

©Коллектив авторов

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ мРНК ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ОСНОВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ В НЕИЗМЕНЁННОМ ЭПИТЕЛИИ ТОЛСТОЙ КИШКИ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

*М.В. Захаренко<sup>1</sup>, В.К. Боженко<sup>1</sup>, Я.Ю. Киселёва<sup>1\*</sup>, Е.Л. Джикия<sup>1</sup>,  
У.С. Станоевич<sup>2</sup>, Т.М. Кулинич<sup>1</sup>, Н.В. Мельникова<sup>1</sup>, А.Л. Сенчукова<sup>1</sup>, А.Б. Уракова<sup>1</sup>,  
И.Б. Грунин<sup>1</sup>, С.В. Гончаров<sup>1</sup>, О.П. Близнюков<sup>1</sup>, В.А. Солодкий<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Российский научный центр рентгенорадиологии,  
117997, Москва, ул. Профсоюзная, 86; \*эл. почта: yana.kiseleva@gmail.com  
<sup>2</sup>Курский онкологический научно-клинический центр им. Г.Е. Островерхова,  
305524, Курский р-н, Кислово, ул. Елисеева, 1

Проведён сравнительный анализ молекулярно-генетических фенотипов клеток слизистой оболочки в пяти анатомических отделах толстой кишки в группе условно здоровых доноров. Профили экспрессии мРНК 62 генов, участвующих в регуляции жизненно важных клеточных функций, исследовали в биопсийном материале морфологически неизменной слизистой оболочки толстой кишки 181 образца, полученного из основных отделов ободочной (восходящая, поперечно-ободочная, нисходящая, сигмовидная) и прямой кишки в ходе профилактической колоноскопии 58 доноров, у которых отсутствовала патология толстой кишки. Экспрессию мРНК 62 генов, регулирующих апоптоз, пролиферацию, транскрипцию, дифференцировку, межклеточную адгезию и иммунный ответ, оценивали методом ОТ-ПЦР. Установлены статистически значимые отличия молекулярных фенотипов пяти отделов толстой кишки. Результаты проведённого исследования могут служить основанием для создания референсной базы данных (значений экспрессионных профилей), разработки методов дифференциальной диагностики и скрининга различных патологий толстой кишки.

**Ключевые слова:** экспрессия генов; толстая кишка; неизменённая слизистая оболочка толстой кишки; мРНК; ОТ-ПЦР  
**DOI:** 10.18097/PBMC20216704366

### ВВЕДЕНИЕ

Современное представление о патологическом процессе не может быть полным без детального исследования и понимания молекулярно-генетических механизмов его обуславливающих. Так, несмотря на обширные знания анатомии и физиологии органов желудочно-кишечного тракта, изучение онкогенеза толстой кишки (ТК) зачастую происходит без учёта динамических и адаптивных изменений в геноме, эпигеноме и протеоме клеток слизистой оболочки кишечника здорового человека в течение жизни [1].

В большинстве исследований опухоли ТК обычно рассматриваются в “общей” группе, крайне редко принимается во внимание локализация процесса, в то же время, ткань отделов ТК в норме имеет существенные отличия. В клинической онкологической практике существуют понятия “правая” и “левая” половины ТК, обусловленные различиями в кровоснабжении, иннервации, особенностях опухолевого роста, что определяет тактику хирургического вмешательства в зависимости от локализации опухоли [2]. Несмотря на морфологическое сходство слизистой оболочки правой и левой половины ободочной кишки (ОК), они различаются всасывательной способностью, составом микробиоты (с прогрессивным увеличением количества микроорганизмов от слепой кишки к прямой) и эмбриональным происхождением [3]. В ТК отмечается значительный разброс уровня кислотности (рН) на участках, не превышающих

в длину 20 см [4]. Кроме того, “правая” и “левая” ОК различаются по экспрессии ряда антигенов, метаболизму глюкозы, полиаминов и масляной кислоты, а также по концентрации желчных кислот [5]. Указанные различия во многом определяют характер реакций на общие факторы окружающей среды и проканцерогенные факторы, действующие на слизистую оболочку в проксимальном и дистальном отделах [3, 6].

Известно, что молекулярно-генетические особенности онкологических заболеваний, в том числе рака ТК, зависят от анатомо-физиологических характеристик отдела органа, который дал начало онкогенезу. Различия в частоте возникновения колоректального рака (КРР), склонность к микросателлитной стабильности или нестабильности, а также зависимость частоты мутаций в генах *BRAF* и *KRAS*, кодирующих, соответственно, серин/треониновую протеинкиназу B-raf и ГТФазу KRAS, от анатомического расположения опухоли, могут быть связаны с разными биологическими характеристиками проксимального и дистального отделов ТК [7-10].

