

АЛЬМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

52 (3) • 2024

- Содержание растворимых форм галектинов -1, -3, -4, -7, -9 у больных почечно-клеточным раком различных морфологических типов
- Выявление активирующих соматических мутаций в гене *PIK3CA* в опухолях молочной железы и определение их минимального набора для клинико-диагностического тестирования
- Полиморфизм гена *LGALS1* не связан с содержанием галектина-1 в опухолевой ткани и крови у больных раком толстой кишки
- Сывороточные концентрации хромогранина А, серотонина и натрийуретического пептида снижены у больных нейроэндокринными опухолями с избыточной массой тела и ожирением в сравнении со здоровыми донорами
- Группа гиперметилированных генов длинных некодирующих РНК ассоциирована с разными типами метастазирования рака яичников
- Взаимосвязь показателей клинического анализа крови и стероидного метаболома мочи у больных с объемными образованиями надпочечников
- Детекция кольцевых РНК *hsa_circ_0031263*, *hsa_circ_0072715* и *hsa_circ_0136666*, ассоциированных с колоректальным раком, в плазме крови с помощью нанопроводных чипов
- Психические расстройства депрессивного и тревожного спектра при нейроэндокринных опухолях: распространенность, патогенез, клинические особенности

АЛЬМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал
Издается с 1998 г.
Периодичность – 8 выпусков в год
Учредитель – ГБУЗ МО «Московский
областной научно-исследовательский
клинический институт
им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ)

Том 52 • № 3 • 2024

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Глезер Мария Генриховна, д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Сеченовского университета (Москва, Россия)

Заместитель главного редактора

Какорина Екатерина Петровна, д-р мед. наук, профессор, заместитель директора ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского по науке и международным связям (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Алексеев Сергей Алексеевич, д-р мед. наук, профессор (Хабаровск, Россия)
Базарный Владимир Викторович, д-р мед. наук, профессор (Екатеринбург, Россия)

Белоусова Елена Александровна, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)
Богачев-Прокофьев Александр Владимирович, д-р мед. наук (Новосибирск, Россия)

Васюк Юрий Александрович, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)
Великанова Людмила Иосифовна, д-р биол. наук, профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Галстян Гагик Радикович, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)
Ганюков Владимир Иванович, д-р мед. наук (Кемерово, Россия)

Годков Михаил Андреевич, д-р мед. наук (Москва, Россия)
Голухова Елена Зеликовна, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Григорьев Евгений Валерьевич, д-р мед. наук, профессор, профессор РАН (Кемерово, Россия)

Гуляева Людмила Федоровна, д-р биол. наук, профессор (Новосибирск, Россия)

Давыдов Михаил Михайлович, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

Добрынина Лариса Анатольевна, д-р мед. наук (Москва, Россия)

Драпкина Оксана Михайловна, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Зыбина Наталья Николаевна, д-р биол. наук, профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Киров Михаил Юрьевич, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН (Архангельск, Россия)

Коков Леонид Сергеевич, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Котов Алексей Сергеевич, д-р мед. наук, доцент (Москва, Россия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Литвиненко Игорь Вячеславович, д-р мед. наук, профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Лобзин Юрий Владимирович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Санкт-Петербург, Россия)

Львов Андрей Николаевич, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Мельниченко Галина Афанасьевна, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Ответственный редактор

Парпара Олеся Анатольевна (Москва, Россия)

Молочков Антон Владимирович, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Наймарк Олег Борисович, д-р физ.-мат. наук, профессор (Пермь, Россия)

Неров Владимир Владимирович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Овезов Алексей Мурадович, д-р мед. наук (Москва, Россия)

Пономаренко Геннадий Николаевич, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН (Санкт-Петербург, Россия)

Потекаев Николай Николаевич, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Проваторов Сергей Ильич, д-р мед. наук (Москва, Россия)

Пронин Игорь Николаевич, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Романко Юрий Сергеевич, д-р мед. наук (Москва, Россия)

Синицын Валентин Евгеньевич, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Ситкин Станислав Игоревич, канд. мед. наук, д-р медицины Латвийской Республики (Санкт-Петербург, Россия)

Стилиди Иван Сократович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Трофимова Татьяна Николаевна, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН (Санкт-Петербург, Россия)

Шишацкая Екатерина Игоревна, д-р биол. наук, канд. мед. наук, профессор РАН (Красноярск, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Баркан Ариель, д-р мед. наук, профессор (Энн-Арбор, США)

Брагин Анатолий Григорьевич, д-р биол. наук (Лос-Анджелес, США)

Бухфельдер Михаэль, д-р мед. наук, профессор (Эрланген, Германия)

Густина Андреа, д-р мед. наук, профессор, президент Европейского общества эндокринологов (Милан, Италия)

Де Херт Стефан, д-р мед. наук, профессор, председатель научного комплекса Европейского общества анестезиологии (Гент, Бельгия)

Литвинов Рустем Игоревич, д-р мед. наук, профессор (Филадельфия, США)

Майр Йоханнес, д-р мед. наук, профессор (Базель, Швейцария)

Мурешану Дафин Ф., д-р мед. наук, профессор (Клуж-Напока, Румыния)

Палеев Николай Романович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Райниш Уолтер, д-р мед. наук (Вена, Австрия)

Ян Чи, д-р мед. наук, профессор (Шанхай, Китай)

Содержание

Юбилей

К 70-летию академика РАН, профессора
Николая Евгеньевича Кушлинского 105

Оригинальные статьи

Кушлинский Н.Е., Ковалева О.В., Басов А.Г.,
Кузьмин Ю.Б., Алферов А.А., Бежанова С.Д.,
Колтащиков А.В., Климанов И.А., Грачев А.Н.,
Зыбина Н.Н., Матвеев В.Б., Янушевич О.О.,
Стилиди И.С.

Содержание растворимых форм галектинов
-1, -3, -4, -7, -9 у больных почечно-клеточным
раком различных морфологических типов 107

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

Детекция кольцевых РНК *hsa_circ_0031263*,
hsa_circ_0072715 и *hsa_circ_0136666*,
ассоциированных с колоректальным раком,
в плазме крови с помощью нанопроводных
чипов 120

Боярских У.А., Кечин А.А., Зюзюкина А.В., Храпов Е.А.,
Оскорбин И.П., Алексеенко Е.А., Авдюк Г.А.,
Зуков Р.А., Кушлинский Н.Е., Филипенко М.Л.

Выявление активирующих соматических мутаций
в гене *PIK3CA* в опухолях молочной железы
и определение их минимального набора для
клинико-диагностического тестирования 132

Ворохобина Н.В., Калугина В.В., Великанова Л.И.,
Шафигуллина З.Р., Малеваная Е.В., Лисицын А.А.

Взаимосвязь показателей клинического анализа
крови и стероидного метаболизма мочи у больных
с объемными образованиями надпочечников 140

Бурдённый А.М., Лукина С.С., Филиппова Е.А.,
Иванова Н.А., Пронина И.В., Логинов В.И.,
Казубская Т.П., Кушлинский Д.Н., Цекатунов Д.А.,
Жордания К.И., Брага Э.А.

Группа гиперметилированных генов длинных
некодирующих РНК ассоциирована с разными
типами метастазирования рака яичников 149

Тимофеев Ю.С., Любимова Н.В., Драпкина О.М.

Сывороточные концентрации хромогранина А,
серотонина и натрийуретического пептида
снижены у больных нейроэндокринными
опухолями с избыточной массой тела и ожирением
в сравнении со здоровыми донорами 162

Уразова О.И., Рейнгардт Г.В., Колобовникова Ю.В.,
Курносенко А.В., Полетика В.С., Васильева О.А.,
Августиневич А.В.

Полиморфизм гена *LGALS1* не связан
с содержанием галектина-1 в опухолевой ткани
и крови у больных раком толстой кишки 170

Обзор

Коляго О.О., Мунирова А.А., Иванов С.В., Стилиди И.С.

Психические расстройства депрессивного
и тревожного спектра при нейроэндокринных
опухолях: распространенность, патогенез,
клинические особенности 178

Журнал индексируется в Scopus
(<https://www.scopus.com/sourceid/21101158852>),
входит в Russian Science Citation Index (RSCI)

© 2024 ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского
www.monikiweb.ru

ISSN 2072-0505 (print)
ISSN 2587-9294 (online)

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе
по надзору в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.
Свидетельство ПИ № ФС77-34730 от 23.12.2008.

«Альманах клинической медицины» входит
в перечень рецензируемых научных изданий,
в которых должны быть опубликованы основные
научные результаты диссертаций на соискание
ученой степени кандидата наук, на соискание
ученой степени доктора наук, Категория 1
(Перечень ВАК, К1).

Шифры научных специальностей:

3.1.18. Внутренние болезни (медицинские науки)

3.1.19. Эндокринология (медицинские науки)

3.1.20. Кардиология (медицинские науки)

3.1.24. Неврология (медицинские науки)

3.1.6. Онкология, лучевая терапия
(медицинские науки)

3.1.23. Дерматовенерология (медицинские науки)

3.1.25. Лучевая диагностика (медицинские науки)

3.1.30. Гастроэнтерология и диетология
(медицинские науки)

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика
(биологические науки, медицинские науки)

Редакция не несет ответственности за содержа-
ние рекламных публикаций.

Статьи, опубликованные в журнале «Альманах
клинической медицины», распространяются
по Лицензии «С указанием авторства –
некоммерческая» – Creative Commons
Attribution-NonCommercial 4.0 International
(CC BY-NC 4.0). Пользователи вправе
читать, скачивать, копировать, делиться
(распространять на любом носителе и в любом
формате) и адаптировать материалы статьи
(перерабатывать, видоизменять, создавать новые
произведения) при соблюдении следующих
условий: оформление ссылки на оригинальную
публикацию в журнале «Альманах клинической
медицины», указание на внесение изменений
(в случае адаптации), использование
исключительно в некоммерческих целях.
По вопросам репринтов и коммерческого
использования просьба обращаться в редакцию.

Адрес редакции:

129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2, корп. 8
Тел.: +7 (495) 688 32 41
E-mail: o.pargara@monikiweb.ru
www.almclinmed.ru

ALMANAC OF CLINICAL MEDICINE

The scientific and practical journal

Published since 1998

Founded and published by Moscow Regional
Research and Clinical Institute (MONIKI),
Moscow, Russian Federation

Publication frequency: 8 issues per year

Volume 52 • Number 3 • 2024

EDITOR-IN-CHIEF

Maria G. Glezer, MD, PhD, Professor, Chair of Cardiology, Functional and Ultrasonic Diagnostics, Institute of Clinical Medicine named after N.V. Sklifosovskiy, Sechenov University (Moscow, Russia)

Deputy Chief Editor

Ekaterina P. Kakorina, MD, PhD, Professor, Deputy Director on Science and International Communications, MONIKI (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Sergei A. Alekseenko, MD, PhD (Khabarovsk, Russia)

Vladimir V. Bazarnyi, MD, PhD, Professor (Yekaterinburg, Russia)

Elena A. Belousova, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Alexandr V. Bogachev-Prokophiev, MD, PhD (Novosibirsk, Russia)

Mikhail M. Davydov, MD, PhD, Professor, Corr. Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Larisa A. Dobrynina, MD, PhD (Moscow, Russia)

Oksana M. Drapkina, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Gagik R. Galstyan, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Vladimir I. Ganyukov, MD, PhD (Kemerovo, Russian)

Mikhail A. Godkov, MD, PhD (Moscow, Russia)

Elena Z. Golukhova, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Evgeny V. Grigoryev, MD, PhD, Professor, Professor of Russ. Acad. Sci. (Kemerovo, Russia)

Lyudmila F. Gulyaeva, Doctor of Biol. Sci., Professor (Novosibirsk, Russia)

Mikhail Yu. Kirov, MD, PhD, Professor, Corr. Member of Russ. Acad. Sci. (Arkhangelsk, Russia)

Leonid S. Kokov, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Alexey S. Kotov, MD, PhD, Associate Professor (Moscow, Russia)

Nikolay E. Kushlinskii, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Igor V. Litvinenko, MD, PhD, Professor (Saint Petersburg, Russia)

Yurii V. Lobzin, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Saint Petersburg, Russia)

Andrey N. Lvov, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Galina A. Mel'nichenko, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Anton V. Molochkov, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Oleg B. Naimark, ScD in Phys.-Math., Professor (Perm, Russia)

Vladimir V. Neroev, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Alexey M. Ovezov, MD, PhD (Moscow, Russia)

Managing Editor

Olesya A. Parpara (Moscow, Russia)

Gennadiy N. Ponomarenko, MD, PhD, Professor, Corr. Member of Russ. Acad. Sci. (Saint Petersburg, Russia)

Nikolay N. Potekaev, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Igor N. Pronin, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Sergei I. Provatorov, MD, PhD (Moscow, Russia)

Yury S. Romanko, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Ekaterina I. Shishatskaya, ScD in Biology, PhD, Professor of Russ. Acad. Sci. (Krasnoyarsk, Russia)

Valentin E. Sinitsyn, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Stanislav I. Sitkin, Dr. med., PhD (Saint Petersburg, Russia)

Ivan S. Stilidi, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Tatyana N. Trofimova, MD, PhD, Professor, Corr. Member of Russ. Acad. Sci. (Saint Petersburg, Russia)

Yury A. Vasyuk, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Ludmila I. Velikanova, Doctor of Biol. Sci., Professor (Saint Petersburg, Russia)

Natalia N. Zybina, Doctor of Biol. Sci., Professor (Saint Petersburg, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Ariel L. Barkan, MD, Professor of Medicine, Professor of Neurosurgery (Ann Arbor, USA)

Anatol J. Bragin, PhD (Los Angeles, USA)

Michael Buchfelder, MD, PhD, Professor (Erlangen, Germany)

Stefan De Hert, MD, PHD, Professor, Chair of ESA Scientific Committee, Professor of Department of Anaesthesiology and Perioperative Medicine (Gent, Belgium)

Andrea Giustina, MD, Professor, President of European Society of Endocrinology, Professor of Endocrinology (Milan, Italy)

Rustem I. Litvinov, MD, PhD, Professor (Philadelphia, USA)

Johannes Mayr, MD, Professor of Pediatric Surgery (Basel, Switzerland)

Dafin F. Muresanu, MD, PhD, MBA, FANA, Professor (Cluj-Napoca, Romania)

Nikolay R. Paleev, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Walter Reinisch, MD (Vienna, Austria)

Chi Yang, DDS, PhD, Professor (Shanghai, PRC)

Content

Jubilee	
On the 70th anniversary of Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor Nikolay E. Kushlinskii	105
Articles	
<i>N.E. Kushlinskii, O.V. Kovaleva, A.G. Basov, Yu.B. Kuzmin, A.A. Alferov, S.D. Bezhanova, A.V. Kolpashchikov, I.A. Klimanov, A.N. Grachev, N.N. Zybina, V.B. Matveev, O.O. Yanushevich, I.S. Stilidi</i>	
The content of soluble forms of galectins -1, -3, -4, -7, -9 in patients with renal cell cancer of various morphological types	107
<i>Y.D. Ivanov, E.D. Nevedrova, A.V. Vinogradova, K.V. Goldaeva, T.O. Pleshakova, R.A. Galiullin, A.N. Ableev, I.D. Shumov, A.F. Kozlov, V.P. Popov, N.E. Kushlinskii, I.S. Stilidi, Z.Z. Mamedli, D.V. Enikeev, N.V. Potoldykova, V.A. Konev, O.B. Kovalev, V.S. Ziborov, L.I. Grishin, A.Y. Dolgoborodov, O.F. Petrov, A.I. Archakov</i>	
Detection of colorectal cancer associated circular RNAs hsa_circ_0031263, hsa_circ_0072715, and hsa_circ_0136666 in plasma with nanowire chips	120
<i>U.A. Boyarskih, A.A. Kechin, A.V. Zyuzuyukina, E.A. Khrapov, I.P. Oskorbin, E.Yu. Alekseenok, G.A. Avdiyuk, R.A. Zukov, N.E. Kushlinskii, M.L. Filipenko</i>	
Identification of activating somatic mutations in the <i>PIK3CA</i> gene in breast tumors and determination of their minimal set for clinical diagnostic testing	132
<i>N.V. Vorokhobina, V.V. Kalugina, L.I. Velikanova, Z.R. Shafigullina, E.V. Malevanaya, A.A. Lisitsyn</i>	
Association between full blood count and urine steroid metabolome in patients with adrenal masses	140
<i>A.M. Burdenny, S.S. Lukina, E.A. Filippova, N.A. Ivanova, I.V. Pronina, V.I. Loginov, T.P. Kazubskaya, D.N. Kushlinskiy, D.A. Tsekatunov, K.I. Zhordania, E.A. Braga</i>	
The group of hypermethylated long noncoding RNA genes is associated with different types of metastasis in ovarian cancer	149
<i>Y.S. Timofeev, N.V. Lyubimova, O.M. Drapkina</i>	
Serum concentrations of chromogranin A, serotonin and natriuretic peptide are decreased in patients with neuroendocrine tumors with overweight and obesity compared to healthy donors	162
<i>O.I. Urazova, G.V. Reyngardt, Yu.V. Kolobovnikova, A.V. Kurnosenko, V.S. Poletika, O.A. Vasil'yeva, A.V. Avgustinovich</i>	
The <i>LGALS1</i> gene polymorphism is not associated with galectin-1 levels in tumor tissue and blood of colon cancer patients	170
Review Article	
<i>O.O. Kolyago, A.A. Munirova, S.V. Ivanov, I.S. Stilidi</i>	
Mental disorders of the depressive and anxiety spectrum in neuroendocrine tumors: prevalence, pathogenesis, clinical particulars	178

The Almanac of Clinical Medicine journal is indexed by **Scopus** (<https://www.scopus.com/sourceid/21101158852>), **Russian Science Citation Index (RSCI)**

© 2024 MONIKI
www.monikiweb.ru

ISSN 2072-0505 (print)
ISSN 2587-9294 (online)

The journal is registered by Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom, Information Technologies and Mass Communications. Registration certificate ПИ № ФС77-34730 was issued on December 23, 2008.

Since 2001 the Almanac of Clinical Medicine is included in the List of leading referred journals, recommended by VAK (Higher Attestation Committee) for publication of scientific results of dissertations for the degrees of doctors and candidates of sciences.

Editorial board and the editors are not responsible for claims made in the advertisements published in the journal.

“Almanac of Clinical Medicine” is an open access journal which means that everybody can read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of these articles in accordance with Creative Commons Attribution – NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

Editorial Office

Almanac of Clinical Medicine, MONIKI, 61/2–8 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 688 32 41
E-mail: o.papara@monikiweb.ru
www.almclinmed.ru



К 70-летию академика РАН, профессора Николая Евгеньевича Кушлинского



Настоящий выпуск журнала «Альманах клинической медицины» приурочен к 70-летию выдающегося биохимика-онколога, академика РАН, профессора, доктора медицинских наук Николая Евгеньевича Кушлинского. Будучи членом редколлегии на протяжении 15 лет, Николай Евгеньевич внес бесценный вклад в развитие журнала, его выход на национальный и международный уровни. А с учредителем журнала – Московским областным научно-исследовательским клиническим институтом им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ) – профессора Н.Е. Кушлинского как руководителя лаборатории клинической биохимии ФГБУ

«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) связывают 30 лет сотрудничества. Проблемы рака простаты, почечно-клеточного рака и рака щитовидной железы Н.Е. Кушлинский разрабатывал совместно с академиком РАМН Маргаритой Федоровной Трапезниковой (1929–2013), возглавлявшей урологическую клинику МОНИКИ; профессором Ириной Александровной Казанцевой (1938–2019), руководителем патологоанатомического отделения; профессором Львом Марковичем Портным (1926–2007), руководителем рентгенологического отдела института.

В НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Н.Е. Кушлинский пришел сразу после окончания лечебного факультета 1-го Московского медицинского института имени И.М. Сеченова – в клиническую ординатуру и аспирантуру, а затем (в 1982 г.) остался работать в лаборатории клинической биохимии. В 1982 г. Н.Е. Кушлинский защитил кандидатскую диссертацию «Исследование цитоплазматических рецепторов андрогенов и эстрогенов в злокачественных опухолях и нодулярной гиперплазии предстательной железы», в 1992 г. – докторскую диссертацию «Гормонально-метаболические

нарушения у больных первичными опухолями костей и возможные пути их коррекции». После успешной защиты докторской диссертации Н.Е. Кушлинский возглавил лабораторию клинической биохимии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, которой бессменно руководил более 30 лет. С 2023 г. академик Н.Е. Кушлинский – научный руководитель клиничко-диагностической лаборатории консультативно-диагностического центра НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

В 1994 г. Н.Е. Кушлинскому было присвоено ученое звание профессора по специальности «онкология». В 1999 г. он был избран членом-корреспондентом РАМН по специальности «биохимия», а в 2020 г. – действительным членом РАН по специальности «медицинская биохимия» в отделении медико-биологических проблем.

Основные научные исследования, проводимые под руководством академика Н.Е. Кушлинского, посвящены изучению опухолевых маркеров в диагностике злокачественных новообразований, роли гормонов, аутопаракринных факторов роста и их рецепторов, протеолитических ферментов, регуляторов межклеточных взаимодействий в механизмах роста, инвазии, метастазирования, апоптоза широкого спектра злокачественных опухолей человека. Приоритетными научными результатами лаборатории, возглавляемой Н.Е. Кушлинским, считаются разработка биохимического метода оценки гормоночувствительности рака молочной железы, яичников, эндометрия, простаты, выделение биологических фенотипов этих новообразований, что имеет определяющее значение при выборе эффективного лечения и оценке прогноза этих заболеваний.

Н.Е. Кушлинский одним из первых в Европе установил, что гиперэкспрессия рецепторов эпидермального фактора роста играет ключевую роль в регуляции процессов пролиферации, метастазирования и неблагоприятном прогнозе рака молочной железы, яичников, легкого, сарком костей, а эффективная терапия таких опухолей связана с использованием ингибиторов этого рецептора. Он убедительно доказал связь экспрессии опухоль-ассоциированных протеаз и их тканевых

ингибиторов с инвазивной и метастатической активностью опухолей, а также выделил группу молекулярно-биологических маркеров ангиогенеза (VEGF, его рецепторы VEGFR-1, VEGFR-2, sVEGFR-1, sVEGFR-2, эндостатин), значимых для выбора эффективной антиангиогенной противоопухолевой терапии.

Проведенные исследования позволили разработать и внедрить в клиническую онкологическую практику эффективные методы лабораторной диагностики и патогенетического лечения предопухолевых процессов слизистой полости рта, эндометрия, а также первичных сарком костей, рака молочной железы и простаты. Под руководством Н.Е. Кушлинского разработаны биохимические методы диагностики метастатического поражения костей, оценки чувствительности злокачественных новообразований к гормоно- и химиотерапии, а также критерии нефро-, нейро- и гепатотоксичности проводимой химиотерапии. В лаборатории академика Н.Е. Кушлинского создан первый в России референсный Центр биохимической диагностики нейроэндокринных опухолей.

Особый интерес Н.Е. Кушлинского на протяжении всей его научной карьеры вызывало изучение роли биохимических, гормональных и молекулярно-генетических факторов в развитии и прогрессировании первичных опухолей костей. В экспериментальных и клинических исследованиях он доказал роль андрогенов в патогенезе остеосаркомы и предложил метод антиандрогенной терапии опухоли, а также разработал биохимические критерии оценки чувствительности остеосаркомы к химиотерапии. Применение препаратов, назначенных с учетом этих критериев, в комплексе с хирургическими методами увеличило показатели 5-летней выживаемости больных с 12 до 70%.

Академик Н.Е. Кушлинский разработал биохимические методы дифференциальной диагностики морфологических вариантов сарком костей. Впервые в России провел анализ отдаленных наблюдений по результатам исследования рецепторов эстрогенов и андрогенов в саркомах костей, изучил каскад ферментов метаболизма андрогенов в этих новообразованиях и показал их связь с клиническим течением заболеваний. За эти разработки в 1999 г. в составе группы авторов Н.Е. Кушлинский стал лауреатом Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники.

В последние годы в круг интересов академика Н.Е. Кушлинского вошло исследование ключевых контрольных точек иммунитета (PD-1, PD-L1, B7-H3, CD314-1, ULPB, HLA-G), в первую очередь их растворимых форм, как предикторов эффективности лечения, прогноза и выживаемости пациентов с колоректальным раком, меланомой, раком почки, желудка, легкого, яичников, опухолями костей. Совместно с сотрудниками ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» он также активно изучает клиническую значимость аберрантного метилирования группы генов микроРНК (*MIR-124-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125B-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*) как предвестников нечувствительности к химиотерапии, раннего рецидива и генерализации процесса при раке яичников. Выделил гены, вовлеченные в апоптоз (*APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *RASSF1(A)*, *DAPK1*), связанные с агрессивным течением рака молочной железы.

Академиком Н.Е. Кушлинским опубликовано более 500 научных работ, среди них 8 монографий, посвященных опухолевым маркерам, эндогенным регуляторам роста, инвазии и метастазирования раковых клеток, биохимическим методам оценки чувствительности злокачественных новообразований к химио- и гормонотерапии. Н.Е. Кушлинский – ответственный секретарь редколлегии журнала «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», заместитель главного редактора журнала «Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии», член редколлегии журналов «Технологии живых систем», «Иммунология», «Успехи молекулярной онкологии», «Доклады Российской академии наук», «Молекулярная медицина», «Альманах клинической медицины».

Н.Е. Кушлинский ведет большую педагогическую работу, с 2003 г. возглавляет созданную им кафедру клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. Под его руководством создана школа биохимиков-онкологов, он подготовил 35 докторов и 96 кандидатов наук.

Особую сторону жизни Н.Е. Кушлинского составляет интерес к истории, музыке, литературе, живописи. На протяжении более 25 лет он входит в состав попечительского совета музея-заповедника А.П. Чехова «Мелихово», а в 2014 г. избран почетным членом Российской академии художеств.

Редакционная коллегия журнала «Альманах клинической медицины» поздравляет Николая Евгеньевича Кушлинского с юбилеем, желает ему крепкого здоровья, долгих и плодотворных лет жизни!



Оригинальная статья

Содержание растворимых форм галектинов -1, -3, -4, -7, -9 у больных почечно-клеточным раком различных морфологических типов

Кушлинский Н.Е.^{1,2} • Ковалева О.В.¹ • Басов А.Г.¹ • Кузьмин Ю.Б.^{1,2} • Алферов А.А.^{1,2} • Бежанова С.Д.¹ • Колпашиков А.В.² • Климанов И.А.¹ • Грачев А.Н.¹ • Зыбина Н.Н.³ • Матвеев В.Б.¹ • Янушевич О.О.² • Стилиди И.С.¹

Актуальность. Галектины представляют собой семейство β-галактозид-связывающих белков, которые регулируют подавляющее большинство клеточных функций, включая пролиферацию, миграцию, адгезию и фагоцитоз как в норме, так и при патологии. Все больше экспериментальных и клинических данных свидетельствуют о том, что галектины вовлечены в процесс канцерогенеза на многих его этапах, в том числе и у больных почечно-клеточным раком (ПКР).

Цель – анализ клинической значимости растворимых форм галектинов -1, -3, -4, -7, -9 у больных с различными гистологическими типами ПКР.

Материал и методы. Проведен ретроспективный анализ клинической значимости галектинов -1, -3, -4, -7, -9 в сыворотке крови у 140 пациентов с ПКР (84 – со светлоклеточным ПКР (скПКР); 38 – с папиллярным (папПКР); 18 – с хромофобным (хрПКР)) и у 73 здоровых доноров группы контроля, проходивших обследование и лечение в период с 2019 по 2023 г. в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Концентрацию галектинов определяли в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, с помощью иммуноферментного анализа.

Результаты. Выявлено статистически значимое повышение содержания галектинов -1, -3, -9 в сыворотке крови больных ПКР по сравнению со здоровыми донорами контрольной группы, для галектинов -4 и -7 такой зависимости не обнаружено. Отмечено статистически значимое

повышение содержания галектина-1 в сыворотке крови больных скПКР и папПКР по сравнению с контролем ($p = 0,0003$ и $0,0135$ соответственно). Не обнаружено ассоциации между сывороточным содержанием галектинов -1 и -7 с клинико-морфологическими характеристиками ПКР, однако содержание галектина-7 в сыворотке крови больных папПКР коррелировало со степенью дифференцировки опухоли ($r = -0,592$; $p = 0,001$). Для галектина-1 площадь под ROC-кривой (AUC) в случае скПКР равна $0,721$ ($p < 0,0001$), папПКР – $0,673$ ($p = 0,0086$) и хрПКР – $0,576$ ($p = 0,355$). Для галектина-7 AUC = $0,527$ ($p = 0,634$) в случае скПКР; $0,513$ ($p = 0,845$) – папПКР и $0,566$ ($p = 0,425$) – хрПКР. Статистически значимое повышение содержания галектина-3 в сыворотке крови больных по сравнению с контролем отмечено для всех гистологических типов ПКР (скПКР: $p = 0,0208$, папПКР: $p = 0,0014$, хрПКР: $p = 0,0041$). ROC-анализ для галектина-3 у больных ПКР различных гистологических типов показал: AUC = $0,721$ ($p < 0,0001$) для скПКР; $0,673$ ($p = 0,0086$) – папПКР и $0,576$ ($p = 0,355$) – хрПКР. Обнаружена прямая статистически значимая корреляция между концентрацией галектина-9 и размером опухоли, а также наличием регионарных метастазов ($r = 0,251$, $p = 0,021$; $r = 0,239$, $p = 0,028$ соответственно). Для галектина-4 AUC = $0,619$ ($p = 0,021$) в случае скПКР; $0,577$ ($p = 0,214$) – папПКР и $0,534$ ($p = 0,666$) – хрПКР; для галектина-9 AUC = $0,649$ ($p = 0,0075$); $0,613$ ($p = 0,087$) и $0,539$ ($p = 0,637$) соответственно.

Заключение. Проведенное исследование продемонстрировало определенную связь содержания галектинов -1, -3, -4, -7, -9 в сыворотке крови больных ПКР с различными гистологическими типами опухоли. Несмотря на то что результаты ROC-анализа свидетельствовали о среднем качестве модели и не позволяют использовать полученные данные в диагностических целях, необходимо продолжить исследования для более глубокого понимания механизмов функционирования галектинов, прежде чем терапевтические средства на их основе будут внедрены в клиническую практику при лечении ПКР.

Ключевые слова: рак почки, галектины, галектин-1, галектин-3, галектин-4, галектин-7, галектин-9, сыворотка крови, ROC-анализ

Для цитирования: Кушлинский Н.Е., Ковалева О.В., Басов А.Г., Кузьмин Ю.Б., Алферов А.А., Бежанова С.Д., Колпашиков А.В., Климанов И.А., Грачев А.Н., Зыбина Н.Н., Матвеев В.Б., Янушевич О.О., Стилиди И.С. Содержание растворимых форм галектинов -1, -3, -4, -7, -9 у больных почечно-клеточным раком различных морфологических типов. Альманах клинической медицины. 2024;52(3):107–119. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-005.

Поступила 14.02.2024; доработана 22.03.2024; принята к публикации 03.04.2024; опубликована онлайн 08.04.2024



Кушлинский Николай Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель клиничко-диагностической лаборатории консультативно-диагностического центра¹, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>. E-mail: biochimia@yandex.ru

Ковалева Ольга Владимировна – д-р биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>

✉ 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация. E-mail: ovkovaleva@gmail.com

Басов Арсений Геннадьевич – заместитель главного врача по медицинской части консультативно-диагностического центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-9351-880X>. E-mail: arsbasovtmn@yandex.ru

Кузьмин Юрий Борисович – канд. биол. наук, медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант) клиничко-диагностической лаборатории консультативно-диагностического центра¹,

старший лаборант кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9684-2509>. E-mail: yriikuzmin@yandex.com

Алферов Александр Андреевич – канд. мед. наук, врач клинической лабораторной диагностики клиничко-диагностической лаборатории консультативно-диагностического центра¹, ассистент кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3585-5693>. E-mail: aleksandr.alferov@yahoo.com

Бежанова Светлана Дмитриевна – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7336-9210>. E-mail: dmitrownaja@gmail.com

Колпащиков Алексей Викторович – врач клинической лабораторной диагностики кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования²; ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8784-3059>. E-mail: kolpaschikov@mail.ru

Климанов Игорь Анатольевич – канд. мед. наук, заведующий клиничко-диагностической лабораторией консультативно-диагностического центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8593-1098>. E-mail: igorklimanov@yandex.ru

Грачев Алексей Николаевич – д-р биол. наук, профессор РАН, заведующий лабораторией биологии стромальных клеток опухолей¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>. E-mail: alexei.gratchev@gmail.com

Зыбина Наталья Николаевна – д-р биол. наук, профессор, заведующая отделом лабораторной диагностики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5422-2878>. E-mail: zybinan@inbox.ru

Матвеев Всеволод Борисович – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующий отделением онкоурологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>. E-mail: v.matveev@ronc.ru

Янушевич Олег Олегович – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, ректор²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0059-4980>. E-mail: nauch.ot@mail.ru

Стилиди Иван Сократович – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>. E-mail: info@ronc.ru

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России; 127473, г. Москва, ул. Делегатская, 20/1, Российская Федерация

³ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России; 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 4–2, Российская Федерация

Хроническое воспаление связано с прогрессией и лекарственной устойчивостью опухолей, поэтому воздействие на воспалительные процессы при онкологических заболеваниях может представлять альтернативную терапевтическую стратегию [1]. Опухоль-ассоциированное воспаление провоцируется многими экзогенными факторами, включая инфекции и воздействие токсических веществ, а также эндогенными факторами, такими как мутации и генетическая нестабильность, приводя к рекрутированию и активации соответствующих клеток микроокружения [2]. Гликозилирование белков клеточной поверхности опухолевых и иммунных клеток – динамический процесс, влияющий и на рост опухоли, и на воспалительные реакции [3]. Галектины – β -галактозид-связывающие белки, относятся к семейству лектинов, имеют общую аминокислотную последовательность и домен распознавания углеводов (англ. carbohydrate recognition domain, CRD), являются ключевыми участниками регуляции тканевого гомеостаза (клеточный цикл и иммунный ответ), способствуя поддержанию хронического воспаления в опухолевом микроокружении [4]. И хотя галектины распространены во многих тканях, некоторые их изоформы экспрессируются более специфично.

Большинство современных исследований посвящено внеклеточным эффектам галектинов: они могут связывать белки плазматической мембраны и взаимодействовать с компонентами внеклеточного матрикса [5]. Однако галектины обладают и важными внутриклеточными функциями, выполняемыми в цитоплазме, ядре, митохондриях, экзосомах и лизосомах [6], при этом регуляция экспрессии галектинов осуществляется в зависимости от тканевой специфичности [7].

На основании доменной структуры галектины млекопитающих классифицированы на протогалектины, химерные и тандемно-повторные изоформы. Протогалектины (галектины -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15) содержат один CRD-домен на полипептид и нековалентно связанные гомодимеры [7]. Тандемно-повторяющиеся галектины (галектины -4, -6, -8, -9, -12) состоят из двух CRD, соединенных неструктурированным линкерным пептидом [7]. Уникальным представителем химерных изоформ является галектин-3, состоящий из одного CRD-домена на С-конце, слитого с нелектиновым N-концом, на котором представлены два сайта фосфорилирования (Ser6, Ser12), при этом статус фосфорилирования маркера регулирует субклеточную локализацию и транслокацию белка [8].



Галектины активно вовлечены в различные механизмы регуляции. Так, галектин-1 экспрессируется различными иммунными клетками в микроокружении опухоли, а также опухолевыми и эндотелиальными клетками [9], считается негативным регулятором иммунного ответа, поскольку может ингибировать взаимодействие Т-клеток с компонентами внеклеточного матрикса (фибронектином и ламинином), тем самым подавляя продукцию провоспалительных цитокинов, выделяемых активированными Т-клетками [10].

Для галектина-3 доказано участие в противоопухолевом иммунном ответе посредством регуляции функции НК- и Т-клеток, а его повышенная экспрессия ассоциирована с утратой функций эффекторных Т-клеток [11]. Наряду с этим галектин-3 может вызывать усиленную продукцию провоспалительных цитокинов в различных иммунных клетках [12], при этом подавление галектина-3 приводит к увеличению числа функциональных CD8⁺ Т-клеток и, как следствие, к экспрессии провоспалительных цитокинов и элиминации опухоли у галектин-3-дефицитных животных [13].

Галектин-4 считается опухолевым супрессором, ингибирующим пролиферацию клеток колоректального рака (КРР) посредством сигнальных путей Wnt и IL-6/NF-κB/STAT3 [14]. Аналогичные результаты отмечены при раке поджелудочной железы [15]. Кроме того, галектин-4 ингибирует миграцию опухолевых клеток и метастазирование, снижает уровень цитоплазматического β-катенина и делает клетки рака поджелудочной железы чувствительными к ингибиторам Wnt [16], а его дефицит ассоциирован с ранним рецидивированием и прогрессией опухоли.

Галектин-7 является маркером эпителиальной дифференцировки [17], высокий уровень экспрессии которого обнаружен в агрессивных подтипах рака молочной железы, часто с базально-подобным фенотипом и в эстроген-негативных опухолях [18]. Повышения уровня галектина-7 оказалось достаточно для приобретения опухолевыми клетками более злокачественного фенотипа, а именно способности к метастазированию и устойчивости к апоптозу [19].

Галектин-9 конститутивно экспрессируется в антигенпрезентирующих клетках, а в опухолевых клетках его экспрессия повышается под действием интерферонов [20]. Функция галектина-9 тесно связана с иммуносупрессорным фенотипом опухолевого микроокружения, маркер связывается с Tim-3 на поверхности Т-клеток, тем самым вызывая их гибель [21].

Цель данного исследования – анализ клинической значимости растворимых форм галектинов -1, -3, -4, -7, -9 у больных почечно-клеточным раком (ПКР) различных гистологических типов.

Материал и методы

В ретроспективное исследование включены данные 140 пациентов с ПКР, из них 84 – со светлоклеточным ПКР (скПКР), 38 – с папиллярным (папПКР), 18 – с хромофобным (хрПКР), и 73 здоровых донора, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2019 по 2023 г. Проведение данного исследования одобрено этическим комитетом «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (протокол от 25.11.2021). Клинический диагноз у всех пациентов подтвержден данными морфологического

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики больных почечно-клеточным раком

Характеристика	Число случаев, абс. (%)
Возраст	
≤ 60 лет	71 (51)
> 60 лет	69 (49)
Пол	
мужской	87 (62)
женский	53 (38)
Гистология	
скПКР	84 (60)
папПКР	38 (27)
хрПКР	18 (13)
Стадия	
I	58 (41)
II	27 (19)
III	33 (24)
IV	22 (16)
Размер опухоли (T)	
T1–T2	93 (66)
T3–T4	47 (34)
Регионарные метастазы (N)	
N0	124 (89)
N+	16 (11)
Отдаленные метастазы (M)	
M0	120 (86)
M+	20 (14)
Дифференцировка опухоли по Фурман (G)	
G1–G2	88 (63)
G3–G4	52 (37)

папПКР – папиллярный почечно-клеточный рак, скПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак, хрПКР – хромофобный почечно-клеточный рак

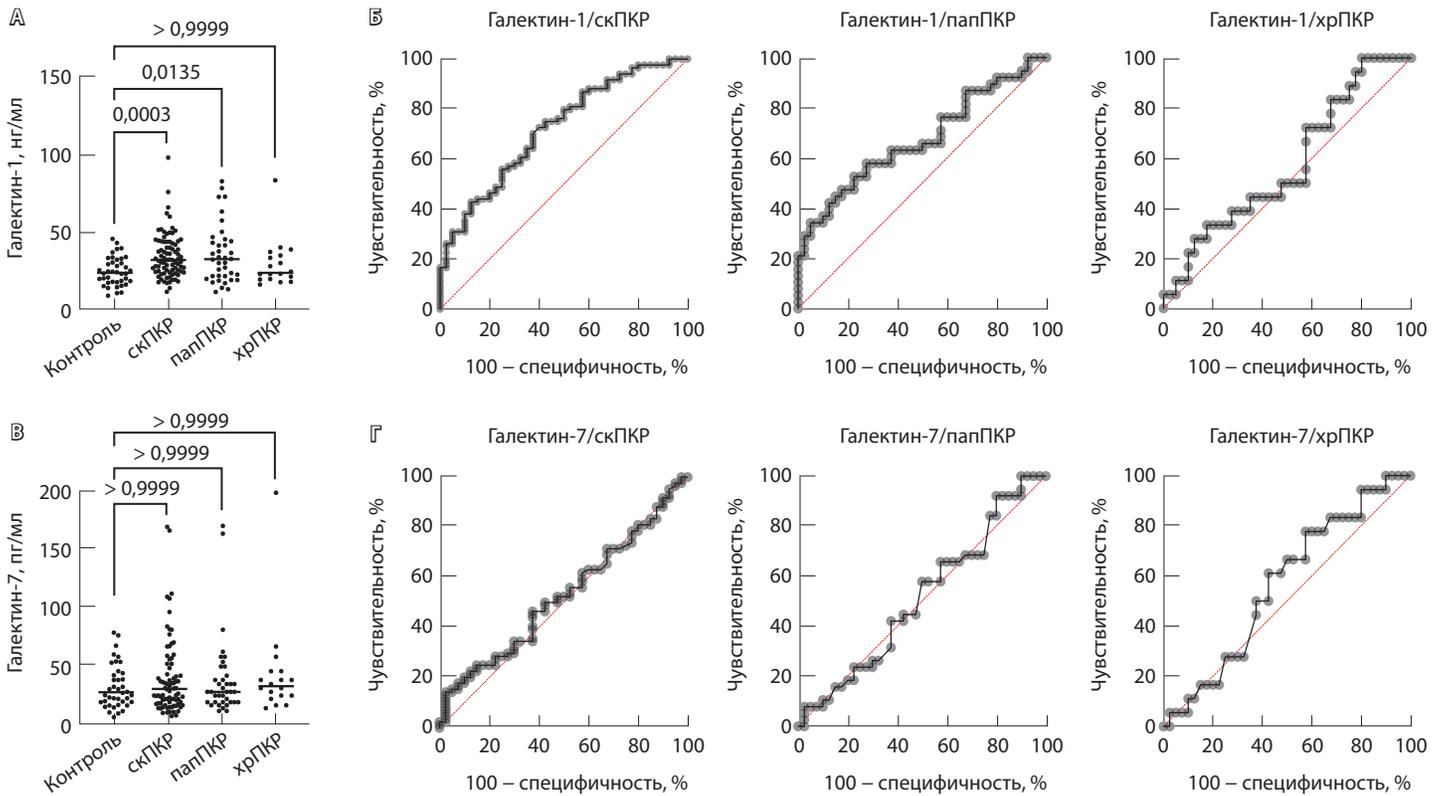


Рис. 1. Сравнительный анализ содержания в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком (ПКР) и здоровых доноров галектина-1 (А) и -7 (В). ROC-анализ для галектина-1 (С) и -7 (Г) у больных ПКР различных гистологических типов: для галектина-1 AUC = 0,721 ($p < 0,0001$) для светлоклеточного ПКР (скПКР), 0,673 ($p = 0,0086$) – для папиллярного ПКР (папПКР) и 0,576 ($p = 0,355$) – для хромобного ПКР (хрПКР); для галектина-7 AUC = 0,527 ($p = 0,634$) для скПКР; 0,513 ($p = 0,845$) – для папПКР и 0,566 ($p = 0,425$) – для хрПКР

исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей почки (Всемирная организация здравоохранения, 2016). Описание исследованной выборки больных ПКР представлено в табл. 1.

Концентрацию галектинов -1, -3, -4, -7, -9 определяли в сыворотке крови до начала лечения с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа Human Galectin-1, -3, -9 Quantikine ELISA (R&D Systems, США) и Galectin-4, -7 Quantikine ELISA (RayBiotech, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг) или нанogramмах (нг) на 1 мл сыворотки крови.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 10.0. При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна – Уитни, Краскела – Уоллиса с последующим применением критерия Данна с поправкой Бонферрони для

парных сравнений. Анализ информативности диагностического метода путем оценки его чувствительности и специфичности проводили с помощью построения ROC-кривых и вычисления площади под ними (англ. area under the curve, AUC). Корреляционный анализ выполняли посредством определения коэффициента корреляции Спирмена. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Провели анализ содержания галектинов -1 и -7 в сыворотке крови больных ПКР в сравнении со здоровыми донорами (рис. 1). Содержание галектина-1 в сыворотке крови было выше у больных скПКР и папПКР по сравнению со здоровыми донорами, однако площадь под ROC-кривой, равная 0,721 для скПКР и 0,673 для папПКР, свидетельствует о среднем качестве модели, что не позволяет использовать полученные данные в диагностических целях. Для галектина-7 не выявлено различий в содержании данного белка между группами контроля и больных ПКР.

