]	15,37 [14,1; 17,07]	13,45 [11,31; 14,95]	16,08 [14,75; 17,2]	13,67 [10,93; 15,57]
<i>P14ARF</i>	7,05 [5,92; 7,65]	9,65 [6,83; 10,55]	6,75 [5,28; 7,33]	9,77 [7,1; 11,15]	7,9 [7,13; 8,78]	9,47 [7,7; 10,93]
<i>IGF1</i>	14,13 [13,3; 14,73]	11,57 [10,05; 12,87]	13,82 [12,87; 14,45]	11,37 [9,75; 12,55]	14,43 [13,83; 14,87]	11,48 [9,86; 13,48]
<i>COX-2</i>	8,77 [8,18; 9,35]	10,28 [7,18; 13,17]	8,8 [7,78; 9,5]	10,23 [6,78; 12,3]	9,78 [9,33; 10,73]	10,4 [6,92; 11,4]
<i>IGF2</i>	10,57 [9,2; 11,13]	10,03 [8,85; 13,88]	10,63 [9,37; 11,33]	11,03 [8,95; 12,35]	11,77 [10,73; 12,47]	10,7 [8,58; 12,9]
<i>CYP19A</i>	6,13 [5,15; 6,75]	7,72 [5,02; 11,02]	6,12 [5,35; 7,05]	7,12 [4,68; 9,18]	6,63 [6,12; 7,62]	6,73 [5; 8,53]
<i>GREM1</i>	10,87 [10,03; 11,83]	12,02 [9,4; 14,5]	10,93 [9,4; 11,77]	12,18 [10,32; 13,95]	12,77 [11,93; 13,62]	12,01 [10,33; 14,07]
<i>MMP2</i>	13,48 [12,8; 14]	9,95 [7,9; 11,8]	13,57 [12,88; 14,05]	10,07 [8,4; 11,7]	13,92 [13,47; 14,23]	10,07 [8,25; 11,58]
<i>PAPPA</i>	13,6 [12,8; 14,03]	12,47 [10,03; 14,12]	13,3 [12,3; 13,97]	13,23 [11,04; 14,58]	13,02 [12,35; 13,5]	12,44 [10,93; 13,73]
<i>MMP7</i>	5,27 [3,97; 6,23]	11,3 [9,97; 13,67]	5,03 [3,51; 6,12]	12,37 [10,18; 14,13]	6,32 [5,4; 7,42]	13,03 [10,87; 15,33]
<i>IL2</i>	6,97 [6,57; 7,53]	5,85 [4,38; 7,17]	7,17 [6,57; 7,53]	4,5 [3,27; 6,47]	7,57 [7,23; 8,03]	5,16 [3,63; 5,8]
<i>MMP8</i>	5,88 [4,75; 6,42]	10,78 [8,78; 13,6]	5,28 [4,62; 6,15]	10,53 [8,77; 12,45]	6,02 [4,42; 6,45]	10,14 [8,63; 11,48]
<i>IL2Ra</i>	13,25 [12,52; 13,95]	13 [10,05; 14,57]	12,62 [11,58; 13,53]	12,12 [10,55; 13,88]	12,98 [11,9; 13,35]	13,08 [10,48; 13,77]
<i>IL6</i>	6,27 [4,87; 7,47]	9,95 [7,88; 12,78]	5,77 [4,73; 6,9]	9,37 [7,1; 12,23]	7,23 [6,17; 8]	9,7 [7,77; 11,88]
<i>IL12a</i>	10,06 [9,15; 13,52]	8,18 [6,82; 9,83]	9,37 [8,67; 10,37]	9,15 [7,1; 10,12]	13,77 [9,83; 14,13]	8,75 [7,35; 9,58]
<i>IL7</i>	6,82 [6,33; 7,20]	5,55 [4,73; 6,43]	7 [6,53; 7,55]	5,93 [5; 6,47]	7,02 [6,58; 7,5]	6,19 [4,72; 6,7]
<i>IL15</i>	8,23 [4,6; 8,57]	7,23 [6,15; 7,9]	8,13 [6,98; 8,5]	6,5 [5,08; 7,52]	4,78 [4,32; 8,35]	6,87 [6,08; 7,43]
<i>IL8</i>	5,01 [3,83; 6,17]	12,88 [10,8; 15,3]	4,58 [3,62; 5,78]	11,93 [10,3; 13,17]	6,83 [5,72; 7,74]	12,43 [10,89; 13,33]



