

мРНК гена *OY-TES-1* в периферической крови и опухоли при колоректальном раке

Н.Р. Хилал^{1,2}, Д.В. Новиков^{1,3}, В.Н. Якимов¹, Р.Г. Пегов⁴, В.В. Новиков^{1,3}

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; Россия, 603022 Нижний Новгород, пр-кт Гагарина, 23;

²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России; Россия, 603000 Нижний Новгород, площадь Минина и Пожарского, 10/1;

³ФГБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора; Россия, 603022 Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71;

⁴Нижегородский областной клинический онкологический диспансер; Россия, 603093 Нижний Новгород, ул. Деловая, 11/1

Контакты: Надежда Риядовна Хилал nadia.hilal@hotmail.com

Введение. Одним из раково-тестикулярных генов является ген *OY-TES-1*, кодирующий проакрозинсвязывающий белок. Известно об экспрессии этого гена в опухолевых клетках.

Цель исследования – определение частоты обнаружения матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) *OY-TES-1* в периферической крови и опухолевых очагах больных колоректальным раком (КРР) в сопоставлении с клиническими особенностями течения заболевания для оценки потенциальной мониторинговой значимости данного показателя.

Материалы и методы. Использован метод определения мРНК *OY-TES-1* на основе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, и проведена оценка частоты встречаемости мРНК *OY-TES-1* в периферической крови и опухолевых очагах 66 больных КРР, а также в крови здоровых волонтеров с помощью построения таблиц сопряженности, использования критерия χ^2 и точного критерия Фишера.

Результаты. В периферической крови здоровых волонтеров мРНК *OY-TES-1* не обнаруживалась. В крови больных КРР мРНК *OY-TES-1* выявлена в 13,6 % случаев. В опухолях она обнаруживалась в 60,6 % случаев. В крови и опухолевых очагах больных КРР мРНК *OY-TES-1* выявлялась статистически значимо чаще на III и IV стадиях, чем на I и II стадиях (в 11,0 и 4,5 раза соответственно), а также многократно чаще при опухолях с низкой степенью дифференцировки, чем при высокодифференцированных опухолях. У больных КРР мРНК *OY-TES-1* в опухолях при метастазах в органах и лимфатических узлах обнаруживалась многократно чаще, чем при их отсутствии (в 16,4 и 17,4 раза соответственно).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии мРНК гена *OY-TES-1* в крови здоровых лиц и появлении мРНК гена *OY-TES-1* в крови больных КРР. Показана возможность использования теста на наличие в крови мРНК гена *OY-TES-1* в качестве дополнительного информативного мониторингового показателя при КРР.

Ключевые слова: *OY-TES-1*, раково-тестикулярные гены, колоректальный рак, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

Для цитирования: Хилал Н.Р., Новиков Д.В., Якимов В.Н. и др. мРНК гена *OY-TES-1* в периферической крови и опухоли при колоректальном раке. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(3):28–35. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-28-35

mRNA of the *OY-TES-1* gene in peripheral blood and tumors in colorectal cancer

Nadezhda R. Hilal^{1,2}, Dmitry V. Novikov^{1,3}, Vasily N. Yakimov¹, Roman G. Pegov⁴, Viktor V. Novikov^{1,3}

¹National Research N.I. Lobachevsky Nizhgorodsky State University; 23 Gagarin ave., Nizhny Novgorod 603022, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 10/1 Minin and Pozharsky sq., Nizhny Novgorod 603000, Russia;

³Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod 603022, Russia;

⁴Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncology Center; 11/1 Delovaya St., Nizhny Novgorod 603093, Russia

Contacts: Nadezhda Riyadovna Hilal nadia.hilal@hotmail.com

Background. One of the testicular cancer genes is the *OY-TES-1* gene, which encodes a proacrosin-binding protein. This gene is known to be expressed in tumor cells.

Aim. To determinate the detection frequency of *OY-TES-1* matrix ribonucleic acid (mRNA) in the peripheral blood and tumor of patients with colorectal cancer (CRC) in comparison with the clinical features of the course of a disease in order to assess the potential monitoring significance of this indicator.

Materials and methods. A method for determining the level of *OY-TES-1* mRNA based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The detection frequency of mRNA *OY-TES-1* gene in blood and tumor samples of 66 patients with CRC, as well as the blood of healthy volunteers, was evaluated.