**Таблица 2.** Ассоциация содержания галектинов-1 и -7 в сыворотке крови с клинико-морфологическими характеристиками больных почечно-клеточным раком

Характеристика	Галектин-1, нг/мл			Галектин-7, пг/мл		
	медиана	25%; 75%	значение <i>p</i>	медиана	25%; 75%	значение <i>p</i>
Возраст, годы						
≤ 60	31,45	23,99; 40,46	0,779	29,56	20,05; 50,55	0,918
> 60	32,60	21,99; 44,50		31,76	19,58; 51,07	
Пол						
мужской	30,86	23,56; 40,56	0,358	32,13	22,78; 56,79	0,079
женский	33,75	22,91; 45,86		27,44	17,41; 40,91	
Гистология						
1. скПКР	32,60	25,01; 44,20	1 vs 2 > 0,999	31,39	19,11; 55,83	1 vs 2 > 0,999
2. папПКР	33,01	21,70; 44,90	1 vs 3 = 0,194	28,88	20,05; 44,70	1 vs 3 > 0,999
3. хрПКР	24,33	20,25; 36,03	2 vs 3 = 0,492	33,83	25,05; 46,58	2 vs 3 > 0,999
Стадия						
I–II	30,81	22,80; 41,88	0,376	32,13	22,47; 53,80	0,297
III–IV	32,60	23,65; 44,23		26,06	19,11; 42,13	
Размер опухоли						
T1–T2	30,81	22,80; 41,20	0,296	32,13	20,18; 52,93	0,595
T3–T4	32,87	23,65; 45,70		28,88	20,05; 46,58	
Регионарные метастазы						
N0	30,88	23,28; 42,97	0,339	32,13	20,11; 49,56	0,487
N+	33,01	27,15; 44,37		25,83	17,69; 50,21	
Отдаленные метастазы						
M0	32,03	23,02; 43,49	0,540	31,95	20,05; 52,34	0,890
M+	31,47	25,17; 41,88		27,47	20,05; 46,67	
Степень дифференцировки опухоли						
G1–G2	32,60	23,93; 44,90	0,6291	35,52	20,30; 58,91	0,097
G3–G4	32,86	23,58; 43,29		25,59	19,35; 39,83	

папПКР – папиллярный почечно-клеточный рак, скПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак, хрПКР – хромофобный почечно-клеточный рак

Таблица 3. Корреляционный анализ содержания галектина-1 с клинико-морфологическими характеристиками почечно-клеточного рака различных гистологических типов

Параметр	скПКР	папПКР	хрПКР
Галектин-1 vs возраст	$r = -0,194; p = 0,078$	$r = -0,216; p = 0,194$	$r = -0,216; p = 0,388$
Галектин-1 vs пол	$r = 0,165; p = 0,134$	$r = -0,017; p = 0,917$	$r = -0,065; p = 0,799$
Галектин-1 vs стадия	$r = 0,161; p = 0,143$	$r = 0,048; p = 0,774$	$r = -0,132; p = 0,602$
Галектин-1 vs T	$r = 0,175; p = 0,112$	$r = 0,052; p = 0,755$	$r = -0,055; p = 0,827$
Галектин-1 vs N	$r = 0,054; p = 0,623$	$r = 0,045; p = 0,788$	$r = 0,171; p = 0,499$
Галектин-1 vs M	$r = 0,076; p = 0,490$	$r = -0,051; p = 0,762$	$r = -0,023; p = 0,927$
Галектин-1 vs G	$r = -0,026; p = 0,813$	$r = -0,096; p = 0,632$	$r = 0,169; p > 0,999$

G – степень дифференцировки опухоли, M – отдаленные метастазы, N – регионарные метастазы, T – размер опухоли, папПКР – папиллярный почечно-клеточный рак, скПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак, хрПКР – хромофобный почечно-клеточный рак

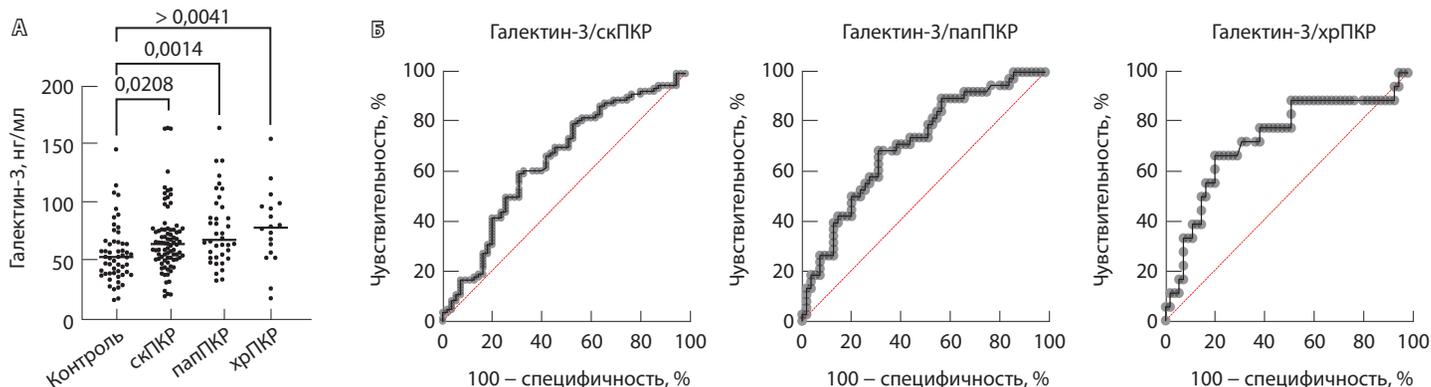


Рис. 2. Сравнительный анализ содержания галектина-3 в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком (ПКР) и здоровых доноров (А). ROC-анализ для галектина-3 у больных ПКР различных гистологических типов (Б): AUC = 0,721 ($p < 0,0001$) для светлоклеточного ПКР (скПКР); 0,673 ($p = 0,0086$) для папиллярного ПКР (папПКР); 0,576 ($p = 0,355$) для хромофобного ПКР (хрПКР)

Как видно из данных табл. 2, значимых ассоциаций между содержанием в сыворотке крови галектинов -1 и -7 и клинико-морфологическими характеристиками заболевания не выявлено.

Корреляционный анализ показал отсутствие корреляции содержания галектина-1 с клинико-морфологическими характеристиками различных гистологических типов ПКР (табл. 3). При этом содержание галектина-7 в сыворотке крови больных скПКР значимо коррелировало с полом пациентов, а в группе папПКР – со степенью дифференцировки опухоли (табл. 4).

По данным ROC-анализа, содержание галектина-3 в сыворотке крови значимо возрастало при развитии всех типов ПКР, но наибольшее содержание данного белка наблюдалось в случае хромофобного ПКР (рис. 2). При этом содержание галектина-3 в сыворотке крови у женщин с ПКР

было значимо выше по сравнению с мужчинами (табл. 5). Вместе с тем корреляционная связь с полом пациентов установлена только в группе скПКР. Для данной группы характерна значимая прямая корреляция содержания галектина-3 с возрастом пациентов (табл. 6).

Анализ содержания галектинов -4 и -9 в сыворотке крови больных ПКР в сравнении со здоровыми донорами (рис. 3) показал: для галектина-4 отмечено незначимое повышение содержания в сыворотке крови больных ПКР относительно контроля, а для галектина-9 – статистически значимое повышение его концентрации только у больных скПКР относительно контроля.

Результаты анализа связи содержания галектинов -4 и -9 с клинико-морфологическими характеристиками заболевания представлены в табл. 7. Более высокие уровни галектина-9 в сыворотке

Таблица 4. Корреляционный анализ содержания галектина-7 с клинико-морфологическими характеристиками почечно-клеточного рака различных гистологических типов

Параметр	скПКР	папПКР	хрПКР
Галектин-7 vs возраст	$r = 0,004; p = 0,975$	$r = -0,108; p = 0,519$	$r = 0,139; p = 0,582$
Галектин-7 vs пол	$r = -0,264; p = 0,015^*$	$r = 0,032; p = 0,846$	$r = 0,043; p = 0,860$
Галектин-7 vs стадия	$r = -0,081; p = 0,464$	$r = -0,219; p = 0,185$	$r = -0,181; p = 0,472$
Галектин-7 vs T	$r = -0,050; p = 0,649$	$r = -0,207; p = 0,212$	$r = -0,104; p = 0,681$
Галектин-7 vs N	$r = 0,030; p = 0,786$	$r = -0,168; p = 0,314$	$r = -0,205; p = 0,414$
Галектин-7 vs M	$r = 0,016; p = 0,885$	$r = -0,109; p = 0,511$	$r = 0,117; p = 0,643$
Галектин-7 vs G	$r = -0,027; p = 0,807$	$r = -0,592; p = 0,001^*$	$r = -0,4287; p = 0,533$

G – степень дифференцировки опухоли, M – отдаленные метастазы, N – регионарные метастазы, T – размер опухоли, папПКР – папиллярный почечно-клеточный рак, скПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак, хрПКР – хромофобный почечно-клеточный рак

* Корреляция статистически значима

**Таблица 5.** Ассоциация содержания галектина-3 в сыворотке крови с клинико-морфологическими характеристиками больных почечно-клеточным раком

Характеристика	Галектин-3, нг/мл		
	медиана	25%; 75%	значение <i>p</i>
Возраст, годы			
≤ 60	10,20	7,870; 13,53	0,831
> 60	10,00	8,305; 12,29	
Пол			
мужской	9,140	7,720; 12,21	0,006*
женский	10,82	9,220; 15,67	
Гистология			
1. скПКР	9,880	7,885; 11,79	1 vs 2 = 0,408
2. папПКР	10,45	8,098; 14,91	1 vs 3 = 0,261
3. хрПКР	12,06	8,595; 14,99	2 vs 3 > 0,999
Стадия			
I–II	10,10	8,000; 12,67	0,585
III–IV	10,17	8,090; 14,88	
Размер опухоли			
T1–T2	10,17	8,065; 12,67	0,889
T3–T4	9,950	8,030; 14,88	
Регионарные метастазы			
N0	10,09	7,975; 12,54	0,111
N+	10,81	9,113; 16,39	
Отдаленные метастазы			
M0	10,00	8,053; 12,54	0,204
M+	10,99	8,938; 16,12	
Степень дифференцировки опухоли			
G1–G2	9,660	7,830; 12,40	0,615
G3–G4	10,08	8,498; 11,97	

G – степень дифференцировки опухоли, M – отдаленные метастазы, N – регионарные метастазы, T – размер опухоли, папПКР – папиллярный почечно-клеточный рак, скПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак, хрПКР – хромофобный почечно-клеточный рак

Таблица 6. Корреляционный анализ содержания галектина-3 с клинико-морфологическими характеристиками почечно-клеточного рака различных гистологических типов

Параметр	скПКР	папПКР	хрПКР
Галектин-3 vs возраст	$r = 0,364; p = 0,0007^*$	$r = -0,197; p = 0,236$	$r = 0,089; p = 0,725$
Галектин-3 vs пол	$r = 0,401; p = 0,0002^*$	$r = -0,055; p = 0,744$	$r = 0,021; p = 0,932$
Галектин-3 vs стадия	$r = 0,186; p = 0,089$	$r = 0,138; p = 0,407$	$r = -0,249; p = 0,319$
Галектин-3 vs T	$r = 0,210; p = 0,055$	$r = 0,062; p = 0,712$	$r = -0,250; p = 0,316$
Галектин-3 vs N	$r = 0,048; p = 0,666$	$r = 0,255; p = 0,123$	$r = 0,170; p = 0,499$
Галектин-3 vs M	$r = 0,074; p = 0,502$	$r = 0,250; p = 0,129$	$r = 0,210; p = 0,402$
Галектин-3 vs G	$r = 0,075; p = 0,504$	$r = -0,076; p = 0,705$	$r = -0,169; p > 0,999$

G – степень дифференцировки опухоли, M – отдаленные метастазы, N – регионарные метастазы, T – размер опухоли, папПКР – папиллярный почечно-клеточный рак, скПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак, хрПКР – хромофобный почечно-клеточный рак

* Корреляция статистически значима

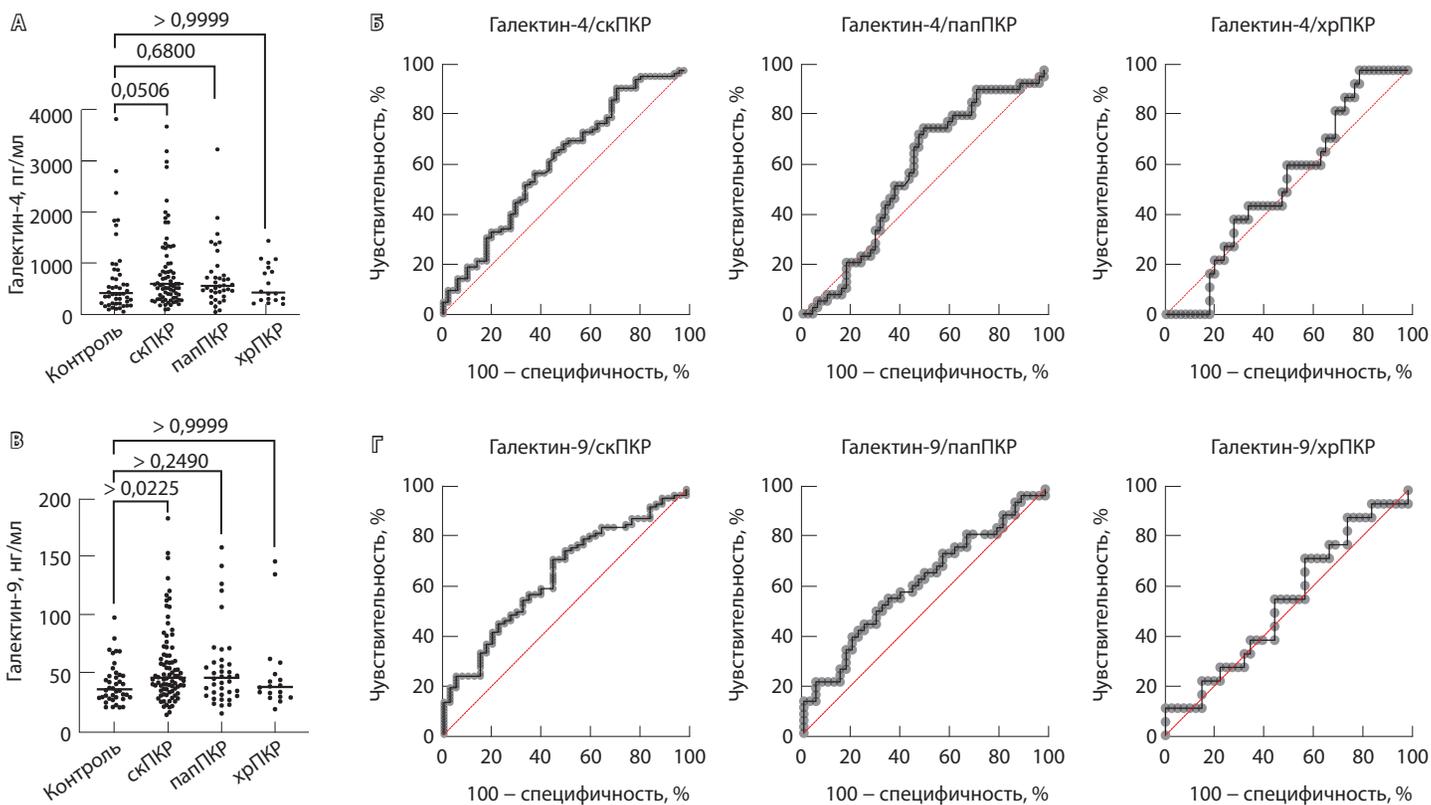


Рис. 3. Сравнительный анализ содержания в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком (ПКР) и здоровых доноров галектина-4 (А) и галектина-9 (В). ROC-анализ для галектина-4 у больных ПКР различных гистологических типов (Б, Г): AUC = 0,619 ($p = 0,021$) для светлоклеточного ПКР (скПКР); 0,577 ($p = 0,214$) – для папиллярного ПКР (папПКР); 0,534 ($p = 0,666$) – для хромофобного ПКР (хрПКР); для галектина-9 AUC = 0,649 ($p = 0,0075$) для скПКР; 0,613 ($p = 0,087$) – для папПКР и 0,539 ($p = 0,637$) – для хрПКР

крови отмечены у больных ПКР старшей возрастной группы. Что касается данных корреляционного анализа (табл. 8 и 9), в группе больных скПКР помимо корреляции с возрастом выявлена статистически значимая прямая корреляция содержания галектина-9 с размером опухоли и наличием регионарных метастазов.

Обсуждение

В настоящее время в прогрессии онкологических заболеваний, в том числе и ПКР, особую роль отводят галектинам, которые опосредуют взаимодействие между опухолью и ее микроокружением [4, 22]. Выбор нами нозологической формы, а именно ПКР, для исследования различных галектинов связан с тем, что этот тип опухоли относится к высокоиммуногенным новообразованиям и представляется перспективным направлением в плане разработки новых методов терапии, влияющих на иммунную систему. Галектины способны модулировать иммунный ответ, принимают активное участие в воспалительных процессах и помогают опухолевым клеткам избежать иммунного надзора – это делает

их привлекательной терапевтической мишенью [4]. Настоящее исследование посвящено изучению клинической значимости содержания галектинов -1, -3, -4, -7, -9 в сыворотке крови больных ПКР с акцентом связи данных молекул с основными гистологическими типами этих опухолей.

Прежде всего, нами выявлено статистически значимое повышение содержания галектинов -1, -3, -9 в сыворотке крови больных ПКР по сравнению со здоровыми донорами контрольной группы, для галектинов -4 и -7 такой зависимости не обнаружено. Следует отметить, что другие авторы также выявили повышение уровня галектина-3 в крови онкологических больных, в частности, при раке молочной железы, легкого и КРР [23]. По данным литературы экспрессия галектина-3 повышена во многих типах солидных опухолей, в том числе и ПКР, и прямо связана с неблагоприятным прогнозом заболевания [24]. Повышение экспрессии галектина-3 при ПКР ассоциировано со стволовым фенотипом опухолевых клеток, которые начинают продуцировать белки Oct4, Sox2, Nanog, а снижение его уровня в опухолях данной нозологии

**Таблица 7.** Ассоциация содержания галектинов-4 и -9 в сыворотке крови с клинико-морфологическими характеристиками больных почечно-клеточным раком

Характеристика	Галектин-4, пг/мл			Галектин-9, нг/мл		
	медиана	25%; 75%	значение <i>p</i>	медиана	25%; 75%	значение <i>p</i>
Возраст, годы						
≤ 60	506,1	286,0; 928,2	0,050*	8,830	6,430; 12,03	0,365
> 60	698,5	419,5; 1326		9,550	7,185; 13,87	
Пол						
мужской	540,5	295,2; 829,3	0,079	8,940	6,940; 12,03	0,357
женский	698,5	381,0; 1383		9,550	6,795; 17,40	
Гистология						
1. скПКР	589,7	329,3; 1329	1 vs 2 > 0,999	9,455	7,315; 13,38	1 vs 2 > 0,999
2. папПКР	549,5	398,6; 854,4	1 vs 3 = 0,436	9,450	6,510; 12,18	1 vs 3 = 0,408
3. хрПКР	417,8	272,3; 928,2	2 vs 3 > 0,999	7,880	6,185; 10,57	2 vs 3 > 0,999
Стадия						
I–II	601,6	276,3; 1350	0,866	9,270	7,085; 12,06	0,985
III–IV	570,7	396,6; 836,2		9,090	6,430; 14,31	
Размер опухоли						
T1–T2	565,1	276,3; 1350	0,867	9,190	6,965; 12,10	0,716
T3–T4	576,2	437,4; 836,2		9,170	6,550; 13,24	
Регионарные метастазы						
N0	559,4	315,7; 1299	0,993	8,895	6,873; 12,11	0,058
N+	595,5	464,4; 776,3		11,44	7,355; 23,99	
Отдаленные метастазы						
M0	589,7	296,3; 1281	0,701	9,230	6,995; 12,27	0,717
M+	571,5	457,9; 827,0		9,055	5,665; 14,04	
Степень дифференцировки опухоли						
G1–G2	650,7	338,5; 1306	0,744	8,520	7,010; 13,43	0,368
G3–G4	574,3	332,8; 1303		9,995	7,095; 13,24	

G – степень дифференцировки опухоли, M – отдаленные метастазы, N – регионарные метастазы, T – размер опухоли, папПКР – папиллярный почечно-клеточный рак, скПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак, хрПКР – хромофобный почечно-клеточный рак

* Межгрупповые различия статистически значимы

Таблица 8. Корреляционный анализ содержания галектина-4 с клинико-морфологическими характеристиками почечно-клеточного рака различных гистологических типов

Параметр	скПКР	папПКР	хрПКР
Галектин-4 vs возраст	$r = 0,266; p = 0,015^*$	$r = -0,125; p = 0,454$	$r = 0,304; p = 0,220$
Галектин-4 vs пол	$r = 0,118; p = 0,286$	$r = 0,294; p = 0,074$	$r = -0,075; p = 0,766$
Галектин-4 vs стадия	$r = -0,012; p = 0,909$	$r = -0,072; p = 0,668$	$r = 0,032; p = 0,899$
Галектин-4 vs T	$r = 0,009; p = 0,934$	$r = -0,080; p = 0,632$	$r = 0,149; p = 0,552$
Галектин-4 vs N	$r = 0,011; p = 0,921$	$r = 0,004; p = 0,982$	$r = -0,102; p = 0,686$
Галектин-4 vs M	$r = 0,032; p = 0,769$	$r = -0,003; p = 0,981$	$r = 0,023; p = 0,927$
Галектин-4 vs G	$r = 0,096; p = 0,391$	$r = -0,309; p = 0,116$	$r = 0,169; p > 0,999$

G – степень дифференцировки опухоли, M – отдаленные метастазы, N – регионарные метастазы, T – размер опухоли, папПКР – папиллярный почечно-клеточный рак, скПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак, хрПКР – хромофобный почечно-клеточный рак

* Корреляция статистически значима

**Таблица 9.** Корреляционный анализ содержания галектина-9 с клинико-морфологическими характеристиками почечно-клеточного рака различных гистологических типов

Параметр	скПКР	папПКР	хрПКР
Галектин-9 vs возраст	$r = 0,216; p = 0,048^*$	$r = 0,012; p = 0,943$	$r = -0,254; p = 0,309$
Галектин-9 vs пол	$r = 0,108; p = 0,324$	$r = 0,029; p = 0,858$	$r = 0,064; p = 0,798$
Галектин-9 vs стадия	$r = 0,146; p = 0,185$	$r = -0,098; p = 0,554$	$r = -0,199; p = 0,428$
Галектин-9 vs T	$r = 0,251; p = 0,021^*$	$r = -0,152; p = 0,363$	$r = -0,051; p = 0,842$
Галектин-9 vs N	$r = 0,239; p = 0,028^*$	$r = 0,063; p = 0,707$	$r = 0,068; p = 0,788$
Галектин-9 vs M	$r = -0,021; p = 0,848$	$r = 0,023; p = 0,888$	$r = -0,397; p = 0,102$
Галектин-9 vs G	$r = 0,124; p = 0,265$	$r = -0,033; p = 0,871$	$r = -0,169; p > 0,999$

G – степень дифференцировки опухоли, M – отдаленные метастазы, N – регионарные метастазы, T – размер опухоли, папПКР – папиллярный почечно-клеточный рак, скПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак, хрПКР – хромофобный почечно-клеточный рак

* Корреляция статистически значима

может подавлять инвазию клеток, их способность к образованию колоний и неприкрепленному росту [25]. В целом эти результаты позволяют предположить, что галектин-3 регулирует стволовость опухолевых клеток, способствуя прогрессии опухоли. Кроме того, данные литературы указывают на то, что галектин-3 играет существенную роль в прогрессии и метастазировании опухолей [26]. Важно, что, несмотря на участие галектина-3 в различных биологических процессах, связанных с развитием и прогрессией опухоли, практически во всех случаях галектин-3 действует как промотор опухолевого роста. Таким образом, ингибиторы галектина-3 могут быть полезны в терапии различных видов онкологических заболеваний, включая ПКР, за счет подавления митогенных путей.

Для галектина-1 описаны аналогичные закономерности, а именно повышение его экспрессии при ПКР [26], что согласуется с полученными нами результатами. Показано также, что при меланоме галектин-1 вносит существенный вклад в формирование иммуносупрессорного микроокружения, индуцируя апоптоз цитотоксических Т-клеток [27]. При КРП галектин-1 может влиять на рост опухоли, регулируя активность CD8⁺ Treg-клеток [28]. В соответствии с этим высокая экспрессия галектина-1 у больных КРП коррелирует с повышенным уровнем CD8⁺ Treg и неблагоприятным прогнозом [28]. Кроме того, высокий уровень галектина-1 выявлен в эндотелии первичных опухолей легкого, толстой кишки, а также рака полости рта, что было ассоциировано с гипоксией и ангиогенезом [29]. Учитывая известную биологическую роль галектина-1 в опухолевой прогрессии, он был предложен в качестве привлекательной мишени для противоопухолевой терапии. В частности,

имеются данные о том, что галектин-1, продуцируемый опухолью, способствует «ускользанию» опухоли от иммунологического надзора, поэтому ингибиторы галектина-1 могут быть использованы для противодействия этому эффекту и усиления противоопухолевого иммунитета [27].

Проведенный нами анализ данных показал, что для галектина-7, с одной стороны, не наблюдается изменения его содержания в сыворотке крови при развитии ПКР, с другой стороны, его содержание у больных скПКР значимо коррелирует с полом пациентов, а в группе больных папПКР – со степенью дифференцировки опухоли. Несмотря на то что галектин-7 может выступать как промотор опухолевой прогрессии, в случае опухолей желудочно-кишечного тракта была показана его противоположная роль. Так, например, экспрессия галектина-7 в клетках КРП делала их более чувствительными к апоптозу [30]. Галектин-7 также снижает инвазивность клеток рака простаты, подавляя клеточную подвижность и повышая чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам [31]. Проведенное нами исследование не выявило повышения содержания галектина-7 в сыворотке крови при развитии ПКР и его связи с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания; это свидетельствует о том, что он не принимает активного участия в развитии и прогрессии ПКР.

При анализе галектина-9 мы показали: в группе светлоклеточных опухолей почки помимо корреляции с возрастом наблюдалась значимая прямая корреляция содержания галектина-9 с размером опухоли и наличием регионарных метастазов, что говорит о его участии в опухолевой прогрессии. В литературе описаны различные механизмы, посредством которых галектин-9 принимает участие



в процессе распространения опухоли. Так, галектин-9 может взаимодействовать с CD44 на клеточной поверхности или блокировать взаимодействие VCAM1 с $\alpha\beta 1$ -интегринами, что ослабляет миграцию опухолевых клеток и метастазирование меланомы и КРР [32]. Кроме того, галектин-9 может ингибировать метастазирование меланомы, способствуя агрегации опухолевых клеток, тем самым предотвращая их распространение [33]. Галектин-9 также участвует в поляризации эпителиальных клеток [34]. Проапоптотическая функция галектина-9 описана в моделях рака яичников [35]. В целом вышеописанные исследования позволили предположить, что в зависимости от типа опухоли галектин-9 может служить диагностическим и прогностическим маркером, а также терапевтической мишенью. Согласно данным, полученным в настоящем исследовании, содержание галектина-9 в сыворотке крови больных ПКР возрастало как при развитии заболевания, так и при его дальнейшей прогрессии.

Заключение

Идентификация лигандов, опосредующих активность галектинов, имеет большое значение для выяснения их функций. Это непростая задача, поскольку галектины в большом количестве связываются с нерелевантными гликопротеинами, которые оказываются в тесном контакте с галектинами после лизиса клеток. К настоящему времени опубликованы работы, посвященные галектинам

-1 и -3 у нокаутных животных моделей [36, 37]. Интерес к этим исследованиям связан с тем, что некоторые ткани одновременно экспрессируют несколько галектинов, и существует вероятность того, что у нокаутных животных может происходить функциональная компенсация за счет других галектинов. Однако выраженные фенотипы у животных, лишенных одного из этих двух галектинов, подтверждают функциональную уникальность некоторых членов данного семейства.

Ввиду того, что при развитии различных типов злокачественных опухолей наблюдается изменение содержания как тканевых, так и растворимых форм галектинов, они в перспективе могут обладать терапевтическим потенциалом. Однако прежде чем терапевтические средства на основе галектинов будут экстраполированы в клиническую практику, необходимо более глубокое понимание механизмов их функционирования. Нерешенными остаются также вопросы функционирования данных белков в зависимости от их локализации, особенно в условиях *in vivo*. Ответы на эти вопросы позволят определить, как именно должны функционировать ингибиторы или активаторы данных белков. Анализ связи растворимых форм галектинов, исследованных в настоящей работе, позволил оценить их ассоциации с ключевыми клинико-морфологическими факторами ПКР для дальнейшего изучения их роли в прогнозе заболевания, а также выборе возможной целенаправленной терапии их ингибиторами. ☺

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

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

Участие авторов

Н.Е. Кушлинский, В.Б. Матвеев, О.О. Янушевич, И.С. Стилиды – концепция и дизайн исследования, лечение пациентов, редактирование текста; О.В. Ковалева, А.Г. Басов, А.Н. Грачев и Н.Н. Зыбина – анализ полученных данных, статистический анализ, написание текста; С.Д. Бежанова – гистологическое исследование опухоли; Ю.Б. Кузьмин, А.А. Алферов, А.В. Колпацников,

И.А. Климанов – сбор материала, подготовка биологических образцов, анализ полученных данных. 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

- Borsig L, Wolf MJ, Roblek M, Lorentzen A, Heikenwalder M. Inflammatory chemokines and metastasis – tracing the accessory. *Oncogene*. 2014;33(25):3217–3224. doi: 10.1038/onc.2013.272.
- Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med*. 2019;18(3):121–126. doi: 10.4103/aam.aam_56_18.
- Radovani B, Gudelj I. N-Glycosylation and Inflammation; the Not-So-Sweet Relation. *Front Immunol*. 2022;13:893365. doi: 10.3389/fimmu.2022.893365.
- Girotti MR, Salatino M, Dalotto-Moreno T, Rabinovich GA. Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression. *J Exp Med*. 2020;217(2):e20182041. doi: 10.1084/jem.20182041.
- Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(13):1679–1700. doi: 10.1007/s00018-007-7044-8.
- Popa SJ, Stewart SE, Moreau K. Unconventional secretion of annexins and galectins. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;83:42–50. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.022.
- Di Lella S, Sundblad V, Cerliani JP, Guardia CM, Estrin DA, Vasta GR, Rabinovich GA. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry*. 2011;50(37):7842–7857. doi: 10.1021/bi201121m.
- Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, Kim HR, Bresalier RS, Raz A. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol*.



- 2004;24(10):4395–4406. doi: 10.1128/MCB.24.10.4395-4406.2004.
9. Sundblad V, Morosi LG, Geffner JR, Rabinovich GA. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *J Immunol*. 2017;199(11):3721–3730. doi: 10.4049/jimmunol.1701172.
10. Rabinovich GA, Ariel A, Hershkoviz R, Hirabayashi J, Kasai KI, Lider O. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology*. 1999;97(1):100–106. doi: 10.1046/j.1365-2567.1999.00746.x.
11. Demotte N, Stroobant V, Courtoy PJ, Van Der Smissen P, Colau D, Luescher IF, Hivroz C, Nicaise J, Squifflet JL, Mourad M, Godelaine D, Boon T, van der Bruggen P. Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity*. 2008;28(3):414–424. doi: 10.1016/j.immuni.2008.01.011.
12. Díaz-Alvarez L, Ortega E. The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:9247574. doi: 10.1155/2017/9247574.
13. Demotte N, Wieërs G, Van Der Smissen P, Moser M, Schmidt C, Thielemans K, Squifflet JL, Weynand B, Carrasco J, Lurquin C, Courtoy PJ, van der Bruggen P. A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice. *Cancer Res*. 2010;70(19):7476–7488. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0761.
14. Kaur S, Singh J, Kaur M. Multifaceted role of galectin-4 in cancer: A systematic review. *Eur J Clin Invest*. 2023;53(7):e13987. doi: 10.1111/eci.13987.
15. Maftouh M, Belo AI, Avan A, Funel N, Peters GJ, Giovannetti E, Van Die I. Galectin-4 expression is associated with reduced lymph node metastasis and modulation of Wnt/ β -catenin signalling in pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2014;5(14):5335–5349. doi: 10.18632/oncotarget.2104.
16. Belo AI, van der Sar AM, Tefsen B, van Die I. Galectin-4 Reduces Migration and Metastasis Formation of Pancreatic Cancer Cells. *PLoS One*. 2013;8(6):e65957. doi: 10.1371/journal.pone.0065957.
17. Sewgobind NV, Albers S, Pieters RJ. Functions and Inhibition of Galectin-7, an Emerging Target in Cellular Pathophysiology. *Biomolecules*. 2021;11(11):1720. doi: 10.3390/biom11111720.
18. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–752. doi: 10.1038/35021093.
19. Demers M, Rose AA, Grosset AA, Biron-Pain K, Gaboury L, Siegel PM, St-Pierre Y. Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *Am J Pathol*. 2010;176(6):3023–3031. doi: 10.2353/ajpath.2010.090876.
20. Yang R, Sun L, Li CF, Wang YH, Yao J, Li H, Yan M, Chang WC, Hsu JM, Cha JH, Hsu JL, Chou CW, Sun X, Deng Y, Chou CK, Yu D, Hung MC. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat Commun*. 2021;12(1):832. doi: 10.1038/s41467-021-21099-2.
21. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med*. 2010;207(10):2187–2194. doi: 10.1084/jem.20100643.
22. Короткова ЕА, Герштейн ЕС, Самойлова ЕВ, Горячева ИО, Петросян АП, Зыбина НН, Янушевич ОО, Стилиди ИС, Кушлинский НЕ. Галектин-3 и матриксные металлопротеиназы 2 и 9 в крови больных раком желудка. *Альманах клинической медицины*. 2023;51(1):23–31. doi: 10.18786/2072-0505-2023-51-001.
- Короткова ЕА, Gershtein ES, Samoilova EV, Goryacheva IO, Petrosyan AP, Zybyina NN, Yanushkevich OO, Stilidi IS, Kushlinskii NE. [Galectin-3 and matrix metalloproteinases 2 and 9 in peripheral blood of gastric cancer patients]. *Almanac of Clinical Medicine*. 2023;51(1):23–31. doi: 10.18786/2072-0505-2023-51-001.
23. Blair BB, Funkhouser AT, Goodwin JL, Strigens AM, Chaballout BH, Martin JC, Arthur CM, Funk CR, Edenfield WJ, Blenda AV. Increased Circulating Levels of Galectin Proteins in Patients with Breast, Colon, and Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(19):4819. doi: 10.3390/cancers13194819.
24. Farhad M, Rolig AS, Redmond WL. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*. 2018;7(6):e1434467. doi: 10.1080/2162402X.2018.1434467.
25. Huang CS, Tang SJ, Lee MH, Chang Wang CC, Sun GH, Sun KH. Galectin-3 promotes CXCR2 to augment the stem-like property of renal cell carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2018;22(12):5909–5918. doi: 10.1111/jcmm.13860.
26. Kaneko N, Gotoh A, Okamura N, Matsuo E, Terao S, Watanabe M, Yamada Y, Hamami G, Nakamura T, Ikekita M, Okumura K, Nishimura O. Potential tumor markers of renal cell carcinoma: α -enolase for postoperative follow up, and galectin-1 and galectin-3 for primary detection. *Int J Urol*. 2013;20(5):530–535. doi: 10.1111/j.1442-2042.2012.03206.x.
27. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL, Rabinovich GA. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*. 2004;5(3):241–251. doi: 10.1016/s1535-6108(04)00024-8.
28. Cagnoni AJ, Giribaldi ML, Blidner AG, Cuttine AM, Gatto SG, Morales RM, Salatino M, Abba MC, Croci DO, Mariño KV, Rabinovich GA. Galectin-1 fosters an immunosuppressive microenvironment in colorectal cancer by reprogramming CD8⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(21):e2102950118. doi: 10.1073/pnas.2102950118.
29. Thijssen VL. Galectins in Endothelial Cell Biology and Angiogenesis: The Basics. *Biomolecules*. 2021;11(9):1386. doi: 10.3390/biom11091386.
30. Ueda S, Kuwabara I, Liu FT. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. *Cancer Res*. 2004;64(16):5672–5676. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0985.
31. Advedissian T, Deshayes F, Viguier M. Galectin-7 in Epithelial Homeostasis and Carcinomas. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2760. doi: 10.3390/ijms18122760.
32. Nobumoto A, Nagahara K, Oomizu S, Katoh S, Nishi N, Takeshita K, Niki T, Tominaga A, Yamauchi A, Hirashima M. Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. *Glycobiology*. 2008;18(9):735–744. doi: 10.1093/glycob/cwn062.
33. Kageshita T, Kashio Y, Yamauchi A, Seki M, Abedin MJ, Nishi N, Shoji H, Nakamura T, Ono T, Hirashima M. Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *Int J Cancer*. 2002;99(6):809–816. doi: 10.1002/ijc.10436.
34. Mishra R, Grzybek M, Niki T, Hirashima M, Simons K. Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(41):17633–17638. doi: 10.1073/pnas.1012424107.
35. Jafari SM, Nazri A, Shabani M, Balajam NZ, Aghaei M. Galectin-9 induces apoptosis in OVCAR-3 ovarian cancer cell through mitochondrial pathway. *Res Pharm Sci*. 2018;13(6):557–565. doi: 10.4103/1735-5362.245967.
36. Bresalier RS, Mazurek N, Sternberg LR, Byrd JC, Yunker CK, Nangia-Makker P, Raz A. Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the beta-galactoside-binding protein galectin 3. *Gastroenterology*. 1998;115(2):287–296. doi: 10.1016/s0016-5085(98)70195-7.
37. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabepu Y, Baum LG, Bakkers J, Mayo KH, Poirier F, Griffioen AW. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(43):15975–15980. doi: 10.1073/pnas.0603883103.



The content of soluble forms of galectins -1, -3, -4, -7, -9 in patients with renal cell cancer of various morphological types

N.E. Kushlinskii^{1,2} • O.V. Kovaleva¹ • A.G. Basov¹ • Yu.B. Kuzmin^{1,2} • A.A. Alferov^{1,2} • S.D. Bezhanova¹ • A.V. Kolpashchikov² • I.A. Klimanov¹ • A.N. Grachev¹ • N.N. Zybina³ • V.B. Matveev¹ • O.O. Yanushevich² • I.S. Stilidi¹

Background: Galectins are a family of β -galactoside binding proteins that regulate the vast majority of cellular functions, including proliferation, migration, adhesion, and phagocytosis in both health and disease. More and more experimental and clinical evidence indicates that galectins are involved in many stages of carcinogenesis, including patients with renal cell carcinoma (RCC).

Aim: To analyze the clinical significance of soluble forms of galectins -1, -3, -4, -7, -9 in patients with various histological RCC types.

Materials and methods: We performed a retrospective analysis of the clinical significance of galectins -1, -3, -4, -7, -9 in the serum of 140 RCC patients (84 with clear cell RCC (ccRCC), 38 with papillary (papRCC), 18 with chromophobe (chrRCC)) and in 73 healthy donors (control group), who were examined and treated from 2019 to 2023 in the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Galectin levels were measured in serum (obtained according to standard methods before the initiation of specific treatment) with an enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: There was a significant increase in serum galectin -1, -3, -9 levels in the whole RCC patient group, compared to the healthy donor control group; no increase was found for galectins -4 and -7. Serum galectin-1 levels in the ccRCC and papRCC patients were significantly higher than those in the controls ($p = 0.0003$ and $p = 0.0135$, respectively). No association between the serum galectins -1 and -7 and the clinical and morphological characteristics of RCC was found; however, serum galectin-7 levels in the papRCC patients correlated with the grade of tumor differentiation ($r = -0.592$; $p = 0.001$). The area under the ROC curve (AUC) for galectin-1 in ccRCC was 0.721 ($p < 0.0001$), in papRCC 0.673 ($p = 0.0086$), and in chrRCC 0.576 ($p = 0.355$). For galectin-7, the ROC AUC values were 0.527 ($p = 0.634$) in ccRCC, 0.513 ($p = 0.845$) in papRCC, and 0.566 ($p = 0.425$) in chrRCC. In all histological types of RCC,

there was a significant increase in serum galectin-3 compared to the controls (ccRCC, $p = 0.0208$; papRCC, $p = 0.0014$; chrRCC, $p = 0.0041$). The ROC analysis for galectin-3 in patients with RCC of various histological types showed AUC = 0.721 ($p < 0.0001$) for ccRCC, 0.673 ($p = 0.0086$) for papRCC, and 0.576 ($p = 0.355$) for chrRCC. Galectin-9 levels were directly and significantly associated with the tumor size, as well as with regional metastases ($r = 0.251$, $p = 0.021$; $r = 0.239$, $p = 0.028$, respectively). The AUC values for galectin-4 were 0.619 ($p = 0.021$) in ccRCC, 0.577 ($p = 0.214$) in papRCC, and 0.534 ($p = 0.666$) for chrRCC. For galectin-9, they were 0.649 ($p = 0.0075$), 0.613 ($p = 0.087$), and 0.539 ($p = 0.637$), respectively.

Conclusion: The study has demonstrated a certain association between serum galectin -1, -3, -4, -7, and -9 in the patients with RCC of various histological types. Although the results of the ROC analysis indicated average quality of the model, which does not allow for the use of the obtained data for diagnostic purposes, it is necessary to continue the research for better understanding of the mechanisms of galectin functioning, before galectin-based therapeutic agents would be introduced into clinical practice for the treatment of RCC.

Key words: renal cancer, galectins, galectin-1, galectin-3, galectin-4, galectin-7, galectin-9, serum, ROC analysis

For citation: Kushlinskii NE, Kovaleva OV, Basov AG, Kuzmin YuB, Alferov AA, Bezhanova SD, Kolpashchikov AV, Klimanov IA, Grachev AN, Zybina NN, Matveev VB, Yanushevich OO, Stilidi IS. The content of soluble forms of galectins -1, -3, -4, -7, -9 in patients with renal cell cancer of various morphological types. Almanac of Clinical Medicine. 2024;52(3):107–119. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-005.

Received 14 February 2024; revised 22 March 2024; accepted 3 April 2024; published online 8 April 2024

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contribution

N.E. Kushlinskii, V.B. Matveev, O.O. Yanushevich, I.S. Stilidi, the study concept and design, patient management, text editing; O.V. Kovaleva, A.G. Basov, A.N. Grachev, N.N. Zybina, analysis of the data obtained, statistical analysis, text writing; S.D. Bezhanova, histological examination of the tumor; Yu.B. Kuzmin, A.F. Alferov, A.V. Kolpashchikov, I.A. Klimanov, data collection, preparation of biological samples, analysis of the data obtained. 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.