<i>IL1b</i>	13,36 [11,9; 14,47]	17,56 [15,83; 19,68]	13,63 [12,75; 14,6]	16,83 [15,02; 18,05]	14,82 [14,07; 15,6]	16,93 [15,71; 17,95]
<i>IL10</i>	7,37 [6,78; 7,68]	6,88 [5,72; 7,92]	7,15 [6,22; 7,58]	6,88 [5,65; 7,98]	7,67 [7,22; 8,27]	6,86 [5,62; 7,95]
<i>TPA</i>	13 [12,63; 13,33]	12,81 [11,72; 13,93]	12,9 [12,38; 13,32]	12,98 [12,25; 14,03]	12,97 [12,62; 13,43]	13,39 [12,21; 14,08]
<i>IFNg</i>	8,53 [7,93; 9,43]	10,12 [8,48; 11,1]	8,37 [7,8; 9,23]	8,82 [8,08; 9,94]	8,63 [8,27; 9,2]	9,88 [8,26; 11,08]
<i>CD45</i>	8,07 [7,28; 8,58]	6,58 [5,12; 7,45]	7,63 [6,55; 8,32]	6,08 [4,38; 7,13]	8,45 [7,52; 9]	5,85 [4,6; 7,41]
<i>TNFa</i>	9,08 [8,63; 9,63]	8,33 [7,27; 10,13]	8,9 [8,24; 9,38]	7,85 [6,9; 8,97]	9,43 [8,72; 9,92]	7,9 [7,1; 8,73]
<i>CD56</i>	9,77 [8,82; 10,35]	7,58 [4,33; 8,72]	9,68 [8,28; 10,25]	6,8 [3,72; 8,45]	9,9 [9,37; 10,46]	6,96 [5,42; 8,53]
<i>TGFb</i>	8,88 [8,33; 9,27]	8,53 [6,28; 8,97]	8,6 [7,77; 9,13]	8,42 [6,9; 9,17]	9,17 [8,75; 9,63]	8,3 [7,27; 9,2]
<i>CD69</i>	5,72 [5,33; 6,2]	5,8 [4,7; 7,45]	5,5 [5,04; 6,03]	4,55 [3,9; 5,93]	5,78 [5,1; 6,18]	5,37 [4,1; 6,37]
<i>VEGFA121</i>	3,59 [3,36; 3,89]	4,46 [3,96; 5,03]	3,56 [3,27; 3,78]	4,41 [3,74; 5,38]	3,24 [3,06; 3,48]	4,74 [4,06; 5,44]
<i>BAX</i>	12,22 [11,37; 2,53]	10,11 [6,5; 11,12]	12,15 [10,62; 12,5]	10,18 [8,82; 11,7]	12,53 [11,48; 12,92]	9,63 [7,97; 11,07]
<i>VEGFA165</i>	7,53 [7,33; 7,87]	7,68 [5,95; 8,83]	7,47 [7,03; 7,81]	7,62 [6,85; 8,68]	7,32 [7,03; 7,55]	7,71 [6,8; 8,47]
<i>TLR2</i>	10,3 [9,55; 10,68]	10,07 [9,1; 11,43]	10,08 [8,78; 10,62]	9,55 [7,95; 11,17]	10,35 [9,82; 10,68]	10,43 [8,07; 11,47]
<i>VEGFA189</i>	8,76 [8,43; 9,1]	8,07 [6,53; 9,42]	8,51 [8,07; 8,87]	8,17 [7,23; 9,4]	8,52 [8,32; 8,87]	8,25 [7,52; 8,93]
<i>TLR4</i>	9,8 [9,38; 10,25]	8,91 [7,43; 10,08]	9,56 [8,7; 10,05]	8,83 [7,73; 9,6]	9,52 [9,23; 9,87]	9,02 [6,83; 9,93]
<i>TLR7</i>	8,05 [7,58; 8,45]	5,9 [4,28; 6,55]	7,95 [7,4; 8,43]	5,54 [4,47; 6,08]	8,33 [8; 8,69]	5,42 [4,42; 6,62]
<i>HLA-G5</i>	17,03 [15,1; 20,23]	14,26 [11,1; 17,28]	17,33 [15,23; 21,17]	15,53 [11,23; 17,66]	20,87 [17,8; 21,9]	14,97 [12,7; 18,77]
<i>GATA3</i>	6,28 [5,9; 6,8]	5,88 [5,4; 6,67]	6,18 [5,27; 6,72]	5,33 [4,1; 6,5]	6,87 [6,28; 7,22]	5,65 [4,53; 6,2]
<i>LGALS1</i>	13,67 [12,8; 14,13]	13,28 [8,13; 14,7]	13,53 [11,88; 13,98]	13,77 [11,4; 15,13]	14,18 [13,87; 14,62]	13,76 [10,68; 14,87]
<i>LIF</i>	8,65 [7,33; 9,74]	8,32 [5,02; 9,52]	9,05 [8,22; 9,85]	9,53 [7,08; 10,72]	10,35 [9,25; 10,92]	9,08 [6,97; 10,32]
<i>LIFR</i>	8,67 [8,27; 9,07]	6,93 [4,35; 8,07]	8,6 [8,23; 9,03]	6,1 [4,47; 6,83]	9,22 [8,77; 9,48]	6,27 [4,98; 7,32]

