

Профиль экспрессии микроРНК в изолированных циркулирующих опухолевых клетках при колоректальном раке

О.И. Кит¹, И.А. Новикова¹, Н.Н. Тимошкина¹, Д.Ю. Гвалдин¹, А.А. Пушкин¹, О.Ю. Каймакчи²,
А.А. Маслов¹, А.В. Шапошников¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 344022 Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29

Контакты: Антон Андреевич Пушкин anton.a.pushkin@gmail.com

Введение. Колоректальный рак – часто диагностируемое заболевание, занимающее 3-е место среди онкологических заболеваний как по частоте встречаемости, так и по смертности. Сегодня внимание исследователей сосредоточено на разработке более доступных и надежных биомаркеров колоректального рака для преодоления ограничений в диагностике и прогнозе течения данной патологии.

Цель исследования – изучение особенностей экспрессии микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках (ЦОК) пациентов с колоректальным раком.

Материалы и методы. В исследование включены образцы крови от 299 больных раком ободочной кишки II (T3–4N0M0), III (T1–4N1–2M0) и IV (T1–4N0–2M1) стадий. Циркулирующие опухолевые клетки были отобраны с помощью системы детекции маркера EpCAM. Методом полимеразной цепной реакции исследована относительная экспрессия микроРНК hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-92a-3p в ЦОК.

Результаты. Положительный статус ЦОК выявлен у 188 (62,9 %) из 299 больных, отрицательный – у 111 (37,1 %). В группе больных с опухолями pT1–2 преобладали пациенты, у которых не были обнаружены ЦОК (53,3 %). У остальных пациентов с заболеванием pT1–2 ЦОК оказалось в 1,2 и 4,4 раза меньше, чем у пациентов с заболеванием pT3 и pT4 соответственно. При pT4 1–3 ЦОК встречались в 2,7 и 1,7 раза, а 3 ЦОК – в 1,4 раза чаще по сравнению с pT1–2 и pT3 соответственно ($p \leq 0,05$). Наличие метастатического поражения в 2,1 раза повышает вероятность выявления ЦОК: при метастазах >3 ЦОК обнаруживаются в 60,1 раза чаще, чем при M0 ($p \leq 0,05$). Экспрессия микроРНК hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p в ЦОК у пациентов с колоректальным раком III стадии была ниже, чем у пациентов с заболеванием II стадии, в 2,5 и 5 раз ($p < 0,05$) соответственно, а экспрессия hsa-miR-21-5p и hsa-miR-92a-3p – выше в 3,2 и 3 раза ($p < 0,05$) соответственно. В ЦОК больных колоректальным раком IV стадии уровень относительной экспрессии hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p оказался ниже в 4,6 и 5,3 раза соответственно ($p < 0,05$) по сравнению с уровнем экспрессии при заболевании II стадии, а уровень экспрессии hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-92a-3p – выше в 2,6; 4,6; 2,6 и 5,0 раз соответственно ($p < 0,05$) (результаты статистически значимы).

Заключение. Уровень экспрессии микроРНК в ЦОК может быть использован для дифференциальной диагностики наличия регионарных и отдаленных метастазов.

Ключевые слова: колоректальный рак, циркулирующие опухолевые клетки, микроРНК

Для цитирования: Кит О.И., Новикова И.А., Тимошкина Н.Н. и др. Профиль экспрессии микроРНК в изолированных циркулирующих опухолевых клетках при колоректальном раке. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(1):49–56. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-49-56

MicroRNA expression profile in isolated circulating tumor cells in colorectal cancer

O.I. Kit¹, I.A. Novikova¹, N.N. Timoshkina¹, D. Yu. Gvaldin¹, A.A. Pushkin¹, O. Yu. Kaimakchi², A.A. Maslov¹,
A.V. Shaposhnikov¹

¹National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Line, Rostov-on-Don 344037, Russia;

²Rostov State Medical University, Ministry of Health of Russia; 29 Nahichevanskij pereulok, Rostov-on-Don 344022, Russia

Contacts: Anton Andreevich Pushkin anton.a.pushkin@gmail.com

Introduction. Colorectal cancer is a frequently diagnosed disease being in the third place among oncological diseases both in incidence and mortality. Currently, researchers focus on development of more accessible and reliable biomarkers of colorectal cancer to overcome the problems in diagnosis and progression prognosis of this pathology.

Aim. To investigate characteristics of microRNA expression in circulating tumor cells (CTC) of patients with colorectal cancer.

Materials and methods. The study included blood samples from 299 patients with colon cancer, stages II (T3–4N0M0), III (T1–4N1–2M0) and IV (T1–4N0–2M1). Circulating tumor cells were identified using EpCAM marker detection system. Relative expression of hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-92a-3p micro RNA in CTC was measured using polymerase chain reaction.