Изучение нормальной слизистой и сравнение её с морфологически неизменённой тканью при патологии позволит определить молекулярные маркеры, которые будут отражать тип патологического процесса. В настоящее время в большинстве исследований при изучении патологических процессов в качестве контрольных образцов используют ткани без морфологических признаков заболевания,

часто полученные из резецированного участка поражённого органа. В то же время в ряде работ [11-14] подчеркивается, что край резекции нельзя считать нормальной тканью, так как при развитии злокачественного процесса в отдалённых от опухоли участках поражённого органа обнаруживаются молекулярные изменения. В наших предыдущих исследованиях [13, 14] также показано, что морфологически неизменная ткань ТК на расстоянии 15-20 см от опухоли демонстрирует глубокие отличия в уровне экспрессии ряда генов по сравнению с тем же отделом ТК здоровых людей. Однако исследования здоровых доноров ограничены сложностью получения биологического материала, особенно, когда речь идёт о внутренних органах. В отечественной и зарубежной литературе мы не встретили публикаций, описывающих молекулярно-генетические исследования тканей ТК здоровых доноров.

Целью исследования являлся сравнительный анализ молекулярно-генетических фенотипов клеток слизистой оболочки в пяти анатомических отделах ТК в группе условно здоровых доноров путём сопоставления профилей экспрессии мРНК 62 генов, обеспечивающих внутриклеточный гомеостаз.

Данное исследование является пилотным — впервые в разных отделах ТК здоровых доноров детально проанализированы изменения экспрессии мРНК 62 генов (“молекулярно-генетический фенотип”), ответственных за основные процессы, участвующие в канцерогенезе. Панель генов была сформирована на основании ранее проведенных исследований по изменению профиля экспрессии в морфологически нормальной ткани (крае резекции) при КРР [13, 14]. Результаты проведенного исследования могут послужить основой для формирования референсной базы данных, могут учитываться при разработке новых методов диагностики воспалительных, предраковых и злокачественных поражений ТК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Образцы тканей

В работе использовали биоптаты морфологически неизменённой слизистой оболочки ТК, полученные в ходе профилактической колоноскопии 58 условно здоровых доноров, проходивших обследование в Российском научном центре рентгенорадиологии с 2018 по 2019 г. Распределение пациентов по полу и возрасту было следующим: мужчины (n=7) в возрасте от 26 до 71 лет, средний возраст — 50,7±21,0; женщины (n=51) в возрасте от 23 до 79 лет, средний возраст — 56,9±13,1. Всего был проанализирован 181 образец тканей, включавших 33 биоптата восходящего отдела, 36 — поперечного, 35 — нисходящего, 43 — сигмовидного, 34 — прямой кишки. При проведении анализа полученных результатов, образцы были разделены на три группы: (1) правая ОК (восходящая и проксимальный участок поперечной кишки) (n=68), (2) левая ОК (дистальный участок поперечной кишки, нисходящая, сигмовидная кишка) (n=79) и (3) прямая кишка (ПК) (n=34).

Согласно эндоскопическому заключению, на момент обследования у пациентов патологический процесс в ТК не наблюдался.

### Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР)

Материал биопсии немедленно помещали в раствор солей, стабилизирующих РНК EverFresh RNA (“Клоноген”, Россия). Выделение РНК проводили в течение 30-40 мин после получения биоптата, при невозможности быстрой экстракции РНК образцы хранили при -70°C. Из каждого образца ткани объёмом 2 мм<sup>3</sup> выделяли суммарную РНК с помощью набора RNeasy Mini Kit (“QIAGEN”, Германия) согласно протоколу производителя. Параметры проведения двухступенчатой ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) и использованное оборудование описаны ранее [14, 15]. Для определения экспрессии генов методом ОТ-ПЦР использовали набор из 62 ген-специфичных зондов и пар праймеров, разработанный “НПФ ДНК-Технология” (Россия). Данный набор праймеров предоставляется “НПФ ДНК-Технология” по запросу на коммерческой основе. Реакцию ставили в дубликатах. Относительную экспрессию мРНК генов измеряли в относительных единицах, определяемых согласно методике, описанной ранее [14], используя в качестве нормировочных генов *GUSB* (бета-глюкуронидаза), *B2M* (бета-2-микроглобулин) и *HPRT1* (гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза) как наиболее стабильно экспрессирующиеся в различных тканях [16, 17]. Процедура нормирования экспрессии генов подробно описана в [14]. В результате был определён относительный уровень экспрессии 62 генов, активность которых может быть нарушена как при злокачественном, так и при доброкачественном патологическом процессе. В исследование вошли гены, участвующие в процессах апоптоза (*BCL2*, *BAX*, *BAG1*, *NDRG1*, *BIRC5*), пролиферации (*Ki-67*, *CCND1*, *CCNB1*, *PTEN*, *STK-15(AURKA)*, *P16INK4A*, *P14ARF*, *HER2/neu(C-erbB2)*, *TERT*), транскрипции (*MYC*, *MYBL2*), дифференцировки клеток (*ESR1*, *PGR*, *CYP19A1*, *GRB7*, *CD45*, *CD56*, *CD68*, *CD69*), межклеточных взаимодействий (*MMP11*, *MMP2*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP9*, *CTSL2*, *PAPPA*, *TPA*), а также гены факторов роста (*VEGFA121*, *VEGFA165*, *VEGFA189*, *SCUBE2*, *IGF1*, *IGF2*, *TGFβ*), цитокинов и факторов иммунного ответа (*IL1β*, *IL2*, *IL6*, *IL7*, *IL8*, *IL10*, *IL12α*, *IL15*, *COX-2*, *TNFα*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR7*, *IFNγ*, *GNLY*, *HLA-G1*, *HLA-G5*, *LIF*, *LIFR*, *LGALS1*, *GATA3*, *IL2Rα*, *GREM1*), многофункциональные гены (*LIF*, *LIFR*).