KPP – колоректальный рак, ЛОК – левая ободочная кишка, ПК – прямая кишка, ПОК – правая ободочная кишка

Значения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [25-й; 75-й процентиля]



Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Т.В. Крашихина в период с 2018 по 2021 г. была очным аспирантом (специальность 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия) в ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России и принимала непосредственное участие в исследовании по теме публикации.

Участие авторов

С.В. Гончаров – разработка дизайна проекта, набор клинического материала, формирование групп пациентов, анализ и интерпретация результатов, написание и редактирование текста; В.К. Боженко – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментальных исследований и статистическая обработка результатов, написание и редактирование текста,

подготовка иллюстративного материала; М.В. Захаренко – проведение экспериментальных исследований, анализ и статистическая обработка результатов, формирование базы данных, написание и редактирование текста, подготовка иллюстративного материала; Я.Ю. Киселева – анализ и статистическая обработка результатов, написание и редактирование текста, подготовка иллюстративного материала; А.А. Чаптыков – концепция и дизайн исследования, написание и редактирование текста, подготовка иллюстративного материала; Т.М. Кулинич – проведение экспериментальных исследований и статистическая обработка результатов, написание и редактирование текста, подготовка иллюстративного материала; Т.В. Крашихина – набор клинического материала, формирование групп пациентов, анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка результатов; В.А. Солодкий – концепция и дизайн исследования, разработка дизайна клинической части исследования, утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Список литературы / References