Results. In the peripheral blood of healthy volunteers, no *OY-TES-1* mRNA was detected. In the blood of CRC patients, *OY-TES-1* mRNA was detected in 13.6 % of cases. In tumors, it was found in 60,6 % of cases. *OY-TES-1* mRNA in the blood and in tumor of patients with CRC was detected statistically significantly more often at stages III and IV than at stages I and II (11,0 and 4,5 times, respectively), and also many times more often in tumors with a low degree of differentiation than with highly differentiated tumors. In patients with CRC, the *OY-TES-1* mRNA in tumors with metastases in organs and lymph nodes was detected many times more often than in tumors without any metastases (by 16,4 and 17,4 times respectively).

Conclusion. The data obtained indicate the absence of mRNA *OY-TES-1* gene in the blood of healthy individuals, the appearance of mRNA *OY-TES-1* gene in the blood of CRC patients, and the possibility of using the detection of mRNA *OY-TES-1* gene in the blood as an additional informative monitoring marker for colorectal cancer.

Keywords: *OY-TES-1*, cancer-testis genes, expression level, colorectal cancer, reverse transcription polymerase chain reaction

For citation: Hilal N.R., Novikov D.V., Yakimov V.N. et al. mRNA of the *OY-TES-1* gene in peripheral blood and tumors in colorectal cancer. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(3): 28–35. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-28-35

Введение

Раково-тестикулярные гены (cancer/testis, CT) представляют собой группу генов, экспрессия которых в норме характерна только для репродуктивных тканей (тестикул), эмбриональных тканей и стволовых клеток. При злокачественной трансформации клеток и тканей повышается экспрессия некоторых CT-генов, локализованных на X-хромосоме [1]. При тяжелых стадиях опухоли увеличивается спектр экспрессируемых CT-генов и уровень их экспрессии. Наблюдается сильная вариация в уровнях экспрессии CT-генов в зависимости от типа опухоли. При колоректальном раке (КРР) повышается экспрессия ряда CT-генов, уровень которой зависит от степени дифференцировки опухоли и наличия метастазов. Экспрессия некоторых CT-генов, таких как *MAGE-C1* и *XAGE-1*, ассоциируется с благоприятным прогнозом КРР, а например *MAGE-A (1-6)* и *SSX1*, 2, 4 и др. — с плохим прогнозом КРР [2, 3].

Одним из новых CT-генов, информативных и перспективных для мониторинга КРР, является ген *OY-TES-1*, известный под названием акрозинсвязывающий белок (ACRBP). В норме матричная рибонуклеиновая кислота (мРНК) *OY-TES-1* экспрессируется в сперматогониях и яичниках, участвуя в сперматогенезе и оплодотворении [4]. В соматических тканях были обнаружены лишь следы мРНК *OY-TES-1*, тогда как в различных опухолях мРНК этого гена обнаруживалась с высокой частотой. Изучена экспрессия *OY-TES-1* в мезенхимальных стволовых клетках [5], в клетках гепатоцеллюлярной

карциномы [6], при раке яичников [7], раке молочной железы [8], показано влияние *OY-TES-1* на процессы клеточного роста, клеточную миграцию, апоптоз, митоз и пролиферацию раковых клеток [5–7]. Иммуногистохимические исследования (ИГХ) и метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) продемонстрировали полное отсутствие экспрессии *OY-TES-1* в тканях здорового кишечника, здоровой печени и циррозной печени [6, 9]. Опубликованы всего 2 работы по изучению экспрессии *OY-TES-1* при КРР. Показана зависимость между экспрессией гена *OY-TES-1* и степенью опухолевой инвазии в образцах КРР [9]. Нокдаун гена *OY-TES-1* способствовал уменьшению канцерогенности опухоли и повышению степени дифференцировки клеток [10]. Однако при КРР осталась неизученной связь между мРНК *OY-TES-1* и клиническими характеристиками течения заболевания. Неясно также, присутствует ли мРНК *OY-TES-1* в периферической крови больных и как это связано со стадией развития опухоли, степенью дифференцировки и локализацией опухоли, наличием метастазов.

Цель настоящей работы — определение частоты обнаружения мРНК *OY-TES-1* в периферической крови и опухолевых очагах больных КРР в сопоставлении с клиническими особенностями течения заболевания для оценки потенциальной мониторинговой значимости данного показателя.