Results. Positive CTC status was observed in 188 (62.9 %) of 299 patients, negative in 111 (37.1 %). In the patient group with pT1–2 tumors, the majority of patients did not have CTC (53.3 %). In other patients with pT1–2 disease, the number of CTC was 1.2 and 4.4 times lower than in patients with pT3 and pT4 disease, respectively. In pT4, 1–3 CTC were found 2.7 and 1.7 times more frequently, 3 CTC 1.4 times more frequently than in pT1–2 and pT3, respectively ($p \leq 0.05$). Presence of metastatic lesions increases the probability of CTC detection by the factor of 2.1: in metastases, >3 CTC were observed 60.1 times more frequently than in M0 ($p \leq 0.05$). Expression of hsa-miR-143-3p and hsa-miR-26a-5p microRNA in CTC of patients with stage III colorectal cancer was respectively 2.5 and 5 times lower than in patients with stage II disease ($p < 0.05$) and expression of hsa-miR-21-5p and hsa-miR-92a-3p microRNA was respectively 3.2 and 3 times higher ($p < 0.05$). In CTC of patients with stage IV colorectal cancer, the relative level of expression of hsa-miR-143-3p and hsa-miR-26a-5p was respectively 4.6 and 5.3 times lower ($p < 0.05$) compared to the level of expression in stage II disease, and hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p and hsa-miR-92a-3p expression levels were respectively 2.6, 4.6, 2.6 and 5.0 times higher ($p < 0.05$) (statistically significant results).

Conclusion. The level of microRNA expression in CTC can be used for differential diagnosis of regional and distant metastases.

Keywords: colorectal cancer, circulating tumor cells, miRNA

For citation: Kit O.I., Novikova I.A., Timoshkina N.N. et al. MicroRNA expression profile in isolated circulating tumor cells in colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):49–56. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-49-56

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) — распространенное заболевание, занимающее 3-е место среди онкологических нозологий как по частоте встречаемости, так и по смертности [1]. В развитых странах, где данное заболевание диагностируется особенно часто, реализуется программа скрининга для пациентов, входящих в группу риска (возраст старше 50 лет, наличие наследственного синдрома) [2]. Методы скрининга включают: 1) анализ стула на наличие крови (анализ кала на скрытую кровь с гваяковой кислотой или иммунохимический тест кала) [3]; 2) эндоскопические исследования (ректоскопия или колоноскопия) [4]; 3) компьютерную томографическую колонографию, которая является менее инвазивным методом. Наиболее надежный подход основывается на исследовании биопсийного материала опухоли. Однако полученные результаты могут не содержать полную информацию об опухолевой ткани в связи с ее неоднородностью как в пространственном, так и во временном контексте. К тому же исследование занимает довольно много времени [5], а процедура биопсии ткани иногда ассоциирована с осложнениями — болевыми ощущениями, кровотечением, инфекциями или перфорациями. Сообщается, что в результате скрининга или диагностики с использованием колоноскопии общая частота нежелательных явлений составляет около 2,8 случая на 1000 наблюдений [6].

Стоит отметить, что методы визуализации или биопсийные исследования не обладают удовлетворительными показателями чувствительности и специфич-

ности для достоверного прогноза риска развития рецидивирования или терапевтического ответа [7]. Сегодня внимание исследователей сосредоточено на разработке более доступных и надежных биомаркеров КРР для преодоления ограничений в диагностике и прогнозе течения данной патологии.

Для поиска биомаркеров используют кровь, мочу, спинномозговую жидкость, кал и слюну [8]. В отношении скрининга, диагностики, лечения КРР, прогнозирования и оценки терапевтического ответа при данной патологии в качестве наиболее перспективных диагностических, прогностических и терапевтических мишеней рассматривают циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), циркулирующую опухолевую ДНК (цОДНК) и микроРНК.

Циркулирующие опухолевые клетки были впервые описаны австралийским врачом Т. Эшвортом в крови умершего пациента [9]. Они происходят как из первичных опухолей, так и из метастатических очагов. Существуют различные биологические фенотипы ЦОК: эпителиальные, мезенхимальные, стволоподобные или смешанные [10, 11]. Циркулирующие опухолевые клетки присутствуют в крови в очень малых количествах, значительно уступая по количеству другим клеткам, особенно лейкоцитам.

Присутствие ЦОК в крови коррелирует с процессом метастазирования. Опухолевые клетки попадают в кровеносное русло путем эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), где они демонстрируют свойства стволовых клеток [12], а затем проникают

в отдаленные органы с помощью мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП). Циркулирующие опухолевые клетки могут иметь маркеры либо ЭМП (например N-кадгерин), либо МЭП (например E-кадгерин) [13, 14]. Кроме того, чтобы циркулировать в кровотоке, эти клетки должны избегать обнаружения иммунной системой [15].

