



Оригинальная статья

Детекция кольцевых РНК hsa_circ_0031263, hsa_circ_0072715 и hsa_circ_0136666, ассоциированных с колоректальным раком, в плазме крови с помощью нанопроводных чипов

Иванов Ю.Д.^{1,2} • Неведрова Е.Д.¹ • Виноградова А.В.¹ • Голдаева К.В.¹ • Плешакова Т.О.¹ • Галиуллин Р.А.¹ • Аблеев А.Н.¹ • Шумов И.Д.¹ • Козлов А.Ф.¹ • Попов В.П.³ • Кушлинский Н.Е.⁴ • Стилиди И.С.⁴ • Мамедли З.З.⁴ • Еникеев Д.В.⁵ • Потолдыкова Н.В.⁵ • Конев В.А.⁶ • Ковалев О.Б.⁶ • Зиборов В.С.^{1,2} • Гришин Л.И.² • Долгобородов А.Ю.² • Петров О.Ф.² • Арчаков А.И.¹

Обоснование. Колоректальный рак (КРР) – одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний с высокой смертностью. «Золотым стандартом» диагностики КРР признан инвазивный метод оптической (эндоскопической) колоноскопии. Перспективное направление – разработка неинвазивных методов диагностики КРР с использованием кольцевых РНК (кольцоРНК). Одним из наиболее чувствительных неинвазивных методов детекции РНК-маркеров онкопатологии считается биосенсорный метод с использованием чипов с нанопроводами (НП-чипов) с иммобилизованными на их поверхности одНК-зондами (фрагментами ДНК-олигонуклеотидов). Ранее показано, что с КРР ассоциированы кольцоРНК hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1 и hsa_circ_0072715_CBC1.

Цели – определение нижнего предела концентрационной чувствительности детекции кольцоРНК, ассоциированных с развитием КРР, при помощи НП-чипов с иммобилизованными одНК-зондами; демонстрация применимости этих чипов для неинвазивной детекции кольцоРНК в плазме крови с целью диагностики КРР; определение возможности использования НП-чипов для выявления ранних стадий КРР.

Материал и методы. Для обеспечения биоспецифического связывания кольцоРНК hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1 и hsa_circ_0072715_CBC1 – маркеров КРР – на поверхность нанопроводов были иммобилизованы

одНК-зонды, нуклеотидные последовательности которых комплементарны целевым кольцоРНК. На I этапе исследования определяли нижний концентрационный предел обнаружения целевых молекул, для чего использовали их аналоги – синтетические модельные одНК с нуклеотидными последовательностями, комплементарными одНК-зондам. На II этапе применяли НП-чипы с иммобилизованными одНК-зондами для детекции кольцоРНК в образцах плазмы крови больных с подтвержденным диагнозом КРР. В качестве контрольных использовали образцы от пациентов без онкопатологии.

Результаты. Нижний концентрационный предел обнаружения ДНК-аналогов кольцоРНК hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1 и hsa_circ_0072715_CBC1 с помощью НП-чипов с одНК-зондами составил 10^{-16} М. При анализе образцов суммарной РНК, выделенной из плазмы крови пациентов с КРР, наблюдали существенный рост уровня сигнала от чувствительных элементов НП-чипа. При анализе образцов, выделенных из плазмы крови пациентов без онкологических заболеваний, изменение уровня сигнала от нанопроводов было незначительным, что свидетельствовало об отсутствии детектируемых концентраций целевых кольцоРНК в плазме крови пациентов без онкопатологии.

Заключение. Установлена минимальная детектируемая концентрация кольцоРНК hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1

и hsa_circ_0072715_CBC1, ассоциированных с развитием КРР, с помощью НП-чипов с иммобилизованными одНК-зондами: она составила 10^{-16} М. Экспериментально продемонстрирована применимость таких НП-чипов для неинвазивной детекции указанных кольцоРНК-маркеров в образцах суммарной РНК, выделенной из плазмы крови больных КРР.

Ключевые слова: колоректальный рак (КРР), кольцевая РНК, биосенсорная диагностика, нанопровод, ДНК-зонд, плазма крови человека

Для цитирования: Иванов ЮД, Неведрова ЕД, Виноградова АВ, Голдаева КВ, Плешакова ТО, Галиуллин РА, Аблеев АН, Шумов ИД, Козлов АФ, Попов ВП, Кушлинский НЕ, Стилиди ИС, Мамедли ЗЗ, Еникеев ДВ, Потолдыкова НВ, Конев ВА, Ковалев ОБ, Зиборов ВС, Гришин ЛИ, Долгобородов АЮ, Петров ОФ, Арчаков АИ. Детекция кольцевых РНК hsa_circ_0031263, hsa_circ_0072715 и hsa_circ_0136666, ассоциированных с колоректальным раком, в плазме крови с помощью нанопроводных чипов. Альманах клинической медицины. 2024;52(3):120–131. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-016.

Поступила 16.02.2024; доработана 16.04.2024; принята к публикации 24.06.2024; опубликована онлайн 08.08.2024



Иванов Юрий Дмитриевич – д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией нанобиотехнологии¹, вед. науч. сотр.; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5041-1914>
✉ 119121, г. Москва, ул. Погодинская, 10–8, Российская Федерация. E-mail: yurii.ivanov.nata@gmail.com

Неведрова Екатерина Дмитриевна – мл. науч. сотр., лаборатория нанобиотехнологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2767-2299>. E-mail: nevedrova.kat@yandex.ru

Виноградова Ангелина Владимировна – мл. науч. сотр., лаборатория нанобиотехнологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6044-3490>. E-mail: angeluna1234@bk.ru

Голдаева Кристина Витальевна – мл. науч. сотр., Научный центр мирового уровня²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4082-1247>. E-mail: goldaeva.nata@mail.ru

Плешакова Татьяна Олеговна – д-р биол. наук, заместитель директора по научной работе¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3217-9095>. E-mail: topleshakova@yandex.ru

Галиуллин Рафаэль Анварович – ведущий программист лаборатории исследований единичных биомакромолекул¹. E-mail: rafael.anvarovich@gmail.com

Аблеев Александр Нариманович – ведущий инженер лаборатории нанобиотехнологии¹. E-mail: ableev@mail.ru

Шумов Иван Дмитриевич – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории нанобиотехнологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9795-7065>. E-mail: shum230988@yandex.ru

Козлов Андрей Федорович – ведущий инженер лаборатории нанобиотехнологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2117-8743>. E-mail: afkozlow@mail.ru

Попов Владимир Павлович – д-р физ.-мат. наук, зав. лабораторией № 10 физических основ материаловедения кремния³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7415-1405>. E-mail: popov@isp.nsc.ru

Кушлинский Николай Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель клинично-диагностической лаборатории консультативно-диагностического центра⁴; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>. E-mail: biochimia@yandex.ru

Стилиди Иван Сократович – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор⁵; <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>. E-mail: info@ronc.ru

Мамедли Заман Заурович – д-р мед. наук, доцент, зав. отделением абдоминальной онкологии № 3 (колопроктологии)⁶; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9289-1247>. E-mail: z.z.mamedli@gmail.com

Еникеев Дмитрий Викторович – д-р мед. наук, профессор, хирург-уролог, Институт урологии и репродуктивного здоровья человека⁵; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7169-2209>. E-mail: enikeev_dv@mail.ru

Потолдыкова Наталья Валерьевна – врач-уролог, Институт урологии и репродуктивного здоровья человека⁵; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9947-9725>. E-mail: natalis8282@mail.ru

Конев Владимир Александрович – канд. мед. наук, доцент, кафедра инфекционных болезней у детей, педиатрический факультет⁶; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1566-1771>. E-mail: konev60@mail.ru

Ковалев Олег Борисович – д-р мед. наук, профессор, кафедра инфекционных болезней у детей, педиатрический факультет⁶; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0273-6700>. E-mail: doctor87@list.ru

Зиборов Вадим Серафимович – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаборатории № 6.2 (ударно-волновых воздействий)²; ведущий специалист лаборатории нанобиотехнологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7942-3337>. E-mail: ziborov.vs@yandex.ru

Гришин Леонид Игоревич – науч. сотр. лаборатории № 6.2 (ударно-волновых воздействий)². E-mail: lena-grishin@mail.ru

Долгобородов Александр Юрьевич – д-р физ.-мат. наук, зав. лабораторией № 6.2 (ударно-волновых воздействий)²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7054-7341>. E-mail: aldol@ihed.ras.ru

Петров Олег Федорович – д-р физ.-мат. наук, академик РАН, директор². E-mail: ofpetrov@ihed.ras.ru

Арчаков Александр Иванович – д-р биол. наук, академик РАН, профессор, научный руководитель¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2290-8090>. E-mail: alexander.archakov@ibmc.msk.ru

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»; 119121, г. Москва, ул. Погодинская, 10–8, Российская Федерация

² ФГБНУ Объединенный институт высоких температур Российской академии наук; 125412, г. Москва, ул. Ижорская, 13–2, Российская Федерация

³ ФГБНУ Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук; 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 13, Российская Федерация

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

⁵ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация

⁶ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1, Российская Федерация

Колоректальный рак (КРР) – одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний с высокой смертностью, характеризующееся устойчивой тенденцией дебюта в возрастной группе младше 50 лет [1, 2]. Согласно мировой статистике, КРР занимает 3–4-е место в структуре заболеваемости онкопатологией в Европе, Китае и Северной Америке [3] и вышел на 2-е место среди причин смерти от онкологических заболеваний [4].