### Статистический анализ

Статистический анализ результатов определения экспрессии 62 генов проводили с использованием возможностей программного пакета Statistica 13.0. Для анализа зависимости уровня экспрессии от отдела ТК использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни. С целью выбора наиболее значимых генов для классификации отделов ТК по молекулярному фенотипу проводили

дискриминантный анализ с пошаговым включением переменных, основанный на проверке многомерного F-критерия Фишера (при уровне значимости  $p < 0,05$ ). Выбранный метод анализа позволяет выявить те параметры (экспрессия генов) объекта (образца ткани), которые вносят определяющий вклад (наибольший вес) в дискриминацию объектов (отнесение образцов к той или иной группе ТК). Выбранные параметры (экспрессия определённых генов) и их вес были использованы для построения дискриминантной модели в рамках программного пакета Statistica 13.0, которая позволила классифицировать образцы ткани по отделам ТК на основе их молекулярного фенотипа. При проведении дискриминантного анализа с помощью программы Statistica 13.0 использовали опцию исключения “неполных образцов”, то есть образцов, у которых отсутствуют данные одного или нескольких исследованных параметров. Поэтому общее количество образцов в приводимых таблицах может отличаться от суммарного количества исследованных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведённого исследования нормальной слизистой ТК условно здоровых доноров были получены значения уровней экспрессии 62 генов для каждого анатомического отдела (данные представлены в таблице S1 дополнительных материалов). Далее был проведён парный сравнительный статистический анализ данных с использованием U-теста Манна-Уитни, что позволило выявить статистически значимые отличия экспрессии 44 генов в разных отделах ТК, представленные в таблице 1. Для удобства данная таблица с наложенной на неё тепловой картой дифференциальной экспрессии генов при попарном сравнении различных отделов ТК представлена в дополнительных материалах (табл. S2).

Экспрессионные профили слизистой исследуемых отделов ОК (восходящей, нисходящей, поперечной и сигмовидной) при сравнении в парах достоверно отличались между собой по 15 генам, а ткань ПК достоверно отличалась от ОК по 42 генам (табл. 1). Среди исследуемых генов нами выявлены такие, уровень экспрессии которых достоверно отличался как в отделах ОК, так и в ПК. Ими оказались регуляторы пролиферативной активности *TERT* и циклин D1 (*CCND1*), активатор митохондриального апоптоза *NDRG1*, гены иммунного ответа (*IL2Rα*, *IL8*, *IL12α*, *TNFα*), эндотелиальные факторы роста сосудов (*VEGFA165*, *VEGFA189*), инсулиноподобный фактор роста *IGF2*. В этот список также вошли ген *CYP19A*, кодирующий белок семейства цитохрома P450 и многофункциональный цитокин *LIF*, играющий важную роль в различных биологических процессах, и, в частности, как недавно показано, принимающий участие в регуляции функционирования кишечных стволовых клеток и регенерации кишечного эпителия [18].

Таким образом, мы можем предположить различия в молекулярных механизмах поддержания гомеостаза в отделах ПК и ОК, которые

отражают физиологические процессы и определяют молекулярные фенотипы данных отделов. Обнаруженные отличия экспрессионных профилей отделов ТК послужили основой для проведения дискриминантного анализа с целью выяснения возможности классификации образцов тканей по молекулярному фенотипу — то есть создания дискриминантной модели, которая бы позволила на основании профиля экспрессии определённых генов определять принадлежность образца к определённому отделу ТК. Проведённый с помощью статистического программного пакета Statistica 13.0 дискриминантный анализ выявил 20 ключевых генов, значения уровня экспрессии которых вносят определяющий вклад в отнесение образца к отделу ТК по молекулярному профилю: *CCND1*, *SCUBE2*, *LIF*, *IL8*, *IL2Rα*, *IGF1*, *TERT*, *P16INK4A*, *PAPPA*, *GATA3*, *MMP2*, *VEGFA121*, *CYP19A*, *IL1β*, *BAG1*, *GREM1*, *IL12α*, *IL15*, *TGFβ*, *HER2/neu*. Данные 20 генов послужили основой для построения дискриминантной модели с использованием программного пакета Statistica 13.0 для классификации отделов ТК. В таблице 2 представлены результаты дискриминантного анализа полученных молекулярных фенотипов и процент совпадения классификации на основе созданной дискриминантной модели с реальной принадлежностью образца к определённому анатомическому отделу. Наибольший процент совпадений выявлен для тканей ПК — 100%, образцов сигмовидной и восходящей ОК — 81,4% и 78,8% соответственно. Средняя частота совпадений по всем отделам составила 78,3%.

Как можно видеть из таблицы 2, наибольшее число ошибочных определений связано с распределением образцов в соседние отделы ТК, что может быть объяснено неполным соответствием анатомического расположения и функциональными особенностями тканей ТК.