Циркулирующие опухолевые клетки способны нести некоторую информацию об опухоли и использоваться для исследования белков и нуклеиновых кислот (ДНК, РНК). Таким образом, можно применять цитологические и молекулярно-биологические методы исследований этих клеток для решения актуальных задач онкокоопроктологии.

По сравнению с уже установленной императивной ролью микроРНК в опухолевой ткани, а также циркулирующих микроРНК в плазме или сыворотке, об экспрессии микроРНК в ЦОК известно намного меньше. Более того, исследования микроРНК ЦОК находятся на самых начальных этапах. Таким образом, **цель** данной **работы** — исследование особенностей экспрессии микроРНК в ЦОК пациентов с КРР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика исследуемых групп. В исследование включены данные о 299 больных раком ободочной кишки II стадии (T3–4N0M0; $n=110$) с неблагоприятными факторами прогноза (низкая степень дифференцировки, лимфоваскулярная/перинеуральная инвазия), III стадии (T1–4N1–2M0; $n=88$) и IV стадии (T1–4N0–2M1; $n=101$), находившихся на лечении в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России с 2012 по 2016 г. Возраст пациентов варьировал от 42 до 86 лет (средний возраст $64,2 \pm 1,7$ года). Достоверных различий в среднем возрасте больных с заболеванием разных стадий выявлено не было. У больных КРР II стадии этот показатель составил $62,8 \pm 1,9$ года, III стадии — $66,2 \pm 1,8$ года, IV стадии — $64,6 \pm 2,0$ года. Стадирование пациентов проводилось в соответствии с 8-м изданием международной классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) [16].

Детекция и сепарация циркулирующих опухолевых клеток. Детекцию ЦОК проводили с использованием системы Veridex CellSearch™ (JanssenDiagnostics, США) с учетом рекомендаций производителя. Кровь в объеме 8–10 мл отбирали в пробирки CellSave Preservative Tube, содержащие антикоагулянт этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), а также реагент для сохранения жизнеспособности опухолевых клеток. Забор крови осуществляли до проведения оперативного вмешательства. Для выявления ЦОК клетки иммуномагнитно обогащали микрочастицами железа, покрытыми антителами к маркерам адгезии эпителиальных клеток EpCAM, CD45 и цитокератинам 8, 18, 19. Материал сканировали в анализаторе CellTracks® Analyzer II® (Cellsearch, США).

У ЦОК-положительных пациентов был взят дополнительный образец крови объемом 10 мл для сепарации ЦОК и последующего молекулярного профилирования с использованием набора CellSearch® Profile Kit (Menarini Silicon Biosystems, Италия) и системы CELLTRACKS® AUTOPREP® (Cellsearch, США) с учетом рекомендаций производителей. Полученные в результате иммуномагнитного обогащения опухолевые клетки, экспрессирующие молекулу адгезии эпителиальных клеток (EpCAM), без дополнительного окрашивания и подсчета клеток, а также после удаления лейкоцитов и других компонентов крови были использованы для дальнейших исследований. Оценку различия долей качественных признаков между группами определяли с помощью критерия χ^2 с непараметрической поправкой Мантеля–Ханзеля (метод кросстабуляции в программе Statistica 12).

Выделение микроРНК и оценка ее относительной экспрессии. Тотальную РНК выделяли с помощью набора miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) и автоматической станции выделения QIAcube Connect (Qiagen, Германия) с учетом рекомендаций производителя. Выделенную тотальную РНК подвергали обратной транскрипции, совмещенной с реакцией полиаденилирования. Уровень полученной комплементарной ДНК оценивали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Дизайн синтетических олигонуклеотидов осуществляли с использованием алгоритма Balcels I [17]. Реакционная смесь для обратной транскрипции содержала 1x поли(А)буфер, 10 U/мкл Reverse Transcriptase MMLV, 0,1 mM dNTPs, 0,1 mM АТФ, 1 μ M RT-праймера, 0,5 U/мкл Poly(A)-полимеразы и 1 мкг тотальной РНК. Смесь инкубировали 15 мин при 16 °C и 15 мин при 42 °C. Затем обратную транскриптазу инактивировали нагреванием 90 °C в течение 5 мин.

Уровень представленности транскриптов микроРНК определяли методом ПЦР в реальном времени. Амплификацию проводили в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen, 20 мкл PCR-смеси: 1x PCR-буфер, 0,25 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 500 нМ прямого и обратного праймеров. Для амплификации использовали следующую программу: 2 мин — 94 °C; 50 циклов: 95 °C — 10 с, 64 °C — 20 с. Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью амплификатора ДТпрайм («ДНК-технологии», Россия).