Сегодня «золотым стандартом» в диагностике КРР признана оптическая (эндоскопическая) колоноскопия, играющая центральную роль в программах скрининга пациентов. Этот метод позволяет выявлять не только злокачественные образования в прямой кишке, но и предраковые изменения,

такие как аденоматозные полипы и зубчатые аденомы [5, 6]. Вместе с тем метод имеет существенное ограничение – необходимость предварительной подготовки (очищения кишечника), что часто связано с использованием медикаментозных препаратов (слабительных) и дополнительных процедур (клизм) [7]. Негативная реакция на предварительную подготовку может служить причиной отказа пациента от процедуры колоноскопии [6]. Важно отметить, что эндоскопическая колоноскопия – инвазивный метод [8, 9], болезненный для пациента [9]. Ирригоскопия, популярный в медицинской практике и альтернативный колоноскопии метод, также относится к инвазивным [8], при этом его чувствительность относительно колоноскопии значительно ниже [7].



Указанные обстоятельства определяют необходимость разработки и внедрения в клиническую практику неинвазивных методов диагностики заболеваний прямой кишки [9]. Перспективным подходом считают жидкую биопсию, принцип которой заключается в детекции циркулирующих в крови пациента ДНК опухолевых клеток и других нуклеиновых кислот (микроРНК и длинных некодирующих РНК), ассоциированных с развитием онкологического заболевания [10]. МикроРНК как маркеры могут быть неспецифичными к конкретным онкологическим заболеваниям [11]. Кольцевые (циркулярные) РНК (кольцРНК), напротив, обладают потенциалом в плане использования в качестве маркеров онкологических заболеваний, так как по сравнению с микроРНК их замкнутая структура более стабильна и они имеют более высокую клеточную и тканевую специфичность [12, 13].

КольцРНК – уникальный класс биологически активных молекул РНК, пространственная структура которых представляет собой замкнутую петлю [14, 15]. Установлено, что кольцРНК образуются посредством обратного сплайсинга линейных РНК с формированием ковалентной связи [14, 15]; кольцРНК экспрессируются в тканях [16], но при этом широко представлены (циркулируют) в крови [17, 18] и обнаруживаются в плазме крови [18]. В отличие от линейных РНК, кольцРНК не имеют 5'- и 3'-концов и, соответственно, более химически стойки (в частности, устойчивы к воздействию экзонуклеаз) [15], что определяет их преимущество в качестве маркеров. К основным функциям кольцРНК относят контроль линейного сплайсинга РНК и участие в экспрессии генов [19, 20]. При развитии рака экспрессия кольцРНК нарушается за счет различных механизмов, таких как амплификация или делеция генов кольцРНК, аномальный контроль транскрипции кольцРНК, дефекты в механизме биогенеза кольцРНК [21]. Уровень кольцРНК в опухолевой ткани (и, соответственно, концентрация в крови) по сравнению со здоровой может быть как пониженным [22, 23], так и повышенным [24]. Как следствие, изменение уровня конкретной маркерной кольцРНК в ткани (и, соответственно, в плазме крови) может свидетельствовать о наличии заболевания.

J.N. Guo и соавт. показали, что при КРР уровень экспрессии кольцРНК *hsa_circ_0000069* повышен и связан с пролиферацией, миграцией и инвазией опухолевых клеток [25]. X. Zhang и соавт. установили роль *hsa_circ_0020397* в патогенезе КРР, выявив свойство этой кольцРНК регулировать жизнеспособность

клеток при КРР, их апоптоз и инвазию [26]. S. Chen и соавт. идентифицировали 10 245 дифференциально экспрессируемых кольцРНК (6264 с повышенной регуляцией и 3981 с пониженной), уровень трех из них повышался при КРР: *hsa_circ_0136666_CBC1*, *hsa_circ_0031263_CBC1* и *hsa_circ_0072715_CBC1* [16]. Таким образом, появилась возможность практического применения кольцРНК, в частности *hsa_circ_0136666_CBC1*, *hsa_circ_0031263_CBC1* и *hsa_circ_0072715_CBC1*, в качестве биомаркеров в неинвазивных методах диагностики КРР. При этом ключевым аспектом следует признать чувствительность метода детекции маркеров КРР.

Среди наиболее чувствительных неинвазивных методов детекции РНК-маркеров онкологических заболеваний выделяется биосенсорный метод с использованием чипов с чувствительными (сенсорными) элементами нанометрового размера (нанопроводами, НП) [27–33]. Высокую чувствительность этого метода обеспечивает именно малый размер НП [34]. Для детекции РНК-маркеров используют ДНК-зонды (англ. DNA probe) – фрагменты ДНК, которые применяют для гибридизации с комплементарными участками РНК и, следовательно, для идентификации таких молекул. В этом методе на поверхности НП-чипа иммобилизуют олигонуклеотидные ДНК-зонды (оДНК-зонды), комплементарные детектируемому молекулам РНК. Комплементарность оДНК-зондов целевым молекулам РНК обеспечивает их биоспецифическое связывание с поверхностью НП-чипа. В результате образованной связи изменяется физическая характеристика (электрическая проводимость) НП. Это изменение и регистрируют в процессе анализа исследуемого образца на предмет содержания в нем целевой РНК [27–33].

Цели настоящей работы – определение нижнего предела концентрационной чувствительности детекции кольцРНК (*hsa_circ_0136666_CBC1*, *hsa_circ_0031263_CBC1* и *hsa_circ_0072715_CBC1*), ассоциированных с развитием КРР, при помощи НП-чипов с иммобилизованными оДНК-зондами; демонстрация применимости этих чипов для неинвазивной детекции кольцРНК в плазме крови с целью диагностики КРР; определение возможности использования НП-чипов для выявления ранних стадий КРР.

Материал и методы

Дизайн исследования

Проведено экспериментальное одномоментное выборочное исследование применимости НП-чипов с иммобилизованными оДНК для детекции



целевых кольцРНК hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1 и hsa_circ_0072715_CBC1, ассоциированных с развитием КРР. Дизайн исследования предусматривал сбор образцов биологического материала (крови) от пациентов с КРР и пациентов без онкопатологии, подготовку образцов (в том числе выделение РНК из образцов плазмы крови) и проведение измерений для выявления в исследуемых образцах целевых кольцРНК (hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1 и hsa_circ_0072715_CBC1). Исследование включало в себя подготовительный и два основных этапа.

На подготовительном этапе проводили иммобилизацию оДНК-зондов, комплементарных целевым кольцРНК, на поверхности чувствительных элементов НП-чипов и проверку эффективности иммобилизации оДНК-зондов.

На I основном этапе определяли нижний концентрационный предел обнаружения целевых молекул нуклеиновых кислот с использованием НП-чипов с иммобилизованными оДНК, комплементарными целевым молекулам. Для этого проводили измерения с использованием НП-чипов и очищенных буферных растворов с известной концентрацией модельных оДНК, нуклеотидные последовательности которых соответствовали таковым целевых кольцРНК: hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1 и hsa_circ_0072715_CBC1.

На II основном этапе исследовали применимость НП-чипов с иммобилизованными оДНК для детекции трех целевых кольцРНК в образцах

РНК, выделенных из плазмы крови больных КРР. В качестве контрольных использовали образцы РНК, выделенные из плазмы крови пациентов без онкопатологии.