Nikolay E. Kushlinskii – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Scientific Director of Clinical Diagnostic Laboratory, Consultative and Diagnostic Center¹; Head of Chair of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Faculty of Additional Professional Education²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>. E-mail: biochimia@yandex.ru

Olga V. Kovaleva – Doctor of Biol. Sci., Senior Research Fellow, Laboratory of Regulation of Cellular and Viral Oncogenes¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924> ✉ Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115522, Russian Federation. E-mail: ovkovaleva@gmail.com

Arseniy G. Basov – Deputy Chief Physician for Medical Affairs, Consultative and Diagnostic Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-9351-880X>. E-mail: arsbasovtmn@yandex.ru

Yurii B. Kuzmin – PhD (in Biol.), Medical Technologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Consultative and Diagnostic Center¹; Senior Assistant, Chair of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Faculty of Additional Professional Education²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9684-2509>. E-mail: yriikuzmin@yandex.com

Aleksandr A. Alferov – MD, PhD, Clinical Laboratory Diagnostics Doctor, Clinical Diagnostic Laboratory, Consultative and Diagnostic Center¹; Assistant Professor, Chair of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Faculty of Additional Professional Education²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3585-5693>. E-mail: aleksandr.alferov@yahoo.com

Svetlana D. Bezhanova – Pathologist, Department of Morbid Anatomy¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7336-9210>. E-mail: dmitrownaja@gmail.com

Aleksey V. Kolpashchikov – Clinical Laboratory Diagnostics Doctor, Chair of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Faculty of Additional Professional Education²; ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8784-3059>. E-mail: kolpaschikov@mail.ru

Igor A. Klimanov – MD, PhD, Head of Clinical Diagnostic Laboratory, Consultative and Diagnostic Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8593-1098>. E-mail: igorklimanov@yandex.ru

Alexey N. Grachev – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Laboratory of Tumor Stromal Cell Biology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>. E-mail: alexei.grachev@gmail.com

Natalia N. Zybina – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Department of Laboratory Diagnostics²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5422-2878>. E-mail: zybinan@inbox.ru

Vsevolod B. Matveev – MD, PhD, Professor, Corr. Member of Russ. Acad. Sci., Head of Department of Oncology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>. E-mail: v.matveev@ronc.ru

Oleg O. Yanushevich – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Rector²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0059-4980>. E-mail: nauch.ot@mail.ru

Ivan S. Stilidi – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Director³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>. E-mail: info@ronc.ru

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115522, Russian Federation

²Russian University of Medicine; ul. Delegatskaya 20/1, Moscow, 127473, Russian Federation

³The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine; ul. Akademika Lebedeva 4–2, Saint Petersburg, 194044, Russian Federation



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 биомолекул¹. 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

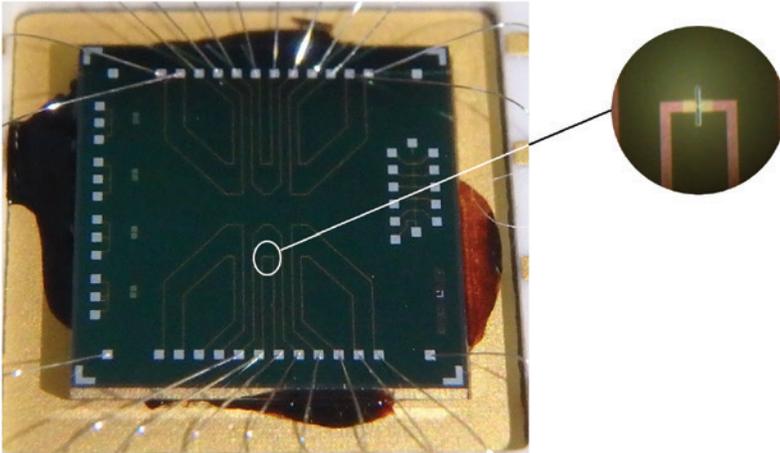


Рис. 1. Поверхность нанопроводного чипа. На выноске показано увеличенное оптическое изображение чувствительного элемента чипа (нанопровода)

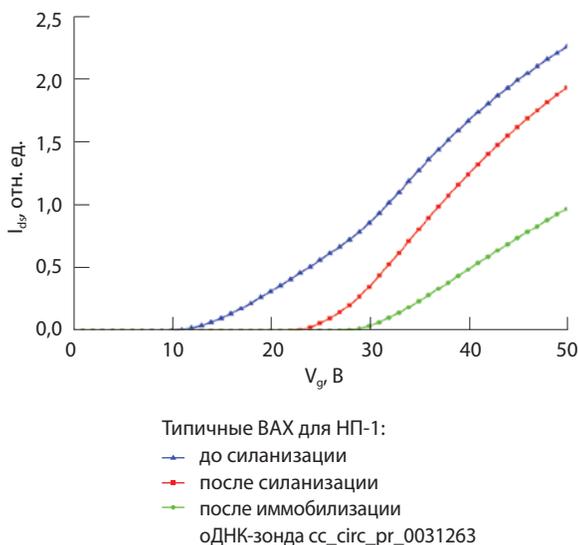


Рис. 2. Оценка эффективности силанизации нанопроводного чипа и иммобилизации ДНК-олигонуклеотидных зондов (оДНК-зондов) на поверхности чувствительного элемента чипа (нанопровода, НП) путем измерения вольт-амперных характеристик (ВАХ) НП-1; $I_{ср}$ (отн. ед.) – сила тока/сигнала между контактами НП-1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

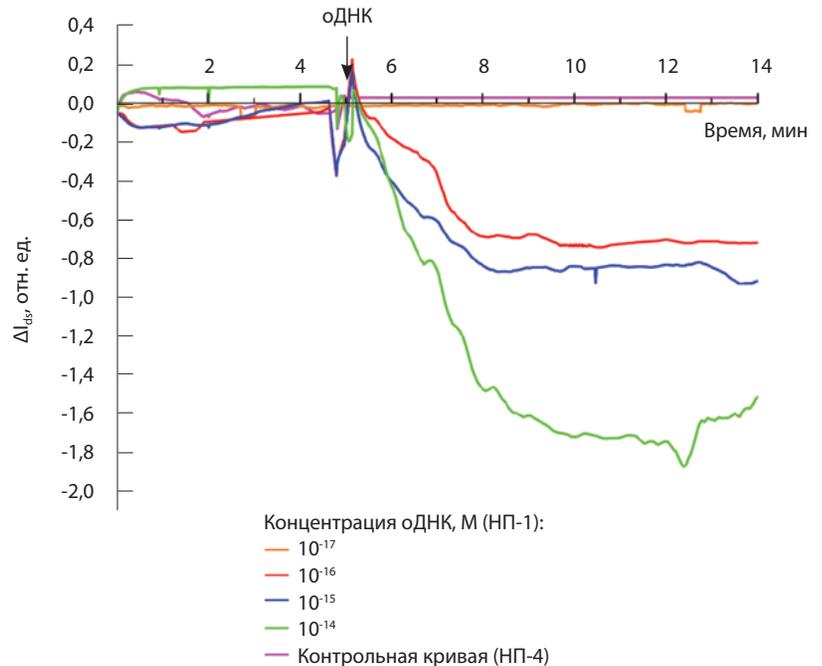


Рис. 3. Типичные зависимости сигнала (ΔI_{ds}) между контактами чувствительного элемента чипа (нанопровода, НП) с иммобилизованным ДНК-олигонуклеотидным зондом (оДНК-зондом) от времени, полученные в экспериментах с синтетическими модельными оДНК. Экспериментальные условия: концентрация модельной оДНК от 10^{-17} до 10^{-14} М; оДНК-зонд *probe_1*, комплементарный кольцевой РНК *hsa_circ_0031263*; 1 мМ 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 кольцРНК 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 № К193 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 кольцРНК, 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 кольцРНК. Напротив, при исследовании контрольного

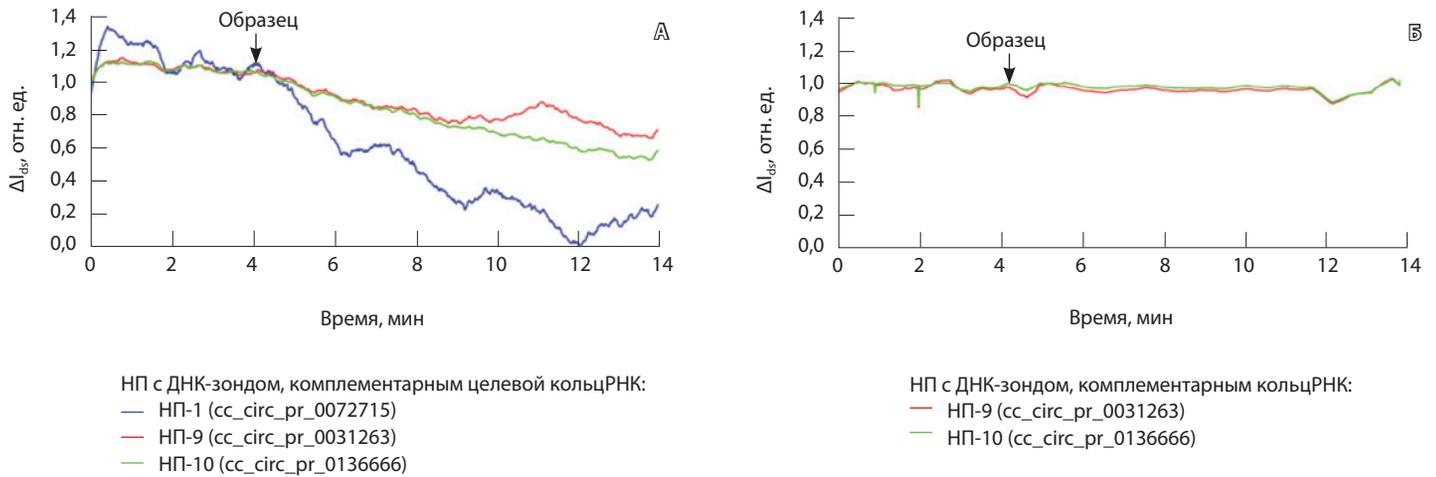


Рис. 4. Типичные зависимости сигнала (ΔI_{490}) между контактами чувствительных элементов нанопроводного (НП) чипа с иммобилизованными ДНК-олигонуклеотидными зондами (оДНК-зондами) от времени, полученные с помощью НП-чипа в экспериментах по обнаружению комплементарных кольцевых РНК (кольцРНК), выделенных 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, Dolotkazin 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, Bashiry-an 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



Оригинальная статья

Выявление активирующих соматических мутаций в гене *PIK3CA* в опухолях молочной железы и определение их минимального набора для клиничко-диагностического тестирования

Боярских У.А.¹ • Кечин А.А.¹ • Зюзюкина А.В.^{2,3} • Храпов Е.А.¹ • Оскорбин И.П.¹ • Алексеенок Е.Ю.¹ • Авдюк Г.А.⁴ • Зуков Р.А.^{2,3} • Кушлинский Н.Е.⁵ • Филипенко М.Л.¹

Обоснование. Для эффективного скрининга больных раком молочной железы с целью назначения таргетной терапии аллелисидом необходимо выявление активирующих соматических мутаций в гене *PIK3CA* методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР), для разработки которого требуется составить оптимальный список мутаций.

Цель – определение спектра соматических мутаций в гене *PIK3CA* в опухолях молочной железы методом таргетного высокопроизводительного секвенирования (англ. next generation sequencing, NGS) и установление их минимального набора для рутинного клиничко-диагностического тестирования методом аллель-специфичной ПЦР.

Материал и методы. Для определения мутаций в гене *PIK3CA* в ДНК, полученной из парафиновых блоков с опухолевым материалом 431 пациентки с гормонозависимым HER2-отрицательным (HR+HER2-) раком молочной железы, использовали таргетное NGS. Набор наиболее часто встретившихся соматических мутаций также детектировали с помощью аллель-специфичной ПЦР.

Результаты. Нами разработаны набор реагентов и протокол проведения таргетного NGS часто мутируемых районов генов *PIK3CA* и *ESR1*, который был применен для анализа образцов HR+HER2- рака молочной железы 431 пациентки. Клинически значимые активирующие мутации в гене *PIK3CA* выявлены в 32,7% (141/431) образцов. Частота мутантного аллеля варьировала в пределах 15–65%. Наиболее часто встретились 6 мутаций: с.3140A>G p.His1047Arg (69), с.1633G>A p.Glu545Lys (32), с.1035T>A p.Asn345Lys (12), с.1624G>A p.Glu542Lys (9), с.3140A>T p.His1047Leu (8), Cys420Arg с.1258T>C (3). В сумме эти мутации составили 94,3% (133/141). В 3,5% (15/431) образцов обнаружены клинически значимые соматические мутации в гене *ESR1* – с.1613A>G p.Asp538Gly (7), с.1610A>C p.Tyr537Ser (6), с.1609T>A p.Tyr537Asn (1), с.1610A>G p.Tyr537Cys (1), обуславливающие резистентность к гормональной терапии пациентов с раком молочной железы. Ввиду того что редкие мутации составили лишь 5,7% выборки, проведена валидация набора реагентов для детекции только 6 вышеперечисленных мутаций методом аллель-специфичной ПЦР. NGS и ПЦР показали полную конкордантность.

Заключение. ПЦР-тестирование активирующих соматических мутаций гена *PIK3CA* удовлетворяет требованиям к чувствительности (> 90%) и специфичности (100%) теста для клинического применения и может быть использовано при отборе пациентов для проведения таргетной терапии ингибиторами *PIK3CA*.

Ключевые слова: *PIK3CA*, NGS, аллель-специфичная полимеразная цепная реакция, рак молочной железы (РМЖ), соматические мутации

Для цитирования: Боярских УА, Кечин АА, Зюзюкина АВ, Храпов ЕА, Оскорбин ИП, Алексеенок ЕА, Авдюк ГА, Зуков РА, Кушлинский НЕ, Филипенко МЛ. Выявление активирующих соматических мутаций в гене *PIK3CA* в опухолях молочной железы и определение их минимального набора для клиничко-диагностического тестирования. Альманах клинической медицины. 2024;52(3):132–139. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-017.

Поступила 15.02.2024; доработана 06.05.2024; принята к публикации 23.07.2024; опубликована онлайн 04.09.2024



Фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3Ks) – группа липидкиназ, являющихся значимыми компонентами сигнальных путей, стимулирующих клеточную пролиферацию, адгезию, выживание и подвижность [1]. Сигнальный путь PI3K играет важную роль в онкогенезе. Нарушение его регуляции связано с развитием различных онкологических заболеваний. Среди генетических изменений этого сигнального пути наиболее известны потеря опухолевого супрессора *PTEN*, амплификация гена *AKT* и активирующие мутации в генах *PIK3CA* и *PIK3R1* [2].

Впервые соматические мутации гена *PIK3CA* при злокачественных опухолях человека описали Y. Samuels и соавт. [3]. Исследователи проанализировали нуклеотидные последовательности 8 PI3K и 8 PI3K-подобных генов первичных колоректальных опухолей и обнаружили, что *PIK3CA* был единственным геном, содержащим соматические мутации. Соматические мутации в гене *PIK3CA*, кодирующем каталитическую субъединицу p110α PI3K, наиболее часто встречаются при раке эндометрия и раке молочной железы (РМЖ) – до 50 и 40% случаев соответственно – и присутствуют более чем при половине всех солидных опухолей человека, но в меньшем проценте [4].

Соматические мутации гена *PIK3CA* могут быть разделены на 4 класса, определяемых 4 доменами каталитической субъединицы, в которых они встречаются: домен-адаптер (ABD), домен C2, спиральный домен и каталитический домен [5].

Большинство мутаций локализуется в 3 кодонах: E542 и E545 – в спиральном домене (экзон 9), H1047 – в киназном домене (экзон 20). E542 и E545 обычно заменяются на лизин, тогда как H1047 часто замещается аргинином. Мутации *PIK3CA* усиливают сигнал PI3K, стимулируют последующую передачу сигнала на АКТ, что способствует росту опухоли, и повышают клеточную инвазию и метастазирование [5].

В силу того что нарушение регуляции сигнального пути PI3K является одним из наиболее частых драйверных мутационных событий при многих видах рака человека, воздействие на отдельные компоненты этого пути, и в первую очередь на *PIK3CA*, может быть потенциальным терапевтическим средством при различных злокачественных новообразованиях [6]. Эта идея в течение двух десятилетий активных поисков стимулировала разработку почти сотни ингибиторов сигнального каскада PI3K, которые в настоящее время проходят различные фазы клинических испытаний [7, 8]. Среди них можно выделить алпелисиб – низкомолекулярный специфический ингибитор *PIK3CA* [9]. В мае 2019 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (англ. Food and Drug Administration, FDA) по результатам III фазы рандомизированного исследования SOLAR-1 одобрило алпелисиб для лечения пациентов с позитивным по экспрессии гормональных рецепторов и негативным по амплификации гена *HER2* (HR+/HER2-) РМЖ с активирующими

Боярских Ульяна Александровна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории фармакогеномики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5660-2276>.

✉ 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8, Российская Федерация.
E-mail: boyarskih.u@gmail.com

Кечин Андрей Андреевич – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории фармакогеномики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4822-0251>.
E-mail: a.a.kechin@gmail.com

Зююкина Алена Владимировна – канд. мед. наук, врач-онколог²; доцент кафедры онкологии и лучевой терапии с курсом последипломного образования³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6758-4800>.
E-mail: alena-vz@mail.ru

Храпов Евгений Александрович – мл. науч. сотр. лаборатории фармакогеномики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0991-5349>. E-mail: khrap80@gmail.com

Оскорбин Игорь Петрович – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории фармакогеномики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3754-5824>.
E-mail: osc.igor@gmail.com

Алексеенок Ефим Юрьевич – ст. лаборант лаборатории фармакогеномики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7850-7931>.
E-mail: alekseenokefim@gmail.com

Авдюк Галина Александровна – канд. мед. наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета⁴; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-0264-9377>. E-mail: galasoft@bk.ru

Зуков Руслан Александрович – д-р мед. наук, профессор, главный врач²; зав. кафедрой онкологии и лучевой терапии с курсом ПО³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7210-3020>.
E-mail: zukov_rus@mail.ru

Кушлинский Николай Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель клиничко-диагностической лаборатории консультативно-диагностического центра⁵; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>.
E-mail: biochimia@yandex.ru

Филипенко Максим Леонидович – д-р биол. наук, зав. лабораторией фармакогеномики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8950-5368>.
E-mail: mfilipenko@gmail.com

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук; 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8, Российская Федерация

² КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского»; 660133, г. Красноярск, ул. 1-я Смоленская, 16, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1, Российская Федерация

⁴ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52, Российская Федерация

⁵ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

мутациями *PIK3CA* [10]. Вместе с алпелисибом был также одобрен сопутствующий диагностический тест *therascreen PIK3CA* (QIAGEN, ФРГ) для отбора пациентов с мутациями *PIK3CA* с использованием образцов опухолевой ткани или образцов плазмы для анализа циркулирующей опухолевой ДНК. В основу дизайна набора *therascreen PIK3CA*, по-видимому, были положены данные спектра мутаций *PIK3CA* в различных типах опухолей. Он позволяет выявлять 11 мутаций в экзонах 9 и 20 гена *PIK3CA*.

Значительный прогресс в технологии секвенирования ДНК привел к резкому увеличению числа случаев обнаружения новых мутаций *PIK3CA*, в том числе не локализованных в экзонах 9 и 20. Закономерно возник вопрос о чувствительности диагностического теста *therascreen PIK3CA* и других появляющихся на рынке наборов реагентов для обнаружения соматических мутаций гена *PIK3CA*. Чтобы ответить на него, необходима информация о полном спектре соматических мутаций этого гена, полученных методом секвенирования. Систематических исследований соматических изменений гена *PIK3CA* у больных РМЖ в Российской Федерации не проводилось.

Цель исследования – определение спектра соматических мутаций в гене *PIK3CA* в опухолях молочной железы методом таргетного высокопроизводительного секвенирования (англ. *next generation sequencing*, NGS) и установление их минимального набора для рутинного клинико-диагностического тестирования методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Материал и методы

Клинический материал

В исследовании использованы образцы ДНК, выделенные из парафиновых блоков с опухолевой тканью 381 больной с различными стадиями РМЖ, проходивших молекулярно-генетическое тестирование в Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН) в 2019–2021 гг. Из них 46 пациенток получали неоадъювантную гормональную терапию. Проанализированы также образцы ДНК из парафиновых блоков с опухолевой тканью 71 больной РМЖ, которые получали комплексное лечение в КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» (КГБУЗ «КККОД им. А.И. Крыжановского») с 2017 по 2020 г.

Проведение исследования одобрено этическим комитетом ИХБФМ СО РАН (протокол № 2 от 25.02.2018) и локальным этическим комитетом

КГБУЗ «КККОД им. А.И. Крыжановского» (протокол № 6 от 22 марта 2016 г.). Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение ДНК проводили с помощью QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, ФРГ) согласно инструкции компании-производителя.

Таргетное высокопроизводительное секвенирование

Олигонуклеотидные праймеры для амплификации часто мутирующих областей гена *PIK3CA*, а также часто встречающихся соматических мутаций в генах *AKT1*, *CDH1*, *ERBB2*, *ESR1*, *GNAS*, *IRF5*, *SF3B1* и *KEAP1* были разработаны программой NGS-PrimerPlex [11]. Всего в NGS-панель вошли 24 пары праймеров, распределенных по двум мультиплексным реакциям (таблица). NGS-библиотеки были приготовлены при помощи двухстадийной ПЦР, при которой на первом этапе происходит наработка ген-специфичных последовательностей с праймеров, содержащих адаптеры на 5'-конце, а на втором – встройка индексированных последовательностей с адаптерами для секвенирования технологией Illumina [12]. Секвенирование проводили на приборе MiniSeq Illumina с использованием картриджа MiniSeq Mid Output Kit 300 cycles (Illumina, США). Анализ NGS-данных был выполнен по протоколу, описанному ранее [13], с добавлением аннотации выявленных вариантов по базе данных COSMIC (release 70) [14].

Анализ соматических мутаций гена *PIK3CA* методом мультиплексной аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Для детекции соматических мутаций гена *PIK3CA* методом мультиплексной аллель-специфичной ПЦР применяли набор реагентов HUM-PIK3CA-AS-1 производства ИХБФМ СО РАН. Использовали 10–50 нг ДНК на реакцию, амплификацию осуществляли в термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США). Для каждого образца анализ проводили в двух повторах. Для анализа вычисляли *dCqMUT* по формуле:

$$dCqMUT = Cq\text{-mutation} - CqNORM,$$
где *Cq-mutation* – *Cq*, полученное при амплификации тестируемой ДНК с аллель-специфичным праймером для мутации, а *CqNORM* – *Cq*, полученное при амплификации контрольного однокопийного локуса ДНК.

Полученное значение *dCqMUT* сравнивали с критическими значениями, приведенными



Информация о праймерах, вошедших в таргетную NGS-панель для секвенирования гена *PIK3CA*

Прямой праймер	Обратный праймер	Хромосома	Начало	Конец	Кодоны <i>PIK3CA</i> или ген
AGAATGTTTACTACCAAATGGAATGA	AAATAGTTCATGCTTTATGTTATTAATGTAG	3	178916679	178916763	32–39
AGATGAATCTTCTTACATTTTCGTA	GGGTTGAAAAAGCCGAAG	3	178916802	178916904	73–90
ACAAGACGACTTTGTGACCT	CTCGATTGAGGATCTTTCTTC	3	178916869	178916959	93–118
AAGTAATTGAACCAAGTAGGCAAC	TTGCATTTAGAAATAGGATATTGTATCATAAC	3	178916912	178916996	93–118
ATGCTGTGTATGTAATAGAATGTTATATTC	ATCAAATTCACACACTGGCATG	3	178917428	178917512	118–121
GTGCACTCAGAATAAAAAATCTTTGTG	GCATCAGCATTTGACTTTACCTT	3	178921513	178921597	342–351
CTTATGTGACAATGTGAACACTCAA	ATAACCTTTGAAAATATAAATCTATATACTTCCT	3	178922329	178922413	376–381
TGAAATGTGTTTTATAATTAGACTAGTGA	AGTTTATATTTCCCATGCCAA	3	178927922	178928007	420
AATGGCTTTGAATCTTTGGCCA	ATTTGATCCAGTAACACCAATAGGG	3	178928042	178928117	449–464
GTACCTCATGGATTAGAAGATTTGCTG	TTTATGACAATAAAACCTTACTTTATTTGGA	3	178928064	178928148	449–464
CTCAAAGCAATTTCTACACGAGA	TAGCACTTACCTGTGACTCC	3	178936049	178936132	539–551
TGTTTATTTGTTTCTCCACACA	TTCCATTTAACAGACAGAAGCAATT	3	178936959	178937043	558–566
TGGAAAAGCTCATTAACTTAAGTGA	AAACACAACTAGAGTCACACAC	3	178938884	178938968	713–728
CAGCATGCCAATCTTTCATAAAT	ATGCAATGTCATCAAAGATTGTAGTT	3	178951922	178952006	1002–1010
GCAAGAGGCTTTGGAGTATTTTC	GGAAGATCCAATCCATTTTTG	3	178952041	178952123	1041–1049
GGAGGAAGTAGCGTGGCCG	TGGCGAGGGTCTGACGGGTA	14	105246515	105246609	<i>AKT1</i>
GGTTCATCTACCTTTCCCC	GCGTCAAAGCCAGGGTG	16	68772172	68772252	<i>CDH1</i>
AATGTGAAAATCCAGTGGCCA	GGGGCTTACGTCTAAGATTTCTTT	17	37880189	37880272	<i>ERBB2</i>
CCCATACCTCTCAGCGTAC	CCAGAAGCGGGAGACATAT	17	37880947	37881030	<i>ERBB2</i>
CAGCATGAAGTGAAGAACG	GGCTAGTGGGCGCATGTA	6	152419891	152419976	<i>ESR1</i>
TTGGCTTTGGTGAAGTCCATT	TCTCAAAGATTCCAGAAGTCAGGA	20	57484365	57484447	<i>GNAS</i>
TTTACTCAAAGAGGATGCAAGTGGC	CTGCAGAGTGGGCGGCT	7	128587321	128587375	<i>IRF5</i>
TTTGCCCGTCAAAGCCC	CCAATGCTGACACGAAGGAT	19	10600410	10600492	<i>KEAP1</i>
AATGGCCAAAGCACTGATGG	TGGGGCATAGTTAAACCTGT	2	198266805	198266889	<i>SF3B1</i>

NGS (next generation sequencing) – высокопроизводительное секвенирование; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Последовательности праймеров указаны в направлении 5'→3'. Столбцы «Начало» и «Конец» обозначают координаты ПЦР-продукта на хромосоме 3 референсного генома человека сборки hg19

в инструкции к набору реагентов. В случае их меньшего значения делали заключение о наличии соответствующей мутации.

Статистический анализ

Для оценки статистической значимости различий распределения соматических мутаций использовали таблицы сопряженности и критерий хи-квадрат Пирсона в программе MedCalc V22.023.

Результаты

Выявление соматических мутаций гена *PIK3CA* в образцах ДНК рака молочной железы методом таргетного высокопроизводительного секвенирования

Выделена ДНК из 452 парафиновых блоков с операционным материалом больных HR+HER- РМЖ. По результатам анализа количества и качества ДНК, проведенного с помощью количественной амплификации двух локусов из ядерного генома – *RPP30* и *ALB* (размеры ампликонов 68 и 105 п.н. соответственно), 21 образец оказался непригоден для таргетного NGS ввиду значительного уменьшения доли длинного ампликона *ALB*, что свидетельствует о деградации ДНК. Таким образом, NGS-анализ выполнен для 431 образца ДНК. При секвенировании добивались не менее чем 500-кратного прочтения анализируемых областей ДНК. В результате была выявлена 141 клинически значимая активирующая мутация в гене *PIK3CA* (32,7% образцов, 141/431):

- H1047R – 69;
- E545K – 32;
- N345K – 12;
- E542K – 9;
- H1047L – 8;
- C420R – 3;
- G1049R – 2;
- E545G – 1;
- Q546L – 1;
- Q546E – 1;
- R88Q – 1;
- R108H – 1;
- M1004I – 1.

Частота обнаружения мутантного аллеля варьировала в пределах 15–65%. Наиболее часто встречались 6 мутаций – с.3140A>G p.His1047Arg (69), с.1633G>A p.Glu545Lys (32), с.1035T>A p.Asn345Lys (12), с.1624G>A p.Glu542Lys (9), с.3140A>T p.His1047Leu (8), Cys420Arg с.1258T>C (3). В сумме эти мутации составили 94,3% (133/141). В 5 случаях мы наблюдали 2 соматические мутации в одном образце с сопоставимой долей. В 3,5% случаев (15/431) выявлены клинически значимые соматические

мутации в гене *ESR1* – с.1613A>G p.Asp538Gly (7), с.1610A>C p.Tyr537Ser (6), с.1609T>A p.Tyr537Asn (1), с.1610A>G p.Tyr537Cys (1), вызывающие резистентность к гормональной терапии пациентов с РМЖ. Из них 6 мутаций обнаружены у пациентов, получавших неоадъювантную гормональную терапию. Таким образом, встречаемость активирующих соматических мутаций в гене *ESR1* у нелеченых пациентов составила 2,3% (9/391). Не наблюдалось статистически значимой ассоциации между наличием мутации *PIK3CA* и *ESR1* (4 ESR1m+/141PIK3Cm+ против 11 ESR1m+/290 PIK3Cm+, $p > 0,8$).

Выявление соматических мутаций гена *PIK3CA* в образцах ДНК рака молочной железы методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции

Использованный в работе набор реагентов HUM-PIK3CA-AS-1 позволяет с помощью мультиплексной аллель-специфичной ПЦР выявлять мутации с.3140A>G p.His1047Arg, с.1633G>A p.Glu545Lys, с.1035T>A p.Asn345Lys, с.1624G>A p.Glu542Lys, с.3140A>T p.His1047Leu, Cys420Arg с.1258T>C – наиболее частые из мутаций, определенных в нашей выборке методом таргетного NGS. Нами проведена валидация данного набора реагентов на анализируемой выборке образцов. В данном случае мы не отбраковывали 21 образец ДНК, которые оказались непригодны для NGS. Из них 17 образцов нормально прошли анализ, в них были дополнительно выявлены мутации с.3140A>G p.His1047Arg (4) и с.1633G>A p.Glu545Lys (1). Установлены все положительные по результатам NGS образцы ДНК, в том числе с двойной мутацией p.His1047Arg/p.Cys420Arg. Аллель-специфичная ПЦР также показала наличие 3 дополнительных образцов с мутацией. При детальном анализе данных NGS мы поняли, что эти образцы были отсеяны в биоинформационном анализе ввиду малого (менее 5%) количества прочтений с мутацией. В то же время чувствительность аллель-специфичной ПЦР была заявлена на уровне 2% мутантного аллеля. Таким образом, данный метод характеризуется 100% чувствительностью в выявлении 6 частых мутаций относительно «золотого стандарта» NGS.

Обсуждение

Полученные нами данные о спектре и частоте активирующих соматических мутаций в гене *PIK3CA* могут иметь важное значение для организации рутинного клинико-диагностического тестирования в России. Безусловно, NGS все шире внедряется в клиническую практику. Например, некоторые



NGS-тесты, одобренные для клинического использования, такие как Foundation One CDx (Foundation Medicine Inc., США) или Guardant360 (Guardant Health, США), позволяют анализировать большинство или все экзоны гена *PIK3CA*. Весьма вероятно, что благодаря идентификации редких мутаций увеличится число пациентов, которым может быть рекомендована таргетная терапия. Вместе с тем важен потенциальный ответ пациентов с такими мутациями на терапию алпелисибом. Например, мутация N345K, которая составила 8,5% от всех мутаций *PIK3CA* в анализируемой нами выборке, не входит в зарегистрированный набор реагентов *therascreen PIK3CA* и не изучалась в клиническом исследовании SOLAR-1 [10]. Достаточно ли нам функциональных преклинических исследований, которые показывают ее явный онкогенный эффект? В любом случае функциональные характеристики и клиническое значение редких мутаций в пути PI3K еще предстоит выяснить. И хотя анализ *in silico* может предсказать влияние мутации на фолдинг и сохранение функции белка, необходимы более надежные доказательства биологических эффектов редких соматических мутаций в гене *PIK3CA* [2]. Все вышесказанное в значительной степени определяет целесообразность включения редких мутаций в схемы клинико-диагностического тестирования.

Ранее было показано существование двойных функциональных мутаций гена *PIK3CA* в 12% всех случаев с мутацией [15]. Двойные мутации вызывают большее повышение активности белка PI3K по сравнению с одиночными. Эти сложные мутации, по-видимому, определяют повышенную чувствительность опухолевых клеток к PI3K альфа-специфичным ингибиторам в доклинических моделях, а также у отдельных пациентов с РМЖ, получавших лечение в ранней фазе клинических исследований [15]. В нашей работе мы также детектировали двойные мутантные последовательности гена *PIK3CA* с сопоставимой частотой альтернативного аллеля (30–55%), но с более низкой частотой встречаемости – 2,1% (3/141).

Полученные нами данные демонстрируют относительно малый вклад редких мутаций в общий пул – всего 4,7%. Исследования, проведенные в других странах с участием представителей других этнических групп, показывают несколько большую частоту встречаемости редких мутаций *PIK3CA* [16]. Так, в широкомасштабном исследовании, проведенном в КНР с применением NGS, 5 частых мутаций гена *PIK3CA* составили 73% от общего количества: H1047R (35%), E545K (17%), E542K (11%), N345K (6%) и H1047L (4%) [16].

Наше исследование имеет явные ограничения: относительно небольшой объем анализируемой выборки и NGS только части гена *PIK3CA*. Возможно, расширение выборки увеличит как спектр, так и процент редких мутаций. Тем не менее данные нашего исследования пока вполне оправдывают применение для клинического тестирования более простых, чем NGS, методов. Из них сегодня самым распространенным является аллель-специфичная ПЦР, которая уже много лет используется в реальной клинической практике для обнаружения соматических мутаций. Для проведения аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени в клинико-диагностической лаборатории не требуется дорогостоящего оборудования, и исследование занимает меньше времени, чем секвенирование. В нашей работе аллель-специфичная ПЦР также показала большую эффективность анализа ДНК из парафиновых блоков: 4 невалидных образца ДНК против 21 невалидного образца для NGS. Это в значительной степени обусловлено минимизацией размеров ампликонов (менее 80 п.н.) и, как следствие, более эффективным использованием деградированной ДНК. За счет мультиплексирования возможно снизить стоимость и повысить удобство постановки, а стандартизация методики сокращает время получения результата, что позволяет рекомендовать данную методику для рутинного применения в клинико-диагностической лаборатории.

Использованная для секвенирования панель также позволила проанализировать область частых мутаций в гене *ESR1* (536–538-й кодоны). Показано, что активирующие мутации этого гена в основном возникают в процессе прогрессирования опухоли и в результате гормональной терапии [17]. Частота первичных мутаций у нелеченых пациентов, описанная в литературе, составляет около 1% и значительно варьирует (12–55%) для метастатических опухолей [18, 19]. В нашем исследовании высокий процент (2,3%) мутаций резистентности у нелеченых пациентов может быть объяснен особенностями формирования выборки. Требуются дальнейшие исследования на более полно охарактеризованных образцах, полученных от больных РМЖ, для определения частоты встречаемости этих мутаций.

Заключение

В настоящей работе определен спектр соматических мутаций в гене *PIK3CA* при помощи таргетного NGS. Показано, что 6 частых мутаций составляют значительную долю и могут быть использованы для их выявления методом аллель-специфичной ПЦР, характеризующимся простотой и низкой



стоимостью. Использование аллель-специфичной ПЦР позволяло проанализировать большее количество ДНК с низким качеством ввиду большей устойчивости теста. Применение набора HUM-PIK3CA-AS-1 показало полную конкордантность

с таргетным NGS и может быть рекомендовано для использования в рутинной клинической практике с целью стратификации больных РМЖ для последующей таргетной терапии ингибиторами PIK3CA. 

Дополнительная информация

Финансирование

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300045-2.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

У.А. Боярских, Е.А. Храпов, И.П. Оскорбин, Е.Ю. Алексеенко – проведение экспериментов, редактирование текста; А.А. Кечин – биоинфор-

мационная обработка полученных данных, редактирование текста; А.В. Зюзюкина, Р.А. Зуков, Г.А. Авдюк – сбор клинического материала, ведение больных, анализ историй болезни, редактирование текста; Н.Е. Кушлинский – концепция исследования, утверждение итогового варианта рукописи; М.Л. Филипенко – концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста. 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

1. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K pathway in human disease. *Cell*. 2017;170(4):605–635. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.029.
2. Chen L, Yang L, Yao L, Kuang XY, Zuo WJ, Li S, Qiao F, Liu YR, Cao ZG, Zhou SL, Zhou XY, Yang WT, Shi JX, Huang W, Hu X, Shao ZM. Characterization of PIK3CA and PIK3R1 somatic mutations in Chinese breast cancer patients. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–17. doi: 10.1038/s41467-018-03867-9.
3. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004;304(5670):554. doi: 10.1126/science.1096502.
4. Alqahtani A, Ayesh HSK, Halawani H. PIK3CA gene mutations in solid malignancies: Association with clinicopathological parameters and prognosis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1):1–18. doi: 10.3390/cancers12010093.
5. Jenkins ML, Ranga-Prasad H, Parson MAH, Harris NJ, Rathinaswamy MK, Burke JE. Oncogenic mutations of PIK3CA lead to increased membrane recruitment driven by reorientation of the ABD, p85 and C-terminus. *Nat Commun*. 2023;14(1):1–14. doi: 10.1038/s41467-023-35789-6.
6. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer*. 2019;18(1):26. doi: 10.1186/s12943-019-0954-x.
7. Belli C, Repetto M, Anand S, Porta C, Subbiah V, Curigliano G. The emerging role of PI3K inhibitors for solid tumour treatment and beyond. *Br J Cancer*. 2023;128(12):2150–2162. doi: 10.1038/s41416-023-02221-1.
8. Faes S, Dornmond O. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):21138–21152. doi: 10.3390/ijms160921138.
9. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, Iwata H, Conte P, Mayer IA, Kaufman B, Yamashita T, Lu YS, Inoue K, Takahashi M, Pápai Z, Longin AS, Mills D, Wilke C, Hirawat S, Juric D; SOLAR-1 Study Group. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(20):1929–1940. doi: 10.1056/NEJMoa1813904.
10. André F, Ciruelos EM, Juric D, Loibl S, Campone M, Mayer IA, Rubovszky G, Yamashita T, Kaufman B, Lu YS, Inoue K, Pápai Z, Takahashi M, Ghaznavi F, Mills D, Kaper M, Miller M, Conte PF, Iwata H, Rugo SH. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Ann Oncol*. 2021;32(2):208–217. doi: 10.1016/j.annonc.2020.11.011.
11. Kechin A, Borobova V, Boyarskikh U, Khrapov E, Subbotin S, Filipenko M. NGS-PrimerPlex: high-throughput primer design for multiplex polymerase chain reactions. *PLoS Comput Biol*. 2020;16(12):e1008468. doi: 10.1371/journal.pcbi.1008468.
12. Boyarskikh UA, Gulyaeva LF, Avdalyan AM, Kechin AA, Khrapov EA, Lazareva DG, Kushlinskii NE, Melkonyan A, Arakelyan A, Filipenko LM. Spectrum of TP53 mutations in BRCA1/2 associated high-grade serous ovarian cancer. *Front Oncol*. 2020;10:1103. doi: 10.3389/fonc.2020.01103.
13. Kechin A, Khrapov E, Boyarskikh U, Kel A, Filipenko M. BRCA-analyzer: Automatic workflow for processing NGS reads of BRCA1 and BRCA2 genes. *Comput Biol Chem*. 2018;77:297–306. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.10.012.
14. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, Boutselakis H, Cole CG, Creatore C, Dawson E, Fish P, Harsha B, Hathaway C, Jupe SC, Kok CY, Noble K, Ponting L, Ramshaw CC, Rye CE, Speedy HE, Stefancsik R, Thompson SL, Wang S, Ward S, Campbell PJ, Forbes SA. COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D941–D947. doi: 10.1093/nar/gky1015.
15. Vasan N, Razavi P, Johnson JL, Shao H, Shah H, Antoine A, Ladewig E, Gorelick A, Lin TY, Toska E, Xu G, Kazmi A, Chang MT, Taylor BS, Dickler MN, Jhaveri K, Chandraratnam S, Rabadan R, Reznik E, Smith ML, Sebra R, Schimmoller F, Wilson TR, Friedman LS, Cantley LC, Scaltriti M, Baselga J. Double PIK3CA mutations in CIS increase oncogenicity and sensitivity to PI3Kα inhibitors. *Science*. 2020;366(6466):714–723. doi: 10.1126/science.aaw9032.
16. Huang Q, Zhou Y, Wang B, Zhao Y, Zhang F, Ding B. Mutational landscape of pan-cancer patients with PIK3CA alterations in Chinese population. *BMC Med Genomics*. 2022;15(1):146. doi: 10.1186/s12920-022-01297-7.
17. Grinshpun A, Chen V, Sandusky ZM, Fanning SW, Jeselsohn R. ESR1 activating mutations: From structure to clinical application. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2023;1878(1):188830. doi: 10.1016/j.bbcan.2022.188830.
18. Dahlgren M, George AM, Brueffer C, Gladchuk S, Chen Y, Vallon-Christersson J, Hegardt C, Häkkinen J, Rydén L, Malmberg M, Larsson C, Grubberg-Saal SK, Ehinger A, Loman N, Borg Å, Saal LH. Preexisting somatic mutations of estrogen receptor alpha (ESR1) in early-stage primary breast cancer. *JNCI Cancer Spectr*. 2021;5(2):pkab028. doi: 10.1093/jncics/pkab028.
19. Kinslow CJ, Tang A, Chaudhary KR, Cheng SK. Prevalence of estrogen receptor alpha (ESR1) somatic mutations in breast cancer. *JNCI Cancer Spectr*. 2022;6(5):kac060. doi: 10.1093/jncics/pkac060.



Identification of activating somatic mutations in the *PIK3CA* gene in breast tumors and determination of their minimal set for clinical diagnostic testing

U.A. Boyarskih¹ • A.A. Kechin¹ • A.V. Zyuzukina^{2,3} •
E.A. Khrapov¹ • I.P. Oskorbin¹ • E.Yu. Alekseenok¹ •
G.A. Avdiyuk⁴ • R.A. Zukov^{2,3} • N.E. Kushlinskii⁵ •
M.L. Filipenko¹

Background: For effective screening of breast cancer patients for candidates for target therapy with alpelisib, it is necessary to identify activating somatic mutations in the *PIK3CA* gene by allele specific polymerase chain reaction (PCR); this requires that an optimal list of mutations should be compiled.

Aim: To determine the spectrum of somatic mutations in the *PIK3CA* gene in breast cancer tumors by means of high performance sequencing (next generation sequencing, NGS) and to identify their minimal set for clinical diagnostic testing by allele specific PCR.

Methods: Targeted NGS was used to identify mutations in the *PIK3CA* gene in DNA obtained from paraffin blocks with tumor material from 431 patients with HR+HER2- breast cancer. A set of the most common somatic mutations was also detected by allele specific PCR.

Results: We have developed a set of reagents and a protocol for targeted NGS of frequently mutating regions of the *PIK3CA* and *ESR1* genes, which was used to analyze samples from 451 HR+/HER2- breast cancer patients. Clinically significant activating mutations in the *PIK3CA* gene were found in 32.7% of the samples (141/431). The frequency of the mutant allele ranged from 0.15 to 0.65. Six mutations were most common: c.3140A>G p.His1047Arg (69), c.1633G>A p.Glu545Lys (32), c.1035T>A p.Asn345Lys (12), c.1624G>A p.Glu542Lys (9), c.3140A>T p.His1047Leu (8), Cys420Arg c.1258T>C (3). In total, these mutations amounted to 94.3% (133/141). In 3.5% of

the samples (15/431), there were clinically significant somatic mutations in the *ESR1* gene: c.1613A>G p.Asp538Gly (7), c.1610A>C p.Tyr537Ser (6), c.1609T>A p.Tyr537Asn (1), c.1610A>G p.Tyr537Cys (1), causing resistance to hormone therapy in patients with breast cancer. While rare mutations comprised only 5.7% of our sample, we validated a set of reagents to identify the six mutations described above by allele specific PCR. NGS and PCR were completely concordant.

Conclusion: PCR testing of activating somatic mutations of the *PIK3CA* gene meets the requirements for sensitivity (> 90%) and specificity (100%) for a clinical test and can be used in the selection of patients for targeted therapy with PIK3CA inhibitors.

Key words: PIK3CA, NGS, allele specific polymerase chain reaction, breast cancer, somatic mutations

For citation: Boyarskih UA, Kechin AA, Zyuzukina AV, Khrapov EA, Oskorbin IP, Alekseenok EYu, Avdiyuk GA, Zukov RA, Kushlinskii NE, Filipenko ML. Identification of activating somatic mutations in the *PIK3CA* gene in breast tumors and determination of their minimal set for clinical diagnostic testing. Almanac of Clinical Medicine. 2024;52(3):132–139. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-017.

Received 15 February 2024; revised 06 May 2024; accepted 23 July 2024; published online 4 September 2024

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contribution

U.A. Boyarskih, E.A. Khrapov, I.P. Oskorbin, E.Yu. Alekseenok, experimental studies, text editing; A.A. Kechin, bioinformatical data analysis, text editing; A.V. Zyuzukina, R.A. Zukov, G.A. Avdiyuk, clinical data collection, patient management, analysis of the medical files, text editing; N.E. Kushlinskii, the study concept, approval of the final version of the manuscript; M.L. Filipenko, the study concept and design, data analysis, text writing. 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.

Ulyana A. Boyarskih – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Pharmacogenomics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5660-2276>.
✉ Pr. Akademika Lavrentyeva 8, Novosibirsk, 630090, Russian Federation.
E-mail: boyarskih.u@gmail.com

Andrey A. Kechin – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Pharmacogenomics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4822-0251>.
E-mail: a.a.kechin@gmail.com

Alyona V. Zyuzukina – MD, PhD, Oncologist², Associate Professor, Chair of Oncology and Radiation Therapy with Postgraduate Course³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6758-4800>.
E-mail: alena-vz@mail.ru

Yevgeny A. Khrapov – Junior Research Fellow, Laboratory of Pharmacogenomics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0991-5349>.
E-mail: khrap80@gmail.com

Igor P. Oskorbin – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Pharmacogenomics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3754-5824>.
E-mail: osc.igor@gmail.com

Yefim Yu. Alekseenok – старший лаборант, Laboratory of Pharmacogenomics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7850-7931>.
E-mail: alekseenokefim@gmail.com

Galina A. Avdiyuk – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Obstetrics and Gynecology of the Medical Faculty⁴; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-0264-9377>. E-mail: galasoft@bk.ru

Ruslan A. Zukov – MD, PhD, Professor, Chief Physician², Head of Chair of Oncology and Radiation Therapy⁵; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7210-3020>. E-mail: zukov_rus@mail.ru

Nikolay E. Kushlinskii – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Scientific Director of the Clinical Diagnostic Laboratory, Consultative and Diagnostic Center⁵; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>. E-mail: biochimia@yandex.ru

Maksim L. Filipenko – Doctor of Biol. Sci., Head of the Laboratory of Pharmacogenomics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8950-5368>.
E-mail: mlfilipenko@gmail.com

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; pr. Akademika Lavrentyeva 8, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

²A.I. Kryzhanovskiy Krasnoyarsk Regional Clinical Oncological Dispensary; ul. 1ya Smolenskaya 16, Krasnoyarsk, 660133, Russian Federation

³Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, ul. Partizana Zheleznaya 1, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

⁴Novosibirsk State Medical University; Krasny pr. 52, Novosibirsk, 630091, Russian Federation

⁵N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115522, Russian Federation



Оригинальная статья

Взаимосвязь показателей клинического анализа крови и стероидного метаболома мочи у больных с объемными образованиями надпочечников

Ворохобина Н.В.¹ • Калугина В.В.¹ • Великанова Л.И.¹ • Шафигуллина З.Р.¹ • Малеваная Е.В.¹ • Лисицын А.А.¹

Ворохобина Наталья Владимировна – д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой эндокринологии им. акад. В.Г. Баранова¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9574-105X>. E-mail: natvorokh@mail.ru

Калугина Валентина Викторовна – аспирант кафедры эндокринологии им. акад. В.Г. Баранова¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2812-6911>. E-mail: kaluginavav@gmail.com

Великанова Людмила Иосифовна – д-р биол. наук, профессор, заведующая научно-исследовательской лабораторией хроматографии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9352-4035>

✉ 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кировная, 41, Российская Федерация. E-mail: velikanova46@gmail.com

Шафигуллина Зульфия Ривгатовна – канд. мед. наук, доцент кафедры эндокринологии им. акад. В.Г. Баранова¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8292-8504>. E-mail: zula183@mail.ru

Малеваная Екатерина Валерьевна – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории хроматографии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0880-0814>. E-mail: e.malevanaia@gmail.com

Лисицын Александр Александрович – канд. мед. наук, доцент кафедры факультетской хирургии им. И.И. Грекова¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2045-0044>. E-mail: 9213244516@mail.ru

Обоснование. Традиционно эндогенный гиперкортизолизм ассоциируется с иммунной супрессией, однако у таких больных наблюдаются и признаки, свойственные хроническим воспалительным заболеваниям. Лучшее понимание механизмов, изменяющих функционирование иммунной системы, позволит разработать пациент-ориентированный подход к лечению больных кортикотропин-независимым эндогенным синдромом Кушинга (СК).