Уровень изменения экспрессии микроРНК (Rm) рассчитывали по формуле:

$$Rm = E^{-\Delta\Delta Ct}.$$

Нормализацию результатов выполняли по референсным локусам (RNU6 и hsa-miR-16) и уровню экспрессии соответствующих микроРНК в образцах контрольной группы. Анализ данных по экспрессии микроРНК, полученных методом ПЦР в реальном

времени, проводился на языке программирования Python (библиотека SciPy) [18]: межгрупповые различия оценивали с использованием U-критерия Манна–Уитни и поправки Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Частота выявления циркулирующих опухолевых клеток у больных раком ободочной кишки и их связь со стадией заболевания. Результаты исследования показали, что у больных раком ободочной кишки различных стадий ЦОК выявлены в 62,9 % случаев (у 188 из 299 пациентов) (в количестве от 1 до 402 клеток), тогда как отсутствие опухолевых клеток в периферической крови больных отмечено в 37,1 % случаев (у 111 из 299 пациентов). В анализ были включены пациенты, у которых обнаружены 1–3 и >3 ЦОК. Число больных, у которых выявлены 1–3 и >3 ЦОК, оказалось равным (50 %; у 94 из 188 больных). Распределение больных КРР в зависимости от уровня ЦОК и стадии заболевания представлено в табл. 1.

В ходе нашего исследования выявлены различия в уровне ЦОК в зависимости от отдельных критериев по классификации TNM. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Согласно данным, представленным в табл. 2, в группе больных с опухолями pT1–2 преобладали пациенты, у которых не были выявлены ЦОК (53,3 % случаев). При pT4 характерной оказалась высокая частота обнаружения ЦОК, при этом на 7,4 % чаще определялись от 1 до 3 ЦОК. Вероятность выявления 1–3 и >3 ЦОК при pT3 была одинаковой. При pT1–2 >3 ЦОК обнаруживались несколько чаще (на 11,1 %) по сравнению с 1–3 ЦОК. При этом при pT4 1–3 ЦОК были выявлены в 2,7 и 1,7 раза чаще ($p < 0,05$), а >3 ЦОК – в 2,1 и 1,4 раза чаще ($p \leq 0,05$), чем при pT1–2 и pT3 соответственно.

В ходе исследования выявлена достоверно значимая взаимосвязь метастазирования в регионарные лимфатические узлы и уровня ЦОК. Так, наиболее часто отсутствие ЦОК отмечалось при N0 (70,7 % случаев), тогда как наличие опухолевых клеток в периферической крови – при наличии поражения лимфатических узлов N1 (84,7 % случаев) и N2 (83,3 % случаев).

При N2 >3 ЦОК обнаружены у 50 % пациентов, тогда как максимальная частота обнаружения 1–3 ЦОК оказалась характерна для N1 (46,0 % случаев). В целом различия в выявлении ЦОК при различной степени метастатического поражения лимфатических узлов отмечено не было. Доля больных, у которых обнаружены ЦОК при отсутствии метастатического поражения лимфатических узлов, была в 2,9 и 2,8 раза меньше доли больных с N1 и N2 ($p \leq 0,05$). Наличие метастатического поражения в 2,1 раза повышает вероятность выявления ЦОК: при метастазах >3 ЦОК обнаруживаются в 60,1 раза чаще, чем при M0 ($p \leq 0,05$). Таким образом, проведенный нами анализ уровня ЦОК и критериев классификации по системе TNM показал статистически значимую связь по всем исследованным параметрам ($p < 0,001$).

Профиль экспрессии микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках у больных раком ободочной кишки II–IV стадий. В изолированных ЦОК с помощью ПЦР в реальном времени была определена экспрессия 7 микроРНК – hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p и hsa-miR-92a-3p. Панель микроРНК сформирована на основе исследования дифференциальной экспрессии микроРНК в образцах тканей КРР методом секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) [19].

Результаты исследования уровня относительной экспрессии микроРНК в ЦОК больных раком ободочной кишки разных стадий и сравнение этих показателей у пациентов с заболеванием III и IV стадий и II стадии представлены в табл. 3.

Экспрессия микроРНК hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p в ЦОК пациентов с заболеванием III стадии относительно экспрессии в ЦОК пациентов с заболеванием II стадии была ниже в 2,5 и 5 раз ($p < 0,05$) соответственно, а экспрессия hsa-miR-21-5p и hsa-miR-92a-3p – выше в 3,2 и 3 раза ($p < 0,05$) соответственно. В ЦОК больных КРР IV стадии аналогично относительная экспрессия hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p была статистически значимо ($p < 0,05$) ниже (в 4,6 и 5,3 раза соответственно) по сравнению с экспрессией в ЦОК больных КРР II стадии, а экспрессия hsa-miR-126-5p,

Таблица 1. Распределение пациентов с колоректальным раком в зависимости от уровня циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и стадии заболевания

Table 1. Distribution of patients with colorectal cancer per the level of circulating tumor cells (CTC) and disease stage