- Zorn AM, Wells JM. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:221–251. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113344.
- Корнева ЮС, Украинец РВ. Морфологические особенности муцинозной аденокарциномы толстой кишки и их эмбриогенетические предпосылки. *Онкологическая колопроктология.* 2019;9(2):16–22. doi: 10.17650/2220-3478-2019-9-2-16-22. [Korneva YuS, Ukrainets RV. [Morphological characteristics of mucinous adenocarcinoma of the colon and its embryogenetic premises]. *Colorectal Oncology.* 2019;9(2):16–22. Russian. doi: 10.17650/2220-3478-2019-9-2-16-22.]
- Zhao H, Ming T, Tang S, Ren S, Yang H, Liu M, Tao Q, Xu H. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Mol Cancer.* 2022;21(1):144. doi: 10.1186/s12943-022-01616-7.
- Ouko L, Ziegler TR, Gu LH, Eisenberg LM, Yang VW. Wnt11 signaling promotes proliferation, transformation, and migration of IEC6 intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004;279(25):26707–26715. doi: 10.1074/jbc.M402877200.
- Захаренко МВ, Боженко ВК, Киселёва ЯЮ, Джикия ЕЛ, Станоевич УС, Кулинич ТМ, Мельникова НВ, Сенчукова АЛ, Уракова АВ, Грунин ИБ, Гончаров СВ, Близнюков ОП, Солодкий ВА. Исследование профилей экспрессии мРНК генов, участвующих в регуляции основных клеточных функций в неизменном эпителии толстой кишки у здоровых доноров. *Биомедицинская химия.* 2021;67(4):366–373. doi: 10.18097/PBMC20216704366. [Zakharenko MV, Bozhenko VK, Kiseleva YY, Dzhikeya EL, Kulnich TM, Melnikova NV, Senchukova AL, Urakova AV, Grunin IB, Goncharov SV, Bliznyukov OP, Solodkiy VA, Stanoevich US. The study of mRNA expression profiles of main cell function regulator genes in unchanged colon mucosa from healthy donors. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2022;16(1):22–29. doi: 10.1134/S1990750822010115.]
- Xiao JB, Leng AM, Zhang YQ, Wen Z, He J, Ye GN. CUEDC2: multifunctional roles in carcinogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2019;24(5):935–946. doi: 10.2741/4759.
- Rebersek M. Consensus molecular subtypes (CMS) in metastatic colorectal cancer – personalized medicine decision. *Radiol Oncol.* 2020;54(3):272–277. doi: 10.2478/raon-2020-0031.
- Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2016;469(2):125–134. doi: 10.1007/s00428-016-1956-3.
- Кит ОИ, Дженкова ЕА, Мирзоян ЭА, Геворкян ЮА, Сагакянц АБ, Тимошкина НН, Каймакчи ОЮ, Каймакчи ДО, Толмах РЕ, Дашков АВ, Колесников ВЕ, Милакин АГ, Полуэктов СИ. Молекулярно-генетическая классификация подтипов колоректального рака: современное состояние проблемы. *Южно-Российский онкологический журнал.* 2021;2(2):50–56. doi: 10.37748/2686-9039-2021-2-2-6. [Kit OI, Jenkova EA, Mirzoyan EA, Gevorkyan YuA, Sagakants AB, Timoshkina NN, Kaymakchi OYu, Kaymakchi DO, Tolmakh RE, Dashkov AV, Kolesnikov VE, Milakin AG, Poluektov SI. [Molecular genetic classification of colorectal cancer subtypes: current state of the problem]. *South Russian Journal of Oncology.* 2021;2(2):50–56. Russian. doi: 10.37748/2686-9039-2021-2-2-6.]
- De Berardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008;7(1):11–20. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.002.
- Кушлинский НЕ, Немцова МВ. Молекулярно-биологические характеристики злокачественных новообразований. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2014;69(1–2):5–15. doi: 10.15690/vramn.v69i1-2.934. [Kushlinsky NE, Nemtsova MV. [Molecular biological characteristics of malignant neoplasms]. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2014;69(1–2):5–15. Russian. doi: 10.15690/vramn.v69i1-2.934.]
- Боженко ВК, Станоевич УС, Троценко ИД, Захаренко МВ, Киселева ЯЮ, Солодкий ВА. Сравнение экспрессии мРНК матриксных металлопротеиназ в морфологически нормальной, неопластической и метастатической тканях толстого кишечника и в биоптатах здоровых доноров. *Биомедицинская химия.* 2018;64(1):46–52. doi: 10.18097/PBMC20186401046. [Bozhenko VK, Stanoevich US, Trotsenko ID, Zakharenko MV, Kiseleva YaYu, Solodkiy VA. [Comparison of matrix metalloproteinase mRNA expression in morphologically normal, neoplastic and metastatic colon tissues and in biopsies from healthy donors]. *Biomedical Chemistry.* 2018;64(1):46–52. Russian. doi: 10.18097/PBMC20186401046.]
- Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, Imamura Y, Qian ZR, Nishihara R, Liao X, Waldron L, Hoshida Y, Huttenhower C, Chan AT, Giovannucci E, Fuchs C, Ogino S. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut.* 2012;61(6):847–854. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300865.
- Hambali MA, Odelede TO, Adewole KS. Microarray cancer feature selection: Review, challenges and research directions. *International Journal of Cognitive Computing in Engineering.* 2020;1:78–97. doi: 10.1016/j.ijcce.2020.11.001.
- Koncina E, Haan S, Rauh S, Letellier E. Prognostic and predictive molecular biomarkers for colorectal cancer: Updates and challenges. *Cancers (Basel).* 2020;30;12(2):319. doi: 10.3390/cancers12020319.