Образцы биоматериала и их подготовка для исследования

Образцы плазмы крови принадлежали больным с подтвержденным диагнозом КРР, контрольные – пациентам без онкологических заболеваний. В табл. 1 обобщена основная информация о пациентах. Все образцы были взяты из Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина и Института урологии и репродуктивного здоровья человека Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета).

Забор крови пациентов проводили из локтевой вены натощак во время медицинского обследования. Образцы крови помещали в контейнеры, содержащие антикоагулянт – 3,8% цитрат натрия (S-Monovette, SARSTEDT, ФРГ), и центрифугировали при комнатной температуре и 3000 об/мин в течение 6 мин. Полученные таким образом образцы плазмы крови хранили в замороженном состоянии при (-80) °С до их использования в экспериментах.

Выделение суммарной РНК, включая кольцРНК, из образцов плазмы крови проводили по соответствующему протоколу производителя набора ExtractRNA (Евроген, Россия).

Таблица 1. Информация об исследуемых и контрольных образцах плазмы крови

| Образцы (№) | Возраст пациента, годы | Пол | Стадия TNM |
|-------------------------------|------------------------|-----|--------------|
| Колоректальный рак: | | | |
| K193 | 65 | м | T3N0M0 (IIa) |
| K114 | 67 | м | T4N0M0 (IIb) |
| K10 | 65 | м | T3N0M0 (IIa) |
| 13 | 54 | ж | T2N0M0 (I) |
| 17 | 51 | м | T2N0M0 (I) |
| 26 | 63 | ж | T3N0M0 (IIa) |
| Контроль (без онкопатологии): | | | |
| 26p | 55 | ж | T0N0M0 |
| 12p | 40 | ж | T0N0M0 |

TNM – система стадирования рака, предложенная Американским объединенным комитетом по изучению рака (American Joint Committee on Cancer, AJCC); ж – женщина; м – мужчина

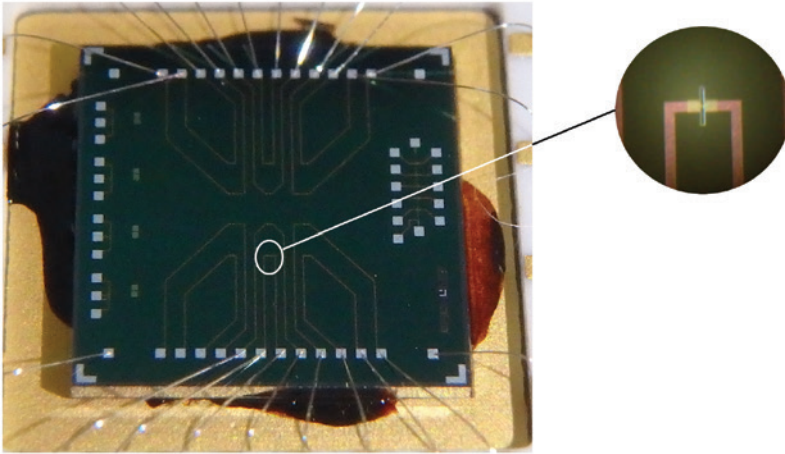


Рис. 1. Поверхность нанопроводного чипа. На выноске показано увеличенное оптическое изображение чувствительного элемента чипа (нанопровода)

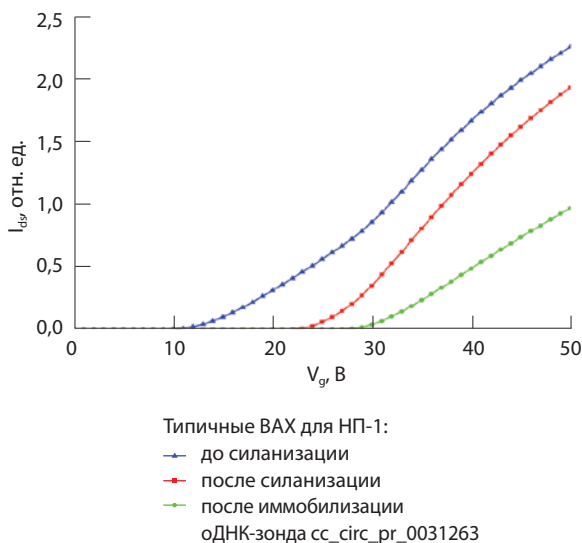


Рис. 2. Оценка эффективности силанизации нанопроводного чипа и иммобилизации ДНК-олигонуклеотидных зондов (оДНК-зондов) на поверхности чувствительного элемента чипа (нанопровода, НП) путем измерения вольт-амперных характеристик (ВАХ) НП-1; $I_{дс}$ (отн. ед.) – сила тока/сигнала между контактами НП-1 (сток – исток); $V_{гр}$ (В) – постоянное напряжение на затворе. Экспериментальные условия: 1 мМ калий-фосфатный буферный раствор (pH = 7,4), напряжение на затворе $V_{гр}$ от 0 до 50 В, напряжение между контактами НП (напряжение «сток – исток») $V_{дс} = 0,1$ В

Подготовка нанопроводных чипов для исследования

Метод нанопроводной детекции с использованием кремниевых НП-чипов был разработан нами ранее [35, 36]. Технология изготовления чипов подробно изложена в работах [31, 32, 37]. Физический

принцип детекции нуклеиновых кислот при помощи таких НП-чипов и используемая для этого аппаратура детально описаны в наших предыдущих публикациях [30–33, 37, 38]. Фотоизображение поверхности НП-чипа представлено на рис. 1. На поверхности одного такого чипа имеется 10 отдельных чувствительных НП.

Для использования НП-чипов в экспериментах по детекции нуклеиновых кислот на поверхности чувствительных элементов иммобилизовали оДНК-зонды по процедуре, описанной в наших работах [30–33, 37, 38]. Поверхность НП-чипа предварительно силанизировали в парах 3-аминопропилтриэтоксисилана для обеспечения иммобилизации оДНК-зондов и затем непосредственно иммобилизовали оДНК-зонды на силанизированной поверхности отдельных чувствительных элементов НП-чипа. Эффективность процедур силанизации поверхности НП-чипа и иммобилизации оДНК-зондов на этой поверхности контролировали по сдвигу вольт-амперных характеристик (ВАХ) НП [30–33, 37, 38].

Типичные кривые ВАХ, полученные в экспериментах, приведены на рис. 2: мы наблюдали смещение ВАХ в сторону более высоких значений напряжения на затворе ($V_{гр}$) как после силанизации НП-чипа, так и после иммобилизации оДНК-зондов на поверхности НП (между его контактами). Данный факт подтверждает эффективность иммобилизации оДНК-зондов и позволяет использовать НП-чип в экспериментах по детекции целевых кольцРНК.

Иммобилизованные на поверхности чувствительных элементов НП-чипа оДНК-зонды были приобретены в ЗАО «Евроген» (Москва, Россия). Характеристики оДНК-зондов (их нуклеотидные последовательности и комплементарные им целевые кольцРНК), иммобилизованных на поверхности НП и обозначенных как probe_1 (зонд_1), probe_2 (зонд_2), probe_3 (зонд_3), приведены в табл. 2. Для обеспечения иммобилизации на поверхность НП оДНК-зонды имели на 5'-конце дополнительно введенную аминогруппу [30–33, 37, 38].

Определение нижнего концентрационного предела обнаружения целевых кольцевых РНК при помощи модельных олигонуклеотидов ДНК
В экспериментах по определению предела обнаружения целевых кольцРНК мы использовали их аналоги – синтетические модельные оДНК, нуклеотидные последовательности которых комплементарны как оДНК-зондам, так и целевым кольцРНК, ассоциированным с развитием КРР.

**Таблица 2.** Нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных ДНК-зондов, ковалентно иммобилизованных на поверхности чипов с нанопроводами

| Наименование оДНК-зонда | Нуклеотидная последовательность оДНК-зонда | Комплементарная целевая кольцРНК |
|-------------------------|--|----------------------------------|
| probe_1 | (NH ₂)-TTTTTTTTTAGGACTCCCATG | hsa_circ_0031263 [16] |
| probe_2 | (NH ₂)-TTTTTTTTTAAAGCCATTCC | hsa_circ_0072715 [16] |
| probe_3 | (NH ₂)-TTTTTTTTGTAGCTGCACCCA | hsa_circ_0136666 [16] |

ДНК-зонд – фрагмент ДНК, комплементарный участкам целевых биомолекул; кольцРНК – кольцевая РНК; оДНК – олигонуклеотид ДНК

Последовательности модельных оДНК, определенные при помощи ресурса circBank (<http://www.circbank.cn/>), приведены в табл. 3.