Цель – установить связь показателей периферической крови больных с объемными образованиями надпочечников и экскреции кортикостероидов с мочой, исследованной методом газовой хромато-масс-спектрометрии, в зависимости от злокачественности опухоли и наличия гиперкортизолизма.

Материал и методы. Ретроспективно проанализированы данные обследования 42 больных с новообразованиями надпочечников, не получавших химиотерапевтического лечения в анамнезе. Медиана возраста обследованных составила 54 [Q25; Q75: 37; 63] года, женщин было 76% (32/42). В дооперационном периоде всем пациентам выполнен клинический анализ крови с определением лейкоцитарной формулы, исследован стероидный метаболом мочи на газовом хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMS-TQ8050.

Результаты. У 12 пациентов был аденокортикальный рак (АКР) и СК, у 9 – АКР без СК, у 11 – аденокортикальные аденомы (АКА) и СК, у 10 – АКА без СК. Определено большее значение нейтрофильно-лимфоцитарного индекса (НЛИ) у больных АКР по сравнению с больными АКА: 3,35 [2,5; 6,3] и 1,99 [1,41; 2,65] ($p = 0,001$). Выявлена линейная зависимость НЛИ от уровня кортизола крови после ночного подавляющего теста с 1 мг дексаметазона ($r = 0,41$, $p = 0,01$), экскреции с мочой 5 β -тетрагидрокортизола ($r = 0,71$, $p < 0,001$) и 11 β -гидроксиандростерона ($r = 0,74$,

$p < 0,001$). Установлены меньшие значения экскреции 5 β -тетрагидрокортизола у больных АКР без СК по сравнению с больными АКА с СК: 931 [616; 1610] и 3139 [1480; 4375] мкг/сут ($p = 0,007$). Экскреция с мочой 11 β -гидроксиандростерона у больных АКР без СК была выше в отличие от больных АКА с СК: 1170 [806; 1266] и 602 [320; 739] мкг/сут ($p = 0,007$). Пороговое значение НЛИ для определения злокачественного потенциала опухоли надпочечника у больных с СК составило более 2,72 (чувствительность – 90,0%, специфичность – 80,0%), для пациентов без гиперкортизолизма – более 1,92 (чувствительность – 71,4%, специфичность – 100,0%).

Заключение. Впервые получены данные о зависимости НЛИ, отражающего уровень системного воспаления, от экскреции с мочой 11 β -гидроксиандростерона, метаболита 11-гидроксиандростендиона, представителя 11-оксигенированных андрогенов, что расширяет представления о воздействии на иммунную систему гормональной активности клеток опухолей надпочечников.

Ключевые слова: аденокортикальный рак, синдром Кушинга, стероидный метаболом мочи, газовая хромато-масс-спектрометрия, нейтрофильно-лимфоцитарный индекс

Для цитирования: Ворохобина НВ, Калугина ВВ, Великанова ЛИ, Шафигуллина ЗР, Малеваная ЕВ, Лисицын АА. Взаимосвязь показателей клинического анализа крови и стероидного метаболома мочи у больных с объемными образованиями надпочечников. Альманах клинической медицины. 2024;52(3):140–148. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-004.

Поступила 12.02.2024; доработана 25.03.2024; принята к публикации 29.03.2024; опубликована онлайн 09.04.2024

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России; 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кировная, 41, Российская Федерация



Кортикотропин-независимый эндогенный гиперкортизолизм наблюдается у 5% больных с объемными образованиями надпочечников [1]. У большинства из них источником избыточной продукции кортизола служит доброкачественная опухоль, исходящая из сетчатой зоны коркового вещества надпочечников, аденокортикальный рак (АКР) встречается у 2% больных [2].

Клинические проявления манифестного синдрома Кушинга (СК) характеризуются большим разнообразием, что обусловлено особенностями действия глюкокортикостероидов. Известно, что комбинация воспаления и нарушенного иммунного ответа вносит вклад в патогенез стероидного диабета, висцерального ожирения, атеросклероза, остеопороза, когнитивных нарушений, предрасположенности к инфекционным заболеваниям, наблюдающихся у таких больных [3].

В литературе есть данные о связи выраженности изменений показателей клинического анализа крови со степенью тяжести гиперкортизолизма [4]. Разработаны индексы, характеризующие системное воспаление у больных с солидными опухолями различной локализации. Среди наиболее обсуждаемых показателей отношения нейтрофилов к лимфоцитам крови – нейтрофильно-лимфоцитарный индекс (НЛИ), суррогатный маркер активации клеточного иммунитета, применяющийся для оценки иммунного ответа [4–7]. Установлены более высокие значения НЛИ у больных СК по сравнению с практически здоровыми лицами [8], а также с больными аденокортикальной аденомой (АКА) без гормональной активности клеток опухоли, определенной традиционными лабораторными методами [9]. В работе M. Detomas и соавт. значения НЛИ у больных АКР с гиперкортизолизмом и кортикотропин-эктопическим синдромом были выше в отличие от обследованных с кортикотропиномы и кортикостеромами [7]. V.Favero и соавт. показали зависимость величины НЛИ от уровня кортизола крови после ночного подавляющего теста с 1 мг дексаметазона (ПДТ1) и на этом основании сделали вывод о влиянии гиперкортизолизма на уровень системного воспаления у больных с доброкачественными объемными образованиями надпочечников [4].

Исследование стероидных метаболитов мочи методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) играет важную роль в диагностике заболеваний надпочечников, благодаря возможности комплексной оценки синтеза и метаболизма кортикостероидов. Показаны преимущества ГХ-МС в обнаружении гормональной активности клеток

опухолей надпочечников в сравнении с традиционными биохимическими методами, подтверждена высокая диагностическая ценность метода в определении злокачественного потенциала новообразований надпочечников на ранних этапах заболевания и в выявлении рецидива АКР после хирургического лечения [10–13].

Работы по установлению зависимости показателей клинического анализа крови от гормональной активности клеток новообразований надпочечников, определенной методом ГХ-МС, в литературе не представлены.

Цель – установить связь показателей периферической крови больных с объемными образованиями надпочечников и экскреции кортикостероидов с мочой, исследованной методом ГХ-МС, в зависимости от злокачественности опухоли и наличия гиперкортизолизма.

Материал и методы

Проведен ретроспективный анализ результатов обследования 42 больных с объемными образованиями надпочечников – АКР (n = 21) и АКА (n = 21). Все больные наблюдались в Центре патологии надпочечников клиники им. Э.Э. Эйхвальда ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России с 2014 по 2023 г. Медиана возраста больных составила 54 [Q25; Q75: 37; 63] года. Преобладали женщины – 76% (32/42). Медиана индекса массы тела, рассчитанная по формуле Кетле (кг/м²), составила 26 [22; 28]. У 12 (57%) пациентов с АКР на этапе установления диагноза стадия II заболевания по классификации Европейской рабочей группы по изучению опухолей надпочечников (ENSAT, 2009 г.), у 6 (29%) – III стадия, у 3 больных – IV стадия [14]. В исследование были включены пациенты старше 18 лет с гистологически подтвержденным диагнозом, предоставившие письменное согласие на обследование и использование их медицинских данных в научных целях. Критериями исключения служили наличие воспалительных заболеваний, острой сердечно-сосудистой патологии в течение предшествующих 3 месяцев, аутоиммунных, гематологических заболеваний, сахарного диабета, болезней печени, почек, злокачественных опухолей другой локализации, химиотерапевтического лечения в анамнезе. Этическая экспертиза исследования не проводилась в связи с его ретроспективным характером.

Уровни кортизола после ПДТ1, альдостерона, ренина, дегидроэпиандростерона-сульфата в сыворотке крови, кортикотропина плазмы, метанефрина и норметанефрина в суточной моче оценивали с помощью традиционных методов



иммуноанализа. Наличие кортикотропин-независимого СК подтверждали на основании сочетания характерных клинических проявлений гиперкортизолизма и результатов лабораторных методов обследования.

Всем больным в дооперационном периоде выполнялся клинический анализ крови с определением лейкоцитарной формулы. Величину НЛИ рассчитывали как отношение абсолютного количества нейтрофилов к абсолютному количеству лимфоцитов крови [5].

Всем обследованным проведено хирургическое лечение с последующим патоморфологическим исследованием послеоперационного материала по шкале L.M. Weiss [15]. При наборе 3 и более баллов подтверждался диагноз АКР, менее 3 баллов – АКА.

В соответствии с результатами проведенного обследования больные были распределены на 4 группы: первую группу составили 12 пациентов с АКР с СК, вторую – 9 пациентов с АКР без СК, третью – 11 пациентов с АКА с СК и четвертую группу – 10 пациентов с АКА без СК. Группы были сопоставимы по полу, возрасту и индексу массы тела. Между больными первой и второй групп различий в распространенности онкологического

процесса не было. У больных АКР с СК и АКА с СК уровни кортизола крови после ПДТ1 были выше: 618 [425; 731] и 508 [446; 601] нмоль/л по сравнению с больными АКР и АКА без СК: 31 (28–35) и 36 (27–40) нмоль/л соответственно ($p < 0,001$).

У всех обследованных определена экскреция с мочой метаболитов кортикостероидов до хирургического лечения. Стероидные профили мочи больных исследовали методом ГХ-МС на газовом хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMS-TQ8050 в научно-исследовательской лаборатории хроматографии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России [16].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программных пакетов MedCalc. Использовали методы непараметрической статистики. Количественные характеристики обследованных представлены в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей [Q25; Q75]. Для сравнения результатов использовали критерий Манна – Уитни. Статистически значимыми считали значения критерия $p < 0,008$ с учетом поправки Бонферрони. Для изучения соотношения между показателями клинического анализа крови, НЛИ и уровнем кортизола после ПДТ1, экскрецией с мочой кортикостероидов применяли метод линейной регрессии.

Таблица 1. Показатели клинического анализа крови и нейтрофильно-лимфоцитарного индекса больных в зависимости от злокачественности объемного образования надпочечника и наличия синдрома Кушинга

Показатель	АКР и СК (n = 12)	АКР без СК (n = 9)	АКА и СК (n = 11)	АКА без СК (n = 10)
	1	2	3	4
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	9,70 [8,00; 11,20] $p_{1-4} = 0,004$	7,40 [6,18; 9,32]	7,85 [6,04; 10,50]	5,74 [4,60; 6,30]
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$	7,26 [6,21; 8,94] $p_{1-2} = 0,04$ $p_{1-3} = 0,03$ $p_{1-4} = 0,0002$	4,88 [3,21; 5,80]	4,77 [3,95; 6,14] $p_{3-4} = 0,004$	2,91 [1,97; 2,99]
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,47 [0,88; 2,10] $p_{1-2} = 0,07$	1,86 [1,78; 2,25]	2,21 [1,46; 2,46]	2,02 [1,76; 2,33]
Эозинофилы, $\times 10^9/\text{л}$	0,00 [0,00; 0,03] $p_{1-2} = 0,02$ $p_{1-4} = 0,01$	0,22 [0,13; 0,36] $p_{2-3} = 0,02$	0,05 [0,00; 0,10]	0,25 [0,04; 0,63]
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	242,00 [215,00; 275,00]	279,00 [257,25; 324,00] $p_{2-4} = 0,02$	266,50 [171,00; 295,00]	227,50 [207,00; 253,00]
Нейтрофильно-лимфоцитарный индекс	4,87 [3,35; 9,22] $p_{1-2} = 0,009$ $p_{1-3} = 0,009$ $p_{1-4} = 0,003$	2,52 [1,63; 2,70] $p_{2-4} = 0,002$	2,57 [2,06; 2,72] $p_{3-4} = 0,001$	1,25 [0,87; 1,66]

АКА без СК – группа больных с аденокортикальной аденомой без гиперкортизолизма, АКА и СК – группа больных с аденокортикальной аденомой с синдромом Кушинга, АКР без СК – группа больных аденокортикальным раком без гиперкортизолизма, АКР и СК – группа больных аденокортикальным раком с синдромом Кушинга

p – статистическая значимость различий между группами больных АКР и СК, АКР без СК, АКА и СК, АКА без СК после применения поправки Бонферрони

Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [Q25; Q75]

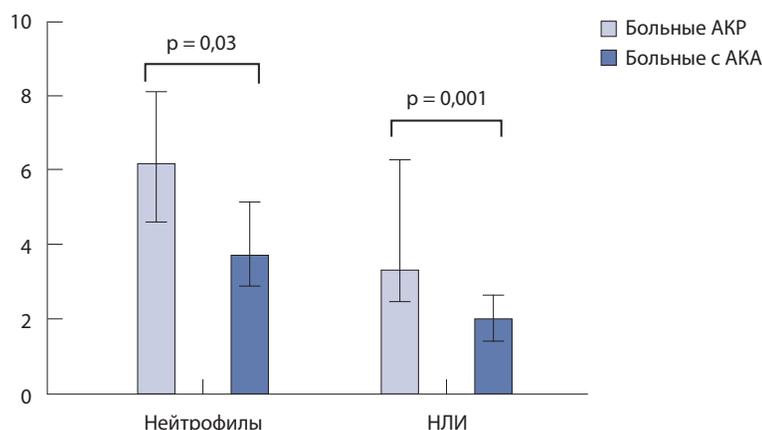


Рис. 1. Количество нейтрофилов крови ($\times 10^9/\text{л}$) и величина нейтрофильно-лимфоцитарного индекса (НЛИ) у больных аденокортикальным раком (АКР) и с аденокортикальными аденомами (АКА)

С целью получения оптимальной точки разделения величины НЛИ для диагностики злокачественного потенциала опухоли надпочечника в дооперационном периоде выполняли анализ с помощью построения характеристической кривой (ROC-анализ).

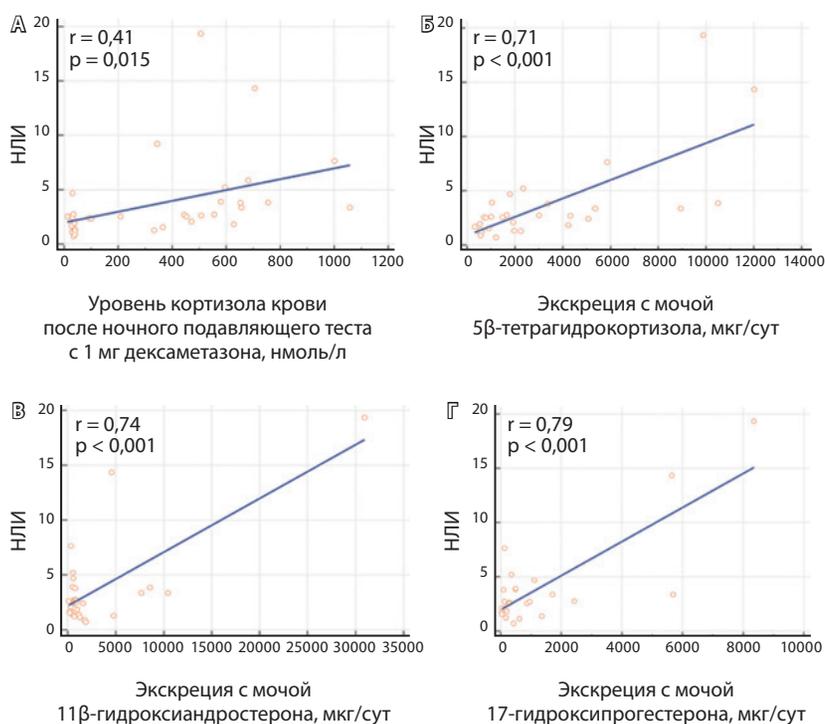


Рис. 2. Зависимость величины нейтрофильно-лимфоцитарного индекса (НЛИ) от уровня кортизола крови после ночного подавляющего теста с 1 мг дексаметазона (А), экскреции 5 β -тетрагидрокортизола с мочой (Б), экскреции 11 β -гидроксиандростерона с мочой (В), экскреции 17-гидроксипрогестерона с мочой (Г)

Результаты

Исследованы показатели клинического анализа крови у больных в зависимости от злокачественности новообразования надпочечника и наличия СК (табл. 1). Количество лейкоцитов и нейтрофилов у больных АКР с СК было выше по сравнению с больными АКА без СК. Определено большее количество нейтрофилов крови у пациентов с АКА с СК в отличие от больных АКА без СК.

Значения НЛИ и количество нейтрофилов были выше у больных АКР по сравнению с пациентами с АКА (рис. 1). У обследованных с АКР и СК величина НЛИ была выше по сравнению с больными АКА без СК и наблюдалась тенденция к большей величине НЛИ по сравнению с больными АКР без СК и АКА с СК. НЛИ был выше у больных АКР без СК и у пациентов с АКА с СК в отличие от обследованных с АКА без СК (см. табл. 1).

Проведен сравнительный анализ стероидных профилей мочи обследованных (табл. 2). У больных с аденокарциномами по сравнению с пациентами с доброкачественными опухолями надпочечников определена повышенная экскреция с мочой основных биомаркеров АКР: 5 β -тетрагидро-11-дезоксикортизола (ТНС), этиохоланолона (Ет), дегидроэпиандростерона (ДНЕА), 17-гидроксипрогестерона (17-ОНР), прегнандиола (Р2), прегнантриола (Р3), прегнендиола (dP2).

Наибольшая экскреция с мочой 5 β -тетрагидрокортизола (5 β -ТНФ) определена в группе больных АКР с СК: 6045 [2251; 9875] мкг/сут. Экскреция тетрагидрометаболита кортизола у больных с АКА и СК была выше, чем у больных АКА без СК. Различий в экскреции 5 β -ТНФ между больными АКР и АКА без СК не выявлено. Получена повышенная экскреция с мочой 5 β -тетрагидрокортизола (5 β -ТНЕ), метаболита кортизола, и 5 β -тетрагидрокортикостерона (5 β -ТНВ), метаболита кортикостерона, у больных АКР с СК в отличие от пациентов с АКА без СК. У больных с АКА и СК экскреция с мочой 5 β -ТНВ превышала соответствующий показатель у пациентов с АКА без СК (см. табл. 2).

Экскреция с мочой 11 β -гидроксиандростерона (11 β -ОН-Ан), метаболита 11-гидроксиандростендиона, была выше у всех больных АКР по сравнению с обследованными с доброкачественными объемными образованиями надпочечников. У больных АКР без СК наблюдалась большая экскреция 11 β -ОН-Ан по сравнению с пациентами АКА с СК и АКА без СК. Различий в экскреции 11 β -ОН-Ан у больных АКР и АКА в зависимости от наличия гиперкортизолизма не определено.



Величина экскреции с мочой 17-ОНР была выше у больных АКР с СК в отличие от пациентов АКА с СК и АКА без СК. У обследованных с АКА без СК наблюдались меньшие значения экскреции

17-ОНР с мочой в сравнении с больными АКР без СК (см. табл. 2).

У всех больных исследована связь показателей клинического анализа крови и уровня

Таблица 2. Экскреция кортикостероидов и их метаболитов с мочой, полученная методом газовой хромато-масс-спектрометрии, у больных в зависимости от злокачественности объемного образования надпочечника и наличия синдрома Кушинга

Экскреция кортикостероида с мочой, мкг/сут	АКР и СК (n = 12)	АКР без СК (n = 9)	АКА и СК (n = 11)	АКА без СК (n = 10)	АКР (n = 21)	АКА (n = 21)
	1	2	3	4	5	6
Метаболиты глюкокортикоидов и минералокортикоидов						
5β-тетрагидро-11-дезоксикортизол (5β-THS)	2496 [577; 6157] p ₁₋₃ = 0,001 p ₁₋₄ = 0,0003	1000 [690; 3999] p ₂₋₃ = 0,006 p ₂₋₄ = 0,001	418 [161; 617] p ₃₋₄ = 0,0009	71 [40; 132]	1269 [642; 4507] p ₅₋₆ < 0,0001	162 [86; 477]
5β-тетрагидрокортизол (5β-THF)	6045 [2251; 9875] p ₁₋₂ = 0,003 p ₁₋₄ = 0,0001	931 [616; 1610] p ₂₋₃ = 0,007	3139 [1480; 4375] p ₃₋₄ = 0,001	585 [530; 1002]	2251 [1015; 9181]	1107 [585; 2162]
5β-тетрагидрокортизон (5β-THE)	8153 [2377; 10800] p ₁₋₄ = 0,005	2289 [1957; 2502]	3936 [2383; 4316]	1836 [1567; 2727]	2526 [2205; 10305]	2418 [1806; 4194]
5β-тетрагидрокортикостерон (5β-TNB)	401 [185; 800] p ₁₋₄ = 0,0006	152 [119; 180]	282 [182; 695] p ₃₋₄ = 0,004	70 [53; 141]	271 [148; 571]	144 [75; 296]
Метаболиты андрогенов						
11β-гидроксиандростерон (11β-ОН-Ан)	4681 [493; 8574] p ₁₋₂ = 0,04 p ₁₋₃ = 0,005 p ₁₋₄ = 0,006	1170 [806; 1266] p ₂₋₃ = 0,007 p ₂₋₄ = 0,007	602 [320; 739]	656 [460; 818]	1712 [869; 7899] p ₅₋₆ = 0,0006	624 [390; 778]
Этиохоланолон (Et)	3658 [544; 6832] p ₁₋₃ = 0,003 p ₁₋₄ = 0,004	2203 [1868; 4655] p ₂₋₃ = 0,0001 p ₂₋₄ = 0,0001	224 [173; 251]	190 [151; 407]	2500 [1594; 5937] p ₅₋₆ < 0,0001	200 [152; 336]
Дегидроэпиандростерон (DHEA)	6593 [2211; 21085] p ₁₋₃ = 0,002 p ₁₋₄ = 0,005	7441 [1652; 20147] p ₂₋₃ = 0,001 p ₂₋₄ = 0,001	9 [5; 15] p ₃₋₄ = 0,008	46 [23; 87]	7017 [1449; 17524] p ₅₋₆ < 0,0001	22 [9; 46]
Метаболиты прогестагенов						
17-гидроксипрогестерон (17-ОНР)	1490 [168; 5836] p ₁₋₃ = 0,003 p ₁₋₄ = 0,001	619 [256; 1363] p ₂₋₃ = 0,018 p ₂₋₄ = 0,004	161 [57; 300]	78 [34; 174]	1112 [384; 2245] p ₅₋₆ < 0,0001	106 [45; 284]
Прегнандиол (P2)	6273 [2733; 12992] p ₁₋₃ = 0,008 p ₁₋₄ = 0,005	1781 [1249; 3517] p ₂₋₃ = 0,001 p ₂₋₄ = 0,0003	378 [281; 977]	228 [157; 640]	3528 [1636; 7720] p ₅₋₆ = 0,001	355 [230; 695]
Прегнантриол (P3)	2574 [1057; 7145] p ₁₋₃ = 0,002 p ₁₋₄ = 0,007	2414 [1170; 4915] p ₂₋₃ = 0,0007 p ₂₋₄ = 0,001	303 [241; 437]	712 [339; 821]	2414 [1149; 5487] p ₅₋₆ = 0,001	359 [259; 730]
Прегнендиол (dP2)	4326 [421; 6256] p ₁₋₃ = 0,009 p ₁₋₄ = 0,003	3084 [1414; 4984] p ₂₋₃ = 0,0004 p ₂₋₄ = 0,0003	212 [95; 525]	490 [174; 601]	3214 [1257; 5356] p ₅₋₆ = 0,0001	396 [108; 555]

АКА – группа больных с аденокортикальной аденомой, АКА без СК – группа больных с аденокортикальной аденомой без гиперкортизолизма, АКА и СК – группа больных с аденокортикальной аденомой с синдромом Кушинга, АКР – группа больных аденокортикальным раком, АКР без СК – группа больных аденокортикальным раком без гиперкортизолизма, АКР и СК – группа больных аденокортикальным раком с синдромом Кушинга

p – статистическая значимость различий между группами больных АКР и АКА, АКР и СК, АКР без СК, АКА и СК, АКА без СК после применения поправки Бонферрони

Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [Q25; Q75]



кортизола крови после ПДТ1 со стероидным метаболомом мочи по данным ГХ-МС. Установлена линейная зависимость величины НЛИ от уровня кортизола крови после ПДТ1, экскреции с мочой 5 β -ТНФ, 11 β -ОН-Ап и 17-ОНР (рис. 2). Получены пороговые значения НЛИ для определения злокачественного потенциала опухолей надпочечников у больных в дооперационном периоде в зависимости от наличия гиперкортизолизма (рис. 3). Превышение значения НЛИ более 2,72 позволяло с 90,0% чувствительностью и 80,0% специфичностью диагностировать АКР у больных с СК. Значения НЛИ более 1,92 с 71,4% чувствительностью и 100,0% специфичностью свидетельствовали о злокачественном потенциале опухоли надпочечника у больных без гиперкортизолизма.

Обсуждение

Проведено исследование влияния гормональной активности клеток объемных образований надпочечников, определенной традиционными биохимическими методами и с помощью ГХ-МС, на показатели периферической крови больных в зависимости от злокачественности опухоли.

Давно отмечено влияние различных инфекционных и неинфекционных стимулов на показатели клинического анализа крови, а также предрасположенность больных СК к воспалительным заболеваниям [3]. Для исключения воздействия воспалительных,

сердечно-сосудистых, аутоиммунных, гематологических заболеваний, болезней почек и печени, а также химиотерапевтического лечения на показатели клинического анализа крови проведен тщательный анализ данных анамнеза и клинико-лабораторных характеристик больных. Пациенты с вышеперечисленной патологией, а также получающие химиотерапию в данное исследование не включались.

В нашей работе показано большее количество лейкоцитов и нейтрофилов крови у больных АКР с гиперкортизолизмом в сравнении с больными АКА без СК. НЛИ был выше у больных АКР в отличие от пациентов с АКА. Известно, что кортизол оказывает влияние на гемопоэз и количество циркулирующих иммунных клеток [3]. Нейтрофилия у онкологических больных также может быть связана с секрецией клетками опухоли миелоидных факторов роста, вторичным воспалением, обусловленным разрушением нормальной ткани злокачественным новообразованием, а также с гиперцитокинемией [5].

В настоящем исследовании выявлена высокая линейная зависимость НЛИ от величины экскреции с мочой 5 β -ТНФ, 11 β -ОН-Ап и 17-ОНР. Связь величины экскреции с мочой 5 β -ТНФ, метаболита кортизола, и маркеров периферической крови, ассоциированных с системным воспалением, у больных с новообразованиями надпочечников свидетельствует о свойствах главного глюкокортикостероида. Показано, что не менее 90% экскретируемого с мочой 11 β -ОН-Ап является метаболитом 11-гидроксиандростендиона и около 5–10% – кортизола [17]. Полученное нами отсутствие различий в экскреции с мочой 11 β -ОН-Ап в группах больных АКР и АКА в зависимости от наличия СК поддерживает данную оценку. Синтезированный в сетчатой зоне коркового вещества 11-гидроксиандростендион с помощью 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы 2-го типа (HSD11B2) превращается в 11-кетандростендион, служащий субстратом для альдо-кеторедуктазы (AKR1C3), метаболизирующей его в 11-кетостерон, который связывается и активирует андрогеновые рецепторы с теми же аффинностью и силой, что и тестостерон [18]. Экскреция с мочой 17-ОНР отражает синтез главного предшественника глюкокортикостероидов – 17-гидроксипрогестерона, поэтому выявленная нами зависимость количества нейтрофилов, лимфоцитов крови и величины НЛИ от экскреции 17-ОНР говорит о связи этих показателей с продукцией кортизола.

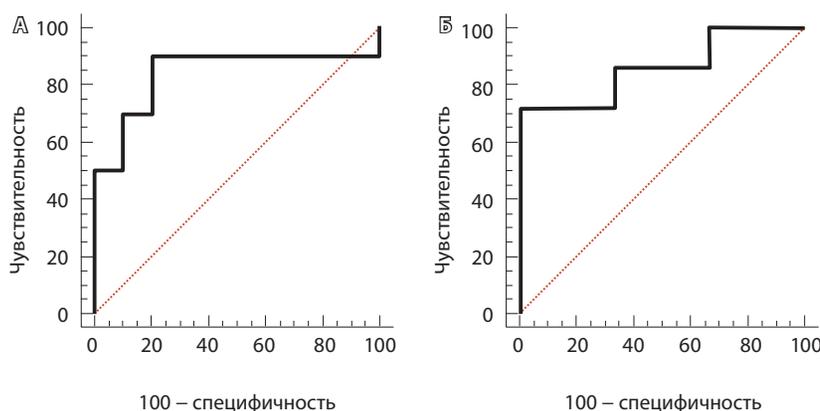


Рис. 3. Чувствительность и специфичность нейтрофильно-лимфоцитарного индекса для определения злокачественного потенциала объемного образования надпочечника в дооперационном периоде у больных с синдромом Кушинга (**А**; чувствительность 90%, специфичность 80%, критерий > 2,72, AUC = 0,840, $p = 0,001$) и без гиперкортизолизма (**Б**; чувствительность 71,4%, специфичность 100%, критерий > 1,92, AUC = 0,857, $p = 0,001$); AUC – площадь под кривой (англ. area under the curve)



В нашем исследовании установлены равные количество нейтрофилов крови и значения НЛИ у больных АКР без СК и пациентов с АКА и СК. Вместе с тем у больных с аденокарциномами отмечена большая экскреция с мочой 11β -ОН-Ап, а у больных с доброкачественными опухолями надпочечников – 5β -ТНФ, что может свидетельствовать о воздействии 11 -гидроксиандростендиона на уровень системного воспаления, определенного с помощью НЛИ, у больных АКР вне зависимости от наличия гиперкортизолизма. Нашу гипотезу подкрепляют опубликованные данные о наличии на лейкоцитах глюкокортикоидных и андрогеновых рецепторов [19], структурной схожести и единой консенсусной последовательности, распознающей обоими рецепторами, и о возможном взаимодействии глюкокортикостероидов и андрогенов на функциональном уровне [20].

В настоящей работе определены пороговые значения НЛИ для диагностики АКР у пациентов с объемными образованиями надпочечников в дооперационном периоде в зависимости от наличия СК. Величина индекса более 2,72 у больных с гиперкортизолизмом обладала высокой чувствительностью, но недостаточной специфичностью для определения злокачественного потенциала опухоли, в то время как НЛИ более 1,92 – 100,0% специфичностью, но недостаточной чувствительностью у обследованных без СК.

В исследовании L.I. Velikanova и соавт. [11] продемонстрированы 100,0% чувствительность и специфичность повышения экскреции с мочой ТНС и/или ДНЕА с обнаружением экскреции неклассических 5-ene -прегненов и снижением соотношений $3\alpha,16,20\text{-dP3}/3\beta,16,20\text{-dP3}$ менее 6,0 и $3\alpha,17,20\text{-dP3}/3\beta,17,20\text{-dP3}$ менее 9,0 для диагностики АКР в дооперационном периоде. Таким образом, диагностическая

ценность исследования стероидных метаболитов мочи больных методом ГХ-МС для определения злокачественного потенциала объемных образований надпочечников превосходит таковую НЛИ.

Заключение

Исследование показателей периферической крови и стероидных метаболитов мочи больных с объемными образованиями надпочечников до хирургического лечения позволило определить различия в значениях НЛИ, отражающего уровень системного воспаления, у больных АКР и АКА. Равные значения индекса у больных АКР без СК и АКА с СК, различные величины экскреции 11β -ОН-Ап и 5β -ТНФ в данных группах, а также зависимость НЛИ от экскреции с мочой данных кортикостероидов позволили предположить влияние уровня 11 -гидроксиандростендиона, представителя 11 -оксигенированных надпочечниковых андрогенов, на НЛИ.

Диагностическая ценность полученных отрезных точек значений НЛИ для определения злокачественного потенциала опухолей надпочечников в дооперационном периоде в зависимости от наличия СК не превосходила таковую исследования экскреции с мочой основных биомаркеров АКР. Несмотря на это, после валидации в проспективных исследованиях данный параметр может стать дополнительным признаком АКР у больных до хирургического лечения.

Интересным направлением дальнейших исследований представляется установление связи уровней С-реактивного белка, провоспалительных цитокинов, субпопуляций лимфоцитов и моноцитов и стероидного метаболита мочи у больных с объемными образованиями надпочечников в зависимости от злокачественности опухоли и наличия гиперкортизолизма. [©]

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № НИОКТР 122012100080-3.

Конфликт интересов

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

Участие авторов

Н.В. Ворохобина – анализ клинико-экспериментальных результатов исследования, редактирование текста, утверждение итогового варианта

текста рукописи; В.В. Калугина – сбор клинического материала, статистическая обработка данных, написание текста; Л.И. Великанова – анализ полученных результатов, статистическая обработка данных, написание текста рукописи; З.Р. Шафигуллина – сбор клинического материала, анализ полученных данных; Е.В. Малеваная – проведение исследований методом газовой хромато-масс-спектрометрии, анализ полученных данных; А.А. Лисицын – хирургическое лечение больных с образованиями надпочечников. 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

- Prete A, Subramanian A, Bancos I, Chortis V, Tsagarakis S, Lang K, Macech M, Delivanis DA, Pupovac ID, Reimondo G, Marina LV, Deutschbein T, Balomenaki M, O'Reilly MW, Gilligan LC, Jenkinson C, Bednarczuk T, Zhang CD, Dusek T, Diamantopoulos A, Asia M, Kondracka A, Li D, Masjkur JR, Quinkler M, Ueland GA, Dennedy MC, Beuschlein F, Tabarin A, Fassnacht M, Ivović M, Terzolo M, Kastelan D, Young WF Jr, Manolopoulos KN, Ambroziak U, Vassiliadi DA, Taylor AE, Sitch AJ, Nirantharakumar K, Arlt W; ENSAT EURINE-ACT Investigators; ENSAT EURINE-ACT Investigators. Cardiometabolic Disease Burden and Steroid Excretion in Benign Adrenal Tumors: A Cross-Sectional Multicenter Study. *Ann Intern Med.* 2022;175(3):325–334. doi: 10.7326/M21-1737.
- Cawood TJ, Hunt PJ, O'Shea D, Cole D, Soule S. Recommended evaluation of adrenal incidentalomas is costly, has high false-positive rates and confers a risk of fatal cancer that is similar to the risk of the adrenal lesion becoming malignant; time for a rethink? *Eur J Endocrinol.* 2009;161(4):513–527. doi: 10.1530/EJE-09-0234.
- Hasenmajer V, Sbardella E, Sciarra F, Minnetti M, Isidori AM, Venneri MA. The Immune System in Cushing's Syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2020;31(9):655–669. doi: 10.1016/j.tem.2020.04.004.
- Favero V, Prete A, Mangone A, Elhassan YS, Pucino V, Asia M, Hardy R, Chiodini I, Ronchi CL. Inflammation-based scores in benign adrenocortical tumours are linked to the degree of cortisol excess: a retrospective single-centre study. *Eur J Endocrinol.* 2023;189(5):517–526. doi: 10.1093/ejendo/lvad151.
- Marques P, de Vries F, Dekkers OM, van Furth WR, Korbonits M, Biermasz NR, Pereira AM. Pre-operative serum inflammation-based scores in patients with pituitary adenomas. *Pituitary.* 2021;24(3):334–350. doi: 10.1007/s11102-020-01112-5.
- Sisman P, Bicer B, Gul OO, Cander S, Ersoy C, Saraydaroglu O, Erturk E. May hemocytometer parameters be a biomarker in distinguishing between adrenal adenomas and carcinomas and in prognosis of adrenocortical carcinomas? *Acta Clin Croat.* 2020;59(3):439–444. doi: 10.20471/acc.2020.59.03.07.
- Detomas M, Altieri B, Chifu I, Remde H, Zhou X, Landwehr LS, Sbiara S, Kroiss M, Fassnacht M, Deutschbein T. Subtype-specific pattern of white blood cell differential in endogenous hypercortisolism. *Eur J Endocrinol.* 2022;187(3):439–449. doi: 10.1530/EJE-22-0211.
- Paja M, Merlo I, Rodríguez-Soto J, Cruz-Iglesias E, Moure MD, Elías C, Oleaga A, Egaña N. White blood cell count: a valuable tool for suspecting Cushing's syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2023;46(1):141–149. doi: 10.1007/s40618-022-01892-6.
- Wang W, Wang J, Shen C, Zhu S, Gao Y, Zhang J. Neutrophil-Lymphocyte Ratio as an Initial Screening Biomarker for Differential Diagnosis of Cushing's Syndrome from Nonfunctional Adenoma in Patients with an Adrenal Mass. *Biomed Res Int.* 2021;2021:6635594. doi: 10.1155/2021/6635594.
- Великанова ЛИ, Ворохобина НВ, Шафигуллина ЗР, Калугина ВВ, Малеваная ЕВ, Стрельникова ЕГ, Буйнова МО, Лисицын АА, Кушлинский НЕ. Взаимосвязь стероидного метаболома мочи с течением адренокортикального рака. *Альманах клинической медицины.* 2023;51(3):143–153. doi: 10.18786/2072-0505-2023-51-018. Velikanova LI, Vorokhobina NV, Shafigullina ZR, Kalugina VV, Malevanaya EV, Strelnikova EG, Buinova MO, Lisitsyn AA, Kushlinskii NE. [The relationship between urine steroid metabolome and the course of adrenocortical cancer]. *Almanac of Clinical Medicine.* 2023;51(3):143–153. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2023-51-018.
- Velikanova LI, Shafigullina ZR, Lisitsyn AA, Vorokhobina NV, Grigoryan K, Kukhianidze EA, Strelnikova EG, Krivokhizhina NS, Krasnov LM, Fedorov EA, Sablin IV, Moskvina AL, Bessonova EA. Different Types of Urinary Steroid Profiling Obtained by High-Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Patients with Adrenocortical Carcinoma. *Horm Cancer.* 2016;7(5–6):327–335. doi: 10.1007/s12672-016-0267-0.
- Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libé R, Hughes BA, Schneider P, Smith DJ, Stiekema H, Krone N, Porfiri E, Opocher G, Bertherat J, Mantero F, Allolio B, Terzolo M, Nightingale P, Shackleton CH, Bertagna X, Fassnacht M, Stewart PM. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(12):3775–3784. doi: 10.1210/jc.2011-1565.
- Chortis V, Bancos I, Nijman T, Gilligan LC, Taylor AE, Ronchi CL, O'Reilly MW, Schreiner J, Asia M, Riestler A, Perotti P, Libé R, Quinkler M, Canu L, Paiva I, Bugalho MJ, Kastelan D, Dennedy MC, Sherlock M, Ambroziak U, Vassiliadi D, Bertherat J, Beuschlein F, Fassnacht M, Deeks JJ, Biehl M, Arlt W. Urine Steroid Me-
- tabolomics as a Novel Tool for Detection of Recurrent Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(3):e307–e318. doi: 10.1210/clinem/dgz141.
- Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B; German Adrenocortical Carcinoma Registry Group; European Network for the Study of Adrenal Tumors. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer.* 2009;115(2):243–250. doi: 10.1002/cncr.24030.
- Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 1984;8(3):163–169. doi: 10.1097/00000478-198403000-00001.
- Великанова ЛИ, Стрельникова ЕГ, Объедкова ЕВ, Кривохижина НС, Шафигуллина ЗР, Григорян К, Поваров ВГ, Москвин АЛ. Получение стероидных профилей мочи больных с инцидентальной надпочечниковой методом газовой хромато-масс-спектрометрии. *Журнал аналитической химии.* 2016;71(7):775–781. doi: 10.7868/S0044450216070161. Velikanova LI, Strel'nikova EG, Obedkova EV, Krivokhizhina NS, Shafigullina ZR, Grigoryan K, Povarov VG, Moskvina AL. Generation of urinary steroid profiles in patients with adrenal incidentaloma using gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Chem.* 2016;71(7):748–754. doi: 10.1134/S1061934816070169.
- Shackleton CH, Neres MS, Hughes BA, Stewart PM, Kater CE. 17-Hydroxylase/C17,20-lyase (CYP17) is not the enzyme responsible for side-chain cleavage of cortisol and its metabolites. *Steroids.* 2008;73(6):652–656. doi: 10.1016/j.steroids.2008.02.001.
- Schiffer L, Barnard L, Baranowski ES, Gilligan LC, Taylor AE, Arlt W, Shackleton CHL, Storbeck KH. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;194:105439. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105439.
- Chakraborty S, Pramanik J, Mahata B. Revisiting steroidogenesis and its role in immune regulation with the advanced tools and technologies. *Genes Immun.* 2021;22(3):125–140. doi: 10.1038/s41435-021-00139-3.
- Kroon J, Pereira AM, Meijer OC. Glucocorticoid Sexual Dimorphism in Metabolism: Dissecting the Role of Sex Hormones. *Trends Endocrinol Metab.* 2020;31(5):357–367. doi: 10.1016/j.tem.2020.01.010.



Association between full blood count and urine steroid metabolome in patients with adrenal masses

N.V. Vorokhobina¹ • V.V. Kalugina¹ • L.I. Velikanova¹ • Z.R. Shafigullina¹ • E.V. Malevanaya¹ • A.A. Lisitsyn¹

Background: Endogenous hypercortisolism of adrenal origin is commonly associated with immune suppression. However, these patients also have signs characteristic of chronic inflammatory diseases. Better understanding of the mechanisms that alter the functioning of the immune system would allow for the development of a patient-centered approach to the treatment of corticotropin-independent endogenous Cushing's syndrome (CS).

Aim: To assess the association between full blood count and gas chromatography-mass spectrometry-based urinary steroid excretion in patients with adrenal masses depending on malignancy grade and presence of hypercortisolism.

Materials and methods: We retrospectively analyzed data from 42 patients with adrenal masses who had not received chemotherapy. The median age of the patients was 54 [Q25; Q75: 37; 63] years, and 76% of them were female. Preoperatively, all patients had hematology tests with differential leukocyte count. Steroid metabolome was assessed with Shimadzu GCMS-TQ8050 gas chromatography-mass spectrometer.

Results: Twelve (12) patients had adrenocortical cancer (ACC) and CS, 9 patients had ACC without CS, 11 had adrenocortical adenomas (ACA) and CS, and 10 patients had ACA without CS. ACC patients had a higher neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) than those with ACA: 3.35 [2.5; 6.3] vs 1.99 [1.41; 2.65] ($p = 0.001$). There was a linear correlation between NLR and serum cortisol levels after the 1 mg overnight dexamethasone suppression test ($r = 0.41$, $p = 0.01$), urinary excretion of 5 β -tetrahydrocortisol (5 β -THF) ($r = 0.71$, $p < 0.001$) and 11 β -hydroxyandrostosterone (11 β -OH-An) ($r = 0.74$, $p < 0.001$). The

ACC patients without CS had lower 5 β -THF urinary excretion values, compared to ACA with CS patients: 931 [616; 1610] and 3139 [1480; 4375] mcg/24h, respectively ($p = 0.007$). 11 β -OH-An urinary excretion in ACC patients without CS was higher than in ACA patients with CS: 1170 [806; 1266] и 602 [320; 739] mcg/24h ($p = 0.007$). The NLR cut-off value for adrenal mass malignancy in patients with CS exceeded 2.72 (sensitivity 90.0%, specificity 80.0%), and for the patients without hypercortisolism was above 1.92 (sensitivity 71.4%, specificity 100.0%).

Conclusion: This is the first association identification between NLR, which is the marker of systemic inflammation, inflammation, and urinary excretion of 11 β -OH-An, a metabolite of 11-hydroxyandrostenedione (a member of 11-oxygenated androgen family). This extends our understanding of the impact of hormonal activity of adrenal mass cells on the immune system.

Key words: adrenocortical cancer, Cushing's syndrome, urine steroid metabolome, gas chromatography-mass spectrometry, neutrophil-to-lymphocyte ratio

For citation: Vorokhobina NV, Kalugina VV, Velikanova LI, Shafigullina ZR, Malevanaya EV, Lisitsyn AA. Association between full blood count and urine steroid metabolome in patients with adrenal masses. Almanac of Clinical Medicine. 2024;52(3):140–148. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-004.

Received 12 February 2024; revised 25 March 2024; accepted 29 March 2024; published online 9 April 2024

Natalia V. Vorokhobina – MD, PhD, Professor, Head of Chair of Endocrinology named after academician V.G. Baranov¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9574-105X>. E-mail: natvorokh@mail.ru

Valentina V. Kalugina – Postgraduate Student, Chair of Endocrinology named after academician V.G. Baranov¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2812-6911>. E-mail: kaluginavav@gmail.com

Ludmila I. Velikanova – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Science and Research Laboratory of Chromatography¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9352-4035>

✉ Ul. Kirochnaya 41, Saint Petersburg, 191015, Russian Federation. E-mail: velikanova46@gmail.com

Zulfiya R. Shafigullina – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Endocrinology named after academician V.G. Baranov¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8292-8504>. E-mail: zula183@mail.ru

Ekaterina V. Malevanaya – PhD (in Chem.), Senior Research Fellow, Science and Research Laboratory of Chromatography¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0880-0814>. E-mail: e.malevanaia@gmail.com

Aleksandr A. Lisitsyn – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Faculty Surgery named after I.I. Grekov¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2045-0044>. E-mail: 9213244516@mail.ru

Funding

The study was performed as a part of the State Task from the Ministry of Health of the Russian Federation No. 122012100080-3.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contributions

N.V. Vorokhobina, analysis of clinical and experimental study results, text editing, approval of the final version of the manuscript; V.V. Kalugina, clinical data collection, statistical analysis, text writing; L.I. Velikanova, analysis of the study results, statistical analysis, text writing; Z.R. Shafigullina, clinical data collection, analysis of the results; E.V. Malevanaya, gas chromatography-mass spectrometry procedures and analysis of the data obtained; A.A. Lisitsyn, surgery of the patients with adrenal masses. 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 North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; ul. Kirochnaya 41, Saint Petersburg, 191015, Russian Federation



Оригинальная статья

Группа гиперметилированных генов длинных некодирующих РНК ассоциирована с разными типами метастазирования рака яичников

Бурдённй А.М.^{1,2} • Лукина С.С.¹ • Филиппова Е.А.¹ • Иванова Н.А.¹ • Пронина И.В.¹ • Логинов В.И.^{1,3} • Казубская Т.П.⁴ • Кушлинский Д.Н.^{5,6} • Цекатунов Д.А.⁶ • Жордания К.И.⁴ • Брага Э.А.^{1,3}

Обоснование. Опухоли яичников характеризуются бессимптомным течением вплоть до поздних стадий, когда на момент установления диагноза у пациентки уже имеется обширное метастазирование. Помимо лимфогенного и гематогенного метастазирования при раке яичников наблюдаются диссеминация по брюшине, метастазирование в большой сальник и образование асцита; при этом канцероматоз брюшины – преимущественный путь метастазирования рака яичников. В процессах прогрессирования новообразования участвуют эпигенетические факторы: метилирование генов, регуляторные микроРНК и длинные некодирующие РНК (днРНК). В наших предыдущих исследованиях сначала биоинформатически, а затем и экспериментально были идентифицированы 13 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*), гиперметилированных в опухолях яичников.