Мы также провели дискриминантный анализ, основываясь на делении ТК на три клинически важных отдела: правая и левая половины ОК и ПК. Это позволило классифицировать образцы по молекулярному фенотипу с более высокой точностью — 90% (табл. 3). В модель классификации на основе дискриминантного анализа вошли 18 генов, уровни экспрессии которых в комплексе достоверно ( $p < 0,05$ ) определяют принадлежность образцов к трем отделам ТК: *CCND1*, *SCUBE2*, *IL1β*, *IL2Rα*, *IGF1*, *IL12α*, *MMP11*, *PAPPA*, *ESR1*, *CYP19A*, *IL15*, *TGFβ*, *IL8*, *HER2*, *LIFR*, *CD45*, *IL7*, *GATA3*.

Таким образом, полученная модель также со 100% вероятностью позволяет идентифицировать по результатам оценки экспрессии генов образцы тканей ПК. При классификации образцов ОК модель допускает вероятность ошибки (8-16%): образцы правой ОК верно классифицируются в 83,8% случаев, а левой ОК в 91,1% случаев.

На рисунке представлен график двумерного распределения образцов (диаграмма рассеяния) для трёх анатомических отделов ТК в пространстве дискриминантных функций, создаваемых программой Statistica 13.0. В рамках дискриминантного анализа

Таблица 1. Достоверность различий дифференциальной экспрессии исследованных генов при парном сравнении различных отделов ТК в тканях, полученных от условно здоровых доноров. Отделы ТК: В — восходящий, П — поперечный, Н — нисходящий, С — сигмовидный, ПК — прямая кишка

Гены	ПК/С	ПК/Н	ПК/П	ПК/В	П/В	Н/В	С/В	С/Н	С/П	Н/П
<i>BAG1</i>	—	0,022	0,034	<0,001	—	—	—	—	—	—
<i>CCNB1</i>	—	—	—	—	0,013	—	0,047	—	—	—
<i>CCND1</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	—	0,002	0,004	—	—	—
<i>CD45</i>	0,042	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>CD68</i>	0,008	—	—	—	—	—	0,015	—	—	—
<i>CD69</i>	—	—	—	—	—	—	0,047	—	—	—
<i>COX-2</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	—	—	—	—	—	—
<i>CTSL2</i>	0,004	0,025	0,027	—	—	—	—	—	—	—
<i>CYP19A1</i>	—	0,013	0,004	0,024	—	—	—	0,040	0,014	—
<i>ESR1</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	—	—	—	—	—	—
<i>GATA3</i>	0,014	0,016	0,037	—	—	—	—	—	—	—
<i>GREM1</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	—	—	—	—	—	—
<i>HLA-G5</i>	—	—	—	0,025	—	—	—	—	—	—
<i>IGF1</i>	0,043	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>IGF2</i>	0,020	0,014	0,048	0,001	0,043	—	—	—	—	—
<i>IL10</i>	0,005	0,026	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>IL12<math>\alpha</math></i>	<0,001	0,020	0,018	0,016	—	—	0,015	—	—	—
<i>IL1<math>\beta</math></i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	—	—	—	—	—	—
<i>IL2</i>	0,008	—	0,001	0,044	—	—	—	—	—	—
<i>IL2R<math>\alpha</math></i>	—	—	0,011	0,015	—	—	0,003	—	0,001	—
<i>IL6</i>	0,006	0,011	0,018	—	—	—	—	—	—	—
<i>IL8</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	—	—	0,023	—	—	—
<i>LGALS1</i>	0,002	0,002	0,018	0,015	—	—	—	—	—	—
<i>LIF</i>	0,009	<0,001	0,001	<0,001	—	—	0,008	0,014	—	—
<i>LIFR</i>	<0,001	0,003	0,005	0,002	—	—	—	—	—	—
<i>MMP11</i>	—	—	0,015	—	—	—	—	—	—	—
<i>MMP2</i>	—	—	—	0,009	—	—	—	—	—	—
<i>MMP7</i>	0,001	0,001	0,008	—	—	—	—	—	—	—
<i>MYC</i>	0,006	0,020	0,003	0,014	—	—	—	—	—	—
<i>NDRG1</i>	—	—	0,006	—	—	—	—	—	0,033	—
<i>P14ARF</i>	0,001	<0,001	0,003	0,002	—	—	—	—	—	—
<i>P16INK4A</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	—	—	—	—	—	—
<i>PAPPA</i>	—	0,010	<0,001	0,035	—	—	—	—	—	—
<i>PTEN</i>	—	0,035	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>SCUBE2</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	—	—	—	—	—	—
<i>TERT</i>	<0,001	0,019	0,024	—	0,004	0,002	<0,001	—	—	—
<i>TGF<math>\beta</math></i>	0,005	0,025	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>TLR2</i>	0,032	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>TLR4</i>	—	—	0,006	—	—	—	—	—	—	—
<i>TLR7</i>	0,032	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	0,019	—	—	—	—	—	0,018	—	0,030	—
<i>VEGFA121</i>	0,013	0,001	<0,001	0,004	—	—	—	—	—	—
<i>VEGFA165</i>	—	0,003	<0,001	0,026	—	—	—	0,014	0,007	—
<i>VEGFA189</i>	—	—	0,022	—	—	—	0,042	—	0,002	—

Примечание: в таблице указаны значения  $p < 0,05$ , полученные с помощью критерия Манна-Уитни при парном сравнении отделов ТК. Знаком “—” отмечены недостоверные отличия.