Для того чтобы установить минимальную концентрацию, необходимую для обнаружения целевых биомолекул, проводили измерения с использованием НП-чипа с иммобилизованными оДНК-зондами с применением модельных оДНК, аналогичных выбранным участкам целевых кольцРНК: регистрировали изменение сигнала, полученного от чувствительных элементов НП-чипа, в зависимости от времени. Измерения проводили в 1 мМ калий-фосфатном буферном растворе (КФБ, pH = 7,4) аналогично описанной ранее методике, при постоянном напряжении на затворе $V_g = 35$ В и напряжении между контактами НП (сток – исток) $V_{ds} = 0,1$ В [30–33, 37, 38]. В экспериментах 150 мкл 1 мМ КФБ, содержащего фиксированную концентрацию (10^{-17} , 10^{-16} , 10^{-15} или 10^{-14} М) модельного оДНК, добавляли в измерительную ячейку, которая была установлена на НП-чипе и содержала 300 мкл 1 мМ КФБ. Первыми выполняли измерения с использованием раствора, содержащего наименьшую концентрацию модельного оДНК (10^{-17} М). После добавления раствора модельного оДНК и измерения сигнала, полученного от чувствительных элементов НП-чипа, в течение 10 мин

раствор, содержащий оДНК, откачивали из измерительной ячейки и добавляли в нее чистый 1 мМ КФБ, в конце промывали ячейку и НП-чип 50 мл горячей (90 °С) деионизированной воды. После этого повторяли весь цикл, проводя аналогичные измерения с использованием раствора модельного оДНК с более высокой концентрацией: 10^{-16} (10^{-15} и 10^{-14}) М.

Детекция целевых кольцевых РНК в плазме крови пациентов с колоректальным раком

С целью исследования применимости НП-чипов с иммобилизованными оДНК для детекции целевых кольцРНК hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1 и hsa_circ_0072715_CBC1 в плазме крови проводили измерения с использованием НП-чипа с иммобилизованными оДНК-зондами и образцов РНК, выделенных из плазмы крови больных КРР либо пациентов без онкологических заболеваний (контрольные образцы). В этих экспериментах также регистрировали изменение сигнала, полученного от чувствительных элементов НП-чипа, в зависимости от времени. Измерения проводили в 1 мМ КФБ (pH = 7,4). В этих экспериментах 7 мкл 1 мМ КФБ, содержащего суммарную РНК, выделенную из исследуемого образца плазмы крови, добавляли в измерительную ячейку, которая была

Таблица 3. Используемые модельные олигонуклеотиды ДНК с последовательностями, соответствующими целевым участкам кольцевой РНК и комплементарными оДНК-зонду

| Модельный оДНК | Последовательность модельного оДНК, комплементарная оДНК-зонду | кольцРНК, соответствующая модельному оДНК |
|----------------|--|---|
| cs_1 | CAATGGGGAAGTCCT | hsa_circ_0031263 [16] |
| cs_2 | GGAAATGGCTTTAA | hsa_circ_0072715 [16] |
| cs_3 | TGGGTGCAGACTAC | hsa_circ_0136666 [16] |

ДНК-зонд – фрагмент ДНК, комплементарный участкам целевых биомолекул; кольцРНК – кольцевая РНК; оДНК – короткий фрагмент (олигонуклеотид) молекулы ДНК

установлена на НП-чипе и содержала 100 мкл 1 mM КФБ. В холостых опытах для учета неспецифического сигнала использовали чистый буфер КФБ из протокола для выделения суммарной РНК, не содержащий нуклеиновых кислот.

Этическая экспертиза

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Института урологии и репродуктивного здоровья человека Сеченовского Университета (протокол № 10-19 от 17.07.2019). Каждый участник исследования дал письменное информированное согласие на использование своего биологического материала в экспериментах.

Результаты

Определение нижнего концентрационного предела обнаружения с использованием модельных олигонуклеотидов ДНК

На I этапе исследования определяли нижний концентрационный предел обнаружения целевых молекул нуклеиновых кислот при помощи НП-чипов с иммобилизованными оДНК, комплементарными целевым молекулам. На рис. 3 приведен пример типичных зависимостей сигнала (ΔI_{ds}), идущего от контактов чувствительных элементов НП-чипа с иммобилизованными оДНК-зондами, от времени, установленных в ходе экспериментов с синтетическими модельными оДНК, аналогичными выбранному участку кольцоРНК и комплементарными оДНК-зонду *probe_1* (в диапазоне концентраций модельной оДНК от 10^{-17} до 10^{-14} М).

Как видно на рис. 3, при добавлении растворов синтетических оДНК с концентрациями от 10^{-16} до 10^{-14} М сигнал от чувствительных элементов НП-чипа уменьшается (кривые идут вниз) и уровень сигнала, как и ожидалось, увеличивается по абсолютной величине (модулю). При этом с уменьшением концентрации модельного оДНК наблюдался меньший уровень сигнала. При концентрации модельного оДНК 10^{-17} М сигнал был сопоставим с уровнем контрольного сигнала. Можно сделать вывод о том, что концентрационный предел обнаружения целевых биомолекул (минимальная детектируемая их концентрация) составил 10^{-16} М.

Детекция кольцевых РНК в образцах суммарной РНК, выделенной из плазмы крови пациентов с колоректальным раком

На II этапе исследования изучали применимость НП-чипов с иммобилизованными оДНК для

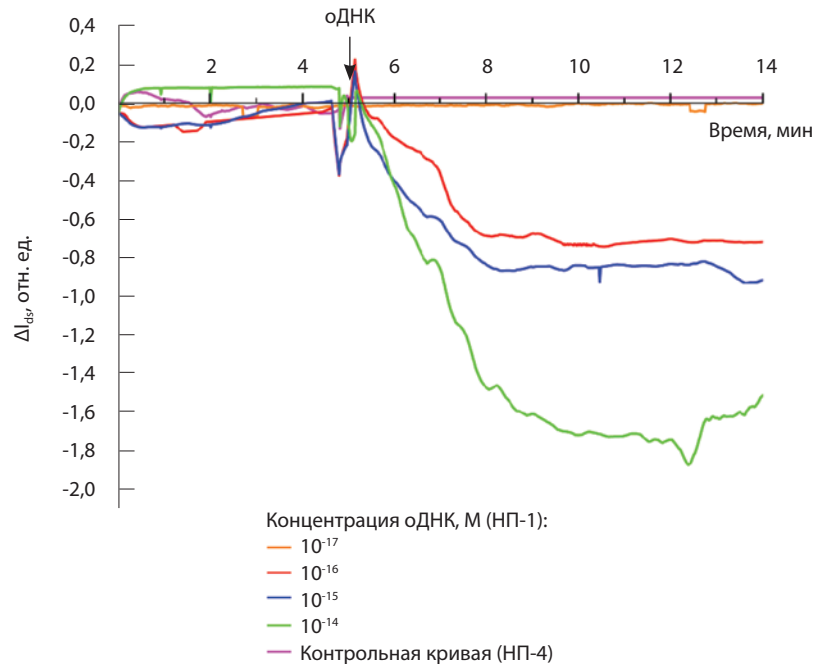


Рис. 3. Типичные зависимости сигнала (ΔI_{ds}) между контактами чувствительного элемента чипа (нанопровода, НП) с иммобилизованным ДНК-олигонуклеотидным зондом (оДНК-зондом) от времени, полученные в экспериментах с синтетическими модельными оДНК. Экспериментальные условия: концентрация модельной оДНК от 10^{-17} до 10^{-14} М; оДНК-зонд *probe_1*, комплементарный кольцевой РНК *hsa_circ_0031263*; 1 mM калий-фосфатный буферный раствор (рН = 7,4); напряжение на затворе $V_g = 35$ В; напряжение между контактами НП $V_{ds} = 0,1$ В; объем раствора в ячейке 450 мкл. Стрелкой отмечен момент добавления раствора модельной оДНК

детекции целевых кольцевых РНК в образцах РНК, выделенных из плазмы крови больных КРР. В качестве контрольных использовали образцы РНК, выделенные из плазмы крови пациентов без онкопатологии. На рис. 4А отображены типичные зависимости сигнала, идущего от чувствительных элементов НП-чипа, от времени, которые были установлены при исследовании образцов суммарной РНК, выделенной из образца № K193 плазмы крови больного КРР. Для сравнения на рис. 4Б показаны зависимости, установленные при исследовании суммарной РНК, выделенной из образца плазмы крови условно здорового пациента.