Цель – оценить клиническую значимость уровней метилирования 13 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*), ассоциированных с разными типами метастазирования рака яичников, включая лимфогенное, по брюшине, в большой сальник и отдаленные органы.

Материал и методы. Уровень метилирования генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*,

MAFG-DT, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1* анализировали с применением количественной метил-специфичной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Исследованы 122 парных образца опухолей яичников, включая 104 злокачественные опухоли и 18 пограничных, а также 45 макроскопических перитонеальных метастазов, собранных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2020 по 2023 г. Исследование включало 21 образец первичной опухоли больных с лимфогенными метастазами, 45 – с диссеминациями по брюшине, 61 – с метастазами в большом сальнике, 49 – с наличием асцита и 9 – с отдаленными метастазами.

Результаты. При анализе образцов опухолей больных с метастазами в лимфатических узлах показано статистически значимое повышение уровня метилирования 2 генов днРНК: *SNHG6* ($p = 0,044$) и *SNHG12* ($p = 0,006$). С диссеминацией по брюшине ассоциировано гиперметилирование 4 генов днРНК: *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472* ($p < 0,05$) и наиболее значимо *TINCR* ($p = 0,001$). С метастазированием в большой сальник ассоциированы *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00886* ($p < 0,05$) и наиболее значимо *LINC00472* ($p < 0,001$); с наличием асцита – *LINC00472* и *LINC00886* ($p < 0,05$). В перитонеальных макроскопических метастазах относительно парных первичных опухолей отмечено повышение метилирования *MAFG-DT*

($p < 0,001$) и *TP53TG1* ($p < 0,001$) и деметилирование *LINC00886* ($p = 0,003$) и *SNHG12* ($p = 0,002$).

Заключение. Проведен анализ клинической значимости 13 гиперметилированных генов днРНК при раке яичников. Впервые установлено, что 10 генов (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) ассоциированы с различными типами метастазирования опухолей данного типа. Выявлены определенные панели днРНК, изменение метилирования которых характерно для лимфогенного и перитонеального метастазирования опухолей яичников.

Ключевые слова: рак яичников, перитонеальное метастазирование, большой сальник, асцит, некодирующая РНК, регуляторный фактор

Для цитирования: Бурдённй АМ, Лукина СС, Филиппова ЕА, Иванова НА, Пронина ИВ, Логинов ВИ, Казубская ТП, Кушлинский ДН, Цекатунов ДА, Жордания КИ, Брага ЭА. Группа гиперметилированных генов длинных некодирующих РНК ассоциирована с разными типами метастазирования рака яичников. Альманах клинической медицины. 2024;52(3):149–161. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-021.

Поступила 25.03.2024; доработана 23.04.2024; принята к публикации 20.08.2024; опубликована онлайн 04.09.2024



Рак яичников относится к наиболее распространенным и высоколетальным видам рака женской репродуктивной системы в России и за рубежом [1, 2]. По состоянию на 2024 г. в мире диагностируется более 300 тыс. новых случаев рака яичников и ежегодно регистрируется более 200 тыс. неблагоприятных исходов [2]. Опухоли яичников на ранних стадиях характеризуются высокой начальной частотой ответа на стандартную терапию. Однако со временем развивается рецидив, который быстро перерастает в химиорезистентное заболевание. Кроме того, вследствие бессимптомного течения у большинства женщин рак яичников выявляют на поздних стадиях с обширным метастазированием и плохим ответом на химиотерапию, что повышает вероятность неблагоприятного исхода. Помимо лимфогенного и гематогенного метастазирования канцерогенез яичников характеризуется также диссеминацией по брюшине, метастазированием в большой сальник и развитием асцита [3]. Более того, считается, что на момент установления диагноза у большинства больных уже выявляется именно диссеминация по брюшине. Механизм перитонеальной диссеминации мало изучен

и продолжает исследоваться, в том числе на морфологическом, цитологическом и иммунологическом уровнях [4–6]. Поиск биомаркеров перитонеального метастазирования опухолей яичников представляет актуальную задачу биомедицины.

За последние две декады утвердилась точка зрения, что в процессах прогрессирования рака главную роль играют не столько генетические нарушения в опухоль-ассоциированных генах, сколько эпигенетические факторы, такие как ДНК-метилирование генов, модификации гистонов, ремоделирование нуклеосом и хроматина, а также регуляторные микроРНК и длинные некодирующие РНК (днРНК) [7, 8]. Эпигенетическим механизмам уверенно отводится центральное место в регуляции биологических процессов в злокачественных новообразованиях. Эпигенетические модификации обратимы и могут повышать фенотипическую пластичность опухолевой клетки и процессов, вовлеченных в метастазирование рака [7]. Показано, что ДНК-метилирование и регуляторные некодирующие РНК могут служить диагностическими и прогностическими биомаркерами, на основе которых разрабатываются новые методы раннего обнаружения и лечения рака [7, 8].

Бурденный Алексей Михайлович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹; мл. науч. сотр. лаборатории химической физики биоаналитических процессов²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>.
✉ 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация. E-mail: burdenny@gmail.com

Лукина Светлана Сергеевна – науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6246-2444>.
E-mail: sveta_sergeevna349@mail.ru

Филиппова Елена Александровна – канд. мед. наук, науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>. E-mail: p.lenyxa@yandex.ru

Иванова Наталья Анатольевна – мл. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3314-6183>.
E-mail: nata-i@list.ru

Пронина Ирина Валерьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>.
E-mail: zolly_sten@mail.ru

Логинов Виталий Игоревич – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики¹; ст. науч. сотр.³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>. E-mail: loginov7w@gmail.com

Казубская Татьяна Павловна – д-р мед. наук, врач-онкогенетик высшей категории, ст. науч. сотр. лаборатории клинической онкогенетики⁴; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>.
E-mail: oncogen5@ronc.ru

Кушлинский Дмитрий Николаевич – канд. мед. наук, доцент кафедры онкологии и патоморфологических дисциплин⁵; заведующий отделением онкогинекологии⁶; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1490-8418>.
E-mail: drkushlinskiy@gmail.com

Цекатунов Дмитрий Анатольевич – врач-патологоанатом, заведующий отделением патологической анатомии⁶; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-1561-9681>.
E-mail: mtsekatonov@inbox.ru

Жордания Кирилл Иосифович – д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения онкогинекологии⁶; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1380-3710>.
E-mail: kiazio2@yandex.ru

Брага Элеонора Александровна – д-р биол. наук, профессор, заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики¹; вед. науч. сотр.³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>.
✉ 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация. E-mail: eleonora10_45@mail.ru

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация

² ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Емануэля Российской академии наук; 119334, г. Москва, ул. Косыгина, 4, Российская Федерация

³ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова»; 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация

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

⁵ КГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации специалистов здравоохранения» Минздрава Хабаровского края; 680009, г. Хабаровск, ул. Краснодарская, 9, Российская Федерация

⁶ КГБУЗ «Краевой клинический центр онкологии» Минздрава Хабаровского края; 680042, г. Хабаровск, Воронежское шоссе, 164, Российская Федерация



Открытие микроРНК и днРНК стало мощным прорывом в анализе транскриптомов и регуляторных генных сетей в злокачественных опухолях. Можно отметить, что анализу микроРНК в новообразованиях посвящено более 10 000 работ, днРНК – более 4000 работ, при раке яичников роль микроРНК исследована в 455 работах, а днРНК – только в 158 работах (поиск в PubMed проведен авторами 27.02.2024). Установлено, что днРНК участвуют в регуляции генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях и могут непосредственно связываться с матричной РНК (мРНК) или белками, а также с ДНК в области промоторов генов или взаимодействовать с мРНК при посредничестве микроРНК или РНК-связывающих белков [9]. Так, в последовательностях и днРНК, и мРНК могут содержаться сайты для связывания микроРНК (англ. MiRNA response elements), благодаря которым днРНК могут конкурировать с мРНК за связывание регуляторных микроРНК по механизму конкурентных эндогенных РНК (англ. ceRNA-model), например при раке яичников [10]. Это один из возможных механизмов участия днРНК в регуляции генов, кодирующих белки, при посредничестве микроРНК.

Исследование закономерностей влияния днРНК на транскриптом в целом и на отдельные РНК в клетках опухолей в частности дает информацию о функциях днРНК. Кроме того, в результате выявляются новые биомаркеры прогрессирования рака. Тканеспецифичный характер экспрессии, эффективное обнаружение в жидкостях организма и стабильность определяют высокий потенциал днРНК в качестве биомаркеров для целей диагностики, прогноза и мониторинга рака, а тканевая специфичность днРНК позволяет разрабатывать селективные терапевтические агенты для лечения рака, включая рак яичников [11, 12].

Ранее в наших исследованиях сначала биоинформатически, а затем и экспериментально были идентифицированы 13 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TGI*, *TUG1*), гиперметилированных в опухолях яичников [13, 14].

Цель данного исследования – оценить клиническую значимость уровней метилирования 13 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TGI*, *TUG1*), ассоциированных с разными типами метастазирования рака яичников, включая лимфогенное, по брюшине, в большой сальник и отдаленные органы.

Материал и методы

Образцы опухолей яичников собраны и охарактеризованы морфологически и клинически в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в течение 2020–2023 гг. Работа проведена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации [15], с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности; получено информированное согласие пациентов. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (протоколы заседаний № 4Б от 24.11.2020 и № 2 от 04.04.2023).

Исследовали образцы больных, которые до операции не получали лучевую, химиотерапию или гормонотерапию. Опухоли были классифицированы в соответствии с TNM (англ. tumor, nodus, and metastasis (опухоль, узел и метастаз) – Международная классификация стадий злокачественных новообразований) Международного противоракового союза и гистологически верифицированы на основании критериев классификации Всемирной организации здравоохранения [16, 17]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70–80%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилином-эозином. Образцы тканей хранили при -70 °С. Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора TissueRuptor II (QIAGEN, Германия).

В исследовании использованы 122 парных образца опухолей яичников и гистологически неизмененных тканей яичника (условной нормы), а также 45 макроскопических перитонеальных метастазов. В связи с высокой представленностью перитонеальных (35–38%) и лимфогенных метастазов (7–19%) среди больных с пограничными опухолями яичников (ПОЯ) выборка включала 104 образца злокачественных опухолей яичников и 18 образцов ПОЯ [18]. Клинико-морфологические характеристики 122 исследованных образцов опухолей яичников отражены в табл. 1.

Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике фенол-хлороформной очистки. ДНК хранили при -20 °С. Качество и концентрацию ДНК определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ уровня метилирования генов днРНК проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специфичной

Таблица 1. Обобщенные данные по образцам опухолей яичников (N = 122)

Клинико-гистологический параметр	Количество, абс.
Тип опухоли яичников:	
пограничная опухоль	18
злокачественная опухоль	104
Гистологический тип:	
серозная аденокарцинома	85
эндометриоидная аденокарцинома	15
другие	22
Стадия:	
I	26
II	19
III	68
IV	9
Размер и распространенность опухоли:	
T1	26
T2	21
T3	75
Степень дифференцировки:	
G1	25
G2	31
G3	48
Гематогенное метастазирование:	
M0	113
M1	9
Лимфогенное метастазирование:	
N0	101
N1–3	21
Диссеминация по брюшине:	
нет	77
есть	45
Метастазирование в большой сальник:	
нет	61
есть	61
Метастазирование всех типов:	
нет	43
есть	79
Наличие асцита:	
нет	53
есть	49

полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени, как описано в работах [13, 14]. Использован набор реактивов qPCRMix-HS SYBR по протоколу фирмы «Евроген» (Россия). Амплификацию проводили в системе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом. Полноту конверсии ДНК определяли с помощью контрольного локуса *ACTB* с использованием олигонуклеотидов, специфичных к неконвертированной матрице [13, 14]. Для сравнительного анализа эффективности амплификации также применяли локус *ACTB* с использованием олигонуклеотидов, специфичных к конвертированной матрице [13]. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения полимеразной цепной реакции для генов днРНК приведены в табл. 2. В качестве контроля для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (Promega, США). В качестве позитивного контроля 100% метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистический анализ полученных данных по степени метилирования генов днРНК проводили с применением индекса метилирования, рассчитанного для каждого образца. Для оценки значимости различий использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Анализ данных выполняли с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 27 и Microsoft Excel 10; значимость различий между исследуемыми группами оценивали, используя непараметрический U-тест Манна – Уитни для независимых выборок с учетом поправки Бенджамини – Хохберга на множественное сравнение (англ. false discovery rate, FDR); результат считали значимым при $p < 0,05$, FDR = 0,1. Для контроля FDR при проведении множественных сравнений с применением метода Бенджамини – Хохберга, поскольку SPSS не имеет встроенной функции для прямого расчета FDR по этому методу, была разработана и применена пользовательская процедура с помощью синтаксиса SPSS. Процедура включала следующие этапы: 1) ранжирование p -значений; 2) расчет критических значений для каждого теста; 3) определение значимости на основе сравнения p -значений с критическими значениями; 4) применение правила остановки Бенджамини – Хохберга для определения окончательного набора значимых результатов. Уровень FDR был установлен на 0,1. Корректность процедуры была верифицирована путем сравнения с эталонными расчетами, выполненными в Microsoft Excel.

**Таблица 2.** Праймеры и условия метил-специфичной полимеразной цепной реакции, использованные в данной работе

Ген днРНК / праймер, нуклеотидная последовательность	Длина, п.н.	Температура отжига, °С
<i>GASS</i>		
MF: CGTTATCGTCGGTATTGGAGGGG	185	60
MR: CGCCCGACGCCTTATCCC		
UF: TGTTATTGTTGGTATTGGAGGGGTGAG	179	60
UR: CAACACCTTATCCCATCTTCTCCA		
<i>HOTAIR</i>		
MF: CGGGTTTTTATTTTTTCGTTATTGCG	258	54
MR: CGACTACTCTCGCAAATTTCACTACTTC		
UF: TGGGTTTTTATTTTTTGTATTGTGTTATTTG	258	52
UR: CAACTACTCTCACAAATTTCACTACTTCACAC		
<i>LINC00472</i>		
MF: AAGGCGTTTTAAGTCGAGGGTA	224	60
MR: AACGACTCCGACAACACACC		
UF: AAGGTGTTTTAAGTTGAGGGTAAAG	228	59
UR: AACAACTCCAACAACACACCCAC		
<i>LINC00886</i>		
MF: CGTGCGATCGTAGTTCGGTAGGTTA	172	60
MR: CGCCGAATTACGCGACGAAA		
UF: CGTGCGATCGTAGTTCGGTAGGTTA	181	60
UR: CCTCACCAAATTACACAACAAATCAACAC		
<i>MAFG-DT</i>		
MF: CGGATTTTCGGGCGTTTCG	232	60
MR: ATTTCGAATCTACCGCGCAC		
UF: TGTGGATTTTTGGGTGTTTTGTTG	236	60
UR: ATTTCAAATCTACCACACACCC		
<i>PLUT</i>		
MF: CGGGGATTTGGTATTGTGTGGC	201	60
MR: CТАААССТААССТСТТААТАСГАССАССА		
UF: TGTTGGAATGTGATGGGTTTTTGTAAGTT	339	61
UR: CACAАТАССТАААССТААССТСТТААТАСАССА		
<i>SNHG1</i>		
MF: CGGCGATCGAGGTTTTAGGA	210	60
MR: ACTAАСТСАССГАССГАТТ		



UF: TGGTGATTGAGGTTTTAGGA	210	55
UR: ACTAACTCACCAACCACATT		
<i>SNHG6</i>		
MF: TTGAGTTATCGCGTTCGGTTT	295	61
MR: CTCTTCCGATACGCGACCC		
UF: CTCTTCCAATACACAACCC	295	58
UR: CAAAAACCATAAACCCCTCC		
<i>SNHG12</i>		
MF: CGCGTTTAGTAAAATTATATATTAGTGAAGAGATAAG	239	60
MR: CCCGACGCTAAACCCACGC		
UF: TGTGTTTAGTAAAATTATATATTAGTGAAGAGATAAG	245	56
UR: TCAATACCCAACACTAAACCCACAC		
<i>SNHG17</i>		
MF: GCGCGAAACGAGCGTA	168	59
MR: CGACGCCCTAACGTCGAATA		
UF: TTGGTGTGAAATGAGTGTA	170	57
UR: CAACACCCTAACATCAAATAACA		
<i>TINCR</i>		
MF: GCGGACGAGGCGTTGTTGTAT	193	60
MR: CGCTAACGAACAACAACCCGAAC		
UF: GTGGATGAGGTGTTGTTATTGTTGATT	194	60
UR: TCACTAACAAACAACAACCCAAACATC		
<i>TP53TG1</i>		
MF: TCGTTTCGTGTTTGACGTC	137	55
MR: ACTCATTTAACACCCGACGA		
UF: GTTTTGTTTTGTGTTTGATGTT	137	55
UR: ACTCATTTAACACCCAACAAACC		
<i>TUG1</i>		
MF: CGGGTTTCGGTTTCGTGGTC	199	60
MR: CGACGAAAACGACAACAACACATAATT		
UF: TGGTTTTTAAGGATTGGATTGAGGGTAG	159	60
UR: CAACAACAACAAAACAACAACACATAAT		

MF/UF и MR/UR – прямые и обратные праймеры к метилированному/неметилированному аллелю соответственно. Олигонуклеотиды подобраны с использованием базы данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> и программы <http://www.urogene.org/methprimer2/> с проверкой в программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании DNASTAR (США). Для гена *TP53TG1* использованы олигонуклеотиды из работы [19]

**Таблица 3.** Уровни метилирования 2 генов днРНК в опухолях больных с метастазами в лимфоузлах и без лимфогенных метастазов

Ген днРНК	Лимфогенное метастазирование	Уровень метилирования, %	Значение p
SNHG6	N0	24,41 [12,14; 47,51]	0,044
	N1–3	50,59 [12,12; 64,11]	
SNHG12	N0	21,42 [7,49; 37,34]	0,006
	N1–3	42,95 [37,38; 48,84]	

Исследованы 21 образец опухолей больных с метастазами в лимфатических узлах и 101 образец опухолей больных без лимфогенных метастазов; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]

Результаты

Проведен сравнительный анализ уровней метилирования 13 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) в 122 образцах опухолевой и гистологически нормальной ткани яичников, охарактеризованных клинически и морфологически (см. табл. 1), в зависимости от наличия разных типов метастазирования. Кроме того, исследованы 45 макроскопических метастазов относительно 45 парных первичных опухолей тех же больных.

При анализе образцов опухолей больных с метастазами в лимфатических узлах относительно образцов опухолей больных без лимфатических метастазов статистически значимое ($p < 0,05$, FDR = 0,1) повышение уровня метилирования отмечено только для 2 генов днРНК из 13 исследованных – *SNHG6* и *SNHG12* (табл. 3), для которых связь с метастазами в лимфатические узлы была отмечена также ранее в работе [14].

В образцах опухолей больных с диссеминацией по брюшине показан статистически значимо ($p < 0,05$, FDR = 0,1) более высокий уровень метилирования 4 генов днРНК: *GAS5*, *LINC00472* и наиболее значимо *HOTAIR* и *TINCR* ($p = 0,001$, FDR = 0,1)

(табл. 4). В образцах опухолей больных с метастазированием в большой сальник был статистически значимо более высокий уровень метилирования другого набора из 4 генов днРНК: *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00886* ($p < 0,05$, FDR = 0,1) и наиболее значимо *LINC00472* ($p < 0,001$, FDR = 0,1) (табл. 5).

При анализе образцов опухолей больных с метастазами всех (любых) типов относительно образцов опухолей пациентов без метастазов получен статистически значимо ($p < 0,05$, FDR = 0,1) более высокий уровень метилирования 7 генов днРНК: *GAS5*, *LINC00886*, *TINCR*, *TUG1*, *HOTAIR*, *SNHG6*, при этом наиболее значимо *LINC00472* ($p < 0,001$, FDR = 0,1), а также обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$, FDR = 0,1) снижение уровня метилирования гена *MAFG-DT* (табл. 6).

Связи данных гиперметилированных генов днРНК с гематогенным метастазированием не установлено, очевидно, вследствие малого количества (9) образцов опухолей больных с отдаленными метастазами в исследуемой выборке. Однако данные по метилированию генов днРНК в опухолях больных с отдаленными метастазами были учтены при анализе связи гиперметилированных генов днРНК с учетом всех типов метастазирования (табл. 7).

Таблица 4. Уровни метилирования 4 генов днРНК в опухолях больных с диссеминацией по брюшине и без таковой

Ген днРНК	Диссеминация по брюшине	Уровень метилирования, %	Значение p
HOTAIR	Нет	4,49 [2,94; 5,64]	0,001
	Есть	6,39 [4,97; 7,83]	
TINCR	Нет	27,16 [5,86; 47,55]	0,001
	Есть	45,41 [37,69; 53,64]	
GAS5	Нет	4,46 [0,71; 9,68]	0,026
	Есть	8,60 [6,72; 9,60]	
LINC00472	Нет	2,14 [0,88; 5,44]	0,041
	Есть	5,20 [0,89; 8,30]	

Исследованы 45 образцов опухолей больных с диссеминацией по брюшине и 77 образцов опухолей больных без диссеминации по брюшине; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]

**Таблица 5.** Уровни метилирования 4 генов днРНК в опухолях больных с метастазами в большом сальнике и без таковых

Ген днРНК	Метастазирование в большой сальник	Уровень метилирования, %	Значение p
<i>HOTAIR</i>	Нет	4,49 [3,06; 5,77]	0,003
	Есть	6,30 [4,78; 7,83]	
<i>GASS</i>	Нет	4,92 [0,77; 9,04]	0,033
	Есть	8,94 [7,05; 9,53]	
<i>LINC00472</i>	Нет	1,52 [0,75; 4,24]	< 0,001
	Есть	6,42 [2,77; 8,25]	
<i>LINC00886</i>	Нет	6,16 [0,84; 13,57]	0,021
	Есть	9,62 [7,83; 12,86]	

Исследованы 61 образец опухолей больных с метастазами в большом сальнике и 61 образец опухолей больных без метастазов в большом сальнике; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]

Для перитонеальных макроскопических метастазов по сравнению с парными первичными опухолями обнаружен статистически значимо меньший уровень метилирования *LINC00886* и *SNHG12* ($p \leq 0,003$, FDR = 0,1), что может указывать на активацию днРНК, кодируемых этими генами, при формировании метастатического узла (см. табл. 7). Кроме того, в перитонеальных макроскопических метастазах наблюдается статистически значимо ($p < 0,001$, FDR = 0,1) более высокий уровень метилирования относительно

первичных опухолей для генов *MAFG-DT* и *TP53TG1* (см. табл. 7).

В образцах опухолей больных с наличием асцита относительно образцов больных без асцита получен статистически значимо ($p < 0,05$, FDR = 0,1) более высокий уровень метилирования 2 генов днРНК: *LINC00472* и *LINC00886* (табл. 8).

Для генов *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1* и *SNHG17*, гиперметилированных в опухолях яичников, не выявлено статистически значимой связи уровня метилирования с метастазированием.

Таблица 6. Сравнение уровней метилирования 8 генов днРНК в опухолях больных с метастазами и без таковых в целом с учетом всех типов метастазирования, включая отдаленные метастазы

Ген днРНК	Метастазирование всех типов	Уровень метилирования, %	Значение p
<i>HOTAIR</i>	Нет	4,38 [3,01; 5,45]	0,002
	Есть	6,05 [3,73; 7,57]	
<i>TUG1</i>	Нет	4,66 [0,71; 5,52]	0,024
	Есть	5,455 [3,8; 6,48]	
<i>SNHG6</i>	Нет	16,95 [8,96; 35,08]	0,005
	Есть	35,44 [12,73; 60,29]	
<i>TINCR</i>	Нет	22,84 [6,05; 47,87]	0,039
	Есть	44,18 [25,0; 49,27]	
<i>GASS</i>	Нет	3,3 [0,57; 8,97]	0,022
	Есть	8,44 [2,08; 9,64]	
<i>LINC00472</i>	Нет	1,4 [0,71; 2,78]	< 0,001
	Есть	6,095 [1,375; 8,26]	
<i>LINC00886</i>	Нет	4,49 [0,83; 14,5]	0,046
	Есть	9,5 [6,34; 12,84]	
<i>MAFG-DT</i>	Нет	5,53 [1,93; 7,42]	0,039
	Есть	2,355 [1,22; 6,13]	

Исследованы 79 образцов опухолей больных с наличием любых метастазов и 43 образца опухолей больных без каких-либо метастазов; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]



Таблица 7. Сравнение уровней метилирования 4 генов днРНК в макроскопических перитонеальных метастазах относительно парной первичной опухоли

Ген днРНК	Опухоль / макрометастаз	Уровень метилирования, %	Значение p
<i>MAFG-DT</i>	Опухоль	2,41 [1,26; 4,96]	< 0,001
	Макрометастаз	6,2 [5,38; 8,11]	
<i>TP53TG1</i>	Опухоль	2,85 [1,38; 5,46]	< 0,001
	Макрометастаз	6,2 [4,56; 8,18]	
<i>SNHG12</i>	Опухоль	9,16 [7,67; 23,82]	0,002
	Макрометастаз	1,88 [0,23; 18,26]	
<i>LINC00886</i>	Опухоль	8,47 [6,38; 12,76]	0,003
	Макрометастаз	6,44 [3,82; 8,27]	

Исследованы 45 образцов макроскопических перитонеальных метастазов относительно 45 образцов парных первичных опухолей; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]

Таблица 8. Уровни метилирования 2 генов днРНК в опухолях больных с асцитом и без асцита

Ген днРНК	Наличие асцита	Уровень метилирования, %	Значение p
<i>LINC00472</i>	Нет	1,99 [0,71; 6,09]	0,022
	Есть	5,80 [0,89; 8,51]	
<i>LINC00886</i>	Нет	5,34 [0,83; 9,49]	0,022
	Есть	9,04 [4,96; 12,75]	

Исследованы 49 образцов опухолей больных с наличием асцита и 53 образца опухолей больных без асцита; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]

Обсуждение

Проведен анализ уровня метилирования 13 генов днРНК на представительной выборке из 122 образцов опухолей яичников и 45 макроскопических перитонеальных метастазов, что позволило оценить связь 10 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) с разными типами метастазирования.

Показано, что гиперметилирование гена днРНК *GAS5* (growth arrest specific 5) ассоциировано с перитонеальным метастазированием опухолей яичников – как с диссеминацией по брюшине, так и с метастазированием в сальник. Эти результаты согласуются с данными о супрессорных и антиметастатических функциях днРНК *GAS5* в опухолях разных локализаций, включая рак яичников [20, 21]. В недавней работе установлено, что *GAS5* может ингибировать метастазирование рака яичников путем подавления экспрессии РНК-связывающего белка, hnRNPК (гетерогенный ядерный рибонуклеопротеид К), в результате ингибирования путей PI3K/AKT/mTOR [22].

Напротив, для генов *SNHG6* (small nucleolar RNA host gene 6) и *SNHG12* (small nucleolar RNA host gene 12) из семейства днРНК, образовавшихся из генов-хозяев малых ядрышковых РНК, обнаружена связь метилирования с лимфогенным метастазированием. Следует отметить, что в отличие от малых ядрышковых РНК, происходящих из одних интронов, днРНК семейства SNHG (small nucleolar RNA host gene) содержат последовательности как интронов, так и экзонов; всего известно более 30 таких днРНК [23]. Ранее для днРНК *SNHG6* и *SNHG12* связь с метастазированием была определена при раке яичников и в опухолях других локализаций, но данные были противоречивы [24–26]. Наши результаты, основанные на исследовании метилирования генов днРНК, позволяют предположить супрессорные антиметастатические свойства для днРНК *SNHG6* в опухолях яичников, что согласуется с результатами исследования функции *SNHG6* в опухолях толстой кишки [24].

Для гена антисмысловой днРНК *HOTAIR* (HOX transcript antisense RNA) также было обнаружено aberrантное ДНК-метилирование при раке

яичников и отмечена его связь с химиорезистентностью [27]. В нашей работе выявлена связь метилирования гена *HOTAIR* с диссеминацией по брюшине и с метастазированием в большой сальник.

Для межгенной днРНК *LINC00472* (long intergenic non-protein coding RNA 472) ранее были определены супрессорные свойства и роль метилирования в инактивации гена этой днРНК в опухолях желудка и молочной железы [28, 29]. Для межгенной днРНК *LINC00886* (long intergenic non-protein coding RNA 886) также имелись данные о роли гиперметилирования в снижении экспрессии гена этой днРНК и об участии *LINC00886* в подавлении эпителиально-мезенхимального перехода при некоторых видах рака [30, 31]. Нами впервые обнаружена ассоциация метилирования генов *LINC00472* и *LINC00886* с метастазированием в большой сальник и с образованием асцитической жидкости у больных с опухолями яичников. Наши результаты подтверждают супрессорный характер этих днРНК, установленный для опухолей других локализаций [28–31].

Отметим, что роль днРНК *TINCR* (terminal differentiation induced ncRNA) в канцерогенезе выявлена при анализе опухолей разных локализаций, но сведения о возможной супрессорной и антиметастатической или онкогенной функции были противоречивы [32, 33]. Роль днРНК *TINCR* при раке яичников не исследована другими авторами. В настоящей работе нами впервые определено влияние гиперметилирования гена *TINCR* на диссеминацию опухолей яичников по брюшине, что согласуется с данными о сниженной экспрессии *TINCR* и возможной супрессорной функции этой днРНК при некоторых видах рака: глиоме, ретинобластоме и раке предстательной железы [33].

В макроскопических перитонеальных метастазах при раке яичников нами было обнаружено гиперметилирование генов *TP53TG1* и *MAFG-DT*. Для антисмысловой днРНК *MAFG-DT* (*MAFG divergent transcript*, или *MAFG-AS1*) ранее показаны повышенная экспрессия в опухолях и способность индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход, инвазию и миграцию клеток рака яичников [34]. Межгенная днРНК *TP53TG1* (tumor protein 53 target 1), как и ее мишень *TP53*, играет преимущественно супрессорную роль при различных видах рака, например при раке шейки матки [35]. *TP53TG1* может подавлять метастазирование желудка и гепатоцеллюлярной карциномы [36, 37]. Обращает на себя внимание, что гиперметилирование генов *TP53TG1* и *MAFG-DT* наблюдается только в макроскопических перитонеальных метастазах, хотя эти гены не повышали

уровень метилирования в первичных опухолях яичников; и напротив, отмечено снижение уровня метилирования гена *MAFG-DT* при тотальном анализе образцов опухолей с любыми типами метастазирования. Таким образом, для определения роли метилирования генов днРНК *MAFG-DT* и *TP53TG1* с противоположными свойствами (онкогенов и опухолевых супрессоров) в колонизации вторичных очагов в брюшине у больных раком яичников нужны дальнейшие исследования.

На основании полученных результатов определены наборы гиперметилированных генов днРНК, ассоциированных с разными типами метастазирования опухолей яичников. Так, с лимфогенным метастазированием оказались связаны 2 гена – *SNHG6* и *SNHG12*, другие 5 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *TINCR*) могут быть вовлечены в перитонеальное метастазирование, включая диссеминацию по брюшине и метастазирование в большой сальник. Повышенное метилирование *HOTAIR* и *TINCR* ($p = 0,001$, $FDR = 0,1$) в опухоли ассоциировано с диссеминацией по брюшине, а повышенный уровень метилирования гена *LINC00472* ($p < 0,001$, $FDR = 0,1$) – с метастазированием в большой сальник. Повышенный уровень метилирования генов *LINC00472* и *LINC00886* в опухолях больных может быть ассоциирован с развитием асцита. Для перитонеальных макроскопических метастазов характерно значимое ($p < 0,001$, $FDR = 0,1$) повышение уровня метилирования генов *MAFG-DT* и *TP53TG1*, не проявляющих повышенного метилирования в первичных опухолях яичников, а также снижение уровня метилирования *LINC00886* и *SNHG12*.

Настоящее исследование ограничено анализом клинических образцов. Выявленные закономерности в дальнейшем планируется тестировать на клеточных культурах.

Заключение

Впервые проведено сравнение клинической значимости 13 гиперметилированных днРНК и установлено, что 10 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) ассоциированы с различными типами метастазирования опухолей данного типа. Определены гены днРНК, связанные с метастазированием в лимфатические узлы (*SNHG6* и *SNHG12*), диссеминацией по брюшине (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472* и *TINCR*) и метастазированием в большой сальник (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472* и *LINC00886*). В перитонеальных макроскопических метастазах относительно парных первичных опухолей наблюдаются



гиперметилирование *MAFG-DT* и *TP53TG1* и деметилирование *LINC00886* и *SNHG12*. Проведение дальнейших исследований позволит оценить

клиническую значимость выявленных в данной работе новых панелей маркеров для эффективного мониторинга течения рака яичников. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 20-15-00368-П).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

А.М. Бурдённый – дизайн исследования, подбор праймеров, выполнение эксперимента, редактирование статьи; С.С. Лукина – выполнение эксперимента, статистический анализ полученных данных, редактирование статьи; Е.А. Филиппова – статистический анализ полученных данных, оформление таблиц и иллюстраций, обсуждение результатов, участие в редактировании статьи; Н.А. Иванова – выполнение эксперимента, анализ результатов, участие в обсуждении результатов и редактировании статьи; И.В. Пронина – выполнение эксперимента, участие в анализе

литературных данных и обсуждении результатов, редактирование статьи; В.И. Логинов – сбор и анализ характеристик клинических образцов, подбор праймеров, редактирование статьи; Т.П. Казубская – сбор и характеристика клинических образцов, участие в обсуждении результатов, редактирование статьи; Д.И. Кушлинский – лечение больных, анализ историй болезни, участие в сопоставлении результатов с клиническими характеристиками пациентов, обсуждение результатов, редактирование статьи; Д.А. Цекатунов – морфологическое исследование опухолей, обсуждение результатов, сопоставление результатов с морфологическими характеристиками опухолей, редактирование статьи; К.И. Жордания – сбор и характеристика клинических образцов, обсуждение результатов, редактирование статьи; Э.А. Брага – дизайн исследования, анализ литературы, написание и окончательное редактирование статьи. 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

- Kaprin AD, Starinsky BV, Shakhzadova AO, Lisichnikova IV, ред. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2023. 275 с.
- Kaprin AD, Starinsky VV, Shakhzadova AO, Lisichnikova IV, editors. Malignant neoplasms in Russia in 2022 (morbidity and mortality). Moscow: P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russian Federation; 2023. 275 p. Russian.
- Sideris M, Menon U, Manchanda R. Screening and prevention of ovarian cancer. *Med J Aust.* 2024;220(5):264–274. doi: 10.5694/mja2.52227.
- Pascual-Antón L, Cardeñes B, Sainz de la Cuesta R, González-Cortijo L, López-Cabrera M, Cabañas C, Sandoval P. Mesothelial-to-mesenchymal transition and exosomes in peritoneal metastasis of ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11496. doi: 10.3390/ijms222111496.
- Purbadi S, Anggraeni TD, Vitria A. Early stage epithelial ovarian cancer metastasis through peritoneal fluid circulation. *J Ovarian Res.* 2021;14(1):44. doi: 10.1186/s13048-021-00795-z.
- Ibrahim LI, Hajal C, Offeddu GS, Gillrie MR, Kamm RD. Omentum-on-a-chip: A multicellular, vascularized microfluidic model of the human peritoneum for the study of ovarian cancer metastases. *Biomaterials.* 2022;288:121728. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121728.
- Miyamoto T, Murphy B, Zhang N. Intraperitoneal metastasis of ovarian cancer: New insights on resident macrophages in the peritoneal cavity. *Front Immunol.* 2023;14:1104694. doi: 10.3389/fimmu.2023.1104694.
- Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- Kan RL, Chen J, Sallam T. Crosstalk between epitranscriptomic and epigenetic mechanisms in gene regulation. *Trends Genet.* 2022;38(2):182–193. doi: 10.1016/j.tig.2021.06.014.
- Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell.* 2011;146(3):353–358. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.014.
- Braga EA, Fridman MV, Moscovtsev AA, Filippova EA, Dmitriev AA, Kushlinskii NE. LncRNAs in ovarian cancer progression, metastasis, and main pathways: ceRNA and alternative mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8855. doi: 10.3390/ijms21228855.
- Kunej T, Obsteter J, Pogacar Z, Horvat S, Calin GA. The decalog of long non-coding RNA involvement in cancer diagnosis and monitoring. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2014;51(6):344–357. doi: 10.3109/10408363.2014.944299.
- Lampropoulou DI, Papadimitriou M, Papadimitriou C, Filippou D, Kourlaba G, Aravantinos G, Gazouli M. The role of EMT-related lncRNAs in ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2023;24(12):10079. doi: 10.3390/ijms241210079.
- Бурдённый АМ, Филиппова ЕА, Лукина СС, Иванова НА, Пронина ИВ, Логинов ВИ, Казубская ТП, Кушлинский НЕ, Брага ЭА. ДНК-метилирование группы генов длинных некодирующих РНК на разных этапах диссеминации рака яичников. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023;176(10):498–504. doi: 10.47056/0365-9615-2023-176-10-498-504. Burdennyu AM, Filippova EA, Lukina SS, Ivanova NA, Pronina IV, Loginov VI, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE, Braga EA. [DNA-methylation of a group of long non-coding RNA genes at different stages of ovarian cancer dissemination.] *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2023;176(10):498–504. Russian. doi: 10.47056/0365-9615-2023-176-10-498-504.
- Лукина СС, Бурдённый АМ, Филиппова ЕА, Урошлев ЛА, Пронина ИВ, Иванова НА, Фридман МВ, Жордания КИ, Казубская ТП, Кушлинский НЕ, Логинов ВИ, Брага ЭА. Метилирование генов длинных некодирующих РНК: SNHG6, SNHG12, TINCR при раке яичников. *Молекулярная биология.* 2024;58(3):429–438. doi: 10.1134/S0026893324700067. Lukina SS, Burdennyu AM, Filippova EA, Uroshlev LA, Pronina IV, Ivanova NA, Fridman MV, Zhordania KI, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE, Loginov VI, Braga EA. [Methylation of long noncoding RNA genes SNHG6, SNHG12, and TINCR in ovarian cancer.] *Mol Biol.* 2024;58(3):429–438. Russian. doi: 10.1134/S0026893324700067.
- World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2191–2194. doi: 10.1001/jama.2013.281053.
- Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C., editors. *The TNM classification of malignant tumours.* 8th edn. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2017. 272 p.
- Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. *WHO Classification of tumours of female reproductive organs.* 4th edn. Lyon, France: IARC Press; 2014. 307 p.
- Новикова ЕГ, Андреева ЮЮ, Шевчук АС. *Пограничные опухоли яичников.* Онкология.



- Журнал им. П.А. Герцена. 2013;2(1):84–91. doi: 10.17116/onkolog201320184.
- Novikova EG, Andreeva YuYu, Shevchuk AS. [Borderline ovarian tumors.] P.A. Herzen Journal of Oncology. 2013;2(1):84–91. Russian. doi: 10.17116/onkolog201320184.
19. Diaz-Lagares A, Crujeiras AB, Lopez-Serra P, Soler M, Setien F, Goyal A, Sandoval J, Hashimoto Y, Martinez-Cardús A, Gomez A, Heyn H, Moutinho C, Espada J, Vidal A, Paúles M, Galán M, Sala N, Akiyama Y, Martínez-Iniesta M, Farré L, Villanueva A, Gross M, Diederichs S, Guil S, Esteller M. Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 2016;113(47):E7535–E7544. doi: 10.1073/pnas.1608585113.
20. Yang W, Xu X, Hong L, Wang Q, Huang J, Jiang L. Upregulation of lncRNA GAS5 inhibits the growth and metastasis of cervical cancer cells. J Cell Physiol. 2019;234(12):23571–23580. doi: 10.1002/jcp.28926.
21. Dong Q, Long X, Cheng J, Wang W, Tian Q, Di W. LncRNA GAS5 suppresses ovarian cancer progression by targeting the miR-96-5p/PTEN axis. Ann Transl Med. 2021;9(24):1770. doi: 10.21037/atm-21-6134.
22. Zhang T, Leng Y, Duan M, Li Z, Ma Y, Huang C, Shi Q, Wang Y, Wang C, Liu D, Zhao X, Cheng S, Liu A, Zhou Y, Liu J, Pan Z, Zhang H, Shen L, Zhao H. LncRNA GAS5-hnRNPK axis inhibited ovarian cancer progression via inhibition of AKT signaling in ovarian cancer cells. Discov Oncol. 2023;14(1):157. doi: 10.1007/s12672-023-00764-6.
23. Zimta AA, Tigu AB, Braicu C, Stefan C, Ionescu C, Berindan-Neagoe I. An emerging class of long non-coding RNA with oncogenic role arises from the snoRNA host genes. Front Oncol. 2020;10:389. doi: 10.3389/fonc.2020.00389.
24. Meng S, Jian Z, Yan X, Li J, Zhang R. LncRNA SNHG6 inhibits cell proliferation and metastasis by targeting ETS1 via the PI3K/AKT/mTOR pathway in colorectal cancer. Mol Med Rep. 2019;20(3):2541–2548. doi: 10.3892/mmr.2019.10510.
25. Zhang T, Beeharry MK, Wang Z, Zhu Z, Li J, Li C. YY1-modulated long non-coding RNA SNHG12 promotes gastric cancer metastasis by activating the miR-218-5p/YWHAZ axis. Int J Biol Sci. 2021;17(7):1629–1643. doi: 10.7150/ijbs.58921.
26. Su M, Huang P, Li Q. Long noncoding RNA SNHG6 promotes the malignant phenotypes of ovarian cancer cells via miR-543/YAP1 pathway. Heliyon. 2023;9(5):e16291. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e16291.
27. Teschendorff AE, Lee SH, Jones A, Fiegl H, Kalwa M, Wagner W, Chindera K, Evans I, Dubeau L, Orjalo A, Horlings HM, Niederreiter L, Kaser A, Yang W, Goode EL, Fridley BL, Jenner RG, Berns EM, Wik E, Salvesen HB, Wisman GB, van der Zee AG, Davidson B, Trope CG, Lambrechts S, Vergote I, Calvert H, Jacobs IJ, Widschwendter M. HOTAIR and its surrogate DNA methylation signature indicate carboplatin resistance in ovarian

The group of hypermethylated long noncoding RNA genes is associated with different types of metastasis in ovarian cancer

A.M. Burdenny^{1,2} • S.S. Lukina¹ • E.A. Filippova¹ • N.A. Ivanova¹ • I.V. Pronina¹ • V.I. Loginov^{1,3} • T.P. Kazubskaya⁴ • D.N. Kushlinskiy^{5,6} • D.A. Tsekatonov⁶ • K.I. Zhordania⁴ • E.A. Braga^{1,3}

Background: Ovarian tumors are characterized by asymptomatic progression until their late stages, when at the time of diagnosis the patient already has extensive metastatic disease. In addition to lymphogenous and hematogenous metastasis in ovarian cancer, there are peritoneal dissemination and metastasis to the greater omentum with ascites; moreover, peritoneal carcinomatosis is the predominant route of metastasizing of ovarian cancer. Epigenetic factors, such as gene methylation, regulatory microRNAs and long non-coding RNAs (lncRNAs), contribute to progression of this cancer. Our previous bioinformatic and experimental studies have identified 13 genes of lncRNAs (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) hypermethylated in the ovarian neoplasms.

Aim: To evaluate the clinical significance of methylation levels of 13 lncRNA genes (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) associated with various types of ovarian cancer metastasis, including lymphogenous, peritoneal, omental, and distant metastases.

Methods: The methylation levels of lncRNA genes *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*,

TINCR, *TP53TG1*, *TUG1* were analyzed by quantitative real-time methylation-specific polymerase chain reaction. We tested 122 duplicate samples of ovarian neoplasms, including 104 malignancies and 18 borderline tumors, as well as 45 peritoneal macro metastases, collected in the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology in 2020 to 2023. The study included 21 samples of primary tumor from patients with lymphogenous metastases, 45 samples from patients with peritoneal dissemination, 61 from those with omental metastases, 49 from patients with ascites, and 9 with distant metastases.