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В НЕИЗМЕНЁННОМ ЭПИТЕЛИИ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Таблица 2. Матрица классификаций дискриминантного анализа: соответствие классификации образцов по молекулярному фенотипу с их принадлежностью к отделу ТК для пяти анатомических отделов ТК согласно дискриминантной модели с 20 генами

Отдел ТК	Частота совпадения классификации (%)	Распределение образцов по отделам ТК согласно дискриминантной модели				
		Восходящий	Поперечный	Нисходящий	Сигмовидный	Прямая кишка
Восходящий	78,8	26	4	2	0	0
Поперечный	65,7	4	23	6	2	0
Нисходящий	65,7	1	8	23	3	0
Сигмовидный	81,4	0	1	7	35	0
Прямая кишка	100,0	0	0	0	0	34
Среднее по ТК	78,3	Суммарное число образцов распределённых по отделам ТК				
		31	36	38	40	34

Примечание. Здесь и в таблице 3 представлено число корректно классифицированных образцов (диагональ таблицы) исследуемого отдела ТК и тех образцов, которые ошибочно отнесены по результатам классификации к другому отделу толстой кишки.

Таблица 3. Матрица классификаций дискриминантного анализа: соответствие классификации образцов по молекулярному фенотипу с их принадлежностью к отделу ТК для трёх анатомических отделов ТК согласно дискриминантной модели с 18 генами

Отдел ТК	Частота совпадения классификации (%)	Распределение образцов по отделам ТК согласно дискриминантной модели		
		Правая ОК	Левая ОК	Прямая кишка
Правая ОК	83,8	57	11	0
Левая ОК	91,1	7	72	0
Прямая кишка	100,0	0	0	33
Среднее по ТК	90,0	Суммарное число образцов, распределённых по отделам ТК		
		64	83	33

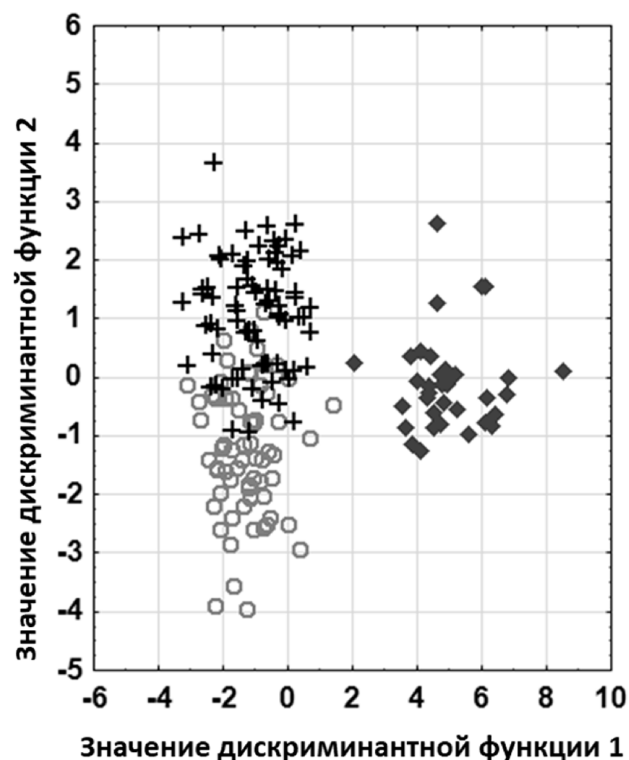


Рисунок. Диаграмма рассеяния: распределения образцов в пространстве дискриминантных функций. О — правая ОК, + — левая ОК, ◆ — ПК+.

дискриминантные функции являются линейными комбинациями признаков объектов (в данном случае — экспрессии 18 генов, указанных выше), минимизирующих внутригрупповые различия.

Из рисунка видно, что для группы ПК отсутствуют пересекающиеся значения с группами “правая” и “левая” ОК. Для групп “правая” и “левая” ОК отмечены единичные попадания образцов в область другого отдела, что можно объяснить вариативностью длины поперечного отдела ОК, что не всегда позволяет чётко провести границу между левой и правой половиной данного отдела. Таким образом, результаты дискриминантного анализа трёх анатомических отделов ТК демонстрируют существование у них статистически значимых отличий в совокупной экспрессии 18 генов, что и позволило с высокой степенью вероятности классифицировать образцы ткани для данных отделов ТК по молекулярному фенотипу.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Нами впервые детально проанализированы изменения экспрессии 62 генов, ответственных за основные внутриклеточные процессы, в отделах ТК условно здоровых доноров. Использование разных вариантов классификации в дискриминантном анализе, проведенном для пяти анатомических отделов и трёх клинически значимых отделов ТК, показало, что независимо от используемого алгоритма, дискриминантная модель классифицирует