Как видно на рис. 4А, при добавлении образца, содержащего пул исследуемых кольцевых РНК, выделенных из плазмы крови больного КРР, наблюдалось значительное увеличение абсолютной величины уровня сигнала от НП с иммобилизованными оДНК-зондами, что свидетельствует о присутствии в исследуемом образце целевых кольцевых РНК. Напротив, при исследовании контрольного

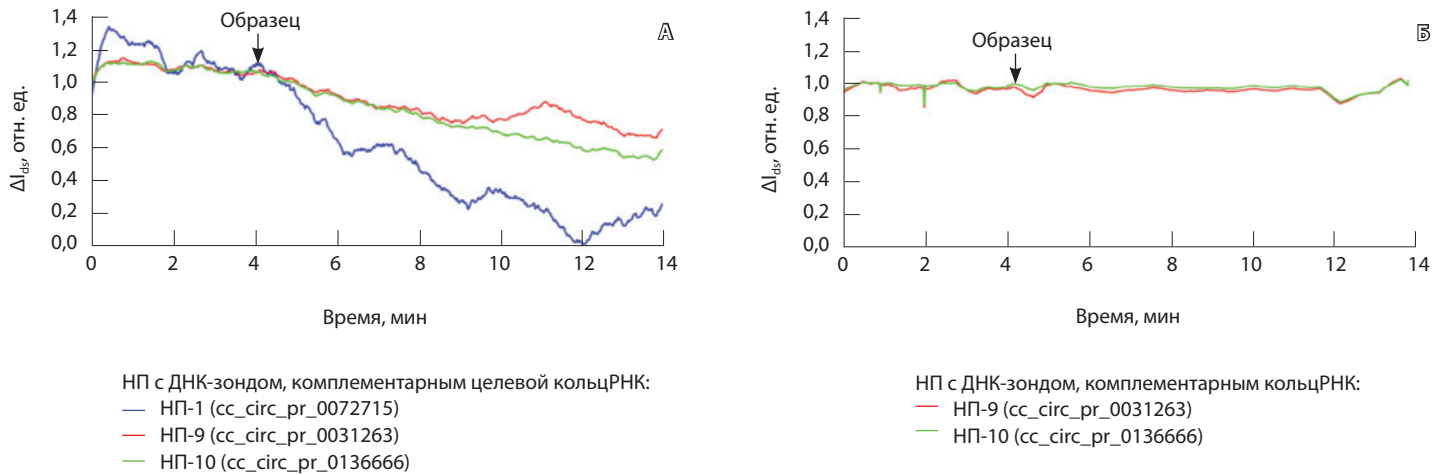


Рис. 4. Типичные зависимости сигнала (ΔI_{490}) между контактами чувствительных элементов нанопроводного (НП) чипа с иммобилизованными ДНК-олигонуклеотидными зондами (оДНК-зондами) от времени, полученные с помощью НП-чипа в экспериментах по обнаружению комплементарных кольцевых РНК (кольцРНК), выделенных из плазмы крови: **А** – пациента с колоректальным раком (образец № К193); **Б** – пациента без онкопатологии (контрольный образец № 26р). Экспериментальные условия: НП с иммобилизованными оДНК-зондами probe_1, probe_2, probe_3, комплементарными кольцевым РНК hsa_circ_0031263, hsa_circ_0072715, hsa_circ_0136666 соответственно; 1 мМ калий-фосфатный буферный раствор (рН = 7,4); напряжение на затворе $V_g = 35$ В; напряжение между контактами нанопровода $V_{ds} = 0,1$ В. Стрелкой отмечен момент добавления исследуемого образца кольцРНК

образца, содержащего РНК, выделенную из плазмы крови пациента без онкологических заболеваний, сигнал от НП изменялся весьма незначительно (см. рис. 4Б). Этот факт свидетельствует об отсутствии в исследуемом образце целевых кольцРНК в детектируемых концентрациях (выше 10^{-17} М).

Обсуждение

В настоящей работе при помощи НП-чипов с иммобилизованными оДНК-зондами был определен нижний концентрационный предел обнаружения кольцРНК hsa_circ_0136666_CVC1, hsa_circ_0031263_CVC1 и hsa_circ_0072715_CVC1, ассоциированных с развитием КРР: он составил 10^{-16} М. Экспериментально продемонстрирована применимость этих НП-чипов для неинвазивной детекции трех указанных кольцРНК в образцах суммарной РНК, выделенных из плазмы крови пациентов с КРР.

В исследовании использовались НП-чипы, на поверхности чувствительных элементов которых были иммобилизованы оДНК-зонды, комплементарные целевым кольцРНК – hsa_circ_0136666_CVC1, hsa_circ_0031263_CVC1 и hsa_circ_0072715_CVC1. Известно, что эти кольцРНК экспрессируются в тканях, циркулируют в крови и их уровень повышен при КРР [16].

Наше исследование включало два основных этапа. На I этапе были выполнены эксперименты

по детекции синтетических модельных оДНК, нуклеотидная последовательность которых была аналогична кольцРНК, ассоциированным с КРР. Опыты проводились с целью определения нижнего концентрационного предела их обнаружения с помощью НП-чипов. Минимальная детектируемая концентрация модельных оДНК, при которых наблюдался четко различимый сигнал от нанопроводов, составила 10^{-16} М. С учетом того что уровень целевых кольцРНК повышается при КРР [16], полученный результат свидетельствует о принципиальной возможности использования НП-чипов с иммобилизованными оДНК-зондами для диагностики КРР на ранних стадиях. Так, D.M. Rissin и соавт. [39] подчеркивают, что выявление биомолекул – маркеров онкологических заболеваний с концентрационным пределом обнаружения ниже 10^{-15} М – принципиально важное направление развития методов диагностики онкологических заболеваний на ранних стадиях.

Задачей II этапа исследования была демонстрация возможности обнаружения кольцРНК в образцах суммарной РНК, выделенных из плазмы крови пациентов с диагнозом КРР. Экспериментально было показано, что использование НП-чипов с иммобилизованными оДНК-зондами позволяет регистрировать присутствие молекул кольцРНК, ассоциированных с КРР, в образцах суммарной



РНК, выделенных из плазмы крови пациентов с диагнозом КРР. При исследовании образцов, содержащих кольцРНК, выделенных из плазмы крови больных КРР (см. табл. 1), наблюдался рост сигнала от чувствительных элементов НП-чипа. В случае контрольных РНК (от пациентов без онкопатологии) изменение уровня сигнала от НП было незначительным, что свидетельствует об отсутствии детектируемых концентраций целевых кольцРНК. Важно отметить, что целевые кольцРНК были обнаружены в образцах от больных КРР I стадии (см. табл. 1), что подтверждает принципиальную возможность использования НП-чипов с иммобилизованными оДНК-зондами для ранней диагностики КРР.

Ограничения исследования

К ограничениям настоящего исследования следует отнести лимитированную панель кольцРНК, уровень которых в плазме крови повышен при КРР [16]. Необходимо отметить, что при проведении медикаментозной терапии присутствие лекарственных веществ в крови пациентов может оказывать влияние на результаты детекции с помощью НП-чипов. Этот аспект должен быть изучен дополнительно. Среди ограничений метода детекции молекул РНК с использованием НП-чипов следует также назвать наличие верхнего концентрационного предела обнаружения молекул кольцРНК на уровне 10^{-13} М [31].

Дополнительная информация

Финансирование

Биосенсорные измерения на нанопроводном детекторе выполнены в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100168-2). Работа по подготовке биосенсорных чипов к анализу выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Государственное задание № 075-00270-24-00).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Ю.Д. Иванов – концепция и дизайн исследования и статьи, разработка метода детекции кольцРНК с помощью НП-чипов, анализ полученных данных, редактирование текста, утверждение итогового варианта рукописи; Е.Д. Невердова и А.В. Виноградова – сбор и обработка материала, анализ полученных данных, написание текста; К.В. Голдаева и А.Ф. Козлов – анализ полученных данных, написание текста; Т.О. Плешакова – концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста; Р.А. Галиуллин – дизайн экспериментальной части исследования, написание текста; А.Н. Аблеев – анализ и интерпретация полученных данных, написание текста;

Заключение

Ассоциируемые с КРР кольцРНК – hsa_circ_0031263, hsa_circ_0072715 и hsa_circ_0136666 – были выделены из плазмы крови пациентов с установленным диагнозом КРР и определены с помощью НП-чипов. На поверхности чувствительных элементов НП-чипов были иммобилизованы оДНК-зонды, комплементарные выбранным целевым молекулам кольцРНК. В экспериментах по детекции синтетических модельных оДНК – аналогов целевых кольцРНК – показано, что использование НП-чипов позволяет обнаруживать целевые молекулы в буферном растворе при их концентрациях вплоть до нижнего концентрационного предела обнаружения – 10^{-16} М. При регистрации целевых кольцРНК было показано, что НП-чипы позволяют регистрировать присутствие этих кольцРНК в образцах суммарной РНК, выделенной из плазмы крови пациентов с установленным диагнозом КРР; при этом в образцах, выделенных из плазмы крови пациентов без онкологических заболеваний, сигналы НП-чипов отсутствовали.