Analysis of molecular phenotypes in normal mucosa and colorectal cancer in embryonic anatomical parts of the colon

S.V. Goncharov¹ • V.K. Bozhenko¹ • M.V. Zakharenko¹ •
Ya.Yu. Kiseleva¹ • A.A. Chaptikov¹ • T.M. Kulinich¹ •
T.V. Krashikhina² • V.A. Solodkiy¹

Background: Differences in the embryonic development of the colonic mucosa determine the physiological embryonic-anatomical asymmetry of its structure and can manifest themselves via different molecular phenotypes (expression profiles) of the colon segments. These molecular characteristics are hypothesized to determine differences in the carcinogenesis mechanisms and influence the prognosis of right- or left-sided colorectal cancer (CRC). Studies of the tumors molecular phenotypes depending on their localization may be of interest for assessment of the prognosis and choice of treatment for CRC.

Aim: To perform comparative analysis of molecular phenotypes of the normal colonic mucosa and adenocarcinoma CRC tissues depending on the natural embryonic anatomic asymmetry of the colon.

Materials and methods: We performed a retrospective study of molecular phenotypes (mRNA expression of 61 genes) from different embryonic-anatomical parts of healthy colon and CRC. The normal group included 254 samples of mucosa from three different parts of the colon from 74 healthy donors who had no cancer and no organic abnormalities of the colon, including 90 samples from the right colon, 116 from the left colon, and 48 from the rectum. The CRC group consisted of 154 samples of localized stage T₁₋₄N₀₋₂M₀ adenocarcinoma from 154 patients who had not received neoadjuvant radio- and chemotherapy, including 40 samples from the right colon, 54 from the left colon, and 60 from the rectum. The relative mRNA abundance of 61 genes was assessed by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. In both groups, the resulting expression phenotypes were compared between the anatomical parts of the colon. Statistical management of the data included the discriminant analysis with stepwise inclusion of variables.

Results: Based on the assessment of the mRNA level of the studied genes, a discriminant model was built that

allows for classification of the normal group samples according to their anatomic origin in the colon with an accuracy of 95.8%. The most significant ($p < 0.05$) for classification are the following 19 genes: *CCND1*, *SCUBE2*, *TERT*, *BAG1*, *NDRG*, *IL1b*, *IL2Ra*, *IL7*, *ESR1*, *TGFb*, *IGF1*, *MMP9*, *MMP11*, *PAPPA*, *CD45*, *CD69*, *TLR2*, *TLR4*, *LIFR*. The discriminant model built for the CRC group included 27 genes and made it possible to differentiate samples from three parts of colon with an accuracy of 75.2%. A statistically significant ($p < 0.05$) contribution to the samples differentiation by the discriminant model was made by the *COX-2*, *BIRCS*, *LIFR*, *TPA*, *IL1b*, *MMP11*, *MMP7*, and *P16INK4A* genes. When combining samples from the two groups into one model in accordance with their embryonic-anatomical origin, there was a clear separation of tumor tissue samples and healthy colonic mucosa in the discriminant function space.