образцы на устойчивые группы. Полученные результаты свидетельствуют о выраженных отличиях молекулярно-генетических фенотипов отделов ТК в визуально неизменной слизистой оболочке толстой кишки здоровых доноров. По результатам дискриминантного анализа экспрессии 62 генов молекулярный фенотип тканей прямой кишки достоверно отличается от других отделов толстой кишки и классифицируется со 100% точностью. При парном сравнении с отделами ОК ткани ПК достоверно отличаются по уровню экспрессии 42 генов. Ключевыми генами, в наибольшей степени определяющими принадлежность образцов к отделу ТК, вошедшими в обе модели классификации, являются гены, регулирующие процессы пролиферации (*CCND1*, *HER2/neu*), дифференцировки (*CYP19A*), а также факторы роста (*IGF1*, *SCUBE2*) и факторы иммунного ответа (*IL2R $\alpha$* , *IL8*, *IL12 $\alpha$* , *IL15*, *GATA3*). Представляется логичным, что ключевыми генами для данной модели из блока “ответственных за пролиферацию” являются *CCND1*, кодирующий белок циклин D1 (один из основных факторов пролиферации, обеспечивающих переход G1/S клеточного цикла), и *HER2/neu* (клинически востребованный маркер, другое название — *ERBB2*), вовлечённый в процессы контроля пролиферации. Интересно, что согласно нашим результатам, уровень экспрессии рецепторов эстрогена (*ESR1*) с высокой достоверностью отличает ткани ПК от тканей отделов ОК, однако не оказывает существенного вклада в классификацию по трём отделам. Большой вклад в обе модели классификации вносят гены *CYP19A1* и *IGF1*, вовлечённые в регулирование гормонального статуса. Ген *CYP19A1* кодирует ароматазу, которая отвечает за превращение стероидов-предшественников андрогенов в эстрогены, катализирует многие реакции, участвующие в метаболизме лекарств и синтезе холестерина, стероидов и других липидов, и, следовательно, может играть роль в регулировании массы жировой ткани и её распределении [19]. Инсулиноподобный фактор роста 1 (*IGF1*) является ключевым регулятором роста и развития тканей. Из литературных источников известно о наличии корреляционных связей между уровнем *IGF1* и риском развития КРП [20], а также риском его прогрессирования [21].

Ткани кишечника, особенно ТК, обладают значительным потенциалом регенерации и самообновления, что определяет высокий уровень экспрессии генов, ответственных за пролиферацию, клеточный рост и дифференцировку [22]. В то же время, полученные результаты свидетельствуют о разном уровне экспрессии генов, ответственных за эти процессы в отделах ТК. Кроме описанных выше регуляторов пролиферации и дифференцировки, наибольший вклад в модель классификации вносит оценка экспрессии гена *SCUBE2*. Этот ген кодирует гликопротеин, который принимает непосредственное участие в сигнальном пути Hh (Hedgehog signaling pathway). В эмбриональном периоде сигнальный путь Hh регулирует процессы дифференциации клеток, в постнатальном периоде и у взрослых участвует в поддержании и регенерации тканей,

регуляции функционирования стволовых клеток, а также может участвовать в онкогенезе [23, 24].

Кишечник является важным органом иммунной системы. В тканях толстой кишки, с учётом постоянного контакта с собственной микрофлорой и повышенным риском воздействия окружающей среды, сложился особый механизм регулирования иммунокомпетентных клеток, входящих в состав слизистой оболочки ТК, при этом отделы кишечника могут отличаться по составу и количеству иммунных клеток. Нами установлено, что экспрессия 18 генов, ответственных за регуляцию иммунного ответа, достоверно отличается в разных анатомических отделах ТК (табл. 1). Пять из этих генов, регуляторов иммуно-компетентных клеток, вносят наибольший вклад в построение моделей классификации. Белок-продукт гена *GATA3* является регулятором развития Т-клеток и играет важную роль в активности интраэпителиальных лимфоцитов. Рецептор интерлейкина-2 (*IL2R $\alpha$* ) участвует в регуляции иммунной толерантности, контролируя активность регуляторных Т-клеток. Цитокин *IL12 $\alpha$*  может действовать как фактор роста для активированных Т- и НК-клеток, усиливать литическую активность НК/лимфокин-активированных клеток-киллеров и стимулировать выработку IFN $\gamma$ . Белок *IL8* является основным медиатором воспалительной реакции, увеличивает проницаемость кровеносных сосудов, а также положительно коррелирует с увеличением тяжести исходов многих заболеваний.