Стадия Stage	0 ЦОК 0 CTC		1–3 ЦОК 1–3 CTC		>3 ЦОК >3 CTC		p (χ^2)
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	
II ($n = 110$)	67	60,9	23	20,9	20	18,2	$p < 0,001$ ($\chi^2 = 44,244$)
III ($n = 88$)	25	28,4	31	35,2	32	36,4	
IV ($n = 101$)	19	18,8	40	39,6	42	41,6	

Таблица 2. Анализ уровня циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в зависимости от критериев классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TMN)

Table 2. Analysis of the level of circulating tumor cells (CTC) depending on the Tumor, Nodus and Metastasis (TMN) criteria

Характеристика опухоли Tumor characteristic	0 ЦОК 0 CTC		1–3 ЦОК 1–3 CTC		>3 ЦОК >3 CTC		p (χ²)
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	
Степень распространенности опухоли Tumor advancement stage							
pT1–2 (n = 45)	24	53,3	8	17,8	13	28,9	p <0,001 (χ² = 32,793)
pT3 (n = 172)	77	44,8	47	27,3	48	27,9	
pT4 (n = 82)	10	12,2	39	47,6	33	40,2	
Метастазирование в регионарные лимфатические узлы Metastases in the regional lymph nodes							
N0 (n = 116)	82	70,7	19	16,4	15	12,9	p <0,001 (χ² = 95,834)
N1 (n = 111)	17	15,3	51	46,0	43	38,7	
N2 (n = 72)	12	16,7	24	33,3	36	50,0	
Отдаленное метастазирование Distant metastases							
M0 (n = 198)	108	54,6	87	43,9	3	1,5	p <0,001 (χ² = 244,004)

Таблица 3. Относительная экспрессия микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках у пациентов с раком ободочной кишки

Table 3. Relative microRNA expression in circulating tumor cells of patients with colon cancer

Стадия Stage	МикроРНК microRNA	Rm	p -value	p_{adj}
III (T1–4N1–2M0)	hsa-let-7i-5p	1,350	0,120	0,150
	hsa-miR-126-5p	1,920	0,060	0,110
	hsa-miR-143-3p	0,401	0,020	0,035
	hsa-miR-21-5p	3,178	0,000	0,040
	hsa-miR-25-3p	1,016	0,040	0,050
	hsa-miR-26a-5p	0,200	0,025	0,030
	hsa-miR-92a-3p	2,987	0,011	0,040
IV (T1–4N0–2M1)	hsa-let-7i-5p	2,004	0,040	0,055
	hsa-miR-126-5p	2,585	0,030	0,045
	hsa-miR-143-3p	0,217	0,020	0,030
	hsa-miR-21-5p	4,581	0,010	0,040
	hsa-miR-25-3p	2,600	0,040	0,045
	hsa-miR-26a-5p	0,190	0,040	0,050
	hsa-miR-92a-3p	5,003	0,010	0,035

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия показателей относительно пациентов с заболеванием II стадии ($p_1 < 0,05$). Rm — уровень изменения экспрессии; p -value — U -критерий Манна–Уитни; p_{adj} — критерий с поправкой на множественные сравнения.

Note. Statistically significant differences ($p_1 < 0.05$) relative to patients with stage II diseases are shown in bold. Rm — level of expression change; p -value — Mann–Whitney U -test; p_{adj} — test with correction for multiple testing.

hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-92a-3p — статистически значимо ($p < 0,05$) выше (в 2,6; 4,6; 2,6 и 5,0 раз соответственно) по сравнению с экспрессией в ЦОК больных КРР II стадии (см. табл. 3). При этом экспрессия hsa-miR-143-3p в ЦОК пациентов с заболеванием IV стадии оказалась в 1,8 раза ($p < 0,05$) ниже по сравнению с этим показателем у пациентов с заболеванием III стадии, а экспрессия hsa-miR-92a-3p — в 1,7 раза ($p < 0,05$) выше в ЦОК пациентов с заболеванием IV стадии по сравнению с этим показателем пациентов с заболеванием III стадии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Метастазирование является следствием распространения опухолевых клеток из первичной опухоли в органы-мишени. Метастатические процессы включают рост первичной опухоли, диссеминацию первичных опухолевых клеток в кровоток, выживание опухолевых клеток в кровотоке, экстравазацию в органы-мишени и образование отдаленных метастазов [20]. Однако рутинные диагностические методы, включая гистологическое исследование, визуализацию с высоким разрешением и применение сывороточных опухолевых маркеров, не способны предоставить достаточно информации о развивающемся процессе метастазирования. Недавние исследования показали, что образование ЦОК является ключевым этапом метастазирования, и обнаружение ЦОК в крови больных раком с помощью иммуноцитохимических и молекулярных анализов может отражать метастатический процесс [21].