Полученные результаты подтверждают, что благодаря высокой чувствительности НП-чипы могут использоваться в диагностических устройствах для задач скрининга онкологических заболеваний, а также применяться в диагностике КРР для неинвазивной детекции маркерных кольцРНК в плазме крови. ☞

И.Д. Шумов – анализ и интерпретация полученных данных, работа с графическим материалом, написание и редактирование текста; В.П. Попов – дизайн экспериментальной части исследования, разработка метода детекции кольцРНК с помощью НП-чипов, анализ полученных данных, написание текста; Н.Е. Кушлинский – дизайн клинической части исследования, сбор и анализ клинического материала, редактирование текста, утверждение итогового варианта рукописи; И.С. Стилиди, З.З. Мамедли, Д.В. Еникеев – дизайн клинической части исследования, интерпретация результатов, финальное редактирование текста; Н.В. Потолдыкова – сбор и анализ клинического материала, лечение больных, финальное редактирование текста; В.А. Конев и О.Б. Ковалев – анализ клинико-экспериментальных данных, написание и редактирование текста; В.С. Зиборов – дизайн экспериментальной части исследования, написание текста; Л.И. Гришин – анализ экспериментальных данных, написание и редактирование текста; А.Ю. Долгобородов и О.Ф. Петров – физико-математический анализ полученных данных, написание текста; А.И. Арчаков – концепция и дизайн исследования, разработка метода детекции кольцРНК с помощью НП-чипов, сбор и обработка материала, анализ полученных данных, написание текста, утверждение итогового варианта 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

- Murphy CC, Zaki TA. Changing epidemiology of colorectal cancer – birth cohort effects and emerging risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2024;21(1):25–34. doi: 10.1038/s41575-023-00841-9.
- Гончаров СВ, Боженко ВК, Захаренко МВ, Киселева ЮЮ, 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.
- Goncharov SV, Bozhenko VK, Zakharenko MV, Kiseleva YY, Chaptykov AA, Kulnich 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. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2023-51-046.
- Li N, Lu B, Luo C, Cai J, Lu M, Zhang Y, Chen H, Dai M. Incidence, mortality, survival, risk factor and screening of colorectal cancer: A comparison among China, Europe, and Northern America. *Cancer Lett*. 2021;522:255–268. doi: 10.1016/j.canlet.2021.09.034.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
- Yang Y, Gao Z, Huang A, Shi J, Sun Z, Hong H, Gu J. Epidemiology and early screening strategies for colorectal cancer in China. *Chin J Cancer Res*. 2023;35(6):606–617. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2023.06.05.
- Шульпекова ЮО. Качественная подготовка к колоноскопии – залог точной диагностики. *Медицинский совет*. 2017;15:82–88. doi: 10.21518/2079-701X-2017-15-82-88.
- Shulpekova YO. [High quality preparation to colonoscopy is a key to exact diagnostics]. *Medical Council*. 2017;15:82–88. Russian. doi: 10.21518/2079-701X-2017-15-82-88.
- Терещенко СГ, Великанов ЕВ, Лукина ЕМ, Титаева АА, Мечева ЛВ. Клинический опыт применения медикаментозных препаратов при подготовке к колоноскопии. *Онкологическая колопроктология*. 2013;3:54–66.
- Tereshchenko SG, Velikanov EV, Lukina EM, Titaeva AA, Mecheva LV. [Clinical experience with different drugs for bowel preparation]. *Oncological coloproctology*. 2013;3:54–66. Russian.
- Бакулин ИГ, Жарков АВ, Журавлева МС, Серкова МЮ. Скрининг колоректального рака: состояние проблемы и перспективы. *Профилактическая медицина*. 2023;26(12):12–18. doi: 10.17116/profmed20232612112.
- Bakulin IG, Zharkov AV, Zhuravleva MS, Serkova MYu. [Colorectal cancer screening: current status and future prospects]. *Russian Journal of Preventive Medicine and Public Health*. 2023;26(12):12–18. Russian. doi: 10.17116/profmed20232612112.
- Долгих ТИ. Фекальный кальпротектин – неинвазивный биомаркер воспалительного процесса кишечника. *Поликлиника*. 2013;1(3):44–46.
- Dolgikh TI. [Fecal calprotectin is a non-invasive biomarker of inflammatory bowel disease]. *Polyclinic*. 2013;1(3):44–46. Russian.
- Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic – implementation issues and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(5):297–312. doi: 10.1038/s41571-020-00457-x.
- Федянин МЮ, Игнатова ЕО, Тюляндин СА. Роль микро-РНК при солидных опухолях. *Злокачественные опухоли*. 2013;1(5):3–14. doi: 10.18027/2224-5057-2013-1-3-14.
- Fedyanin MY, Ignatova EO, Tyulyandin SA. [The role of microRNAs in solid tumours]. *Malignant tumours*. 2013;1(5):3–14. Russian. doi: 10.18027/2224-5057-2013-1-3-14.
- Lu M. Circular RNA: functions, applications and prospects. *ExRNA*. 2020;2(1):1. doi: 10.1186/s41544-019-0046-5.
- Kristensen LS, Jakobsen T, Hager H, Kjems J. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(3):188–206. doi: 10.1038/s41571-021-00585-y.
- Chen L, Wang C, Sun H, Wang J, Liang Y, Wang Y, Wong G. The bioinformatics toolbox for circRNA discovery and analysis. *Brief Bioinform*. 2021;22(2):1706–1728. doi: 10.1093/bib/bbaa001.
- Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Sleivin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*. 2013;19(2):141–157. doi: 10.1261/rna.035667.112.
- Chen S, Zhang L, Su Y, Zhang X. Screening potential biomarkers for colorectal cancer based on circular RNA chips. *Oncol Rep*. 2018;39(6):2499–2512. doi: 10.3892/or.2018.6372.
- Miao S, Zhang Q. Circulating circRNA: a social butterfly in tumors. *Front Oncol*. 2023;13:1203696. doi: 10.3389/fonc.2023.1203696.
- Савельева АВ, Барякин ДН, Морозов ВВ, Кулигина ЕВ, Рихтер ВА, Семенов ДВ. Кольцевые РНК форменных элементов, плазмы и субфракций плазмы крови человека. *Биоорганическая химия*. 2017;43(2):115–125. doi: 10.1134/S1068162017020133.
- Savelyeva AV, Bariakin DN, Kuligina EV, Morozov VV, Richter VA, Semenov DV. Circular RNAs of human blood cells, plasma, and plasma subfractions. *Russ J Bioorg Chem*. 2017;43(2):115–125. doi: 10.1134/S1068162017020133.
- Guo JU, Agarwal V, Guo H, Bartel DP. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol*. 2014;15(7):409. doi: 10.1186/s13059-014-0409-z.
- Wang Y, Liu J, Ma J, Sun T, Zhou Q, Wang W, Wang G, Wu P, Wang H, Jiang L, Yuan W, Sun Z, Ming L. Exosomal circRNAs: biogenesis, effect and application in human diseases. *Mol Cancer*. 2019;18(1):116. doi: 10.1186/s12943-019-1041-z.
- Greene J, Baird AM, Brady L, Lim M, Gray SG, McDermott R, Finn SP. Circular RNAs: biogenesis, function and role in human diseases. *Front Mol Biosci*. 2017;4:38. doi: 10.3389/fmolb.2017.00038.
- Bachmayr-Heyda A, Reiner AT, Auer K, Sukhbaatar N, Aust S, Bachleitner-Hofmann T, Messteri I, Grunt TW, Zeillinger R, Pils D. Correlation of circular RNA abundance with proliferation – exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues. *Sci Rep*. 2015;5:8057. doi: 10.1038/srep08057.
- Dou Y, Cha DJ, Franklin JL, Higginbotham JN, Jeppesen DK, Weaver AM, Prasad N, Levy S, Coffey RJ, Patton JG, Zhang B. Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes. *Sci Rep*. 2016;6:37982. doi: 10.1038/srep37982.
- Long F, Lin Z, Li L, Ma M, Lu Z, Jing L, Li X, Lin C. Comprehensive landscape and future perspectives of circular RNAs in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2021;20(1):26. doi: 10.1186/s12943-021-01318-6.
- Guo JN, Li J, Zhu CL, Feng WT, Shao JX, Wan L, Huang MD, He JD. Comprehensive profile of differentially expressed circular RNAs reveals that hsa_circ_0000069 is upregulated and promotes cell proliferation, migration, and invasion in colorectal cancer. *Onco Targets Ther*. 2016;9:7451–7458. doi: 10.2147/OTT.S123220.
- Zhang XL, Xu LL, Wang F. Hsa_circ_0020397 regulates colorectal cancer cell viability, apoptosis and invasion by promoting the expression of the miR-138 targets TERT and PD-L1. *Cell Biol Int*. 2017;41(9):1056–1064. doi: 10.1002/cbin.10826.
- Doucey MA, Carrara S. Nanowire sensors in cancer. *Trends Biotechnol*. 2019;37(1):86–99. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.07.014.
- Yang S, Kim H, Lee KJ, Hwang SG, Lim EK, Jung J, Lee TJ, Park HS, Kang T, Kim B. Attomolar detection of extracellular microRNAs released from living prostate cancer cells by a plasmonic nanowire interstice sensor. *Nanoscale*. 2017;9(44):17387–17395. doi: 10.1039/c7nr04386d.
- Yasui T, Yanagida T, Ito S, Konakade Y, Takeshita D, Naganawa T, Nagashima K, Shimada T, Kaji N, Nakamura Y, Thiodorus IA, He Y, Rahong S, Kanai M, Yukawa H, Ochiya T, Kawai T, Baba Y. Unveiling massive numbers of cancer-related urinary-microRNA candidates via nanowires. *Sci Adv*. 2017;3(12):e1701133. doi: 10.1126/sciadv.1701133.
- Ivanov YD, Goldaeva KV, Malsagova KA, Pleshakova TO, Galiullin RA, Popov VP, Kushlinskii NE, Alferov AA, Enikeev DV, Potoldykova NV, Archaikov AI. Nanoribbon biosensor in the detection of miRNAs associated with colorectal cancer. *Micro-machines (Basel)*. 2021;12(12):1581. doi: 10.3390/mi12121581.
- Ivanov Y, Pleshakova T, Malsagova K, Kurbatov L, Popov V, Glukhov A, Smirnov A, Enikeev D, Potol-