Таким образом, нами показано, что отличия молекулярных фенотипов отделов ТК обусловлены разным уровнем экспрессии генов разных функциональных групп, что отражает гистологические и функциональные особенности ТК. Полученные результаты позволяют выделить на основе профиля экспрессии 62 генов особый молекулярный фенотип отдела ПК, который при физиологической норме значительно отличается от экспрессионного профиля ОК. Выявленные молекулярные особенности тканей ПК, возможно, позволят объяснить высокую частоту возникновения опухолей данного отдела [25]. Можно надеяться, что дальнейшее развитие работы по молекулярному фенотипированию тканей толстой кишки в “норме” и при патологии позволит выработать критерии для диагностических подходов, способных распознавать патологические состояния даже до проявления клинических симптомов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование позволило оценить молекулярные фенотипы разных отделов ТК здоровых доноров. Определены относительные значения уровней экспрессии мРНК 62 генов в пяти отделах ТК. Выявлена чёткая дифференциация профиля экспрессии генов в зависимости от отдела ТК. Полученные результаты создают предпосылки для формирования базы данных значений экспрессии генов с учётом анатомического отдела ТК, а также демонстрируют возможность разработки новых подходов к дифференциальной диагностике патологических процессов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственного задания МЗ РФ.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Российского научного центра рентгенодиагностики (протокол №4 от 26.04.18).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала ([pbmc.ibmc.msk.ru](http://pbmc.ibmc.msk.ru)).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Добровольский О.В., Сереброва С.Ю. (2007) Рус. мед. журн., **15**(16), 1193-1198. [Dobrovolsky O.V., Serebrova S.Yu. (2007) RMJ, **15**(16), 1193-1198.]
2. Paschke S., Jafarov S., Staib L., Kreuser E.D., Maulbecker-Armstrong C., Roitman M., Holm T., Harris C.C., Link K.H., Kornmann M. (2018) Int. J. Mol. Sci., **19**(9), 2577. DOI: 10.3390/ijms19092577.
3. Glebov O.K., Rodriguez L.M., Nakahara K., Jenkins J., Cliatt J., Humbyrd C.-J., DeNobile J., Soballe P., Simon R., Wright G., Lynch P., Patterson S., Lynch H., Gallinger S., Buchbinder A., Gordon G., Hawk E., Kirsch I.R. (2003) Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., **12**(8), 755-762.
4. Чуркин И.А. (2002) Применение прицельной эндоскопической pH-метрии для оценки функционального состояния слизистой прямой и сигмовидной ободочной кишки. Автореф. дисс. канд. наук. Алтайский государственный медицинский университет МЗ РФ, Томск. [Churkin I.A. (2002) Primenenie pricel'noj endoskopicheskoy rN-metrii dlya ocenki funktsional'nogo sostoyaniya slizistoy pryamoj i sigmovidnoj obodochnoj kishki. Avtoref. diss. kand. nauk. Altajskij Gosudarstvennyj Medicinskij Universitet MZ RF, Tomsk.]
5. Distler P., Holt P.R. (1997) Dig. Dis., **15**, 302-311.
6. Iacopetta B. (2002) Int. J. Cancer, **101**(5), 403-408.
7. Benedix F., Kube R., Meyer F., Schmidt U., Gasteringer I., Lippert H. (2010) Dis. Colon Rectum., **53**(1), 57-64.
8. Forster S., Sattler H.P., Hack M., Romanakis K., Rohde V., Seitz G., Wullich B. (1998) Surgery., **123**(1), 13-18.
9. Hinoue T., Weisenberger D.J., Lange C.P., Shen H., Byun H.-M., van den Berg D., Malik S., Pan F., Noshmeh H., van Dijk C.M., Tollenaar R.A.E.M., Laird P.W. (2012) Genome Res., **22**, 271-282.
10. Yamauchi M., Lochhead P., Morikawa T., Huttenhower C., Chan A.T., Giovannucci E., Fuchs C., Ogino S. (2012) Gut, **61**(6), 794-797.
11. Aran D., Camarda R., Odegaard J., Paik H., Oskotsky B., Krings G., Goga A., Sirota M., Butte A.J. (2017) Nat. Commun., **8**(1), 1077. DOI: 10.1038/s41467-017-01027-z.
12. Sanz-Pamplona R., Berenguer A., Cordero D., Mollevi D.G., Crous-Bou M., Sole X., Paré-Brunet L., Guino E., Salazar R., Santos C., de Oca J., Sanjuan X., Rodriguez-Moranta F., Moreno V. (2014) Mol. Cancer., **13**, 46. DOI: 10.1186/1476-4598-13-46.
13. Станоевич У. (2017) Клиническое значение результатов молекулярно-генетических исследований толстой кишки при колоректальном раке. Дисс. докт. наук. РНЦРР МЗ РФ, Москва. [Stanoevich U. (2017) Klinicheskoe znachenie rezul'tatov molekulyarno-geneticheskikh issledovanij tolstoj kishki pri kolorektal'nom rake. Diss. dokt. med. nauk. FGBU Rossijskij nauchnyj centr rentgenoradiologii Ministerstva zdravoohraneniya Rossijskoj Federacii, Moskva.]
14. Боженко В.К., Станоевич У.С., Троценко И.Д., Захаренко М.В., Киселева Я.Ю., Солодкий В.А. (2018) Биомедицинская химия, **64**(1), 46-52. [Bozhenko V.K., Stanoevich U.S., Trotsenko I.D., Zakharenko M.V., Kiseleva Ya.Yu., Solodky V.A. (2018) Biomeditsinskaya Khimiya, **64**(1), 46-52.] DOI: 10.18097/PBMC20186401046.
15. Кулинич Т.М., Захаренко М.В., Джикия Е.Л., Сенчукова А.Л., Станоевич У.С., Грунин И.Б., Мельникова Н.В., Гончаров С.В., Крашихина Т.В., Кудинова Е.А., Близняков О.П., Боженко В.К. (2020) Успехи молекулярной онкологии, **7**(2), 39-46. [Kulinich T.M., Zakharenko M.V., Dzhikiya E.L., Senchukova A.L., Stanoevich U.S., Grunin I.B., Melnikova N.V., Goncharov S.V., Krashikhina T.V., Kudinova E.A., Bliznyukov O.P., Bozhenko V.K. (2020) Uspekhi Molekulyarnoy Oncologii, **7**(2), 39-46.]
16. Dowling C.M., Walsh D., Coffey J.C., Kiely P.A. (2016) F1000Research, **5**, 99. DOI: 10.12688/f1000research.7656.2.
17. de Kok J., Roelofs R., Giesendorf B. (2005) Lab. Invest., **85**, 154-159.
18. Wang H., Wang J., Zhao Y., Zhang X., Liu J., Zhang C., Haffty B., Verzi M., Zhang L., Gao N., Feng Z., Hu W. (2020) Cell Death Dis., **11**(7), 588. DOI: 10.1038/s41419-020-02790-6.
19. McTernan P.G., Anderson L.A., Anwar A.J., Eggo M.C., Crocker J., Barnett A.H., Stewart P.M., Kumar S. (2002) J. Clin. Endocrinol. Metab., **87**(3), 1327-1336.
20. Murphy N., Carreras-Torres R., Song M., Martin R.M., Tsilidis K.K., Smith-Byrne K., Fensom G., Perez-Cornago A., Travis R.C., Key T.J. (2020) Gastroenterology, **158**, 1300-1312. e20. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.12.020.
21. Kasprzak A., Szaflarski W. (2020) Int. J. Mol. Sci., **21**(19), 6995. DOI: 10.3390/ijms21196995.
22. Боженко В.К., Захаренко М.В., Кулинич Т.М., Джикия Е.Л., Сенчукова А.Л., Станоевич У.С., Грунин И.Б., Мельникова Н.В., Крашихина Т.В., Близняков О.П., Гончаров С.В., Кудинова Е.А. (2020) Вестник Российского научного центра рентгенодиагностики, **20**(3), 15-39. [Bozhenko V.K., Zakharenko M.V., Kulinich T.M., Dzhikiya E.L., Senchukova A.L., Stanoevich U.S., Grunin I.B., Melnikova N.V., Krashikhina T.V., Bliznyukov O.P., Goncharov S.V., Kudinova E.A. (2020) Vestnik RNCRR, **20**(3), 15-39.]
23. Song Q., Li C., Feng X., Yu A., Tang H., Peng Z., Wang X. (2015) Oncol. Rep., **33**(4), 1956-1964.
24. Tsai M.T., Cheng C.J., Lin Y.C., Chen C.C., Wu A.R., Wu M.T., Hsu C.C., Yang R.B. (2009) Biochem. J., **422**(1), 119-128.
25. Rawla P., Sunkara T., Barsouk A. (2019) Prz. Gastroenterol., **14**(2), 89-103.