Несмотря на прогресс в ранней диагностике и улучшение эффективности адъювантной терапии, у многих пациентов с КРР наблюдаются прогрессирование заболевания и возникновение рецидива [22]. Это подчеркивает необходимость поиска прогностических факторов для определения индивидуального риска развития рецидива заболевания.

Согласно данным, представленным в табл. 1, максимальное число случаев с отсутствием ЦОК наблюдалось при заболевании II стадии (60,9 %). Этот показатель был выше, чем при заболевании III и IV стадий, в 2,1 и 3,2 раза соответственно. Доля пациентов с КРР II стадии с выявленными ЦОК составила 39,1 %, тогда как доля пациентов с КРР III и IV стадий — 71,6 и 81,2 % соответственно. Вероятность обнаружения ЦОК при заболевании IV стадии возростала в 2,1 раза по сравнению с заболеванием II стадии и в 1,1 раза по сравнению с заболеванием III стадии. В нашем исследовании среди пациентов с КРР IV стадии преобладали больные с уровнем ЦОК >3 ; они составили 41,6 %, что в 2,3 и 1,1 раза превышало данный показатель у больных с КРР II и III стадий. Чаще всего 1–3 ЦОК выявлялись при IV стадии заболевания. Число больных с данной стадией КРР с таким количеством ЦОК было в 1,9 раза выше по сравнению с больными с КРР II стадии. Незначительные различия

в частоте выявления 1–3 ЦОК обнаружены при заболевании III и IV стадий. Мы выявили достоверно значимую связь количества ЦОК в периферической крови и стадии заболевания ($p \leq 0,05$). Так, при увеличении стадии КРР отмечено повышение частоты обнаружения ЦОК от II к IV стадии и доли больных с >3 ЦОК.

МикроРНК, присутствующие в периферической крови, представляют собой либо внеклеточные циркулирующие, либо ЦОК-ассоциированные молекулы. Многочисленные исследования продемонстрировали клиническую значимость циркулирующих микроРНК в качестве прогностических факторов, мишеней для лекарств и предикторов ответа на терапию у онкологических больных [23].

В нашем исследовании проведено сравнение результатов экспрессии микроРНК в ЦОК. По уровню экспрессии hsa-miR-26a-5p можно дифференцировать рак ободочной кишки с отсутствием и наличием метастазов, поскольку данный показатель имеет статистически значимые различия в ЦОК. В литературе приводятся прямо противоположные данные о функции этой микроРНК при КРР и других опухолях: одни авторы считают ее индуктором аутофагии, химиорезистентности и рецидивирования КРР [24], другие — ингибитором агрессивности клеток КРР [25]. Проонкогенные свойства miR-26a-5p описаны при остеосаркоме [26], и, напротив, свойства, ингибирующие рост и инвазию, показаны при раке желудка [27].

Одной из ключевых особенностей ЭМП является потеря целостности эпителия, осуществляемая за счет протеолитического расщепления матричными металлопротеиназами (ММП), экспрессия которых регулируется hsa-miR-21-5p, hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p. Известно, что hsa-miR-21-5p и hsa-miR-26a-5p положительно модулируют транскрипцию ММП-2 и ММП-14 соответственно, тогда как hsa-miR-143-3p ингибирует экспрессию ММП-14 [28]. Ранее сообщалось, что hsa-miR-21 способствовала миграции и инвазии опухолевых клеток за счет усиления экспрессии ММП-2 и ММП-9 при гепатоцеллюлярной карциноме [29]. При этом hsa-miR-143 оказывает положительный эффект: подавляя транскрипцию ММП-2 и ММП-9, она препятствует миграции и инвазии опухолевых клеток, снижает вероятность метастазирования.

Процесс ЭМП сопровождается ремоделированием цитоскелета, которое частично обусловлено изменением экспрессии белков эзрина, радикина и мозина (ERM) [30]. Белки ERM взаимодействуют с CD44 — известным маркером метастазирования, который способен связываться с внеклеточными протеогликанами, версиканом и гиалуронатом и регулировать клеточную подвижность.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что повышение уровней hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p и hsa-miR-25-3p в сочетании со снижением уровня hsa-miR-143-3p в группах больных с метастазированием и в случае

неблагоприятного исхода приводит к повышению экспрессии версикана и CD44 и интенсификации ЭМП. Так, в работе L. Yan и соавт. было показано, что повышение уровня hsa-miR-21-5p сопряжено со сверхэкспрессией CD44 в келоидных кератиноцитах, инвазией и миграцией клеток, опосредованной ЭМП [31]. Позднее S. Irani и G. Shokri обнаружили, что трансфекция hsa-miR-143 в клеточную культуру подавляет экспрессию CD44 и препятствует ангиогенезу и пролиферации опухолевых стволовых клеток плоскоклеточного рака полости рта [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

МикроРНК являются важными регуляторами возникновения и прогрессирования опухоли, а уровень их экспрессии может быть использован для прогнози-