Results: The tumor samples from the patients with lymphatic nodes metastases showed a significant increase in the methylation level of two lncRNA genes: *SNHG6* ($p = 0.044$) and *SNHG12* ($p = 0.006$). Peritoneal dissemination was associated with hypermethylation of four lncRNA genes: *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472* ($p < 0.05$), and most significantly *TINCR* ($p = 0.001$). *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00886* ($p < 0.05$) and most significantly *LINC00472* ($p < 0.001$) hypermethylation was typical for omental metastasis, and that of *LINC00472* and *LINC00886*, with ascites ($p < 0.05$). Peritoneal macroscopic metastases demonstrated increased methylation of *MAFG-DT* ($p < 0.001$) and *TP53TG1* ($p < 0.001$) and desmethylation of *LINC00886*

($p = 0.003$) and *SNHG12* ($p = 0.002$), compared to their primary tumors.

Conclusion: We performed the analysis of clinical significance of 13 hypermethylated lncRNA genes in ovarian cancer and were the first to show that 10 genes (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) were associated with various types of ovarian tumor metastasis. Also, we were able to determine certain panels of lncRNA, which, if demonstrate abnormal methylation, were specific for lymphogenous and peritoneal metastasis of ovarian tumors.

Key words: ovarian cancer, peritoneal metastasis, omentum, ascites, non-coding RNA, regulatory factor

For citation: Burdenny AM, Lukina SS, Filippova EA, Ivanova NA, Pronina IV, Loginov VI, Kazubskaya TP, Kushlinskiy DN, Tsekatonov DA, Zhordania KI, Braga EA. The group of hypermethylated long noncoding RNA genes is associated with different types of metastasis in ovarian cancer. Almanac of Clinical Medicine. 2024; 52(3):149–161. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-021.

Received 25 March 2024; revised 23 April 2024; accepted 20 August 2024; published online 4 September 2024



- cancer. *Genome Med.* 2015;7:108. doi: 10.1186/s13073-015-0233-4.
28. Tsai KW, Tsai CY, Chou NH. et al. Aberrant DNA hypermethylation silenced lncRNA expression in gastric cancer. *Anticancer Res.* 2019;39(10):5381–5391. doi: 10.21873/anticancer.13732.
29. Shao G, Fan X, Zhang P, Liu X, Huang L, Ji S. Methylation-dependent MCM6 repression induced by LINC00472 inhibits triple-negative breast cancer metastasis by disturbing the MEK/ERK signaling pathway. *Aging (Albany NY).* 2021;13(4):4962–4975. doi: 10.18632/aging.103568.
30. Lan L, Cao H, Chi W. et al. Aberrant DNA hypermethylation-silenced LINC00886 gene accelerates malignant progression of laryngeal carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2020;216(4):152877. doi: 10.1016/j.prp.2020.152877.
31. Dong Z, Yang L, Lu J. et al. Downregulation of LINC00886 facilitates epithelial-mesenchymal transition through SIRT7/ELF3/miR-144 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis.* 2022;39(4):661–677. doi: 10.1007/s10585-022-10171-w.
32. Azman AA, Siok-Fong C, Rajab NF, Md Zin RR, Ahmad Daud NN, Mohamad Hanif EA. The potential roles of lncRNA TINCR in triple negative breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2023;50(9):7909–7917. doi: 10.1007/s11033-023-08661-5.
33. Ghafouri-Fard S, Dashti S, Taheri M, Omrani MD. TINCR: An lncRNA with dual functions in the carcinogenesis process. *Noncoding RNA Res.* 2020;5(3):109–115. doi: 10.1016/j.ncrna.2020.06.003.
34. Bai Y, Ren C, Wang B, Xue J, Li F, Liu J, Yang L. lncRNA MAFG-AS1 promotes the malignant phenotype of ovarian cancer by upregulating NFKB1-dependent IGF1. *Cancer Gene Ther.* 2022;29(3–4):277–291. doi: 10.1038/s41417-021-00306-8.
35. Cheng Y, Huang N, Yin Q, Cheng C, Chen D, Gong C, Xiong H, Zhao J, Wang J, Li X, Zhang J, Mao S, Qin K. lncRNA TP53TG1 plays an anti-oncogenic role in cervical cancer by synthetically regulating transcriptome profile in HeLa cells. *Front Genet.* 2022;13:981030. doi: 10.3389/fgene.2022.981030.
36. Chen B, Lan J, Xiao Y, Liu P, Guo D, Gu Y, Song Y, Zhong Q, Ma D, Lei P, Liu Q. Long noncoding RNA TP53TG1 suppresses the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating the PRDX4/ β -catenin pathway. *Cancer Lett.* 2021;513:75–89. doi: 10.1016/j.canlet.2021.04.022.
37. Fang D, Ou X, Sun K, Zhou X, Li Y, Shi P, Zhao Z, He Y, Peng J, Xu J. m6A modification-mediated lncRNA TP53TG1 inhibits gastric cancer progression by regulating CIP2A stability. *Cancer Sci.* 2022;113(12):4135–4150. doi: 10.1111/cas.15581.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contribution

A.M. Burdenny, the study design, selection of primers, experimental studies, text editing; S.S. Lukina, experimental studies, statistical analysis, text editing; E.A. Filippova, statistical analysis, preparation of tables and illustrations, discussion of the results, text editing; N.A. Ivanova, experimental studies, data analysis, discussion of the results and editing of the manuscript; I.V. Pronina, experimental studies, participation in the analysis of literature and discussion of the results, text editing; V.I. Loginov, collection and analysis of clinical sample characteristics, selection of primers, text editing; T.P. Kazubskaya, collection and characterization of clinical samples, participation in the discussion of the results, text editing; D.N. Kushlinskiy, patient management, analysis of medical files, participation in the correlation of the results with clinical patient characteristics, discussion of the results, text editing; D.A. Tsekatonov, morphological studies of the tumors, discussion of the results, correlation of the results with morphological tumor characteristics, text editing; K.I. Zhordania, collection and characterization of clinical samples, discussion of the results, text editing; E.A. Braga, the study design, literature analysis, text writing and final editing. 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.

Alexey M. Burdenny – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹; Junior Research Fellow, Laboratory of Chemical Physics of Bioanalytical Processes²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>.
✉ Ul. Baltiyskaya, 8, Moscow, 125315, Russian Federation. E-mail: burdenny@gmail.com

Svetlana S. Lukina – Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6246-2444>.
E-mail: sveta_sergeevna349@mail.ru

Elena A. Filippova – PhD, Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>.
E-mail: p.lenyxa@yandex.ru

Natalya A. Ivanova – Junior Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3314-6183>.
E-mail: nata-i@list.ru

Irina V. Pronina – Cand. of Biol. Sci., Senior Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>. E-mail: zolly_sten@mail.ru

Vitaly I. Loginov – Cand. of Biol. Sci., Leading Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹; Senior Research Fellow³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>.
E-mail: loginov7w@gmail.com

Tatyana P. Kazubskaya – MD, PhD, Oncogeneticist, Senior Research Fellow, Laboratory of Clinical Oncogenetics⁴; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>. E-mail: oncogen5@ronc.ru

Dmitry N. Kushlinskiy – PhD, Associate Professor, Chair of Oncology and Pathomorphological Disciplines⁵; Head of the Department of Gynecological Oncology⁶; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1490-8418>.
E-mail: drkushlinskiy@gmail.com

Dmitry A. Tsekatonov – MD, Pathologist, Head of the Department of Pathological Anatomy⁷; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-1561-9681>.
E-mail: mtsekatonov@inbox.ru

Kirill I. Zhordania – MD, PhD, Professor, Leading Research Fellow, Department of Gynecological Oncology⁸; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1380-3710>.
E-mail: kiazoz2@yandex.ru

Eleonora A. Braga – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics¹; Leading Research Fellow³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>.
✉ Ul. Baltiyskaya, 8, Moscow, 125315, Russian Federation. E-mail: eleonora10_45@mail.ru

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology; ul. Baltiyskaya, 8, Moscow, 125315, Russian Federation

²N.M. Emanuel Institute for Biochemical Physics; ul. Kosygina, 4, Moscow, 119334, Russian Federation

³Research Centre for Medical Genetics; ul. Moskvorechye, 1, Moscow, 115522, Russian Federation

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

⁵Institute for Advanced Training of Healthcare Specialists Ministry of Health of the Khabarovsk Territory; ul. Krasnodarskaya, 9, Khabarovsk, 680009, Russian Federation

⁶Regional Clinical Center of Oncology Ministry of Health of the Khabarovsk Territory; 680042, Khabarovsk, Voronezhskoe shosse, 164, Russian Federation



Оригинальная статья

Сывороточные концентрации хромогранина А, серотонина и натрийуретического пептида снижены у больных нейроэндокринными опухолями с избыточной массой тела и ожирением в сравнении со здоровыми донорами

Тимофеев Ю.С.¹ • Любимова Н.В.² • Драпкина О.М.¹

Тимофеев Юрий Сергеевич – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., руководитель лаборатории изучения биохимических маркеров риска хронических неинфекционных заболеваний имени Н.В. Перовой¹;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9305-6713>
✉ 101990, г. Москва, Петроверигский пер., 10, Российская Федерация.
E-mail: timofeev_lab@mail.ru

Любимова Нина Васильевна – д-р биол. наук, профессор, главный научный консультант, лаборатория клиничко-диагностическая консультативно-диагностического центра²;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0430-2754>.
E-mail: biochimia@yandex.ru

Драпкина Оксана Михайловна – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор¹;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4453-8430>.
E-mail: omdrapkina@gnicpm.ru

Обоснование. Нейроэндокринные опухоли (НЭО) представляют собой группу новообразований, для диагностики и мониторинга которых особое значение имеют циркулирующие биомаркеры – хромогранин А (ХгА), серотонин и применяемый как маркер карциноидной болезни сердца N-концевой фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида (англ. N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP). На концентрацию биомаркеров НЭО влияет ряд преаналитических факторов, включая индекс массы тела (ИМТ) пациентов.

Цель – провести сравнительный анализ сывороточных концентраций ХгА, серотонина и NT-proBNP у больных НЭО различных локализаций с нормальной массой тела, с избыточной массой тела и ожирением.

Материал и методы. В поперечное исследование включено 94 пациента с НЭО различных локализаций и 78 условно здоровых лиц без онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний, сопоставимых с больными по полу и возрасту. Определение биохимических маркеров в сыворотке крови проводили до назначения курса химиотерапии/биотерапии или хирургического лечения с использованием стандартизованных иммуноферментных тест-систем Chromogranin A NEOELISA (Eurodiagnostica, Швеция), Serotonin ELISA (IBL, США) и электрохемилюминесцентного метода на анализаторе Cobas e601 (Roche, Швейцария). Общую группу больных НЭО разделили на 2 подгруппы: 46 больных с нормальной массой тела (ИМТ от 18 до 24,9) и 48 пациентов с избыточной массой тела или ожирением (ИМТ \geq 25).

Результаты. У больных НЭО медианы ИМТ не отличались в зависимости от распространенности процесса, функциональной активности

и степени злокачественности опухоли. Медианы концентраций ХгА (150 нг/мл), серотонина (188 нг/мл) и NT-proBNP (117 пг/мл) у пациентов с НЭО с ожирением и избыточной массой тела были статистически значимо ниже ($p = 0,008$, $p = 0,005$ и $p = 0,012$ соответственно), чем у больных НЭО с нормальной массой тела (769 нг/мл, 704 нг/мл и 197 пг/мл соответственно). В подгруппе с ИМТ \geq 25 контрольной группы статистически значимо ($p = 0,0001$) более низким был только уровень серотонина. По данным ROC-анализа, диагностическая эффективность биомаркеров НЭО при ожирении снижается – в группе пациентов с нормальной массой тела AUC (англ. area under curve – площадь под кривой) составила 0,87 для ХгА и 0,78 для серотонина, тогда как при ИМТ \geq 25 – 0,81 и 0,62 соответственно.

Заключение. Ожирение является фактором, способным потенциально затруднить выявление биохимических маркеров НЭО – ХгА, серотонина и NT-proBNP.

Ключевые слова: нейроэндокринные опухоли, ожирение, индекс массы тела, хромогранин А, серотонин, NT-proBNP

Для цитирования: Тимофеев ЮС, Любимова НВ, Драпкина ОМ. Сывороточные концентрации хромогранина А, серотонина и натрийуретического пептида снижены у больных нейроэндокринными опухолями с избыточной массой тела и ожирением в сравнении со здоровыми донорами. Альманах клинической медицины. 2024;52(3):162–169. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-019.

Поступила 25.03.2024; доработана 23.04.2024; принята к публикации 25.07.2024; опубликована онлайн 15.08.2024

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России; 101990, г. Москва, Петроверигский пер., 10–3, Российская Федерация

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация



Нейроэндокринные опухоли (НЭО) представляют собой группу новообразований, происходящих из нейроэндокринных клеток, и характеризуются высокой биохимической и биологической активностью, опосредованной гиперпродукцией и секрецией в циркулирующий кровоток широкого спектра гормонов, нейропептидов и биогенных аминов [1, 2]. Данные соединения используют в диагностике и мониторинге НЭО в качестве циркулирующих биохимических маркеров, среди которых центральное значение имеет универсальный маркер НЭО – хромогранин А (ХгА) [1–3]. Этот нейропептид участвует в организации синаптических везикул и характеризуется плеiotропным биологическим действием. Для диагностики одного из основных осложнений НЭО – карциноидного синдрома (КС) – применяют специфический биогенный амин серотонин, повышенные концентрации которого оказывают профибротический эффект, приводящий к развитию перитонеального и кардиального фиброза [1, 4]. Кардиофиброз, или карциноидная болезнь сердца (КБС), – одно из наиболее жизнеугрожающих состояний при НЭО. Для его биохимической диагностики и раннего выявления используют N-концевой фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида (англ. N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP) [4, 5].

Несмотря на высокую диагностическую и прогностическую эффективность биохимических маркеров НЭО, их концентрации в сыворотке и плазме крови подвержены влиянию преаналитических факторов [1, 4]. Среди них особое место занимают сопутствующие заболевания, в частности ожирение – многофакторное нейроповеденческое заболевание, которое сопряжено не только с избыточным накоплением жировой ткани, но и с биологическими особенностями [6–8]. При ожирении патологически измененная жировая ткань характеризуется аномальным клеточным составом, а также повышенной эндокринной и паракринной активностью, приводящей к секреции биологически активных соединений – цитокинов, адипокинов, белков теплового шока, факторов роста, нейропептидов и их рецепторов [9, 10].

При ожирении происходит снижение концентрации NT-proBNP, что затрудняет диагностику сердечной недостаточности и ограничивает потенциал этого кардиомаркера [11–15]. В ряде работ приведены данные об изменении на фоне ожирения циркулирующих концентраций некоторых нейропептидов и биогенных аминов,

включая серотонин, однако точные биологические механизмы данных процессов до конца не ясны [16–18]. При этом взаимосвязь ожирения с концентрациями ХгА, серотонина и NT-proBNP у больных НЭО практически не изучена, но представляет интерес, особенно с учетом увеличения частоты выявления НЭО и распространенности ожирения в популяции.

Цель настоящего исследования – провести сравнительный анализ сывороточных концентраций ХгА, серотонина и NT-proBNP у больных НЭО различных локализаций с нормальной массой тела, с избыточной массой тела и ожирением.

Материал и методы

В поперечное исследование включено 94 пациента с НЭО различных локализаций в возрасте от 22 до 83 лет (медиана 61 год), вошедших в основную группу, и 78 здоровых лиц без онкологической патологии, а также без острых сердечно-сосудистых заболеваний и заболеваний почек в возрасте от 20 до 84 лет (медиана 55 лет), составивших группу контроля. Набор пациентов осуществляли последовательно в период с ноября 2017 по июль 2023 г.

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, все пациенты подписали информированное согласие на участие в нем. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (протокол № 9 от 12.12.2016).

Основная и контрольная группы были сопоставимы по полу и возрасту (табл. 1). Пациенты основной группы имели морфологически подтвержденный диагноз НЭО, при этом определение биохимических маркеров в сыворотке крови проводилось до назначения курса химиотерапии/биотерапии или хирургического лечения в клинических подразделениях ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Оценивали распространенность опухолевого процесса согласно критериям Международной классификации стадий злокачественных новообразований TNM (англ. tumor, nodule and metastasis – опухоль, узел, метастазы), а также функциональную активность новообразования: наличие КС и КБС по данным клинико-инструментальных исследований. Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывали по формуле Кетле ($\text{кг}/\text{м}^2$). Для анализа в обеих группах выделяли 2 подгруппы: с нормальной массой тела (ИМТ от 18 до 24,9) и с избыточной массой тела или ожирением (ИМТ ≥ 25).

**Таблица 1.** Общая характеристика пациентов, включенных в исследование

Характеристика	Больные НЭО	Контрольная группа
Количество пациентов, абс.	94	78
Возраст, Me [Q25; Q75], годы	61 [22; 83]*	55 [20; 84]
Мужчины, абс. (%)	32 (34,1)**	23 (29,5)
Женщины, абс. (%)	62 (65,9)**	55 (70,5)
Локализация НЭО, абс. (%):		
желудок	11 (11,7)	–
поджелудочная железа	15 (16,0)	–
легкие	16 (17,0)	–
тонкая кишка	26 (27,7)	–
толстая кишка	5 (5,3)	–
Невыявленный первичный очаг, абс. (%)	21 (22,3)	–
Наличие метастазов в печени, абс. (%)	67 (71,3)	–
Карциноидный синдром, абс. (%)	58 (61,7)	–
Карциноидная болезнь сердца, абс. (%)	36 (38,4)	–
Нормальная масса тела (ИМТ 18–24,9), абс. (%)	46 (48,9)	32 (41,0)
Избыточная масса тела или ожирение (ИМТ \geq 25), абс. (%)	48 (51,1)	46 (59,0)

ИМТ – индекс массы тела (кг/м²); НЭО – нейроэндокринная опухольОтличия от контрольной группы: * $p = 0,1$ (критерий Манна – Уитни); ** $p = 0,62$ (двусторонний критерий Фишера)**Таблица 2.** Отсутствие различий в индексе массы тела в зависимости от клинических характеристик нейроэндокринной опухоли

Клиническая характеристика НЭО	ИМТ, Me [Q25; Q75]	Значение p
Наличие отдаленных метастазов:		0,96
выявлены	25,4 [21,5; 30,3]	
не выявлены	24,4 [21,5; 29,9]	
Функциональная активность:		0,37
есть КС	24,3 [21,5; 29,3]	
нет КС	26,1 [22,2; 30,6]	
Наличие КБС:		0,35
выявлена	24,2 [21,3; 29,3]	
не выявлена	25,5 [22,1; 30,3]	
Степень дифференцировки:		0,67
Grade 1	24,9 [21,5; 30,6]	
Grade 2	26,6 [22,7; 31,6]	
Grade 3	26,5 [23,99; 27,1]	

ИМТ – индекс массы тела (кг/м²); КБС – карциноидная болезнь сердца; КС – карциноидный синдром; НЭО – нейроэндокринная опухоль

Взятие крови для исследования биохимических маркеров НЭО проводили натошак из локтевой вены, образцы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин., после чего аликвоты сыворотки крови хранили при температуре (-80) °С в течение 1–1,5 месяцев до проведения исследования. Концентрации ХгА и серотонина определяли иммуноферментным методом на анализаторах ВЕР 2000 Advance (Siemens, ФРГ) и Multiscan FC (Thermo, США) при помощи стандартизованных тест-систем Chromogranin A NEOELISA (Eurodiagnostica, Швеция) и Serotonin ELISA (IBL, США). Анализ уровней NT-proBNP проводили электрохемилюминесцентным методом на автоматическом анализаторе Cobas e601 (Roche, Швейцария) с использованием высокочувствительной технологии Elecsys NT-proBNP (Roche, Швейцария). Биохимические исследования маркеров выполняли в лаборатории клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и в лаборатории изучения биохимических маркеров риска хронических неинфекционных заболеваний имени Н.В. Перовой отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения ФГБУ «НМИЦ терапии и профилактической медицины» Минздрава России с ноября 2017 по июль 2023 г.

Статистический анализ данных осуществляли в программах SPSS Statistics 21 (IBM, Россия) и Statistica 10 (Statsoft, США) с использованием методов непараметрической статистики (критерий Манна – Уитни, Краскела – Уоллиса), а также ROC-анализа (англ. receiver operating characteristic – рабочая характеристика приемника). Для количественных переменных рассчитывали медианы (Me), верхний и нижний квартили [Q25; Q75], для качественных переменных, таких как клинические характеристики больных, оценивали относительную частоту (%) их выявления в группах исследования. Пороговые уровни вычисляли с применением максимального индекса Юдена (J_{max}). Значения считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В группе пациентов с НЭО концентрации ХгА (медиана 387 нг/мл) и серотонина (медиана 397 нг/мл) статистически значимо ($p < 0,001$) превышали аналогичные показатели в контрольной группе (медианы 57,8 и 158 нг/мл соответственно).

Чтобы оценить значение ожирения, изучали связь ИМТ с клиническими особенностями НЭО. Отметим, что медианы ИМТ у больных НЭО не отличались в зависимости от распространенности процесса (табл. 2). Согласно полученным



данным, для пациентов с более тяжелым течением НЭО не было характерно снижение ИМТ относительно больных с более благоприятным клиническим течением заболевания. Таким образом, мы не обнаружили статистически значимых ассоциаций между нормальной массой тела или ее избытком/ожирением и прогрессированием основного заболевания. Учитывая удовлетворительное состояние больных и отсутствие в нашей выборке пациентов с дефицитом массы тела, можно предположить отсутствие влияния возможной кахексии на фоне опухолевого роста на массу тела пациентов.

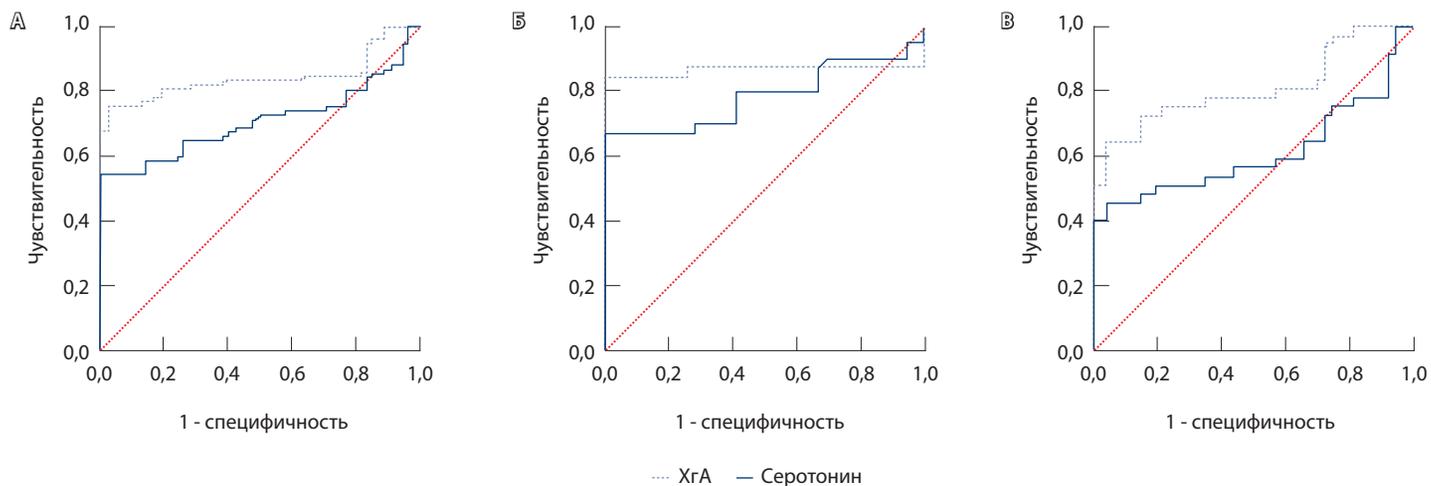
Сравнение концентраций биохимических маркеров показало статистически значимое снижение ХгА, серотонина, NT-proBNP у больных

НЭО с ожирением или избыточной массой тела по сравнению с больными НЭО с нормальной массой тела (табл. 3). Статистически значимые различия между подгруппами, разделенными по величине ИМТ, отмечены как в общей группе НЭО, так и в подгруппах НЭО с метастазами в печени, КС и КБС, практически по всем показателям, кроме уровня серотонина в подгруппе пациентов с КС, где отличия носили характер тенденции. При этом уровни ХгА и серотонина в сыворотке крови больных НЭО с ИМТ ≥ 25 хотя и были ниже, чем у больных с нормальной массой тела, но все же отличались от концентраций у пациентов контрольной группы с ИМТ ≥ 25 ($p < 0,05$). Обращают на себя внимание концентрации NT-proBNP, которые сравнивались между

Таблица 3. Сравнительный анализ концентраций биохимических маркеров нейроэндокринных опухолей

Группы сравнения	n	ХгА, нг/мл		Серотонин, нг/мл		NT-proBNP, пг/мл	
		Me [Q25; Q75]	p	Me [Q25; Q75]	p	Me [Q25; Q75]	p
Общая группа больных НЭО	94	274 [83,4; 1778]	0,0000001	463 [137; 1200]	0,0004	135 [67,8; 284]	0,0000001
Контроль	78	57,8 [44,8; 76,0]		158 [122; 197]		62,1 [32,8; 102]	
Больные НЭО с ИМТ от 18 до 24,9	46	769 [171; 4479]	0,008	704 [195; 1281]	0,005	197 [89,6; 562]	0,012
Больные НЭО с ИМТ ≥ 25	48	150 [66,8; 150]		188 [105; 994]		117 [55,4; 206]	
Больные НЭО с МТС, ИМТ от 18 до 24,9	32	1249 [470; 5520]	0,0006	1170 [551; 1707]	0,0021	336 [177; 620]	0,0001
Больные НЭО с МТС, ИМТ ≥ 25	35	175 [81,3; 1008]		304 [105; 1085]		119 [59; 231]	
Больные НЭО с КС, ИМТ от 18 до 24,9	31	1019 [424; 5106]	0,022	1185 [551; 1707]	0,06	287 [161; 661]	0,004
Больные НЭО с КС, ИМТ ≥ 25	27	176 [103; 1310]		796 [131; 1124]		118 [52; 231]	
Больные НЭО с КБС, ИМТ от 18 до 24,9	19	2959 [768; 22261]	0,004	1138 [613; 1438]	0,049	612 [250; 956]	0,025
Больные НЭО с КБС, ИМТ ≥ 25	17	116 [74,6; 1544]		438 [64,1; 1042]		141 [52,1; 979]	
Контроль, ИМТ от 18 до 24,9	32	61,9 [46,6; 80,9]	0,09	190 [151; 244]	0,0001	74,1 [43,8; 100]	0,354
Контроль, ИМТ ≥ 25	46	55,5 [29,2; 66,8]		139 [101; 174]		53,7 [27,6; 125]	

NT-proBNP (N-terminal pro-brain natriuretic peptide) – N-концевой фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида; ИМТ – индекс массы тела (кг/м²); КБС – карциноидная болезнь сердца; КС – карциноидный синдром; МТС – метастазы; НЭО – нейроэндокринная опухоль; ХгА – хромогранин А



Результаты ROC-анализа уровней хромогранина А (ХгА) и серотонина у больных нейроэндокринными опухолями (НЭО) и в контроле в общей группе (А) и в зависимости от наличия избыточной массы тела или ожирения (Б и В): А – пациенты с НЭО vs контроль (AUC для ХгА 0,84 [95% доверительный интервал (ДИ) 0,77–0,91], AUC для серотонина 0,71 [95% ДИ 0,62–0,80]), Б – пациенты с НЭО с индексом массы тела от 18 до 24,9 vs контроль (AUC для ХгА 0,87 [95% ДИ 0,77–0,97], AUC для серотонина 0,78 [95% ДИ 0,68–0,89]), В – пациенты с НЭО с индексом массы тела ≥ 25 vs контроль (AUC для ХгА 0,81 [95% ДИ 0,71–0,91], AUC для серотонина 0,62 [95% ДИ 0,48–0,75])

подгруппами пациентов с КБС с нормальной массой тела и пациентов с КБС с избыточной массой тела или ожирением: здесь медианы различались более чем в 4 раза. В контрольной группе наблюдалась тенденция к более низким уровням анализируемых биомаркеров у больных с ожирением или избыточной массой тела относительно участников с нормальной массой тела, однако статистически значимые различия установлены только для серотонина.

Согласно результатам ROC-анализа, при ожирении или избыточной массе тела диагностическая эффективность ХгА и серотонина у больных НЭО относительно контрольной группы ниже, чем у больных с нормальной массой тела (рисунок). Площадь под кривой (англ. area under curve, AUC) для ХгА при нормальной массе тела составила 0,87, а в подгруппе с ИМТ ≥ 25 – 0,81. В то же время для серотонина разница в AUC была еще более выраженной (0,78 при нормальной массе тела и 0,62 в подгруппе с ИМТ ≥ 25). Пороговые уровни были рассчитаны с учетом достижения максимального индекса Юдена, при этом в подгруппах они отличались. В общей группе НЭО при рассчитанном пороговом уровне ХгА 101 нг/мл ($J_{\max} = 0,727$) диагностическая чувствительность составила 75,3% при специфичности 97,4%. При анализе выборки с нормальной массой тела пороговый уровень ХгА 94,8 нг/мл ($J_{\max} = 0,85$) позволял достигать чувствительности 85% при практически 100% специфичности, тогда как у больных с ожирением или

избыточной массой тела при пороговом уровне 102 нг/мл ($J_{\max} = 0,606$) диагностическая чувствительность равнялась 64,9% при специфичности 95,7%. Проведенный в общей группе больных НЭО анализ показал, что при рассчитанном пороговом уровне серотонина, равном 223 нг/мл ($J_{\max} = 0,443$), диагностическая чувствительность маркера была 58,4% при специфичности 85,9%. В подгруппе с нормальной массой тела пороговый уровень серотонина, рассчитанный по данным ROC-анализа, был выше 320 нг/мл ($J_{\max} = 0,644$, диагностическая чувствительность – 67,5%, специфичность – 96,9%); при ИМТ ≥ 25 он составлял 223 нг/мл ($J_{\max} = 0,416$, диагностическая чувствительность – 45,9%, специфичность – 95,7%), что соответствует описанным нами ранее статистически значимым различиям в уровнях серотонина в зависимости от массы тела не только у больных НЭО, но и в контрольной группе.

Обсуждение

Согласно полученным нами результатам, концентрации ХгА и серотонина, а также NT-proBNP были значительно ниже у больных НЭО, имеющих ожирение или избыточную массу тела, относительно пациентов с нормальной массой тела.

Снижение циркулирующих уровней NT-proBNP на фоне ожирения впервые показали M. Rivera и соавт. у пациентов с сердечной недостаточностью; позже это было подтверждено в ряде исследований [11, 12, 19, 20]. Механизмы данного явления неизвестны, однако предполагают,



что гипертрофия висцеральной жировой ткани приводит к увеличению экспрессии рецепторов натрийуретических пептидов на адипоцитах, которые связывают циркулирующий NT-proBNP [13, 14]. Другой предполагаемый механизм снижения NT-proBNP может быть обусловлен прямым липотоксическим действием на миокард, сопровождающимся снижением секреции биомаркера [14, 15]. Несмотря на то что обратная зависимость между уровнем NT-proBNP и ИМТ была подробно описана при кардиологической патологии, доказательства влияния ожирения на уровни данного маркера при НЭО в литературе не приводились. В этом отношении полученные нами результаты свидетельствуют о влиянии ожирения на уровни NT-proBNP не только при общей кардиологической патологии, но и у больных НЭО и КБС.

Исследования, посвященные изменениям концентраций ХгА при ожирении, немногочисленны. В ряде работ выявлена обратная корреляция с массой тела для производного ХгА – пептида катестатина – как в экспериментальных моделях, так и на клиническом материале [21–23]. Зафиксировано увеличение уровней ХгА при морбидном ожирении [24]. В нашей выборке не было пациентов с морбидным ожирением. В нашей работе у больных НЭО с ожирением 1-й и 2-й степени и избыточной массой тела было впервые показано снижение ХгА относительно больных с нормальным ИМТ.

В литературе описано комплексное влияние серотонина на желудочно-кишечный тракт, при этом для данного биогенного амина характерен анорексигенный эффект [25, 26]. Известно также, что повышенный уровень серотонина ассоциирован со снижением аппетита, опосредованным взаимодействием с адипокином лептином, что в итоге способствует уменьшению массы тела [27]. При ожирении развивается недостаточность серотонинергических систем, что приводит к подавлению экспрессии и секреции

серотонина, и одновременно повышается его связывание со специфическими рецепторами [17]. Полученные нами результаты демонстрируют статистически значимое снижение уровней серотонина при ИМТ ≥ 25 как у больных НЭО, так и в контрольной группе, что согласуется с данными литературы о снижении уровней серотонина при ожирении, однако применительно к НЭО такая закономерность была описана впервые и нуждается в подтверждении.

К ограничениям настоящего исследования следует отнести относительно небольшую выборку и малое количество данных, касающихся нутритивного статуса больных НЭО. Дальнейшие исследования на большей выборке, с учетом соотношений мышечной и жировой массы, развернутым анализом антропометрических показателей и учетом особенностей диеты больных НЭО и лиц контрольной группы, позволят более точно понять особенности влияния ожирения и избыточной массы тела на биохимический профиль при НЭО.

Заключение

В проведенном нами исследовании установлено, что концентрации биохимических маркеров НЭО ХгА, серотонина и NT-proBNP наиболее высоки у пациентов с нормальной массой тела, тогда как при ожирении и избыточной массе тела концентрации биомаркеров значительно ниже. В контрольной группе более низкие уровни при ожирении и избыточной массе тела зарегистрированы только для серотонина. Таким образом, ожирение не только является фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, но и потенциально способно затруднить выявление биохимических маркеров НЭО в сыворотке крови больных с данным метаболическим заболеванием. В прикладном аспекте важно, что на фоне ожирения биохимическая диагностика НЭО требует особого внимания и учета данного преаналитического фактора. ☺

Дополнительная информация

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Участие авторов

Ю.С. Тимофеев – концепция исследования, проведение биохимических исследований, анализ и интерпретация результатов исследования,

написание текста, статистическая обработка данных, редактирование рукописи; Н.В. Любимова – проведение биохимических исследований, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста, редактирование рукописи; О.М. Драпкина – концепция статьи, редактирование текста, написание текста, 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

- Oberg K. Circulating biomarkers in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(Suppl 1):17–25. doi: 10.1530/ERC-10-0280.
- Jacoba IM, Weber HC. Biomarkers in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2023;30(3):175–180. doi: 10.1097/MED.0000000000000805.
- Любимова НВ, Тимофеев ЮС, Чурикова ТК, Кузьминов АЕ, Кушлинский НЕ. Значение хромогранина А в диагностике и прогнозе нейроэндокринных опухолей. *Медицинский алфавит*. 2019;2(17):19–22. doi: 10.33667/2078-5631-2019-2-17(392)-19-22.
- Lyubimova NV, Timofeev YuS, Churikova TK, Kuzminov AE, Kushlinsky NE. [Significance of chromogranin A in diagnosis and prognosis of neuroendocrine tumors.] *Medical Alphabet*. 2019;2(17):19–22. Russian. doi: 10.33667/2078-5631-2019-2-17(392)-19-22.
- Aluri V, Dillon JS. Biochemical testing in neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017;46(3):669–677. doi: 10.1016/j.ecl.2017.04.004.
- Mariën L, Islam O, Chhajlani S, Lybaert W, Peeters M, Van Camp G, Op de Beeck K, Vandamme T. The quest for circulating biomarkers in neuroendocrine neoplasms: A clinical perspective. *Curr Treat Options Oncol*. 2023;24(12):1833–1851. doi: 10.1007/s11864-023-01147-3.
- Scheja L, Heeren J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(9):507–524. doi: 10.1038/s41574-019-0230-6.
- Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus MV. Anatomical, physiological, and functional diversity of adipose tissue. *Cell Metab*. 2018;27(1):68–83. doi: 10.1016/j.cmet.2017.12.002.
- Vianello E, Kalousova M, Dozio E, Tacchini L, Zima T, Corsi Romanelli MM. Osteopontin: The molecular bridge between fat and cardiac-renal disorders. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5568. doi: 10.3390/ijms21155568.
- Caleyachetty R, Thomas GN, Toulis KA, Mohammed N, Gokhale KM, Balachandran K, Nirantharakumar K. Metabolically healthy obese and incident cardiovascular disease events among 3.5 million men and women. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(12):1429–1437. doi: 10.1016/j.jacc.2017.07.763.
- Тимофеев ЮС, Джиоева ОН, Драпкина ОМ. Циркулирующие биологические маркеры ожирения: на пути к системному подходу. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023;22(4):3551. doi: 10.15829/1728-8800-2023-3551.
- Timofeev YS, Dzhoieva ON, Drapkina OM. [Circulating biological markers of obesity: Towards a systems approach.] *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(4):3551. Russian. doi: 10.15829/1728-8800-2023-3551.
- Rivera M, Cortes R, Salvador A, Bertomeu V, García de Burgos F, Payá R, Portolés M, Taléns-Visconti R, Martínez-Dolz L, Valero R, Sevilla B, Climent V. Obese subjects with heart failure have lower N-terminal pro-brain natriuretic peptide plasma levels irrespective of aetiology. *Eur J Heart Fail*. 2005;7(7):1168–1170. doi: 10.1016/j.ejheart.2005.04.003.
- Kistorp C, Bliddal H, Goetze JP, Christensen R, Faber J. Cardiac natriuretic peptides in plasma increase after dietary induced weight loss in obesity. *BMC Obes*. 2014;1:24. doi: 10.1186/s40608-014-0024-2.
- Aimo A, Januzzi JL Jr, Vergaro G, Clerico A, Latini R, Meessen J, Anand IS, Cohn JN, Gravning J, Ueland T, Nymo SH, Brunner-La Rocca HP, Bayes-Genis A, Lupón J, de Boer RA, Yoshihisa A, Takeishi Y, Egstrup M, Gustafsson I, Gaggin HK, Eggers KM, Huber K, Tentzeris I, Ripoli A, Passino C, Emdin M. Revisiting the obesity paradox in heart failure: Per cent body fat as predictor of biomarkers and outcome. *Eur J Prev Cardiol*. 2019;26(16):1751–1759. doi: 10.1177/2047487319852809.
- Цыганкова ОВ, Евдокимова НЕ, Латынцева ЛД. Хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса на фоне предиабета и абдоминального ожирения: компартменты жировых депо и кардиометаболические маркеры. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2023;7(1):22–29. doi: 10.32364/2587-6821-2023-7-1-22-29.
- Tsygankova OV, Evdokimova NE, Latyntseva LD. [Chronic heart failure with preserved ejection fraction amid prediabetes and abdominal obesity: fat depot compartments and cardiometabolic risk markers.] *Russian Medical Inquiry*. 2023;7(1):22–29. Russian. doi: 10.32364/2587-6821-2023-7-1-22-29.
- Ha Manh T, Do Anh D, Le Viet T. Effect of body mass index on N-terminal pro-brain natriuretic peptide values in patients with heart failure. *Egypt Heart J*. 2023;75(1):75. doi: 10.1186/s43044-023-00401-1.
- Karra E, Chandarana K, Batterham RL. The role of peptide YY in appetite regulation and obesity. *J Physiol*. 2009;587(1):19–25. doi: 10.1113/jphysiol.2008.164269.
- Максим ОВ, Салухов ВВ. От нарушений пищевого поведения к ожирению: вопросы диагностики и нейроэндокринной регуляции. *Consilium Medicum*. 2022;24(4):234–241. doi: 10.26442/20751753.2022.4.201543.
- Maksim OV, Salukhov VV. [From eating to obesity: issues of diagnosis and neuroendocrine regulation. A review.] *Consilium Medicum*. 2022;24(4):234–241. Russian. doi: 10.26442/20751753.2022.4.201543.
- Frank GKW, Shott ME, DeGuzman MC. The neurobiology of eating disorders. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2019;28(4):629–640. doi: 10.1016/j.chc.2019.05.007.
- Zheng LH, Wu LM, Yao Y, Chen WS, Bao JR, Huang W, Shi R, Zhang KJ, Zhang S. Impact of body mass index on plasma N-terminal ProB-type natriuretic peptides in Chinese atrial fibrillation patients without heart failure. *PLoS One*. 2014;9(8):e105249. doi: 10.1371/journal.pone.0105249.
- Rorh R, Jhund PS, Yilmaz MB, Kristensen SL, Welsh P, Desai AS, Køber L, Prescott MF, Rouleau JL, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR, Packer M, McMurray JJV. Comparison of BNP and NT-proBNP in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *Circ Heart Fail*. 2020;13(2):e006541. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006541.
- Bandyopadhyay GK, Mahata SK. Chromogranin A regulation of obesity and peripheral insulin sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:20. doi: 10.3389/fendo.2017.00020.
- Simunovic M, Supé-Domic D, Karin Z, Degoricija M, Paradzik M, Bozic J, Unic I, Skrabic V. Serum catestatin concentrations are decreased in obese children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2019;20(5):549–555. doi: 10.1111/pedi.12825.
- Pankova O, Korzh O. Plasma catestatin levels are related to metabolic parameters in patients with essential hypertension and type 2 diabetes mellitus. *Heart Vessels*. 2024;39(2):144–159. doi: 10.1007/s00380-023-02318-w.
- Malabu UH, Karamatic R, Mahy G, Sangla KS. Malignant range elevation of serum chromogranin A due to inadvertent use of proton pump inhibitor in a subject with pancreatic incidentaloma. *Case Rep Endocrinol*. 2011;2011:342480. doi: 10.1155/2011/342480.
- Schneck AS, Anty R, Tran A, Hastier A, Amor IB, Gugenheim J, Iannelli A, Piche T. Increased prevalence of irritable bowel syndrome in a cohort of French morbidly obese patients candidate for bariatric surgery. *Obes Surg*. 2016;26(7):1525–1530. doi: 10.1007/s11695-015-1907-0.
- Fysekidis M, Bouchoucha M, Bihan H, Reach G, Benamouzig R, Catheline JM. Prevalence and co-occurrence of upper and lower functional gastrointestinal symptoms in patients eligible for bariatric surgery. *Obes Surg*. 2012;22(3):403–410. doi: 10.1007/s11695-011-0396-z.
- Namkung J, Kim H, Park S. Peripheral serotonin: A new player in systemic energy homeostasis. *Mol Cells*. 2015;38(12):1023–1028. doi: 10.14348/molcells.2015.0258.



Serum concentrations of chromogranin A, serotonin and natriuretic peptide are decreased in patients with neuroendocrine tumors with overweight and obesity compared to healthy donors

Y.S. Timofeev¹ • N.V. Lyubimova² • O.M. Drapkina¹

Background: Neuroendocrine tumors (NETs) are a group of neoplasms, in which circulating biomarkers chromogranin A (CgA), serotonin, and N-terminal brain natriuretic pro-peptide (NT-proBNP), used as a marker of carcinoid heart disease, are especially important in the diagnosis and monitoring. A number of pre-analytical factors, including patients' body mass index (BMI), have an impact on NETs biomarker concentrations.

Aim: To perform a comparative analysis of serum concentrations of CgA, serotonin and NT-proBNP in patients with NETs of various locations with normal body weight and with overweight or obesity.

Methods: This cross-sectional study included 94 patients with NETs of various locations and 78 provisionally healthy individuals without cancer and cardiovascular disorders, matched by gender and age to the patients. Serum biochemical markers were measured before a course of chemotherapy/biotherapy or surgery with the use of standardized enzyme-linked immunosorbent assays Chromogranin A NEOELISA (Eurodiagnostica), Serotonin ELISA (IBL), and the electrochemiluminescent assay (Cobas e601 analyzer, Roche). All NETs patients were divided into 2 subgroups: 46 patients with normal bodyweight (BMI 18 to 24.9) and 48 patients with overweight/obesity (BMI \geq 25).

Results: The median BMI in the NET patients did not vary depending on their tumor extension, functional activity and malignancy grade. The median concentrations of CgA (150 ng/ml), serotonin (188 ng/ml)

and NT-proBNP (117 pg/ml) in the NET patients with obesity and overweight were significantly lower ($p = 0.008$, $p = 0.005$ and $p = 0.012$, respectively) than in the NET patients with normal body weight (769 ng/ml, 704 ng/ml and 197 pg/ml, respectively). In the control group, significantly ($p = 0.0001$) lower levels in the subgroup with BMI \geq 25 were obtained only for serotonin. The ROC analysis showed a decrease of the diagnostic efficiency of NET biomarkers in obesity: in the normal BMI group AUC (CgA) was 0.87 and AUC (serotonin) 0.78, whereas in those with BMI \geq 25, the AUC (CgA) and AUC (serotonin) were 0.81 and 0.62, respectively.

Conclusion: Obesity may make it difficult to identify biochemical markers of NETs – CgA, serotonin and NT-proBNP.

Key words: neuroendocrine tumors, obesity, body mass index, chromogranin A, serotonin, NT-proBNP

For citation: Timofeev YS, Lyubimova NV, Drapkina OM. Serum concentrations of chromogranin A, serotonin and natriuretic peptide are decreased in patients with neuroendocrine tumors with overweight and obesity compared to healthy donors. Almanac of Clinical Medicine. 2024;52(3):162–169. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-019

Received 25 March 2024; revised 23 April 2024; accepted 25 July 2024; published online 15 August 2024

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contribution

Y.S. Timofeev, the study concept, biochemical studies, analysis and interpretation of the results, text writing, statistical analysis, editing of the manuscript; N.V. Lyubimova, biochemical studies, analysis and interpretation of the results, text writing, editing of the manuscript; O.M. Drapkina, the paper concept, text writing and editing, 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.