Поступила в редакцию: 28. 01. 2021.  
После доработки: 29. 03. 2021.  
Принята к печати: 06. 04. 2021.

**THE STUDY OF mRNA EXPRESSION PROFILES OF MAIN CELL FUNCTION REGULATOR GENES  
IN UNCHANGED COLONIC MUCOSA FROM HEALTHY DONORS**

*M.V. Zakharenko<sup>1</sup>, V.K. Bozhenko<sup>1</sup>, Ya.Yu. Kiseleva<sup>1\*</sup>, E.L. Dzhikiya<sup>1</sup>,  
U. Stanoevich<sup>2</sup>, T.M. Kulinich<sup>1</sup>, N.V. Melnikova<sup>1</sup>, A.L. Senchukova<sup>1</sup>, A.B. Urakova<sup>1</sup>,  
I.B. Grunin<sup>1</sup>, S.V. Goncharov<sup>1</sup>, O.P. Bliznyukov<sup>1</sup>, V.A. Solodkiy<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Russian Scientific Center of Roentgenoradiology,  
86 Profsoyuznaya str., Moscow, 117997 Russia; \*e-mail: yana.kiseleva@gmail.com

<sup>2</sup>Kursk Regional Clinical Oncology Center,  
1 Eliseeva str., Kislino, Kursk Region, 305524, Russia

A comparative analysis of molecular genetic phenotypes of mucous membrane cells in five anatomical regions of the colon in a group of healthy donors was conducted by comparing mRNA expression profiles of 62 genes involved in the regulation of vital cellular function. We used 181 biopsy samples of morphologically unchanged colonic mucosa, obtained from the colon (ascending, transverse-colon, descending, sigmoid) and rectum sections during prophylactic colonoscopy of 58 donors with no colon pathology. The mRNA levels for 62 genes involved in the regulation of apoptosis, proliferation, transcription, differentiation, cell-cell adhesion, and immune response were assessed by RT-PCR. Statistically significant differences were found for the molecular phenotypes of five sections of the colon. The results of the study can serve as a basis for creating a reference database (values of expression profiles), developing methods of differential diagnostics and screening of various pathologies of the colon.

**Key words:** gene expression; colon; unchanged colon mucosa; mRNA; RT-PCR

**Funding.** The study was conducted in the framework of the State Program of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Received: 28.01.2021, revised: 29.03.2021, accepted: 06.04.2021.