рования течения заболевания или ответа на терапию. Согласно некоторым исследованиям, микроРНК участвуют в регуляции метастазирования и могут использоваться в качестве новых биомаркеров для обнаружения ЦОК. В нашем исследовании отдаленное метастазирование характеризуется снижением экспрессии в ЦОК микроРНК hsa-miR-143-3p, hsa-miR-26a-5p и повышением экспрессии hsa-miR-126-5p и hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-21-5p и hsa-miR-25-3p по сравнению с ЦОК больных без метастазов ($p < 0,05$). Выявлены статистически значимые различия в уровнях экспрессии hsa-miR-26a-5p в ЦОК между у больных заболеванием II и III–IV стадий ($p < 0,05$), что может быть использовано для дифференциальной диагностики наличия регионарных и отдаленных метастазов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424. DOI: g/10.3322/caac.21492
2. Siegel R.L., Torre L.A., Soerjomataram I. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults. *Gut* 2019;68(12):2179–85. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319511
3. Lee J.K., Liles E.G., Bent S. et al. Accuracy of fecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2014;160(3):171–81. DOI: 10.7326/M13-1484
4. Bray C., Bell L.N., Liang H. et al. Colorectal cancer screening. *WMJ* 2017;116(1):27–33.
5. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–92. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205
6. Brown S.R., Hicks T.C., Whitlow C.B. Diagnostic and therapeutic colonoscopy. *Shackelford's Surg Alimentary Tract* 2019;2:1689–99. DOI: 10.1016/B978-0-323-40232-3.00145-X
7. Nagata K., Takabayashi K., Yasuda T. et al. Adverse events during CT colonography for screening, diagnosis and preoperative staging of colorectal cancer: a Japanese national survey. *Eur Radiol* 2017;27(12):4970–8. DOI: 10.1007/s00330-017-4920-y
8. Siravegna G., Marsoni S., Siena S. et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(9):531–48. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.14
9. Ashworth T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869;14:146.
10. Millner L.M., Linder M.W., Valdes R. Circulating tumor cells: a review of present methods and the need to identify heterogeneous phenotypes. *Ann Clin Lab Sci* 2013;43(3):295–304.
11. Кит О.И., Колесников В.Е., Толмах Р.Е. и др. Циркулирующие опухолевые клетки и их связь с клинико-морфологическими характеристиками колоректального рака. *Казанский медицинский журнал* 2018;99 (1):5–9. DOI: 10.17816/KMJ2018-005
12. Кит О.И., Колесников В.Е., Толмах Р.Е. et al. Circulating tumor cells and their association with clinical and morphological characteristics of colorectal cancer. *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal* 2018;99(1):5–9. (In Russ.). DOI: 10.17816/KMJ2018-005
13. Christou N., Perraud A., Blondy S. et al. The extracellular domain of E cadherin linked to invasiveness in colorectal cancer: a new resistance and relapses monitoring serum-bio marker? *J Cancer Res Clin Oncol* 2017;143(7):1177–90. DOI: 10.1007/s00432-017-2382-x
14. Christou N., Perraud A., Blondy S. et al. E-cadherin: a potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncol Lett* 2017;13(6):4571–6. DOI: 10.3892/ol.2017.6063
15. Jaiswal S., Jamieson C.H., Pang W.W. et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 2009;138(2):271–85. DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.046
16. TNM classification of malignant tumours. Ed. by J.D. Brierley, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind. John Wiley & Sons, 2017.
17. Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol* 2011;11(1):1–11. DOI: 10.1186/1472-6750-11-70
18. Jones E., Oliphant T., Peterson P. SciPy: open source scientific tools for Python. 2001. Available at: https://www.researchgate.net/publication/213877848_SciPy_Open_Source_Scientific_Tools_for_Python
19. Новикова И.А., Тимошкина Н.Н., Кутилин Д.С. Дифференциальная экспрессия микроРНК в опухолевых и нормальных тканях толстой кишки. *Якутский медицинский журнал* 2020;4:74–82. DOI: 10.25789/YMJ.2020.72.19
20. Novikova I.A., Timoshkina N.N., Kutulin D.S. Differential miRNA expression in tumor and normal tissues of the colon. *Yakutskii meditsinskii zhurnal = Yakut Medical Journal* 2020;4:74–82. (In Russ.). DOI: 10.25789/YMJ.2020.72.19
21. Coumans F.A., Siesling S., Terstappen L.W. Detection of cancer before distant metastasis. *BMC Cancer* 2013;13(1):1–12. DOI: 10.1186/1471-2407-13-283
22. Dong Y., Skelley A.M., Merdek K.D. et al. Microfluidics and circulating tumor cells. *J Mol Diagn* 2013;15(2):149–57. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2012.09.004
23. Кит О.И., Дженкова Е.А., Мирзоян Э.А. и др. Молекулярно-генетическая классификация подтипов колоректального рака: современное состояние проблемы. *Южно-российский онкологический журнал* 2021;2(2):50–6. DOI: 0.37748/2686-9039-2021-2-2-6
24. Кит О.И., Дженкова Е.А., Мирзоян Э.А. et al. Molecular genetic classification of colorectal cancer subtypes: the current state