dykova N, Alekseev B, Dolotkazhin D, Kaprin A, Ziborov V, Petrov O, Archakov A. Detection of marker miRNAs, associated with prostate cancer, in plasma using SOI-NW biosensor in direct and inversion modes. *Sensors (Basel)*. 2019;19(23):5248. doi: 10.3390/s19235248.

32. Malsagova KA, Popov VP, Kupriyanov IN, Pleshakova TO, Galiullin RA, Kozlov AF, Shumov ID, Larionov DI, Tikhonenko FV, Kapustina SI, Ziborov VS, Petrov OF, Gadzhieva OA, Bashiryana BA, Shimansky VN, Archakov AI, Ivanov YD.

Raman spectroscopy-based quality control of “Silicon-on-Insulator” nanowire chips for the detection of brain cancer-associated microRNA in plasma. *Sensors (Basel)*. 2021;21(4):1333. doi: 10.3390/s21041333.

33. Ivanov YD, Malsagova KA, Goldaeva KV, Kapustina SI, Pleshakova TO, Popov VP, Kozlov AF, Galiullin RA, Shumov ID, Enikeev DV, Potoldykova NV, Ziborov VS, Petrov OF, Dolgoborodov AY, Glukhov AV, Novikov SV, Grabezhova VK, Yushkov ES, Konev VA, Kovalev OB, Archakov AI. Na-

noribbon biosensor-based detection of microRNA markers of prostate cancer. *Sensors (Basel)*. 2023;23(17):7527. doi: 10.3390/s23177527.

34. Elfström N, Juhasz R, Sychugov I, Engfeldt T, Karlström AE, Linnros J. Surface charge sensitivity of silicon nanowires: size dependence. *Nano Lett*. 2007;7(9):2608–2612. doi: 10.1021/nl0709017.

35. Naumova OV, Fomin BI, Nasimov DA, Dudchenko NV, Devyatova SF, Zhanaev ED, Popov VP, Latyshev AV, Aseev AL, Ivanov YD, Archakov AI. SOI nanowires as sensors for charge detection.

Detection of colorectal cancer associated circular RNAs hsa_circ_0031263, hsa_circ_0072715, and hsa_circ_0136666 in plasma with nanowire chips

Y.D. Ivanov^{1,2} • E.D. Nevedrova¹ • A.V. Vinogradova¹ • K.V. Goldaeva¹ • T.O. Pleshakova¹ • R.A. Galiullin¹ • A.N. Ableev¹ • I.D. Shumov¹ • A.F. Kozlov¹ • V.P. Popov³ • N.E. Kushlinskii⁴ • I.S. Stilidi⁴ • Z.Z. Mamedli⁴ • D.V. Enikeev⁵ • N.V. Potoldykova⁵ • V.A. Konev⁶ • O.B. Kovalev⁶ • V.S. Ziborov^{1,2} • L.I. Grishin² • A.Y. Dolgoborodov² • O.F. Petrov² • A.I. Archakov¹

Rationale: Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent oncological diseases with high mortality. Invasive optical (endoscopic) colonoscopy has been recognized as a golden standard for the CRC diagnostics. A promising area is the development of non-invasive tools for CRC diagnosis with circular RNA (circRNA). One of the most sensitive non-invasive tools for detection of cancer RNA markers is considered to be the biosensor methods with the use of nanowire chips with oDNA probes (fragments of DNA oligonucleotides) immobilized on their surface. It has been previously shown that circRNA hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1, and hsa_circ_0072715_CBC1 are associated with CRC.

Aim: To determine the lower limit of concentration sensitivity of detection of CRC-associated circRNA with nanowire chips with immobilized oDNA probes, to demonstrate the usability of these chips for non-invasive detection of circRNA in plasma in the CRC diagnostics, and to establish the potential for the use of nanowire chips for the early CRC diagnosis.

Methods: To ensure biospecific binding of the circRNA hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1, and hsa_circ_0072715_CBC1 (the CRC markers), oDNA probes with the nucleotide sequences complementary to the target circRNA have been immobilized on the nanowire surface. At the study step 1, we detected the lower concentration limit for detection of the target molecules with the use

of their analogues, i.e. synthetic model oDNA with the nucleotide sequences complementary to oDNA probes. At the study step 2, we used the nanowire chips with immobilized oDNA probes to detect the circRNA in plasma of the patients with confirmed CRC. Plasma samples from non-cancer patients were used as controls.

Results: The lower concentration limit for the detection of DNA analogues of the circRNA hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1, and hsa_circ_0072715_CBC1 with nanowire chips with oDNA probes was 10^{-16} M. The analysis of total RNA isolated from plasma of the CRC patients showed a significant increase in the signal from the sensory elements of the nanowire chip. The analysis of plasma samples from the non-cancer patients, the nanowire signal changes were non-significant indicating the absence of detectable concentrations of the circRNA in plasma of the non-cancer patients.

Conclusion: We have identified the minimal detectable concentration of the circRNA hsa_circ_0136666_CBC1, hsa_circ_0031263_CBC1, and hsa_circ_0072715_CBC1, associated to the development of CRC, with nanowire chips with immobilized oDNA probes: it was 10^{-16} M. The experiment showed the usability of such nanowire chips for non-invasive detection of the given circRNA markers in total RNA samples isolated from plasma of CRC patients.