Yuriy S. Timofeev – PhD, Senior Research Fellow, Head of the N.V. Perova Laboratory of Biochemical Markers of Chronical Noninfection Diseases Research¹;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9305-6713>
✉ Petroverigsky per. 10, Moscow, 101990, Russian Federation. E-mail: timofeev_lab@mail.ru

Nina V. Lyubimova – Doctor of Biol. Sci., Professor, Principal Research and Development Advisor, Clinical Diagnostic Laboratory of the Consultative and Diagnostic Center²;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0430-2754>.
E-mail: biochimia@yandex.ru

Oksana M. Drapkina – MD, PhD, Professor, Academician of Russian Academy of Sciences, Director¹;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4453-8430>.
E-mail: omdrapkina@gnicpm.ru

¹National Medical Research Centre of Therapy and Preventive Medicine; Petroverigsky per. 10, Moscow, 101990, Russian Federation

²N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology; Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115522, Russian Federation



Оригинальная статья

Полиморфизм гена *LGALS1* не связан с содержанием галектина-1 в опухолевой ткани и крови у больных раком толстой кишки

Уразова О.И.¹ • Рейнгардт Г.В.^{1,2} • Колобовникова Ю.В.¹ • Курносенко А.В.^{1,2} • Полетика В.С.¹ • Васильева О.А.¹ • Августинович А.В.³

Уразова Ольга Ивановна – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующая кафедрой патофизиологии лечебного факультета¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9457-8879>. E-mail: urazova.oi@smsu.ru

Рейнгардт Глеб Вадимович – ассистент кафедры патофизиологии лечебного факультета¹, врач-онколог²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3148-0900>
✉ 634050, г. Томск, Московский тракт, 2, Российская Федерация.
E-mail: glebreynardt@gmail.com

Колобовникова Юлия Владимировна – д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии лечебного факультета, заведующая кафедрой нормальной физиологии медико-биологического факультета¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7156-2471>. E-mail: kolobovnikova.julia@mail.ru

Курносенко Анна Васильевна – аспирант кафедры патофизиологии лечебного факультета¹, врач-онколог²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3210-0298>. E-mail: a.v.kurnosenko@tomonco.ru

Полетика Вадим Сергеевич – канд. мед. наук, доцент кафедры патофизиологии лечебного факультета¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2005-305X>. E-mail: vpoletika@yandex.ru

Васильева Ольга Александровна – канд. мед. наук, доцент кафедры патофизиологии лечебного факультета¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2882-4533>. E-mail: vasiljeva-24@yandex.ru

Августинович Александра Владимировна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отделения абдоминальной онкологии³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7301-7581>. E-mail: aov862@yandex.ru

Актуальность. Важную роль в патогенезе рака толстой кишки (РТК) играет галектин-1, содержание которого в крови и опухоли может зависеть от полиморфизма промоторной области гена *LGALS1*.

Цель – проанализировать зависимость содержания галектина-1 в ткани опухоли и плазме крови от генотипа полиморфных вариантов rs4820293 и rs4820294 гена *LGALS1* у больных РТК.

Материал и методы. Обследованы 70 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом РТК (код по Международной классификации болезней 10-го пересмотра С18–С20) – 39 мужчин и 31 женщина (средний возраст $65,4 \pm 5,7$ года), находившиеся на стационарном лечении в ОГАУЗ «ТООД» (г. Томск) и НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2020 по 2022 г. Контрольную группу составили 70 здоровых добровольцев – 34 мужчины и 36 женщин (средний возраст $62,3 \pm 7,2$ года). Материалом исследования была венозная кровь и (у больных РТК) образцы опухолевой ткани. Экспрессию галектина-1 в опухоли определяли иммуногистохимическим методом, концентрацию галектина-1 в плазме крови – иммуноферментным методом. Полиморфные варианты rs4820293 и rs4820294 гена *LGALS1* определяли с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Результаты. Распределение частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов rs4820293 и rs4820294 гена *LGALS1* у больных РТК и здоровых доноров было сопоставимым ($p > 0,05$). Анализ величины отношения шансов не подтвердил связь между полиморфными вариантами гена *LGALS1* и развитием РТК. При этом у носителей полиморфизма rs4820294 имела

сильная связь с регионарным метастазированием и степенью дифференцировки опухоли (значение критерия V Крамера более 0,4 при $p < 0,001$). Плазменная концентрация галектина-1 у больных РТК с генотипом AA полиморфизма rs4820294 оказалась выше, чем у здоровых носителей ($17,42$ против $12,92$ нг/мл, $p = 0,040$). Однако статистически значимых различий по содержанию галектин-1-положительных клеток в опухоли и галектина-1 в плазме крови у пациентов с РТК в зависимости от генотипа полиморфных вариантов гена *LGALS1* не выявлено ($p > 0,05$).

Заключение. Полиморфизм гена *LGALS1* не связан с развитием РТК, однако у носителей варианта rs4820294 имеется связь с клинко-морфологическими параметрами опухолевого процесса. Внутриопуховая экспрессия галектина-1 и содержание галектина-1 в крови у пациентов с РТК не зависят от генотипа полиморфных вариантов rs4820293 и rs4820294 гена *LGALS1*.

Ключевые слова: рак толстой кишки, галектин-1, генетический полиморфизм, ген *LGALS1*

Для цитирования: Уразова ОИ, Рейнгардт ГВ, Колобовникова ЮВ, Курносенко АВ, Полетика ВС, Васильева ОА, Августинович АВ. Полиморфизм гена *LGALS1* не связан с содержанием галектина-1 в опухолевой ткани и крови у больных раком толстой кишки. Альманах клинической медицины. 2024;52(3):170–177. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-006.

Поступила 09.02.2024; доработана 01.04.2024; принята к публикации 05.04.2024; опубликована онлайн 08.04.2024

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; 634050, г. Томск, Московский тракт, 2, Российская Федерация

² ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер»; 634009, г. Томск, пр. Ленина, 115, Российская Федерация.

³ Научно-исследовательский институт онкологии – филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; 634009, г. Томск, Кооперативный пер., 5, Российская Федерация



Рак толстой кишки (РТК) – одна из наиболее часто встречающихся злокачественных опухолей в мире, третья по распространенности и вторая по смертности независимо от пола [1]. В Российской Федерации РТК занимает четвертое место в структуре онкологической заболеваемости [2]. Несмотря на тенденцию к снижению заболеваемости и смертности ввиду реализации скрининговых программ и появления новых подходов к лечению, РТК остается значимой социально-экономической проблемой [1, 3]. Важную роль в патогенезе РТК играет опухолевое микроокружение, представленное различными сигнальными молекулами и клетками неопухолевой природы [4, 5]. Показано, что опухолевые клетки способны «программировать» опухолевое микроокружение за счет синтеза различных биомолекул, в том числе галектинов [6, 7].

Галектины относятся к семейству растворимых белков-лектинов, особенностью которых является связывание β -галактозидов [8]. Галектины принимают участие во всех основных этапах канцерогенеза, включая возникновение и рост опухоли, опухолевую прогрессию и метастазирование [9–11]. Гиперэкспрессия галектинов опухолевыми клетками характерна для злокачественных опухолей различных локализаций, в том числе для РТК [12–14], и часто коррелирует со стадией рака и прогнозом болезни [6].

Данные литературы об уровне экспрессии галектинов, в частности галектина-1, здоровыми и патологическими клетками противоречивы [15]. Это может быть обусловлено наличием полиморфных вариантов гена галектина-1 (*LGALS1*). Известно, что полиморфизм данного гена влияет на предрасположенность к развитию различных заболеваний как опухолевой, так и неопухолевой природы. В частности, полиморфный вариант rs4820293 *LGALS1* имеет важное значение в развитии миастении гравис [16], а гаплотип rs4820294/rs2899292 GG *LGALS1* связан с повышенной устойчивостью человека к вирусу гриппа H7N9 [17]. Установлено, что генотип AA полиморфизма rs4644 гена галектина-3 ассоциирован со сниженным риском развития дифференцированного рака щитовидной железы [18]. При этом генотипы СА и АА аллельного полиморфизма rs4652 гена галектина-3 значительно чаще встречаются у пациентов с раком желудка [19]. Согласно результатам работы А. Triguero-Martínez и соавт., различные аллельные варианты промоторной области *LGALS1* могут объяснять гетерогенность уровней данного лектина в периферической крови у больных ревматоидным артритом [20].

Цель исследования – проанализировать зависимость содержания галектина-1 в ткани опухоли и плазме крови от генотипа полиморфных вариантов rs4820293 и rs4820294 гена *LGALS1* у больных РТК.

Материал и методы

Исследование выполнено в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН О.И. Уразова), в отделении клинко-диагностической лаборатории ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (заведующая – д-р мед. наук А.И. Дмитриева) и центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО СибГМУ (заведующая – д-р мед. наук, профессор РАН Е.В. Удут). Проведение исследования одобрено решением локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (№ 8514/1 от 21.12.2020). Набор пациентов осуществлялся проспективно, данные изучались ретроспективно. У всех обследованных получено информированное согласие на участие в исследовании.

В основную группу вошли 70 пациентов с диагнозом РТК (код по Международной классификации болезней 10-го пересмотра С18–С20) – 39 мужчин и 31 женщина (средний возраст $65,4 \pm 5,7$ года). Пациенты находились на лечении в ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» и Научно-исследовательском институте онкологии Томского НИМЦ в период с 2020 по 2022 г.

Контрольную группу составили 70 здоровых добровольцев (группа здоровья II–IIIa) – 34 мужчины и 36 женщин (средний возраст $62,3 \pm 7,2$ года).

Критериями включения пациентов в исследование были злокачественные новообразования ободочной и прямой кишки I–IV стадии, критериями исключения – предоперационная лучевая терапия и химиотерапия, новообразования других локализаций, хронические инфекционные, аллергические и аутоиммунные заболевания в стадии обострения, а также отказ от участия в исследовании.

Для описания распространенности опухолевого процесса у пациентов с РТК использовали международную классификацию по системе TNM 8-го пересмотра (8th Edition AJCC, 2017 г.). Разделение злокачественных новообразований толстой кишки по степени дифференцировки опухоли выполняли в соответствии с российскими клиническими рекомендациями «Злокачественное новообразование ободочной кишки» (2022) и «Рак прямой кишки» (2022). Группа пациентов с РТК в соответствии с клиническими стадиями



(по классификации TNM 8-го пересмотра) включала: 15 человек с I стадией заболевания (T1–2N0M0), 21 – со II стадией (T3–4N0M0), 22 – с III стадией (T1–4N1–2M0) и 12 – с IV стадией (T1–4N0–2M1). Высокодифференцированные опухоли (G1) были диагностированы у 17 пациентов, умереннодифференцированные (G2) – у 41 пациента и низкодифференцированные (G3) – в 12 случаях.

Материалом исследования служила цельная периферическая кровь, полученная из локтевой вены у пациентов с РТК и здоровых доноров, а также образцы опухолевой ткани толстой кишки, полученные при операционном вмешательстве у больных РТК.

Оценку полиморфизма гена *LGALS1* проводили методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов продуктов амплификации специфических участков генома, полученных в ходе полимеразной цепной реакции, с последующей их визуализацией в ультрафиолетовом свете посредством электрофореза в агарозном геле. Изоляция ДНК выполнялась с использованием наборов “QIAamp DNA Blood Mini Kit” (QIAGEN, США) согласно инструкции производителя. Для полиморфных вариантов rs4820293 и rs4820294 гена *LGALS1* размер продуктов составил 220 и 250 п.н. соответственно. После завершения рестрикции детектировались генотипы GG, AA, GA однонуклеотидного полиморфизма.

Экспрессия галектина-1 опухолевыми клетками проводилась на парафиновых срезах тканевых образцов методом иммуногистохимии с применением антител к галектину-1 (поликлональные, кроличьи, рабочее разведение 1:500) (“GeneTex”, США). Для определения концентрации галектина-1 в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа типа «сэндвич» использовали тест-систему “Human Galectin-1 PicoKine ELISA Kit” (“BosterBio”, США).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с применением программы “Statistica for Windows” Version 12.0 (“StatSoft Inc.”, США). При статистическом описании результатов по экспрессии в опухоли и содержанию в крови галектина-1 вычисляли медиану, 25-й и 75-й перцентили. Для проверки соответствия распределения количественных признаков нормальному закону использовали критерий Шапиро – Уилка. С целью сравнительного анализа выборочных данных, имеющих ненормальное распределение, применяли непараметрический U-критерий Манна – Уитни (для независимых выборок). Распределение генотипов по исследованным полиморфным вариантам гена *LGALS1* проверяли на соответствие

равновесию Харди – Вайнберга. Для сравнения основной и контрольной групп по частоте генотипов и аллелей полиморфных вариантов rs4820293 и rs4820294 гена *LGALS1* использовали критерий χ^2 Пирсона. Для подтверждения связи генетического полиморфизма с РТК рассчитывали величину отношения шансов (ОШ). Об отсутствии связи между признаками судили по ОШ = 1, об отрицательной связи – по ОШ менее 1, о положительной связи – по ОШ более 1. Для установления связи между номинальными данными, характеризующими клинко-морфологические признаки опухолевого процесса, и генетическим полиморфизмом рассчитывали коэффициент корреляции V Крамера. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты

По результатам исследования аллельного полиморфизма гена галектина-1 (*LGALS1*) у больных РТК и здоровых доноров чаще встречался аллель G полиморфных вариантов rs4820293 и rs4820294. Анализ распределения генотипов показал, что у пациентов с РТК при обоих вариантах полиморфизма (rs4820293 и rs4820294) преобладал гомозиготный генотип по аллелю G над гомозиготным генотипом AA и гетерозиготным генотипом GA. Частота встречаемости генотипов и аллелей соответствовала равновесию Харди – Вайнберга. Закономерность их распределения у здоровых носителей полиморфизма rs4820293 оказалась сопоставимой с таковой при РТК. В случае полиморфизма rs4820294 имелись различия, указывающие на его слабую связь с заболеванием ($p = 0,037$). Однако расчет величины ОШ не подтвердил связь между генотипами и аллелями обоих полиморфных вариантов гена *LGALS1* с развитием РТК – нижняя и верхняя границы значений ОШ были менее и более 1 соответственно (табл. 1).

Дополнительно у больных РТК была проанализирована взаимосвязь между генотипами однонуклеотидных полиморфизмов rs4820293 и rs4820294 гена галектина-1 и клинко-морфологическими параметрами опухолевого процесса: размером опухоли (T1–4), наличием/отсутствием метастазов в регионарных лимфоузлах (N0–2) и очагов отдаленного метастазирования (M0–1), степенью дифференцировки опухоли (G1–3). При этом обнаруживалась значимая связь генотипов полиморфного варианта rs4820294 гена *LGALS1* с метастазированием опухоли в регионарные лимфатические узлы и дифференцировкой опухолевых клеток ($p < 0,001$). При полиморфизме rs4820293 такого рода связь отсутствовала ($p > 0,05$) (табл. 2).

**Таблица 1.** Распределение генотипов и аллелей rs4820293 и rs4820294 гена галектина-1 у больных раком толстой кишки, абс. (%)

Генотипы и аллели	Группы обследованных		χ^2 ; p	ОШ [95% ДИ]
	больные РТК	здоровые доноры		
Однонуклеотидный полиморфизм rs4820293				
AA	16 (22,8)	15 (21,4)	0,534; 0,062	1,09 [0,49–2,41]
GG	34 (48,6)	31 (44,3)		
GA	20 (28,6)	24 (34,3)		
A	26 (37,1)	27 (38,6)	0,030; 0,862	0,94 [0,47–1,86]
G	44 (62,9)	43 (61,4)		
Однонуклеотидный полиморфизм rs4820294				
GG	32 (45,7)	31 (44,3)	0,189; 0,037	1,05 [0,54–2,06]
AA	12 (17,1)	14 (20,0)		
GA	26 (37,2)	25 (35,7)		
G	45 (64,3)	44 (62,9)	0,031; 0,861	0,94 [0,47–1,87]
A	25 (35,7)	26 (37,1)		

χ^2 – значение критерия χ^2 Пирсона, p – уровень статистической значимости межгрупповых различий, ОШ – значение критерия отношения шансов, отражающее риск развития заболевания с 95% доверительным интервалом (ДИ)

Экспрессия галектина-1 опухолевыми клетками у больных РТК не различалась в зависимости от генотипа полиморфных участков rs4820293 и rs4820294 гена *LGALS1* ($p > 0,05$) (табл. 3).

Содержание галектина-1 в периферической крови у здоровых доноров с гомозиготным генотипом GG было значимо выше, чем при генотипе AA полиморфизма rs4820294 гена галектина-1 ($p = 0,030$). При этом у здоровых носителей генотипа AA данного полиморфизма плазменная концентрация галектина-1 оказалась существенно ниже, чем у носителей того же генотипа с РТК ($p = 0,040$) (табл. 4). Статистически значимых

внутригрупповых различий концентрации галектина-1 в плазме периферической крови в зависимости от носительства определенного генотипа полиморфного варианта rs4820293 или rs4820294 гена *LGALS1* у больных РТК установить не удалось ($p > 0,05$) (см. табл. 4).

Обсуждение

Для злокачественных новообразований различной локализации показана гиперэкспрессия галектина-1 в опухоли, ассоциированная с прогрессией опухолевого процесса. Галектины определяют и в периферической крови, а их плазменная

Таблица 2. Распределение генотипов полиморфизмов rs4820293 и rs4820294 гена галектина-1 у больных раком толстой кишки (количество человек, абс.) в зависимости от клинико-морфологических параметров опухолевого процесса

Однонуклеотидный полиморфизм	Генотип	T1–2	T3–4	N0	N1–2	M0	M1	G1	G2	G3
rs4820293	AA	5	11	10	9	12	2	5	19	2
	GG	6	28	11	20	28	7	2	22	2
	GA	4	16	4	16	18	3	4	11	3
V; p		0,133; 0,541		0,254; 0,104		0,076; 0,818		0,161; 0,458		
rs4820294	GG	5	27	6	29	26	6	5	9	6
	AA	2	10	3	9	9	4	6	9	1
	GA	8	18	16	7	23	2	0	34	0
V; p		0,175; 0,341		0,498; < 0,001		0,215; 0,199		0,455; < 0,001		

V – значение критерия V Крамера, p – уровень статистической значимости связи номинальных данных

**Таблица 3.** Опухолевая экспрессия галектина-1 (% позитивных клеток) у пациентов с раком толстой кишки в зависимости от генотипа полиморфных вариантов гена галектина-1

Однонуклеотидный полиморфизм	Генотип	Галектин-1-положительные опухолевые клетки, Me [Q1; Q3], %
rs4820293	AA	21 [5; 37]
	GG	22 [9; 56]
	GA	21 [2; 69]
rs4820294	GG	23 [7; 44]
	AA	20 [10; 51]
	GA	24 [9; 71]

Таблица 4. Концентрация галектина-1 в плазме крови у пациентов с раком толстой кишки в зависимости от генотипа полиморфных вариантов гена галектина-1

Однонуклеотидный полиморфизм	Генотип	Концентрация галектина-1 в плазме крови, Me [Q1; Q3], нг/мл	
		больные РТК	здоровые доноры
rs4820293	AA	17,67 [14,37; 20,05]	12,28 [12,26; 14,05]
	GG	16,21 [15,28; 18,72]	13,63 [13,28; 14,45]
	GA	16,97 [14,57; 18,92]	12,29 [12,23; 14,52]
rs4820294	GG	15,43 [12,23; 19,65]	14,93 [12,78; 14,04] $p_1 = 0,030$
	AA	17,12 [13,45; 20,75]	12,92 [12,89; 14,51] $p_2 = 0,040$
	GA	15,84 [14,65; 19,64]	13,95 [13,92; 15,46]

РТК – рак толстой кишки

 p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем у носителей генотипа AA аналогичной группы, p_2 – со сходным генотипом у больных РТК

концентрация может коррелировать с особенностями клинического течения опухолевых заболеваний [6, 21–23]. Высокое содержание галектинов в плазме крови при злокачественных новообразованиях обусловлено их избыточным синтезом как опухолевыми клетками, так и элементами опухолевого микроокружения [24, 25].

Согласно результатам исследования, проведенного нами ранее [26], у больных РТК относительное содержание опухолевых клеток, экспрессирующих галектин-1, составило 23% (11–41), что в 2,1 раза ($p = 0,001$) превышало аналогичный показатель у пациентов с аденомой толстой кишки (11% (8–19)). При этом плазменная концентрация галектина-1 у пациентов с РТК была 16,6 (12,23–20,75) нг/мл ($p = 0,004$), что выше, чем у здоровых доноров (13,74 (12,23–14,79) нг/мл). Обнаруживалась положительная корреляция между концентрацией галектина-1 в плазме крови и численностью галектин-1-

положительных опухолевых клеток ($r = 0,59$; $p = 0,002$) [26].

Поскольку в литературе представлены сведения о существовании связи аллельного полиморфизма генов галектинов-1 и -3 с активностью экспрессии кодируемых ими белков и предрасположенностью к определенным (в том числе опухолевым) заболеваниям [16–20], мы предположили, что экспрессия галектина-1 опухолевыми клетками и высокое содержание галектина-1 в периферической крови у больных РТК могут быть генетически детерминированными, а именно ассоциированными с носительством полиморфных вариантов rs4820293 и rs4820294 гена галектина-1 (*LGALS1*).

В настоящем исследовании при оценке полиморфизма гена *LGALS1* наиболее частым у пациентов с РТК оказался аллель G и генотип GG обоих аллельных вариантов – rs4820293 или rs4820294. В распределении генотипов полиморфизма rs4820294 у здоровых доноров и больных РТК имелись небольшие (указывающие на слабую связь с заболеванием) различия. Однако сходный характер распределения генотипов и аллелей полиморфизма rs4820293 в контрольной и основной группах исследования при широкой вариативности значений ОШ для обоих вариантов полиморфизма *LGALS1*, не позволяющих соотнести их с риском развития заболевания, указывает на отсутствие связи rs4820293 и rs4820294 с РТК. Следовательно, полиморфный ген *LGALS1* не является фактором генетической предрасположенности к заболеванию.

Допущение о том, что *LGALS1*-полиморфизм при РТК может определять агрессивный характер роста опухоли и неблагоприятное клиническое течение болезни, подтвердилось только у больных РТК с полиморфизмом rs4820294, у которых имелась относительно сильная связь его генотипов с регионарным метастазированием и степенью дифференцировки опухоли (значение критерия V Крамера более 0,4 при $p < 0,001$). У больных РТК – носителей полиморфизма rs4820293 – наличие/отсутствие регионарных и отдаленных метастазов, а также размер опухоли и степень дифференцировки опухолевых клеток, характеризующие стадию заболевания, не были связаны с исследуемыми генотипами.

Прямых данных литературы о связи полиморфизма гена галектина-1 с проявлениями опухолевой прогрессии при РТК и раке других локализаций нами не обнаружено. В этой связи на текущем этапе мы можем только констатировать этот факт с дальнейшим его изучением и подтверждением при увеличении объема выборочных данных в группах сравнения.



Вместе с тем результаты измерения плазменной концентрации галектина-1 показали, что у больных РТК с генотипом AA полиморфизма rs4820294 гена *LGALS1* она была существенно выше, чем у здоровых носителей. Однако отсутствие значимых внутрigrупповых различий по содержанию галектина-1 в ткани опухоли и плазме крови у обследованных пациентов в зависимости от генотипа полиморфных вариантов rs4820293 и rs4820294 гена *LGALS1*, не связанных (судя по величине ОШ) с заболеванием, свидетельствует о том, что продукция галектина-1 опухолью при РТК не определяется генетическим полиморфизмом. Скорее всего, она служит одним из эволюционных механизмов универсальной (характерной для разных опухолей) стратегии «выживания» опухолевых клеток, зависимым от других факторов.

Известно, что галектины типов 1 и 3 участвуют в агрегации опухолевых клеток и формировании первичного опухолевого очага, стимулируют процессы опухолевой инвазии – клеточно-матриксную адгезию и миграцию опухолевых клеток, неоангиогенез (через активацию экспрессии в опухоли рецептора к сосудисто-эндотелиальному фактору роста – VEGFR). Кроме того, они способны индуцировать опухоль-ассоциированную иммуносупрессию и угнетение противоопухолевого иммунитета через подавление функций и активацию апоптоза эффекторных Т-лимфоцитов

с противоопухолевыми свойствами и экспансию субпопуляций Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), подавляющих клеточно-опосредованный иммунный ответ [6, 27, 28].

Таким образом, функции галектинов разнообразны и направлены на распространение опухоли и ее «ускользание» из-под контроля основных регуляторных систем организма. Исследование роли галектинов в патогенезе опухолевого процесса – безусловно перспективное направление на пути поиска прогностических биомаркеров РТК и других онкозаболеваний, а также разработки новых подходов для предупреждения их прогрессирования.

Заключение

Рак толстой кишки не связан с носительством полиморфных вариантов rs4820293 и rs4820294 гена галектина-1. При этом полиморфизм rs4820294 проявляет сильную связь с клинико-морфологическими параметрами РТК – регионарным метастазированием и степенью дифференцировки опухоли. У носителей полиморфизма rs4820293 такая связь отсутствует. Содержание галектин-1-положительных клеток в опухолевой ткани и концентрация галектина-1 в периферической крови у больных РТК не зависят от генотипа полиморфных вариантов rs4820293 и rs4820294 гена *LGALS1*. Следовательно, аллельный полиморфизм гена *LGALS1* не связан с продукцией галектина-1 опухолью при РТК. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Исследования выполнены при финансовой поддержке (в части приобретения лабораторных расходных материалов и химических реактивов) Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МД-2788.2019.7).

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

О.И. Уразова – интерпретация и анализ данных, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи; Г.В. Рейнгардт – обследование пациентов, сбор данных, проведение исследования, статистический анализ клинико-экспериментальных данных, написание текста; Ю.В. Колобовникова – концепция и дизайн исследования, интерпретация и анализ данных, редактирование текста; А.В. Курносенко – обследование пациентов, сбор данных, проведение исследования, статистический анализ данных, редактирование текста; В.С. Полетика – статистический

анализ данных, написание текста; О.А. Васильева – критический анализ методологии и дизайна исследования, дизайн экспериментальной части исследования, редактирование текста; А.В. Августинович – обследование пациентов, сбор клинических данных, описание основной группы исследования. 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.

Благодарности

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» – главному врачу М.Ю. Грищенко и врачу-онкологу Ю.В. Мельниченко за помощь в наборе материала, ведущей клинико-диагностической лабораторией А.И. Дмитриевой за консультативную поддержку при освоении и проведении анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, а также студентке медико-биологического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России Л.Е. Вигуль за помощь в подготовке и проведении экспериментальных исследований.

Список литературы / References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7–30. doi: 10.3322/caac.21590.
2. Каприн АД, Старинский ВВ, Шахзадова АО, ред. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. М.: МНИ-ОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2022. 239 с.



- Kaprin AD, Starinskiy VV, Shakhzadova AO. The state of oncological care for the population of Russia in 2021. Moscow: The P.A. Herzen Moscow Scientific Research Oncological Institute – a branch of the NMRC of Radiology; 2022. 239 p. Russian.
3. Roselló S, Simón S, Cervantes A. Programmed colorectal cancer screening decreases incidence and mortality. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2019;4:84. doi: 10.21037/tgh.2019.12.13.
4. Chen Y, Zheng X, Wu C. The Role of the Tumor Microenvironment and Treatment Strategies in Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2021;12:792691. doi: 10.3389/fimmu.2021.792691.
5. Al-Zoughbi W, Hoefler G. Tumor Macroenvironment: An Update. *Pathobiology.* 2020;87(2):58–60. doi: 10.1159/000502097.
6. Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, Griffioen AW. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1855(2):235–247. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.03.003.
7. Li CH, Chang YC, Chan MH, Yang YF, Liang SM, Hsiao M. Galectins in Cancer and the Microenvironment: Functional Roles, Therapeutic Developments, and Perspectives. *Biomedicines.* 2021;9(9):1159. doi: 10.3390/biomedicines9091159.
8. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015–2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/>.
9. Vladioiu MC, Labrie M, St-Pierre Y. Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy (Review). *Int J Oncol.* 2014;44(4):1001–1014. doi: 10.3892/ijo.2014.2267.
10. Astorgues-Xerri L, Riveiro ME, Tijeras-Raballand A, Serova M, Neuzillet C, Albert S, Raymond E, Faivre S. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(2):307–319. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.07.007.
11. Girotti MR, Salatino M, Dalotto-Moreno T, Rabinovich GA. Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression. *J Exp Med.* 2020;217(2):e20182041. doi: 10.1084/jem.20182041.
12. Wang J, Liu Y, Yang Y, Xu Z, Zhang G, Liu Z, Fu H, Wang Z, Liu H, Xu J. High expression of galectin-7 associates with poor overall survival in patients with non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(27):41986–41995. doi: 10.18632/oncotarget.9749.
13. Tao L, Jin L, Dechun L, Hongqiang Y, Changhua K, Guijun L. Galectin-3 Expression in Colorectal Cancer and its Correlation with Clinical Pathological Characteristics and Prognosis. *Open Med (Wars).* 2017;12:226–230. doi: 10.1515/med-2017-0032.
14. Wu R, Wu T, Wang K, Luo S, Chen Z, Fan M, Xue D, Lu H, Zhuang Q, Xu X. Prognostic significance of galectin-1 expression in patients with cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int.* 2018;18:108. doi: 10.1186/s12935-018-0607-y.
15. Bacigalupo ML, Carabias P, Troncoso MF. Contribution of galectin-1, a glycan-binding protein, to gastrointestinal tumor progression. *World J Gastroenterol.* 2017;23(29):5266–5281. doi: 10.3748/wjg.v23.i29.5266.
16. Pál Z, Antal P, Millinghoffer A, Hullám G, Pálóczi K, Tóth S, Gabius HJ, Molnár MJ, Falus A, Buzás EI. A novel galectin-1 and interleukin 2 receptor β haplotype is associated with autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 2010;229(1–2):107–111. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.07.015.
17. Chen Y, Zhou J, Cheng Z, Yang S, Chu H, Fan Y, Li C, Wong BH, Zheng S, Zhu Y, Yu F, Wang Y, Liu X, Gao H, Yu L, Tang L, Cui D, Hao K, Bossé Y, Obeidat M, Brandsma CA, Song YQ, To KK, Sham PC, Yuen KY, Li L. Functional variants regulating LGALS1 (Galectin 1) expression affect human susceptibility to influenza A(H7N9). *Sci Rep.* 2015;5:8517. doi: 10.1038/srep08517.
18. Corrado A, Aceto R, Silvestri R, Dell'Anno I, Ricci B, Miglietta S, Romei C, Giovannoni R, Poliseno L, Evangelista M, Vitiello M, Cipollini M, Garritano S, Giusti L, Zallocco L, Elisei R, Landi S, Gemignani F. Pro64His (rs4644) Polymorphism Within Galectin-3 Is a Risk Factor of Differentiated Thyroid Carcinoma and Affects the Transcriptome of Thyrocytes Engineered via CRISPR/Cas9 System. *Thyroid.* 2021;31(7):1056–1066. doi: 10.1089/thy.2020.0366.
19. Shi Y, Lin X, Chen G, Yan J, Ying M, Zheng X. Galectin-3 rs4652 A>C polymorphism is associated with the risk of gastric carcinoma and P-glycoprotein expression level. *Oncol Lett.* 2017;14(6):8144–8149. doi: 10.3892/ol.2017.7258.
20. Triguero-Martínez A, Roy-Vallejo E, Montes N, de la Fuente H, Ortiz AM, Castañeda S, González-Álvarez I, Lamana A. Genetic LGALS1 Variants Are Associated with Heterogeneity in Galectin-1 Serum Levels in Patients with Early Arthritis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7181. doi: 10.3390/ijms23137181.
21. Chawla S, Warren TA, Wockner LF, Lambie DL, Brown IS, Martin TP, Khanna R, Leggatt GR, Panizza BJ. Galectin-1 is associated with poor prognosis in patients with cutaneous head and neck cancer with perineural spread. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(2):213–222. doi: 10.1007/s00262-015-1788-z.
22. Chen K, Cai Y, Zhang M, Wu Z, Wu Y. Both serum and tissue Galectin-1 levels are associated with adverse clinical features in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2018;65(9):e27229. doi: 10.1002/pbc.27229.
23. Gajiwala S, Torgeson A, Garrido-Laguna I, Kinsey C, Lloyd S. Combination immunotherapy and radiation therapy strategies for pancreatic cancer – targeting multiple steps in the cancer immunity cycle. *J Gastrointest Oncol.* 2018;9(6):1014–1026. doi: 10.21037/jgo.2018.05.16.
24. Ebrahim AH, Alalawi Z, Mirandola L, Rakhshanda R, Dahlbeck S, Nguyen D, Jenkins M, Grizzi F, Cobos E, Figueroa JA, Chiriva-Internati M. Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Ann Transl Med.* 2014;2(9):88. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.12.
25. Tang D, Gao J, Wang S, Ye N, Chong Y, Huang Y, Wang J, Li B, Yin W, Wang D. Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression. *Tumour Biol.* 2016;37(2):1889–1899. doi: 10.1007/s13277-015-3942-9.
26. Колобовникова ЮВ, Уразова ОИ, Полетика ВС, Рейнгардт ГВ, Романова ЕВ, Курносенко АВ, Дмитриева АИ, Янкович КИ, Грищенко МЮ. Особенности экспрессии галектинов 1 и 3 при раке толстого кишечника во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами опухоли. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2021;6(4):45–53. doi: 10.23946/2500-0764-2021-6-4-45-53. Kolobovnikova YuV, Urazova OI, Poletika VS, Reyngardt GV, Romanova EV, Kurnosenko AV, Dmitrieva AI, Yankovich KI, Grishchenko MYu. Galectin-1 and Galectin-3 expression in colon cancer and its correlation with tumor invasion, differentiation, and metastatic spread. *Fundamental and Clinical Medicine.* 2021;6(4):45–53. Russian. doi: 10.23946/2500-0764-2021-6-4-45-53.
27. Labrie M, De Araujo LOF, Communal L, Mes-Masson AM, St-Pierre Y. Tissue and plasma levels of galectins in patients with high grade serous ovarian carcinoma as new predictive biomarkers. *Sci Rep.* 2017;7(1):13244. doi: 10.1038/s41598-017-13802-5.
28. Полетика ВС, Колобовникова ЮВ, Уразова ОИ, Васильева ОА, Дмитриева АИ, Янкович КИ, Новицкий ВВ, Рябова ЛМ, Грищенко МЮ. Роль галектина-1, -3 в механизмах дисрегуляции Т-клеточного звена иммунного ответа при раке толстого кишечника. *Бюллетень сибирской медицины.* 2020;19(3):76–82. doi: 10.20538/1682-0363-2020-3-76-82. Poletika VS, Kolobovnikova YuV, Urazova OI, Vasileva OA, Dmitrieva AI, Yankovich KI, Novitsky VV, Ryabova LM, Grishchenko MYu. The role of galectin-1 and galectin-3 in the mechanisms of T-cell immune response dysregulation in colon cancer. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2020;19(3):76–82. doi: 10.20538/1682-0363-2020-3-76-82.



The *LGALS1* gene polymorphism is not associated with galectin-1 levels in tumor tissue and blood of colon cancer patients

O.I. Urazova¹ • G.V. Reyngardt^{1,2} • Yu.V. Kolobovnikova¹ •
A.V. Kurnosenko^{1,2} • V.S. Poletika¹ • O.A. Vasil'yeva¹ •
A.V. Avgustinovich³

Background: Galectin-1 plays an important role in the pathogenesis of colorectal cancer (CRC). The blood and tumoral levels of galectin-1 could be dependent on the polymorphism of the promotor region of *LGALS1* gene.

Aim: To analyze an association between galectin-1 levels in tumor tissue and plasma and the genotype of the rs4820293 and rs4820294 polymorphisms of the *LGALS1* gene in CRC patients.

Materials and methods: The study included a total of 70 inpatients with pathologically verified CRC (International Classification of Diseases 10th Revision codes C18–C20, 39 men and 31 women, mean age 65.4 ± 5.7 years), who were receiving treatment in the Tomsk Regional Oncology Center and Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center from 2020 to 2022. The control group consisted of 70 healthy volunteers (34 men and 36 women, mean age 62.3 ± 7.2 years). Venous blood samples were taken from all study participants and tumor tissue samples were obtained from the CRC patients. Galectin-1 expression in the tumor tissue was assessed by immunohistochemistry and plasma galectin-1 levels by enzyme-linked immunosorbent assay. The *LGALS1* gene polymorphisms rs4820293 and rs4820294 were identified by restriction fragment length polymorphism analysis.

Results: The distributions of genotype and allele frequencies of polymorphic variants rs4820293 and rs4820294 of the *LGALS1* gene in the CRC patients and in the healthy donors were comparable ($p > 0.05$). Calculation of odds ratios did not confirm

any association between *LGALS1* gene polymorphisms and CRC. However, the rs4820294 polymorphism had a strong association with regional metastasis and tumor differentiation grade (Cramer's V above 0.4, $p < 0.001$). The plasma galectin-1 levels in the CRC patients with the AA genotype of the rs4820294 polymorphism were higher than in the healthy carriers (17.42 versus 12.92 ng/ml, $p = 0.040$). However, there were no significant differences in the content of galectin-1+ cells in the tumor and galectin-1 in plasma of the CRC patients depending on the genotype of the *LGALS1* gene polymorphisms ($p > 0.05$).

Conclusion: The *LGALS1* gene polymorphism is not associated with CRC, but in the carriers of the rs4820294 variant is related to clinical and morphological parameters of the tumor process. The intratumoral expression and blood levels of galectin-1 in CRC patients are not dependent on the genotype of rs4820293 and rs4820294 polymorphisms of the *LGALS1* gene.

Key words: colorectal cancer, galectin-1, genetic polymorphism, *LGALS1* gene

For citation: Urazova OI, Reyngardt GV, Kolobovnikova YuV, Kurnosenko AV, Poletika VS, Vasil'yeva OA, Avgustinovich AV. The *LGALS1* gene polymorphism is not associated with galectin-1 levels in tumor tissue and blood of colon cancer patients. Almanac of Clinical Medicine. 2024;52(3):170–177. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-006.

Received 9 February 2024; revised 1 April 2024; accepted 5 April 2024; published online 8 April 2024

Funding

The study was performed with the financial support (for acquisition of laboratory supplies and reagents) from the Grant Council of the President of the Russian Federation for the state assistance to young Russian researchers (MD-2788.2019.7).

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contribution

O.I. Urazova, data analysis and interpretation, text editing, approval of the final version of the manuscript; G.V. Reyngardt, patient examination, data collection, statistical analysis of the clinical and experimental data, text writing; Yu.V. Kolobovnikova, the study concept and design, data analysis and interpretation, text editing; A.V. Kurnosenko, patient examination, data collection, statistical analysis, text editing; V.S. Poletika, statistical analysis, text writing; O.A. Vasil'yeva, review of the study methodology and design, design of the experimental part of the study, text editing; A.V. Avgustinovich, patient examination, clinical data collection. 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.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the following colleagues from the Tomsk Regional Oncology Center: M.Yu. Grishchenko, Head Physician, and Yu.V. Melnichenko, oncologist, for their assistance in the data collection; A.I. Dmitrieva, Head of Clinical Diagnostic Laboratory, for her consultative contribution to the adoption and performance of the restriction fragment length polymorphism analysis, as well as to L.E. Vigul, student of Medical Biological Faculty, Siberian State Medical University, for her assistance in the preparation and conduction of experimental parts of the study.

Olga I. Urazova – MD, PhD, Professor, Corr. Member of Russ. Acad. Sci., Head of Chair of Pathophysiology, Faculty of General Medicine¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9457-8879>. E-mail: urazova.oi@ssmu.ru

Gleb V. Reyngardt – Assistant Professor, Chair of Pathophysiology, Faculty of General Medicine¹; Oncologist²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3148-0900>

✉ Moskovskiy trakt 2, Tomsk, 634050, Russian Federation. E-mail: glebreyngardt@gmail.com

Yulia V. Kolobovnikova – MD, PhD, Professor, Chair of Pathophysiology, Faculty of General Medicine; Head of Chair of Hominal Physiology, Medical Biological Faculty¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7156-2471>. E-mail: kolobovnikova.julia@mail.ru

Anna V. Kurnosenko – Postgraduate Student, Chair of Pathophysiology, Faculty of General Medicine¹; Oncologist²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3210-0298>. E-mail: a.v.kurnosenko@tomonco.ru

Vadim S. Poletika – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Pathophysiology, Faculty of General Medicine¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2005-305X>. E-mail: vpoletika@yandex.ru

Olga A. Vasil'yeva – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Pathophysiology, Faculty of General Medicine¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2882-4533>. E-mail: vasiljeva-24@yandex.ru

Aleksandra V. Avgustinovich – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Abdominal Oncology³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7301-7581>. E-mail: aov862@yandex.ru

¹ Siberian State Medical University; Moskovskiy trakt 2, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Tomsk Regional Oncology Center; prospect Lenina 115, Tomsk, 634009, Russian Federation

³ Cancer Research Institute, branch of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; Kooperativnyy per. 5, Tomsk, 634009, Russian Federation



Обзор

Психические расстройства депрессивного и тревожного спектра при нейроэндокринных опухолях: распространенность, патогенез, клинические особенности

Коляго О.О.^{1,2} • Мунирова А.А.^{1,2} • Иванов С.В.^{2,3} • Стилиди И.С.¹

Коляго Олег Олегович – канд. мед. наук, зав. отделом психотерапевтической помощи¹, ст. науч. сотр. отдела по изучению эндогенных психических расстройств и аффективных состояний²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7595-1239>

✉ 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация.
E-mail: olegkolyago@yandex.ru

Мунирова Адэля Айдаровна – врач-психиатр отдела психотерапевтической помощи¹, мл. науч. сотр. отдела по изучению эндогенных психических расстройств и аффективных состояний²; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-2592-1388>. E-mail: adele@munirova.ru

Иванов Станислав Викторович – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотр. отдела по изучению пограничной психической патологии и психосоматических расстройств², профессор кафедры психиатрии и психосоматики³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9532-7150>. E-mail: stanislvi@gmail.com

Стилиди Иван Сократович – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>. E-mail: ronc@list.ru

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) составляют гетерогенную группу медленно прогрессирующих опухолей, происходящих из нейроэндокринных клеток и способных секретировать биологически активные вещества. Наиболее яркое клиническое проявление функционирующих НЭО – карциноидный синдром, который обусловлен гиперпродукцией серотонина и обычно сопровождается приливами, диареей, абдоминальной болью. У пациентов с НЭО частота психических расстройств депрессивного и тревожного спектра достигает 30–50%. Развитие расстройств депрессивного и тревожного спектра при НЭО может происходить по нозогенному механизму, чему способствуют длительный диагностический этап, наличие серьезного заболевания с тяжелыми соматическими симптомами и последующим снижением качества жизни. Психические расстройства могут возникать в результате действия соматогенных факторов, к которым относятся дисбаланс значимых медиаторов в центральной нервной системе (в частности, серотонина), а также хроническое воспаление и нарушения иммунной защиты организма. При лечении пациентов с НЭО, у которых верифицированы тревожные и депрессивные расстройства, особое внимание уделяется вопросу безопасности назначения первой линии терапии – селективных ингибиторов обратного захвата серотонина. Побочные эффекты этих препаратов связаны с активностью агонистов рецепторов серотонина в кишечнике, что вызывает диарею и усиление моторики желудочно-кишечного тракта – симптомы, подобные проявлениям

карциноидного синдрома. Накопленные данные позволяют судить об относительной безопасности серотонинергических антидепрессантов у пациентов с НЭО, но не исключают группы больных с повышенным риском осложнений, связанных с дополнительным влиянием на обмен серотонина. Современные представления о распространенности, патогенезе и лечении расстройств депрессивного и тревожного спектра, коморбидных НЭО, имеют ограниченный и противоречивый характер. В связи с этим целесообразно проведение исследований на больших выборках пациентов для выявления ключевых факторов патогенеза и манифестации психических расстройств у больных НЭО, что в целом будет способствовать оптимизации лечебного процесса.

Ключевые слова: депрессия, тревожные расстройства, нейроэндокринная опухоль, психические расстройства

Для цитирования: Коляго ОО, Мунирова АА, Иванов СВ, Стилиди ИС. Психические расстройства депрессивного и тревожного спектра при нейроэндокринных опухолях: распространенность, патогенез, клинические особенности. Альманах клинической медицины. 2024;52(3):178–187. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-015.

Поступила 05.03.2024; доработана 10.06.2024; принята к публикации 17.07.2024; опубликована онлайн 31.07.2024

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

² ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» Минобрнауки России; 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 34, Российская Федерация

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация



Нейроэндокринные опухоли (НЭО) – гетерогенная группа редких, медленно прогрессирующих опухолей, происходящих из нейроэндокринных клеток, которые могут возникать в любом органе, где представлена данная клеточная разновидность [1–4]. В течение длительного времени НЭО считались относительно редкими по сравнению с другими типами опухолей. Однако за последние три десятилетия получены подтверждения повышения заболеваемости НЭО [1, 3, 5]. J.C. Yao и соавт. отмечают 5-кратный рост заболеваемости – с 1,09 на 100 тыс. населения в 1973 г. до 5,25 на 100 тыс. в 2004 г. [6]. В России, согласно регистру МОЛНЭО (Медицинское общество по лечению нейроэндокринных опухолей), в период с 2007 по 2017 г. контингент пациентов с НЭО ежегодно увеличился на 7,9%. При сравнении эпидемиологических данных двух регистров – МОЛНЭО и европейского ENETS (англ. The European Neuroendocrine Tumor Society – Европейское общество нейроэндокринных опухолей) – Российская Федерация занимает 2-е место по распространенности НЭО после Чехии [4].

В целом НЭО характеризуются медленным ростом и лучшим прогнозом в сравнении с другими злокачественными новообразованиями. Пятилетняя выживаемость пациентов в зависимости от локализации опухоли и степени дифференцировки составляет от 65 до 82% [7, 8]. Ввиду хорошего прогноза и относительно большой продолжительности жизни больных перед специалистами встает вопрос о поддержании полноценного функционирования пациентов и сохранении качества жизни. В этой связи большое значение имеет своевременное выявление сопутствующей психопатологии.