Conclusion: The analysis of CRC gene expression profiles using the discriminant model showed that genetic changes in the colonic mucosa in CRC flatten the molecular phenotypic boundaries of the embryonic-anatomical parts. These changes are specific to CRC, forming a particular “pathological” molecular phenotype.

Key words: adenocarcinoma, rectum, colon, mucosa, phenotype, reverse-transcriptase polymerase chain reaction, mRNA, discriminant analysis

For citation: Goncharov SV, Bozhenko VK, Zakharenko MV, Kiseleva YaYu, Chaptikov AA, Kulinich TM, Krashikhina TV, Solodkiy VA. Analysis of molecular phenotypes in normal mucosa and colorectal cancer in embryonic anatomical parts of the colon. Almanac of Clinical Medicine. 2023;51(8):441–455. doi: 10.18786/2072-0505-2023-51-046.

Received 7 December 2023; revised 25 December 2023; accepted 29 December 2023

Sergey V. Goncharov – MD, PhD, Head of Department of Surgical Treatment Methods and Antitumor Drug Therapy of Abdominal Oncology with Abdominal Surgery Beds¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7914-1882>. E-mail: svgonch@yandex.ru

Vladimir K. Bozhenko – MD, PhD, Professor, Head of Department of Molecular Biology and Experimental Therapy of Tumors¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8351-8152>. E-mail: vbojenko@mail.ru

Margarita V. Zakharenko – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Immunology and Oncocytology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2480-4145>

✉ Ul. Profsoyuznaya 86, Moscow, 117997, Russian Federation. E-mail: zak-margarita@mail.ru

Yana Yu. Kiseleva – MD, PhD, Research Fellow, Laboratory of Immunology and Oncocytology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8352-4787>. E-mail: yana.kiseleva@gmail.com

Andrey A. Chaptikov – Surgeon, Department of Surgical Treatment Methods and Antitumor Drug Therapy of Abdominal Oncology with Abdominal Surgery Beds¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2120-6783>. E-mail: aachaptikov@mrccr.ru

Tatiana M. Kulinich – MD, PhD, Head of Laboratory of Immunology and Oncocytology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2331-5753>. E-mail: sobral@mail.ru

Tatiana V. Krashikhina – MD, PhD, Head of Department of Oncology No.1²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7567-8308>. E-mail: ciklogidro1@mail.ru

Vladimir A. Solodkiy – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Director¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1641-6452>. E-mail: 9015@mail.ru

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article. T.V. Krashikhina was postgraduate fellow in the Russian Scientific Center of Radiology and Nuclear Medicine from 2018 to 2021 and directly contributed to the study submitted for the publication.

Authors' contribution

S.V. Goncharov, the project design, clinical data collection, patient group recruitment, analysis and interpretation of the results, text writing and editing; V.K. Bozhenko, the study concept and design, conduction of the experimental parts of the study, statistical analysis, text writing and editing, preparation of the illustrations; M.V. Zakharenko, conduction of the experimental parts of the study, statistical analysis and analysis of the results, database management, text writing and editing, preparation of the illustrations; Ya.Yu. Kiseleva, analysis and statistical analysis of the results, text writing and editing, preparation of the illustrations; A.A. Chaptikov, the study concept and design, text writing and editing, preparation of the illustrations; T.M. Kulinich, conduction of the experimental parts of the study, statistical analysis, text writing and editing, preparation of the illustrations; T.V. Krashikhina, clinical data collection, patient group recruitment, analysis and interpretation of the results, statistical analysis; V.A. Solodkiy, the study concept and design, design of the clinical part of the study, approval of the final version of the manuscript. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

¹ Russian Scientific Center of Radiology and Nuclear Medicine; ul. Profsoyuznaya 86, Moscow, 117997, Russian Federation

² Moscow Center for Rehabilitation Treatment; ul. Orshanskaya 16–1, Moscow, 121552, Russian Federation