Key words: colorectal cancer (CRC), circular RNA, biosensory diagnostics, nanowire, DNA probe, human plasma

For citation: Ivanov YD, Nevedrova ED, Vinogradova AV, Goldaeva KV, Pleshakova TO, Galiullin RA, Ableev AN, Shumov ID, Kozlov AF, Popov VP, Kushlinskii NE, Stilidi IS, Mamedli ZZ, Enikeev DV, Potoldykova NV, Konev VA, Kovalev OB, Ziborov VS, Grishin LI, Dolgoborodov AY, Petrov OF, Archakov AI. Detection of colorectal cancer associated circular RNAs hsa_circ_0031263, hsa_circ_0072715, and hsa_circ_0136666 in plasma with nanowire chips. *Almanac of Clinical Medicine*. 2024;52(3):120–131. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-016.

Received 16 February 2024; revised 16 April 2024; accepted 24 June 2024; published online 8 August 2024

Funding

Biosensory measurements with a nanowire detector were performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2). The work on preparation of the biosensory chips for the analysis was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State Assignment No. 075-00270-24-00).

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests related to publication of this manuscript.



- Semicond Sci Technol. 2010;25:055004. doi: 10.1088/0268-1242/25/5/055004.
36. Ivanov YD, Pleshakova TO, Kozlov AF, Malsagova KA, Krohin NV, Shumyantseva VV, Shumov ID, Popov VP, Naumova OV, Fomin BI, Nasimov DA, Aseev AL, Archakov AI. SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBsAg and α -feto-protein. *Lab Chip*. 2012;12(23):5104–5111. doi: 10.1039/c2lc40555e.
37. Ivanov YD, Kapustina SI, Malsagova KA, Goldaeva KV, Pleshakova TO, Galiullin RA, Shumov ID, Ko-

- zlov AF, Glukhov AV, Grabezhova VK, Popov VP, Petrov OF, Ziborov VS, Kushlinskii NE, Alferov AA, Konev VA, Kovalev OB, Uchaikin VF, Archakov AI. "Silicon-on-Insulator"-based biosensor for the detection of microRNA markers of ovarian cancer. *Micromachines* (Basel). 2022;14(1):70. doi: 10.3390/mi14010070.
38. Ivanov YD, Malsagova KA, Goldaeva KV, Pleshakova TO, Shumov ID, Galiullin RA, Kapustina SI, Iourov IY, Vorsanova SG, Ryabtsev SV, Popov VP, Archakov AI. "Silicon-on-insulator"-based nano-

sensor for the revelation of microRNA markers of autism. *Genes* (Basel). 2022;13(2):199. doi: 10.3390/genes13020199.

39. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, Piech T, Patel PP, Chang L, Rivnak AJ, Ferrell EP, Randall JD, Provuncher GK, Walt DR, Duffy DC. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol*. 2010;28(6):595–599. doi: 10.1038/nbt.1641.

Yuri D. Ivanov – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Laboratory of Nanobiotechnology¹; Leading Research Fellow²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5041-1914>
✉ Ul. Pogodinskaya, 10–8, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: yurii.ivanov.nata@gmail.com

Ekaterina D. Nevedrova – Junior Research Fellow, Laboratory of Nanobiotechnology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2767-2299>. E-mail: nevedrova.kat@yandex.ru

Angelina V. Vinogradova – Junior Research Fellow, Laboratory of Nanobiotechnology¹; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6044-3490>. E-mail: angeluna1234@bk.ru

Kristina V. Goldaeva – Junior Research Fellow, World-Class Research Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4082-1247>. E-mail: goldaeva_1996@mail.ru

Tatyana O. Pleshakova – Doctor of Biol. Sci., Deputy Director¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3217-9095>. E-mail: topleshakova@yandex.ru

Rafael A. Galiullin – Leading Programmer, Laboratory for Research of Single Biomacromolecules¹. E-mail: rafael.anvarovich@gmail.com

Alexander N. Ableev – Leading Engineer, Laboratory of Nanobiotechnology¹. E-mail: ableev@mail.ru

Ivan D. Shumov – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Nanobiotechnology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9795-7065>. E-mail: shum230988@yandex.ru

Andrey F. Kozlov – Leading Engineer, Laboratory of Nanobiotechnology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2117-8743>. E-mail: afkozlow@mail.ru

Vladimir P. Popov – Doctor of Phys.-Math. Sci., Head of the Laboratory of Silicon Material Science³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7415-1405>. E-mail: popov@isp.nsc.ru

Nikolay E. Kushlinskii – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Scientific Director of the Clinical Diagnostic Laboratory, Consultative and Diagnostic Center⁴; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>. E-mail: biochimia@yandex.ru

Ivan S. Stilidi – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Director⁵; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>. E-mail: info@ronc.ru

Zaman Z. Mamedli – MD, PhD, Associate Professor, Head of the Department of Abdominal Oncology No. 3 (coloproctology)⁶; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9289-1247>. E-mail: z.z.mamedli@gmail.com

Dmitry V. Enikeev – MD, PhD, Professor, Urologist Surgeon, Institute for Urology and Reproductive Health⁵; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7169-2209>. E-mail: enikeev_dv@mail.ru

Natalia V. Potoldykova – MD, Urologist Surgeon, Institute for Urology and Reproductive Health⁵; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9947-9725>. E-mail: natalis8282@mail.ru

Vladimir A. Konev – MD, PhD, Associate Professor, Department of Infectious Diseases in Children, Faculty of Pediatrics⁶; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1566-1771>. E-mail: konev60@mail.ru

Oleg B. Kovalev – MD, PhD, Professor, Department of Infectious Diseases in Children, Faculty of Pediatrics⁶; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0273-6700>. E-mail: doctor87@list.ru

Vadim S. Ziborov – PhD (in Phys.-Math.), Senior Research Fellow, Laboratory of Shock-Wave Impacts²; Leading Specialist, Laboratory of Nanobiotechnology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7942-3337>. E-mail: ziborov.vs@yandex.ru

Leonid I. Grishin – Research Fellow, Laboratory of Shock-Wave Impacts². E-mail: lenya-grishin@mail.ru

Alexander Y. Dolgoborodov – Doctor of Phys.-Math. Sci., Head of the Laboratory of Shock-Wave Impacts²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7054-7341>. E-mail: aldol@ihed.ras.ru

Oleg F. Petrov – Doctor of Phys.-Math. Sci., Member of Russ. Acad. Sci., Director². E-mail: ofpetrov@ihed.ras.ru

Alexander I. Archakov – Doctor of Biol. Sci., Member of Russ. Acad. Sci., Professor, Scientific Leader¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2290-8090>. E-mail: alexander.archakov@ibmc.msk.ru

Authors' contributions

Y.D. Ivanov, the study and paper concept and design, the development of the assay to detect the circular RNA with nanowire chips, analysis of the results, text writing, approval of the final version of the manuscript; E.D. Nevedrova and A.V. Vinogradova, data collection and management, analysis of the results, text writing; K.V. Goldaeva and A.F. Kozlov, analysis of the results, text writing; T.O. Pleshakova, the study concept and design, analysis of the results, text writing; R.A. Galiullin, the experimental study design, text writing; A.N. Ableev, analysis and interpretation of the results, text writing; I.D. Shumov, analysis and interpretation of the results, preparation of graphics, text writing and editing; V.P. Popov, the experimental study design, development of the assay to detect the circular RNA with nanowire chips, analysis of the results, text writing; N.E. Kushlinskii, the clinical study design, clinical data collection and analysis, text editing, approval of the final version of the manuscript; I.S. Stilidi, Z.Z. Mamedli, D.V. Enikeev, the clinical study design, interpretation of the results, final text editing; Natalia V. Potoldykova, clinical data collection and analysis, treatment of patients, final text editing; V.A. Konev and O.B. Kovalev, analysis of clinical and experimental data, text writing and editing; V.S. Ziborov, the experimental study design, text writing; L.I. Grishin, analysis of the experimental data, text writing and editing; A.Y. Dolgoborodov and O.F. Petrov, physical and mathematical analysis of the results, text writing and editing; A.I. Archakov, the study concept and design, development of the assay to detect the circular RNA with nanowire chips, data collection and management, analysis of the results, text writing, approval of the final version of the manuscript. All the authors have read and approved the final version of the paper before submission, agreed to be responsible for all aspects of the study and ensure that they have properly considered and solved all issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

¹ Institute of Biomedical Chemistry; ul. Pogodinskaya 10–8, Moscow, 119121, Russian Federation

² Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences; ul. Izhor'skaya 13–2, Moscow, 125412, Russian Federation

³ RZhanov Institute of Semiconductor Physics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; pr. Akademika Lavrentjeva 13, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

⁴ N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115522, Russian Federation

⁵ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991, Russian Federation

⁶ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997, Russian Federation