- of the problem. *Yuzhno-rossiiskii onkologicheskii zhurnal* = South Russian Journal of Oncology 2021;2(2):50–6. (In Russ.). DOI: 0.37748/2686-9039-2021-2-2-6
23. Mostert B., Sieuwerts A.M., Martens J.W. et al. Diagnostic applications of cell-free and circulating tumor cell-associated miRNAs in cancer patients. *Exp Rev Mol Diagn* 2011;11(3):259–75. DOI: 10.1586/erm.11.11
 24. Chen B., Deng Y.N., Wang X. miR-26a enhances colorectal cancer cell growth by targeting RREB1 deacetylation to activate AKT-mediated glycolysis. *Cancer Lett* 2021;521:1–13. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.08.017
 25. Li Y., Sun Z., Liu B. et al. Tumor-suppressive miR-26a and miR-26b inhibit cell aggressiveness by regulating FUT4 in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2017;8(6):e2892. DOI: 10.1038/cddis.2017.281
 26. Wang Z., Wang Z., Liu J. et al. Long non-coding RNA SNHG5 sponges miR-26a to promote the tumorigenesis of osteosarcoma by targeting ROCK1. *Biomed Pharmacother* 2018;107:598–605. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.025
 27. Li H.H., Wang J.D., Wang W. et al. Effect of miR-26a-5p on gastric cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting COL10A1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;24(3):1186–94. DOI: 10.26355/eurrev_202002_20170
 28. Zhong Y., Li L., Chen Z. et al. MiR143 inhibits steroidogenesis and induces apoptosis repressed by H3K27me3 in granulosa cells. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:565261. DOI: 10.3389/fcell.2020.565261
 29. Zhu Q., Wang Z., Hu Y. et al. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2012;27(5):1660–8. DOI: 10.3892/or.2012.1682
 30. Tsukita S., Oishi K., Sato N. et al. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 1994;126(2):391–401. DOI: 10.1083/jcb.126.2.391
 31. Yan L., Cao R., Liu Y. et al. MiR-21-5p links epithelial-mesenchymal transition phenotype with stem-like cell signatures via AKT signaling in keloid keratinocytes. *Sci Rep* 2016;6(1):1–11. DOI: 10.1038/srep28281
 32. Irani S., Shokri G. The role of miR-143, miR-145, and miR-590 in expression levels of CD44 and vascular endothelial cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Middle East J Cancer* 2019;10(3):194–204.

Вклад авторов

О.И. Кит: координирование исследования;
И.А. Новикова: сбор и анализ данных, статистический анализ данных, написание текста статьи;
Н.Н. Тимошкина, А.В. Шапошников: редактирование;
Д.Ю. Гвалдин: анализ циркулирующих опухолевых клеток;
А.А. Пушкин: анализ относительной экспрессии микроРНК;
О.Ю. Каймакчи, А.А. Маслов: хирургическое лечение больных, сбор биологических образцов, материала для анализа.

Authors' contribution

O.I. Kit: research coordination;
I.A. Novikova: data collection and analysis, statistical data analysis, article writing;
N.N. Timoshkina, A.V. Shaposhnikov: editing;
D.Yu. Gvaldin: analysis of circulating tumor cells;
A.A. Pushkin: analysis of relative miRNA expression;
O.Yu. Kaymakchi, A.A. Maslov: surgical treatment of patients, collection of biological samples, material for analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.И. Кит / O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>
И.А. Новикова / I.A. Novikova: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>
Н.Н. Тимошкина / N.N. Timoshkina: <https://orcid.org/0000-0001-6358-7361>
Д.Ю. Гвалдин / D.Yu. Gvaldin: <https://orcid.org/0000-0001-8633-2660>
А.А. Пушкин / A.A. Pushkin: <https://orcid.org/0000-0003-2385-6285>
А.А. Маслов / A.A. Maslov: <https://orcid.org/0000-0001-7328-8074>
А.В. Шапошников / A.V. Shaposhnikov: <https://orcid.org/0000-0001-6881-2281>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках экспериментального государственного задания Минздрава России.

Funding. The study was conducted as part of an experimental state task of the Ministry of Health of Russia.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The protocol of the study was approved by the local ethics committee of the National Medical Research Centre for Oncology, Ministry of Health of Russia. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 15.09.2022. Принята к публикации: 07.02.2023.

Article submitted: 15.09.2022. Accepted for publication: 07.02.2023.