Отличительной характеристикой НЭО считается способность продуцировать биологически активные соединения (биогенные амины, пептиды, гормоны). Они могут использоваться в качестве маркеров для диагностики, мониторинга и прогноза заболевания в случае определения в биологическом материале больного [1, 2, 4, 9, 10]. При этом общепринято деление циркулирующих маркеров на общие (или универсальные), гиперсекреция которых не приводит к развитию определенной картины заболевания, и специфические маркеры, ассоциированные с клиническими симптомами и синдромами. До настоящего времени наиболее востребованным универсальным маркером признан гликопротеин семейства гранинов – хромогранин А, который в большинстве случаев характеризуется наилучшим сочетанием диагностической чувствительности и специфичности при обследовании больных НЭО разных локализаций.

В соответствии с биологическими особенностями отдельно рассматривают функционально активные НЭО вследствие их способности синтезировать, накапливать и секретировать биологически активные соединения, такие как биогенные амины (серотонин, гистамин), гормоны и пептиды (инсулин, гастрин, соматостатин, глюкагон, вазоактивный интестинальный пептид), простагландины, тахикинины и др. [2, 9, 10]. Подобная гиперпродукция биологически активных веществ сопровождается соответствующей клинической картиной.

Наиболее яркое клиническое проявление функционирующих НЭО – карциноидный синдром (КС), частота встречаемости которого составляет от 30 до 40% в зависимости от локализации опухоли [11]. Типичные проявления КС обусловлены в первую очередь повышенной секрецией серотонина. К ним относятся приливы с гиперемией лица, секреторная диарея, абдоминальная боль, бронхоконстрикция, венозная телеангиоэктазия; при длительном течении развиваются фиброзные осложнения (мезентериальный фиброз, карциноидная болезнь сердца) [11, 12]. Кроме того, значимую роль в патофизиологии КС играет дофамин, гиперактивность которого преимущественно определяет вегетативную дисфункцию [4], а также гистамин и кинины [11].

Цель настоящего обзора – анализ данных литературы о распространенности, патогенезе и клинических особенностях психических расстройств депрессивного и тревожного спектра при НЭО.

Проведен поиск публикаций на английском и русском языках по ключевым словам “neuroendocrine tumor” / «нейроэндокринная опухоль», “depression” / «депрессия», “anxiety disorders” / «тревожные расстройства», “mental disorders” / «психические расстройства» за период с 2003 по 2023 г. в базе данных Medline через интерфейс системы PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) и РИНЦ (<https://elibrary.ru>). Отбирались оригинальные и обзорные статьи и монографии, анализировались списки литературы в источниках.

Распространенность психических расстройств у пациентов с нейроэндокринными опухолями

Данные по эпидемиологии психических расстройств у пациентов с НЭО ограничены единичными публикациями и во многом противоречивы. В обзоре предметного поля, опубликованном в 2021 г., проанализированы 22 исследования с общим количеством пациентов 3319 на предмет наличия у них психических расстройств, среди которых помимо тревоги и депрессии наблюдались изменения личности, нарушения сна и когнитивные

расстройств, в единичных случаях имели место психозы [5].

Учитывая большую распространенность тревоги и депрессии в популяции, а также значимое влияние этих симптомов на снижение качества жизни больных НЭО, в нашей статье этим психическим состояниям уделено наибольшее внимание. В таблице обобщены данные исследований, в которые были включены наиболее многочисленные группы больных (от 20 до 2721 пациента, всего – 3826) [13–25]. Все пациенты имели подтвержденный диагноз опухолевой патологии; их психическая симптоматика оценивалась с использованием наиболее надежных шкал клинической оценки. Согласно приведенным данным, НЭО характеризуются высокой частотой тревожных и депрессивных симптомов, достигающей 30–50%. При этом частота психических расстройств у больных НЭО может быть значительно выше, чем при других злокачественных новообразованиях. Так, в работе L. Song и соавт. дистресс наблюдался у 31,5% пациентов с НЭО, тогда как при других морфологических вариантах опухолей – примерно в 20% случаев [25].

Наиболее высокие значения встречаемости психических расстройств при НЭО получены в работе L. Major и соавт., в которой проводилась психиатрическая квалификация состояния пациентов с применением Шкалы Гамильтона для оценки депрессии и тревоги: у 50% пациентов выявлена депрессия, у 35% – тревога [13]. Однако малый объем выборки (n = 20) ограничивает возможности экстраполяции результатов на всю популяцию больных НЭО.

В ряде исследований использовали менее надежные с точки зрения клинической оценки инструменты – Госпитальную шкалу тревоги и депрессии (англ. Hospital Anxiety and Depression Scale – HADS), которая заполняется пациентами самостоятельно. Отметим значительный разброс показателей, что наиболее отчетливо прослеживается в результатах двух наиболее крупных современных исследований: доля пациентов с депрессией составила 3,8% по данным E. Soliday и соавт. (200 пациентов с НЭО) [16] против 20% в работе V.L. Beesley и соавт. (111 пациентов с НЭО) [21]. Подобные расхождения, предположительно, обусловлены гетерогенностью выборок, вкладом множества различных факторов, способных повлиять на результаты оценки. В частности, частота тревоги и депрессии может зависеть от локализации НЭО – значительно более высокие показатели отмечаются при гастроэнтеропанкреатических НЭО (возможно, в связи с более высокой частотой гиперпродукции серотонина) по сравнению с внекишечными НЭО [18]. Частота тревоги и депрессии также может значительно варьировать в зависимости от этапа лечения НЭО.

В проспективном исследовании N. Begum и соавт. (n = 90) через 1 год после хирургического вмешательства доля пациентов с повышенной тревожностью достигала 30% среди всех обследуемых и через 5 лет уменьшилась до 10%, тогда как за тот же период наблюдения частота депрессивных расстройств, напротив, увеличилась с 25 до 30% [24]. Сходную тенденцию наблюдали J. Hallet и соавт.: уровень тревоги у пациентов снизился на 10% спустя 6 месяцев после установления диагноза, тогда как выраженность депрессии осталась примерно на том же уровне [23]. В исследованиях G. Larsson и соавт. [14], C. Fröjd [19] средние показатели выраженности симптомов депрессии и тревоги по HADS соответствовали нормальным значениям, то есть не достигали клинической выраженности. По данным G. Larsson и соавт., уровень тревоги через 12 месяцев после установления диагноза НЭО был ниже, чем исходный, а выраженность депрессии спустя 9 месяцев – выше [14]. Следует отметить, что тревожные и депрессивные проявления оценивались специалистами с использованием разных методик, включая опросники качества жизни PROMIS-29 (англ. Patient-Reported Outcomes Measurement Information System – Информационная система оценки исходов, сообщаемых пациентами), EORTC QLQ-c30 (англ. European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire-C30 – Опросник качества жизни Европейской организации по изучению и лечению рака (30 вопросов)), что затрудняет проведение сравнительной оценки полученных результатов, которые в целом выглядят противоречивыми.

В последнее время стали появляться данные о том, что при НЭО так же, как и при злокачественных новообразованиях другой этиологии, психические расстройства могут развиваться на додиагностическом этапе заболевания, опережая манифестацию соматических симптомов. Согласно результатам когортного исследования с выборкой более 300 тыс. онкологических больных с разными типами опухолей, в среднем за 10 месяцев до установления онкологического диагноза у пациентов имели место изменения в модусе реагирования и поведения в отсутствие явных причинных факторов [26]. В другой работе из 62 450 пациентов с карциномой поджелудочной железы у 16,4% диагностирована депрессия до установления онкологического диагноза и у 13% – после верификации рака поджелудочной железы [27]. На додиагностическом этапе отмечаются отчетливые признаки дисфункции центральной нервной системы (ЦНС): неустойчивое настроение, гипертрофированная эмоциональная реакция на стрессовые ситуации, нарушения сна, плаксивость, раздражительность, чрезмерная фиксация



Распространенность психических расстройств депрессивного и тревожного спектра при нейроэндокринных опухолях

Авторы, год	N	Метод оценки	КС, всего	Психические расстройства		
				тревога	депрессия	другие
L. Major и соавт., 1973 [13]	22	HAM-D	–	7 (35%)	10 (50%)	У 10 (35%) – явления спутанности сознания
G. Larsson и соавт., 2001 [14]	24	EORTC QLQ-C30, HADS	20 (83%)	Выраженность симптомов не достигала клинической значимости		–
S. Russo и соавт., 2004 [15]	20	Психиатрическое интервью в соответствии с критериями DSM-IV	20 (100%)	У 3 (15%) выявлялись симптомы тревоги (однако не соответствовали критериям тревожного расстройства)	У 5 (25%) наблюдалась субдепрессивная симптоматика	15 (75%) соответствовали критериям диагноза «изменения личности вследствие другого медицинского состояния» (код DSM-IV 310.1)
E. Soliday и соавт., 2004 [16]	186	HADS	50 (26,9%)	Не оценивалась	7 (3,8%)	34 (18,3%) имели пограничные значения
R. Pezzilli и соавт., 2009 [17]	44	Опросники SF-12, GHQ-12, STAI, BDI-II	–	–	У 8 (18,2%) – депрессия средней тяжести; у 9 (20,5%) – легкая депрессия	–
P. Moretti и соавт., 2013 [18]	45	HADS	–	12 (26,7%) У 11 (24,4%) – коморбидность тревоги и депрессии	20 (44,4%)	–
C. Fröjd и соавт., 2017 [19]	36	EORTC QLQ-C30, HADS	–	Выраженность симптомов не достигала клинической значимости		–
S. Goswami и соавт., 2017 [20]	207	PROMIS-29	–	–	–	–
V. Beesley и соавт., 2018 [21]	111	HADS	62 (56%)	30%	20%	–
J. Adams и соавт., 2018 [22]	120	PROMIS-29	120 (100%)	24,2%	17,7%	–
J. Hallet и соавт., 2019 [23]	2721	ESAS	–	40% 30% (спустя 6 месяцев после установления диагноза)	25%	–
N. Begum и соавт., 2022 [24]	90	HADS	–	20% (в 1-й год после хирургического лечения), 30% (на 2-й год после лечения), 10% (через 5 лет после лечения)	25% (в 1-й год после хирургического лечения), 28% (на 2-й год после лечения), 30% (через 5 лет после лечения)	2 (1,8%) имели диагноз шизофрении
L. Song и соавт., 2022 [25]	200	HADS	–	31%	17,8%	–

BDI-II (Beck Depression Inventory-II) – Шкала депрессии Бека II; DSM-4 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition) – Диагностическое и статистическое руководство по психическим расстройствам, 4-е издание; EORTC QLQ-C30 (European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire-C30) – Опросник качества жизни Европейской организации по изучению и лечению рака (30 вопросов); ESAS (Edmonton Symptom Assessment System) – Эдмонтонская система оценки симптомов; GHQ-12 (12-item General Health Questionnaire) – Опросник общего состояния здоровья (12 вопросов); HADS (Hospital Anxiety and Depression Scale) – Госпитальная шкала тревоги и депрессии; HAM-D (Hamilton Rating Scale for Depression) – Шкала Гамильтона для оценки депрессии; PROMIS-29 (Patient-Reported Outcomes Measurement Information System) – Информационная система оценки исходов, сообщаемых пациентами; SF-12 (12-Item Short-Form Health Survey) – Короткая версия опросника здоровья (12 вопросов); STAI (State Trait Anxiety Inventory) – Шкала реактивной и личностной тревожности Спилбергера; КС – карциноидный синдром

Данные представлены как абсолютное число пациентов в подгруппе (n) и их доля (%) от общего числа пациентов, включенных в исследование (N)

на состоянии собственного здоровья – в сочетании с функциональными соматическими симптомами (диспептические явления, кашель в связи с бронхоконстрикцией, приливы, потливость) [28]. Данный спектр клинических проявлений определяет частое обращение и последующее длительное наблюдение у неврологов и психиатров с диагнозом соматоформного (функционального) расстройства [29]. Так, в исследовании S. Russo и соавт. у 15 из 20 пациентов еще до установления диагноза были отмечены изменения личности – высокая выраженность вербальной агрессии в социальных или профессиональных ситуациях, импульсивность и раздражительность, что описывалось пациентами и их близкими как несоответствие прежней личности пациента [15]. У больных было диагностировано изменение личности вследствие медицинского расстройства (код 310.1 DSM-IV (англ. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition – Диагностическое и статистическое руководство по психическим расстройствам, 4-е издание)); основными критериями данного диагноза выступали стойкий характер изменения личности и связанные с ними функциональные нарушения.

Манифестация указанных психических и функциональных расстройств на додиагностическом этапе НЭО определяет перспективы более раннего выявления этой группы опухолей, однако аспекты взаимосвязи эмоциональных изменений, признаков соматического дистресса и других симптомов с доклиническими и начальными стадиями развития НЭО еще предстоит исследовать.

Патогенез и клинические особенности психических расстройств у пациентов с нейроэндокринными опухолями

Патогенез расстройств депрессивного и тревожного спектра у пациентов с НЭО, а также особенности их клинического течения с учетом биохимических свойств опухоли остаются не до конца изученными.

Ряд авторов подразделяют психические расстройства при НЭО на нозогенные (возникающие в рамках психологической реакции на наличие серьезного соматического заболевания и его проявления) и соматогенные (связанные с нарушением баланса биогенных аминов, преимущественно серотонина) [30]. Еще в середине XX в. A. Thorson и O. Wooley выдвинули гипотезу о нозогенном механизме развития психических расстройств при НЭО [31, 32]. Высказывалось мнение об их схожести с психопатологией при любом другом длительно протекающем соматическом заболевании сопоставимой тяжести [32].

Тем не менее возникновение нозогенных реакций у пациентов с НЭО имеет некоторые отличительные особенности в сравнении с другими онкологическими заболеваниями. Показано, что для НЭО характерен длительный диагностический этап (медиана 9,2 года), в течение которого пациенты посещают более 6 специалистов здравоохранения и осуществляют около 12 визитов к специалистам разного профиля [2, 4, 9, 33]. Вследствие этого у пациентов формируются затяжные тревожные реакции (длительностью до нескольких месяцев), предметом тревоги служит беспокойство в отношении неизвестной болезни [30]. По данным G. Larsson и соавт., такие реакции наблюдались у 8 (42%) из 19 пациентов с НЭО, что было определено в рамках клинических интервью [14]. При установлении диагноза НЭО пациентов информируют об относительно благоприятном прогнозе заболевания – медленном прогрессировании и большей продолжительности жизни по сравнению с другими онкологическими заболеваниями. Как следствие, страх смерти смещается на второй план, уступая место тревожным руминациям, связанным с возможным прогрессирующим течением болезни, последующей трудовой дезадаптацией и значительным снижением качества жизни [14]. Именно поэтому выраженность проявлений тревоги и депрессии у пациентов с НЭО на диагностическом этапе выше, чем в период после установления онкологического диагноза, что является значимым отличием от динамики тревожно-депрессивных симптомов при других нозологиях [4, 25]. Так, в работе G. Larsson и соавт. в рамках расстройств адаптации у пациентов с НЭО преобладали тревожные (52%) и тревожно-депрессивные реакции (26%) [14].

При тревожно-депрессивных нозогениях следует отметить относительно неглубокое снижение аффекта с явлениями подавленности, ангедонии, пессимистического мировоззрения при отсутствии тяжелых депрессий с суицидальными мыслями. Результаты недавнего проспективного популяционного наблюдательного исследования с участием 2721 пациента с НЭО показали: на момент установления диагноза у 30–40% пациентов выявлено наличие тревоги умеренной и тяжелой степени, в течение последующих 6 месяцев доля этих пациентов снизилась на 10% и оставалась стабильной на протяжении 4,5 лет наблюдения [23].

Что касается качества жизни, этот показатель снижен у больных НЭО по сравнению с выборкой практически здоровых людей, сопоставимых по полу и возрасту. В когорте пациентов с НЭО значимый вклад в снижение качества жизни вносят КС, повышенная частота эпизодов приливов и диареи [34].



При оценке качества жизни 120 пациентов, принимавших аналоги соматостатина, по данным опросника EORTC QLQ-c30, наиболее распространенными и значимыми симптомами были утомляемость (76,7%), диарея (62,5%), абдоминальный дискомфорт (64,1%), нарушения сна (57,5%) [22]. У тех же пациентов при применении шкалы PROMIS-29, которая связана с более абстрактными социальными и психологическими конструкциями, чем домены EORTC QLQ-c30, качество жизни также было ниже по сравнению с общей популяцией, при этом значительное количество обследуемых испытывали депрессию (17,7%), беспокойство (24,2%), усталость (58,8%), бессонницу (34,9%) и неудовлетворенность социальной ролью (47%). В то же время более 70% больных отмечали хороший уровень социального функционирования [22].

Установлена зависимость уровня качества жизни больных НЭО и наличия психических расстройств от течения опухолевого процесса. Анкетирование пациентов с использованием инструмента PROMIS-29 показало: больные с рецидивирующими НЭО независимо от вида получаемого лечения (хирургическое, хирургическое и терапия аналогами соматостатина, другие виды лечения) имели самые низкие баллы физического, умственного и социального функционирования. Показатели депрессии в группах были одинаковыми, однако пациенты с рецидивирующим заболеванием сообщали о значительно более высокой тревоге по сравнению с пациентами, у которых не было клинических проявлений НЭО. Еще более заметно различалось физическое функционирование между группами: пациенты с рецидивирующей НЭО сообщали о значительном нарушении общего физического функционирования, расстройствах сна и значительной утомляемости [35].

В ответ на возникновение тяжелых соматических симптомов, в первую очередь приливов и гиперемии лица, у пациентов возникают сенситивные симптомокомплексы, не достигающие синдромальной завершенности. Кроме того, при развитии диареи, которая в тяжелых формах может быть неконтролируемой, описано ограничительное поведение с паническими атаками, что влияет на социальную активность пациентов [30].

При стабильном течении опухолевого процесса со временем отмечалось уменьшение тягостных соматических симптомов. По данным исследования N. Vegum и соавт., через 3 года после проведенного хирургического вмешательства у пациентов с эндокринными, желудочно-кишечными и связанными с лечением симптомами диапазон баллов опросника EORTC QLQ-c30 снижался до 10–30, что говорит

о нормальном функционировании, но при этом увеличивались показатели утомляемости, боли в мышцах/теле, в связи с чем пациенты должны были находиться под наблюдением специалистов в течение длительного времени [24].

В недавнем популяционном исследовании «случай – контроль» анализировали показатели распространенности психических расстройств после установления онкологического диагноза у 11 223 пациентов с НЭО по сравнению с аналогичной по численности группой больных колоректальным раком [36]. В течение 5 лет после установления диагноза заболеваемость тяжелыми психическими расстройствами (госпитализация по поводу психического заболевания или обращение к психиатру / в отделение неотложной помощи более 2 раз) в обеих группах была сопоставимой, составив 7,7% при НЭО и 7,6% при колоректальном раке ($p = 0,5$). То же можно сказать и о частоте других психических расстройств (пациенты, которые 1 раз были на приеме у психиатра, в отделении неотложной помощи или посещали семейного врача) – 32,9 и 31,6% соответственно ($p = 0,005$). Однако в группах больных НЭО тонкой кишки и легких, а также других НЭО, продуцирующих серотонин, частота психических заболеваний была выше, чем при колоректальном раке, что свидетельствует о возможном влиянии уровня продукции серотонина на развитие ряда психических расстройств [36].

По причине наибольшей распространенности карциноидных опухолей, продуцирующих серотонин, дисбаланс которого в ЦНС может приводить к развитию психических расстройств, возникает закономерный интерес к определению их частоты, уточнению патогенеза и изучению возможной взаимосвязи с наличием онкологического заболевания. В литературе можно найти данные о корреляции между маркерами КС и психическими расстройствами. В частности, S. Russo и соавт. обнаружили отрицательную корреляцию между уровнями триптофана в плазме крови у пациентов с КС и функциональной активностью опухоли, оцениваемой с учетом 24-часовой экскреции метаболита серотонина 5-гидроксииндолуксусной кислоты, которая признана более стабильным и достоверным критерием по сравнению с концентрацией серотонина в крови [37]. Ввиду отсутствия способности проходить гематоэнцефалический барьер продукция серотонина в ЦНС напрямую зависит от его предшественника – триптофана. Примерно 95% серотонина в организме сосредоточено в желудочно-кишечном тракте, 90% из которого находится в энтерохромаффинных клетках, а оставшая часть – в энтеральных нейронах. В головном

мозге содержится около 5% серотонина [38]. В случае функционирующей НЭО 60% поступающего триптофана расходуется клетками опухоли для продукции веществ на периферии, что приводит к недостаточной выработке серотонина в ЦНС, тем самым оказывая влияние на настроение и когнитивные функции [16, 39]. Помимо этого, снижение концентрации триптофана и, соответственно, серотонина опосредованно активирует стрессовые системы организма, инициирующие кинурениновый путь метаболизма триптофана, что в свою очередь приводит к формированию еще большего дефицита триптофана, необходимого для синтеза серотонина, создавая потенциальные условия для развития психических расстройств [31, 40].

Присутствие хронического воспалительного процесса имеет значение в возникновении депрессии [41]. Развитие депрессивной симптоматики, предположительно, ассоциировано с факторами воспаления – цитокинами, опосредующими иммунный ответ, включая интерлейкин-1, фактор некроза опухоли альфа и интерлейкин-6, который является одним из наиболее часто верифицируемых биомаркеров при депрессии [42]. Данные факторы воспаления могут влиять на обмен нейромедиаторов, нейроэндокринные функции и нейрональную пластичность. Активация иммунного ответа, сопровождаемая усилением продукции цитокинов, считается фактором риска развития депрессии у онкологических пациентов. В частности, D.L. Musselman и соавт. выявили повышение концентрации интерлейкина-6 в сыворотке крови онкологических больных с наличием депрессии по сравнению с пациентами без проявлений депрессивной симптоматики [43].

Таким образом, психопатологические расстройства при НЭО могут возникать по нозогенному механизму, когда длительный диагностический этап, факт наличия серьезного заболевания, тяжелые соматические симптомы с последующим значимым снижением качества жизни вносят существенный вклад в развитие психопатологии. В то же время не исключены и соматогенные причины развития психических расстройств как при опухолях, вызывающих дефицит определенных веществ, следствием чего является дисбаланс значимых медиаторов в ЦНС (в частности, серотонина), так и при хронических воспалительных процессах и нарушениях иммунной системы организма.

Лечение психических расстройств у пациентов с нейроэндокринными опухолями

До настоящего времени проспективных исследований в области психофармакотерапии пациентов

с НЭО не проводилось. Имеющиеся данные позволяют судить об относительной безопасности серотонинергических антидепрессантов у этих пациентов, но не исключают группы больных с повышенным риском осложнений, связанных с дополнительным влиянием на обмен серотонина. Серотонинергические антидепрессанты, в частности селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, благодаря своему механизму действия повышают доступность серотонина в ЦНС. Однако в результате активности агонистов рецепторов серотонина в кишечнике развиваются побочные эффекты препаратов – диарея и усиление моторики желудочно-кишечного тракта. Из-за совпадения этих симптомов с проявлениями КС возникает закономерный вопрос о целесообразности использования серотонинергических антидепрессантов у пациентов с НЭО. В некоторых клинических наблюдениях было описано усиление проявлений КС, таких как диарея и приливы, при приеме циталопрама, флуоксетина, сертралина, ввиду чего авторы предостерегают от назначения селективных ингибиторов обратного захвата серотонина пациентам с КС [44]. В систематическом обзоре E. Isenberg-Grzeda и соавт. проанализировали 161 случай назначения серотонинергических антидепрессантов у больных НЭО как с проявлениями КС, так и без него [45]. У 89 пациентов без КС прием антидепрессантов не провоцировал возникновение его клинических признаков, даже несмотря на длительный этап поддерживающей терапии (до 172 месяцев). Среди 72 пациентов с КС у 10 (13,8%) было зарегистрировано усиление симптоматики [45]. Примечательно, что по сравнению с развитием побочных эффектов при приеме антидепрессантов в общей популяции (около 16%) процент у пациентов с КС был ниже (13,8%) и среди всех наблюдений не было зарегистрировано случаев смерти или развития карциноидного криза [44, 45].

Обобщая вышесказанное, можно констатировать: валидированных данных о безопасности приема серотонинергических антидепрессантов у пациентов с НЭО пока недостаточно. Кроме того, адекватная психофармакотерапия депрессий и тревожных расстройств при НЭО предполагает учет потенциальных лекарственных взаимодействий с медикаментами, используемыми в лечении НЭО и их осложнений. До настоящего времени и эта проблема не получила должного освещения.

Заключение

Учитывая прогрессирующий рост заболеваемости НЭО, очевидна актуальность изучения



психических расстройств при этих новообразованиях. Опубликованные данные о распространенности расстройств депрессивного и тревожного спектра, коморбидных НЭО, имеют ограниченный и противоречивый характер, в связи с чем очевидна необходимость дальнейших исследований с верификацией ключевого эпидемиологического показателя как для всей совокупности психических расстройств, так и дифференцированно – для депрессии при НЭО. Кроме того,

остаются неясными патогенез развития и особенности депрессивных и тревожных расстройств при НЭО, не до конца уточнено влияние продуцируемых опухолью биологически активных веществ, в частности серотонина. Проведение дальнейшего, более детального анализа на выборках с большим количеством пациентов будет способствовать более раннему выявлению осложнений течения НЭО, а также выбору их адекватной терапии. ☺

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.

Участие авторов

О.О. Коляго – дизайн исследования, сбор материала, анализ полученных данных, написание текста; А.А. Мунирова – сбор материала и обсуждение полученных данных; С.В. Иванов – концепция исследования, анализ полученных данных, написание текста; И.С. Стилиди – редактирование текста. 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

- Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, Delle Fave G, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, Salazar R, Ruzniewski P, Sundin A. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol.* 2008;9(1):61–72. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70410-2.
- Kaltsas GA, Besser GM, Grossman AB. The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. *Endocr Rev.* 2004;25(3):458–511. doi: 10.1210/er.2003-0014.
- Modlin IM, Moss SF, Gustafsson BI, Lawrence V, Schimmack S, Kidd M. The archaic distinction between functioning and nonfunctioning neuroendocrine neoplasms is no longer clinically relevant. *Langenbecks Arch Surg.* 2011;396(8):1145–1156. doi: 10.1007/s00423-011-0794-7.
- Алексеева ТР, Бельцевич ДГ, Бохан ВЮ, Бычков МБ, Бяхова ММ, Васильев ИА, Виршке ЭР, Воронкова ИА, Воронников ИК, Горбунова ВА, Гуревич ЛЕ, Гуторов СЛ, Демидов ЛВ, Долгушин БИ, Драпун СВ, Држева ЛГ, Егоров АВ, Емельянова ГС, Еремкина АК, Замолдчиков РД, Золотарева ТГ, Иванова АК, Калдаров АР, Кармазановский ГГ, Карнаухов НС, Каспшик СМ, Кит ОИ, Колесников ЕН, Комарова ЛЕ, Кондрашин СА, Косырев ВЮ, Кочатков АВ, Кригер АГ, Крупинова ЮА, Кувшинов ЮП, Кузьминов АЕ, Лаптева МГ, Лозовая ВВ, Лысанюк МВ, Любимова НВ, Мойстренко НА, Малихова ОА, Мамедова ЕО, Маркович АА, Мещерякова МЮ, Мокрышева НГ, Мусаев ГХ, Назарова ВВ, Непомнящая ЕМ, Новикова ОЮ, Оджарова АА, Одинцова АС, Орел НФ, Орлова КВ, Ошкина ЕВ, Панова НХ, Патюшко ЮИ, Перегородцев ИН, Пирогова НА, Поддубный БК, Подлужный ДВ, Полоцкий БЕ, Поткина ОН, Простов МЮ, Пшевлотский ЭМ, Пшиченко СВ, Райхлин ИТ, Родионова МВ, Рожинская ЛЯ, Ромащенко ПН, Рослякова АА, Сергеева ОН, Смирнова ЕА, Снежко АВ, Солодинина ЕН, Стилиди ИС, Сураева СА, Таболиновская ТД, Тимофеев ЮС, Тимошкина НН, Трифонов ВС, Фейдоров ИЮ, Филопенко ДА, Фоминых ЕВ, Хохлова СВ, Чекини АК, Черняк МН, Чистякова ОВ, Чичиков ЕИ, Чухрай ОЮ, Чхиквадзе НВ, Ширяев СВ, Ястребова ЕС, Борисова ЕИ, Делекторская ВВ, Мамедов ББ. Нейроэндокринные опухоли. Общие принципы диагностики и лечения. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. doi: 10.33029/9704-5997-3.
- Alekseeva TR, Beltsevich DG, Bokhyan VYu, Bychkov MB, Vyakhova MM, Vasilyev IA, Virshke ER, Voronkova IA, Vorotnikov IK, Gorbunova VA, Gurevich LE, Gutorov SL, Demidov LV, Dolgushin BI, Drapun SV, Drzheva LG, Egorov AV, Emelyanova GS, Eremkina AK, Zamolodchikov RD, Zolotareva TG, Ivanova AK, Kaldarov AR, Karmazanovskiy GG, Karnaukhov NS, Kasprzyk SM, Keith OI, Kolesnikov EN, Komarova LE, Kondrashin SA, Kosyrev VYu, Kochatkov AV, Krieger AG, Krupinova YuA, Kuvshinov YuP, Kuzminov AE, Lapteva MG, Lozovaya VV, Lysanyuk MV, Lyubimova NV, Moistrenko NA, Malikhova OA, Mamedova EO, Markovich AA, Meshcheryakova MYu, Mokrysheva NG, Musaev GH, Nazarova VV, Nepomnyashchaya EM, Novikova OYu, Odzharova AA, Odintsova AS, Oreil NF, Orlova KV, Oshkina EV, Panova NH, Patyushko YI, Peregorodtsev IN, Pirogova NA, Poddubny BK, Podluzhny DV, Polotsky BE, Potkina ON, Prostov MYu, Pshevlotzky EM, Pshichenko SV, Raikhlin IT, Rodionova MV, Rozhinskaya LYa, Romashchenko PN, Roslyakova AA, Sergeeva ON, Smirnova EA, Snezhko AV, Solodinina EN, Stiliidi IS, Surava SA, Tabolinovskaya TD, Timofeev YuS, Timoshkina NN, Trifonov VS, Feydorov IYu, Filopenko DA, Fominykh EV, Khokhlova SV, Chekini AK, Chernyak MN, Chistyakova OV, Chichikov EI, Chukhrai OYu, Chkhikvadze NV, Shiryayev SV, Yastrebova ES, Borisova EI, Delectorskaya VV, Mamedov BB. [Neuroendocrine tumors. General principles of diagnosis and treatment]. Moscow: GEOTAR-Media, 2021. Russian. doi: 10.33029/9704-5997-3.
- Salvia AS, Pomeri AP, Persano I, Trevisi E, Parlagraeco E, Colombi N, Brizzi MP, Picci RL, Oliva F. Serotonergic brain dysfunction in neuroendocrine tumor patients: A scoping review. *Compr Psychiatry.* 2021;109:152244. doi: 10.1016/j.comppsy.2021.152244.
- Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. One hundred years after “carcinoid”: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol.* 2008;26(18):3063–3072. doi: 10.1200/JCO.2007.15.4377.
- Wang J, Liu J, He C, Sun T, Yan Y, Che G, Li X, Sun H, Ma H. Trends in incidence and survival of patients with pancreatic neuroendocrine neoplasm, 1987–2016. *J Oncol.* 2021;2021:4302675. doi: 10.1155/2021/4302675.



8. Warner RRP. Enteroendocrine tumors other than carcinoid: a review of clinically significant advances. *Gastroenterology*. 2005;128(6):1668–1684. doi: 10.1053/j.gastro.2005.03.078.
9. Vinik AI, Silva MP, Woltering EA, Go VLW, Warner R, Caplin M. Biochemical testing for neuroendocrine tumors. *Pancreas*. 2009;38(8):876–889. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181bc0e77.
10. Любимова НВ, Кушлинский НЕ. Биохимические маркеры сыворотки крови и мочи при обследовании больных нейроэндокринными опухолями. *Альманах клинической медицины*. 2016;44(4):439–450. doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-4-439-450. Lyubimova NV, Kushlinskii NE. [Biochemical markers in serum and urine in the workup of patients with neuroendocrine tumors]. *Almanac of Clinical Medicine*. 2016;44(4):439–450. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-4-439-450.
11. Rubin de Celis Ferrari AC, Glasberg J, Riechelmann RP. Carcinoid syndrome: update on the pathophysiology and treatment. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73(Suppl 1):e490s. doi: 10.6061/clinics/2018/e490s.
12. Van der Horst-Schrivers ANA, Machteld Wymenga AN, Links TP, Willemse PHB, Kema IP, de Vries EGE. Complications of midgut carcinoid tumors and carcinoid syndrome. *Neuroendocrinology*. 2004;80(Suppl 1):28–32. doi: 10.1159/000080737.
13. Major LF, Brown GL, Wilson WP. Carcinoid and psychiatric symptoms. *South Med J*. 1973;66(7):787–790. doi: 10.1097/00007611-197307000-00013.
14. Larsson G, Sjöden PO, Oberg K, Eriksson B, von Essen L. Health-related quality of life, anxiety and depression in patients with midgut carcinoid tumours. *Acta Oncol*. 2001;40(7):825–831. doi: 10.1080/02841860152703445.
15. Russo S, Boon JC, Kema IP, Willemse PH, den Boer JA, Korf J, de Vries EG. Patients with carcinoid syndrome exhibit symptoms of aggressive impulse dysregulation. *Psychosom Med*. 2004;66(3):422–425. doi: 10.1097/01.psy.0000126204.97565.91.
16. Soliday E, Garofalo JP, Smith SR, Warner RRP. Depression and antidepressant use in gastrointestinal carcinoid cancer patients. *J Appl Biobehav Res*. 2004;9(2):80–90. doi: 10.1111/j.1751-9861.2004.tb00093.x.
17. Pezzilli R, Campana D, Morselli-Labate AM, Fabbri MC, Brocchi E, Tomassetti P. Patient-reported outcomes in subjects with neuroendocrine tumors of the pancreas. *World J Gastroenterol*. 2009;15(40):5067–5073. doi: 10.3748/wjg.15.5067.
18. Moretti P, Dennis JL, Stella A, Alpini A, Cotichelli P, Ferolla P, Scarpelli G, Quartesan R, Piselli M. Comorbilità di ansia e depressione nei pazienti con tumori carcinoidi [Comorbidity between anxiety and depression in patients with carcinoid tumors]. *Riv Psichiatr*. 2013;48(4):301–306. Italian. doi: 10.1708/1319.14626.
19. Fröjd C, Larsson G, Lampic C, von Essen L. Health related quality of life and psychosocial function among patients with carcinoid tumours. A longitudinal, prospective, and comparative study. *Health Qual Life Outcomes*. 2007;5:18. doi: 10.1186/1477-7525-5-18.
20. Goswami S, Peipert BJ, Helenowski I, Yount SE, Sturgeon C. Disease and treatment factors associated with lower quality of life scores in adults with multiple endocrine neoplasia type I. *Surgery*. 2017;162(6):1270–1277. doi: 10.1016/j.surg.2017.07.023.
21. Beesley VL, Burge M, Dumbrava M, Callum J, Neale RE, Wyld DK. Perceptions of care and patient-reported outcomes in people living with neuroendocrine tumours. *Support Care Cancer*. 2018;26(9):3153–3161. doi: 10.1007/s00520-018-4166-5.
22. Adams JR, Ray D, Willmon R, Pulgar S, Dasari A. Living with neuroendocrine tumors: Assessment of quality of life through a mobile application. *JCO Clin Cancer Inform*. 2019;3:1–10. doi: 10.1200/CCI.19.00025.
23. Hallet J, Davis LE, Mahar AL, Law CHL, Isenberg-Grzeda E, Bubis LD, Singh S, Myrehaug S, Zhao H, Beyfuss K, Moody L, Coburn NG. Patterns of symptoms burden in neuroendocrine tumors: A population-based analysis of prospective patient-reported outcomes. *Oncologist*. 2019;24(10):1384–1394. doi: 10.1634/theoncologist.2019-0112.
24. Begum N, Hunold H, Gerdes B, Keck T, Waldmann A. Anxiety, depression and quality of life in patients with neuroendocrine neoplasia after surgery. *World J Surg*. 2022;46(6):1408–1419. doi: 10.1007/s00268-022-06479-z.
25. Song L, Cao Y, Li J, Lu M, Tang L. Psychological distress and resilience in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:947998. doi: 10.3389/fendo.2022.947998.
26. Lu D, Andersson TML, Fall K, Hultman CM, Czene K, Valdimarsdóttir U, Fang F. Clinical diagnosis of mental disorders immediately before and after cancer diagnosis: A nationwide matched cohort study in Sweden. *JAMA Oncol*. 2016;2(9):1188–1196. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.0483.
27. Seoud T, Syed A, Carleton N, Rossi C, Kenner B, Quershi H, Anand M, Thakkar P, Thakkar S. depression before and after a diagnosis of pancreatic cancer: Results from a national, population-based study. *Pancreas*. 2020;49(8):1117–1122. doi: 10.1097/MPA.0000000000001635.
28. Маркович АА, Анциферов МБ. Новые подходы к диагностике и лечению нейроэндокринных опухолей. *Фарматека*. 2015;17:20–27. Markovich AA, Antsiferov MB. [New approaches to the diagnosis and treatment of neuroendocrine tumors]. *Farmateka*. 2015;17:20–27. Russian.
29. Tremble JM, Buxton-Thomas M, Hopkins D, Kane P, Bailey D, Harris PE. Cushing's syndrome associated with a chemodectoma and a carcinoid tumour. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;52(6):789–793. doi: 10.1046/j.1365-2265.2000.00974.x.
30. Шафигуллин МР, Петелин ДС. Нейроэндокринные опухоли и психические расстройства (обзор литературы). *Психические расстройства в общей медицине*. 2016;4:34–38. Shafigullin MR, Petelin DS. [Psychiatric disorders in neuroendocrine tumors (a literature review)]. *Mental Disorders in General Medicine*. 2016;4:34–38. Russian.
31. Thorson A. Studies on carcinoid disease. *Acta Med Scand*. 1958;334:1–132.
32. Wooley O. *The biochemical basis of psychosis*. New-York: John Wiley & Sons, 1962.
33. Singh S, Granberg D, Wolin E, Warner R, Sissons M, Kolarova T, Goldstein G, Pavel M, Öberg K, Leyden J. Patient-reported burden of a neuroendocrine tumor (NET) diagnosis: Results from the First global survey of patients with NETs. *J Glob Oncol*. 2016;3(1):43–53. doi: 10.1200/JGO.2015.002980.
34. Beaumont JL, Cella D, Phan AT, Choi S, Liu Z, Yao JC. Comparison of health-related quality of life in patients with neuroendocrine tumors with quality of life in the general US population. *Pancreas*. 2012;41(3):461–466. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182328045.
35. Pearman TP, Beaumont JL, Cella D, Neary MP, Yao J. Health-related quality of life in patients with neuroendocrine tumors: an investigation of treatment type, disease status, and symptom burden. *Support Care Cancer*. 2016;24(9):3695–3703. doi: 10.1007/s00520-016-3189-z.
36. Hallet J, Isenberg-Grzeda E, Law CHL, Barabash V, Zuckerman J, Singh S, Myrehaug SD, Assal A, Chan WC, Coburn NG, Mahar AL. Incidence of psychiatric illness in patients with neuroendocrine tumors: a comparative population-based analysis. *Support Care Cancer*. 2022;30(11):9635–9646. doi: 10.1007/s00520-022-07365-z.
37. Russo S, Boon JC, Kema IP, Willemse PHB, den Boer JA, Korf J. Patients with carcinoid syndrome exhibit symptoms of aggressive impulse dysregulation. *Psychosom Med*. 2004;66(3):422–425. doi: 10.1097/01.psy.0000126204.97565.91.
38. Lesurtel M, Soll C, Graf R, Clavien P-A. Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(6):940–952. doi: 10.1007/s00018-007-7377-3.
39. Isenberg-Grzeda E, MacGregor M, Bergel A, Eagle S, Espi Forcen F, Mehta R, Matsou-



kas K, Wills J, Reidy-Lagunes D, Alici Y. Antidepressants appear safe in patients with carcinoid tumor: Results of a retrospective review [published correction appears in *Eur J Surg Oncol*. 2018;44(9):1453]. *Eur J Surg Oncol*. 2018;44(6):744–749. doi: 10.1016/j.ejso.2018.03.010.

40. Curzon G, Bridges PK. Tryptophan metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1970;33(5):698–704. doi: 10.1136/jnnp.33.5.698.

41. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune

system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(1):46–56. doi: 10.1038/nrn2297.

42. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 2009;65(9):732–741. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.11.029.

43. Musselman DL, Miller AH, Porter MR, Manatunga A, Gao F, Penna S, Pearce BD, Landry J, Glover S, McDaniel JS, Nemeroff CB. Higher than normal plasma interleukin-6 concentrations in cancer patients with depression: preliminary findings. *Am J Psychiatry*.

2001;158(8):1252–1257. doi: 10.1176/appi.ajp.158.8.1252.

44. Clement D, Ramage J, Srirajskanthan R. Update on pathophysiology, treatment, and complications of carcinoid syndrome. *J Oncol*. 2020;2020:8341426. doi: 10.1155/2020/8341426.

45. Isenberg-Grzeda E, MacGregor M, Matsoukas K, Chow N, Reidy-Lagunes D, Alici Y. Must antidepressants be avoided in patients with neuroendocrine tumors? Results of a systematic review. *Palliat Support Care*. 2020;18(5):602–608. doi: 10.1017/S147895152000005X.

Mental disorders of the depressive and anxiety spectrum in neuroendocrine tumors: prevalence, pathogenesis, clinical particulars

O.O. Kolyago^{1,2} • A.A. Munirova^{1,2} • S.V. Ivanov^{2,3} • I.S. Stilidi¹

Neuroendocrine tumors (NETs) are a heterogeneous group of slowly progressing tumors from neuroendocrine cells able to secrete biologically active substances. The most striking clinical manifestation of functioning NETs is the carcinoid syndrome, which is caused by serotonin overproduction and is most often associated with hot flashes, diarrhea, and abdominal pain. The prevalence of depressive and anxiety spectrum disorders in NETs patients can amount to 30–50%. The development of depressive and anxiety spectrum disorders in NETs can occur both through a nosogenic mechanism facilitated by a long pre-diagnostic stage, the presence of a serious disease with severe somatic symptoms and resulting significant decrease in quality of life. The mental disorders may be a result of somatogenic factors, which include an imbalance of significant mediators in the central nervous system (in particular, serotonin), as well as chronic inflammation and abnormalities of the body's immune defense. In the treatment of patients with NETs and verified anxiety and depressive disorders, special attention is paid to the safety of prescribing the first-line therapy, the selective serotonin reuptake inhibitors. The side effects of these agents are related to the activity of serotonin receptor agonists in the gut, which results in diarrhea and increased gastrointestinal motility,

the symptoms similar to the carcinoid syndrome manifestations. The accumulated evidence allows concluding on the relative safety of serotonergic antidepressants in NETs patients, but does not exclude some groups of patients with an increased risk of complications related to an additional effect on serotonin metabolism. Current knowledge on the prevalence, pathogenesis and treatment of depressive and anxiety spectrum disorders, comorbid to NETs, are limited and contradictory. Therefore, further studies with a larger patient samples are required to identify key factors of the pathophysiology and manifestation of mental disorders in NETs patients, which would generally facilitate the optimization of their treatment.

Key words: depression, anxiety disorders, neuroendocrine tumor, mental disorders, serotonin

For citation: Kolyago OO, Munirova AA, Ivanov SV, Stilidi IS. Mental disorders of the depressive and anxiety spectrum in neuroendocrine tumors: prevalence, pathogenesis, clinical particulars. *Almanac of Clinical Medicine*. 2024;52(3):178–187. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-015.

Received 5 March 2024; revised 10 June 2024; accepted 17 July 2024; published online 31 July 2024

Oleg O. Kolyago – PhD, Psychiatrist, Head of the Department of Psychotherapeutic Assistance¹; Senior Research Fellow, Department for the Study of Endogenous Mental Disorders and Affective States²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7595-1239>
✉ Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115522, Russian Federation. E-mail: olegkolyago@yandex.ru

Adele A. Munirova – MD, Psychiatrist, Department of Psychotherapeutic Assistance¹; Junior Research Fellow, Department for the Study of Endogenous Mental Disorders and Affective States²; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-2592-1388>. E-mail: adele@munirova.ru

Stanislav V. Ivanov – MD, PhD, Professor, Chief Research Fellow, Department for the Study of Borderline Mental Pathology and Psychosomatic Disorders²; Professor, Chair of Psychiatry and Psychosomatics³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9532-7150>. E-mail: stanislvi@gmail.com

Ivan S. Stilidi – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Director¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>. E-mail: info@ronc.ru

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contributions

O.O. Kolyago, the study design, data collection and analysis, text writing; A.A. Munirova, data collection and discussion; S.V. Ivanov, the study concept, data analysis, text writing; I.S. Stilidi, text editing. 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 N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115522, Russian Federation

² Mental Health Research Center; Kashirskoe shosse 34, Moscow, 115522, Russian Federation

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991, Russian Federation



Журнал
«Альманах клинической медицины»
доступен на сайте:

almclinmed.ru

Возможности для читателей:

- свободный доступ к архиву журнала
- удобство поиска: по ключевым словам, по выпускам, по авторам, по заглавиям

Возможности для авторов:

- изучить правила для авторов, подробно регламентирующие требования к статье
- отправить статью через личный кабинет
- оставить комментарий для редакторов
- отслеживать этапы рассмотрения статьи в личном кабинете
- отслеживать количество просмотров своих публикаций в журнале и ссылки на них