Материалы и методы

Материалом для исследований послужили образцы периферической крови и опухоли 66 больных КРР,

поступивших на лечение в областной онкологический диспансер г. Нижнего Новгорода, и образцы периферической крови 5 здоровых волонтеров. Кли-

нические данные больных КРР и патологические характеристики исследованных образцов приведены в табл. 1.

Таблица 1. Частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах и крови больных КРР

Table 1. Frequency of *OY-TES-1* mRNA detection in tumor and blood samples of CRC patients

Параметр Parameter		Абсолютное и относительное (%) количество образцов Absolute and relative (%) number of samples	Частота обнаружения мРНК гена <i>OY-TES-1</i> (%) Frequency detection of mRNA <i>OY-TES-1</i> gene (%)	
			Опухолевый очаг Tumor	Кровь Blood
Все пациенты/All patients		66 (100,0)	60,6	13,6
Возраст, лет Age, years	<55	16 (24,0)	58,0	25,0
	55–65	23 (35,0)	59,0	7,0
	≥65	27 (41,0)	64,0	16,0
Пол Gender	Мужской Male	29 (44,0)	72,4	17,2
	Женский/ Female	37 (56,0)	51,3	10,8
Локализация опухоли Tumor localization	Ампулярный отдел прямой кишки Ampulla of the rectum	34 (51,5)	59,0	12,0
	Сигмовидная кишка Sigmoid colon	16 (24,2)	58,0	17,0
	Ободочная кишка Large intestine	10 (15,1)	70,0	10,0
	Слепая кишка Cecum	6 (9,2)	60,0	10,0
Стадия заболевания Stage of the disease	I–II	24 (36,1)	8,0	4,3
	III–IV	42 (63,9)	88,0*	18,6
Степень дифференцировки Differentiation degree	Высокая High	5 (7,6)	20,0	0,0
	Умеренная Moderate	42 (63,6)	60,0**	7,1
	Низкая Low	19 (28,8)	73,6**	31,5
Противоопухолевая терапия Anticancer therapy	После лучевой, химио- или комбинированной терапии After radiation, chemo- or combination therapy	15 (22,5)	50,0	17,0
	Без противоопухолевой терапии Without anticancer therapy	51 (77,5)	77,0	13,0

*Статистически значимые различия по сравнению с опухолевыми очагами на ранних (I+II) стадиях ($p < 0,05$). **Статистически значимые различия в частоте обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах по сравнению с высокодифференцированной опухолью ($p < 0,05$).

*Statistically significant differences compared with tumor at early (I+II) stages ($p < 0,05$). **Statistically significant differences in the detection frequency of mRNA of the *OY-TES-1* gene in tumor in comparison with a highly differentiated tumor ($p < 0,05$).

Кроме того, учтены данные о противоопухолевой терапии, которую получили 15 (22,5 %) из 66 пациентов. Забор крови у больных ККР проводили до операции, а образцы опухоли были получены при резекции опухоли. Из образцов периферической крови и опухолевых очагов выделяли суммарную РНК методом фенол-хлороформной экстракции [11]. Для удаления контаминирующей геномной ДНК полученный препарат дополнительно обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно рекомендациям производителя. Затем образцы выделенной РНК хранили при -20°C до начала постановки ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). На основе данных о нуклеотидной последовательности, предоставленных ресурсом <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> в разделе nucleotide под регистрационным номером NM_032489.3, а также с помощью пакета программ Lasergene (США) сконструированы специфические праймеры для определения мРНК гена *OY-TES-1* (табл. 2).

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров

Table 2. Nucleotide sequences of primers used

мРНК mRNA	Название праймера Primer name	Нуклеотидная последовательность праймера (5'–3') Nucleotide sequence of primer (5'–3')
<i>HPRT</i>	F	CTGAAGAGCTATTGTAATGA
	R	TTATATCCAACACTTCGTGG
<i>OY-TES-1</i>	OY-F	TCCTTggTTTCgggAAGTCggTCTg
	OY-R	CggAAGgTgTCCCgCATgAgATgTC

При составлении олигонуклеотидных последовательностей учтены длины интронных участков. Для расчета температуры отжига праймеров принимали за исходную температуру, рассчитанную с помощью программы Oligo Calculator V10 (Россия) и впоследствии оптимизированную опытным путем. Праймеры для гена *OY-TES-1* синтезировали в компании ЗАО «Синтол» (Россия). Сконструированные праймеры использовали в постановке ОТ-ПЦР с целью синтеза и амплификации кДНК гена *OY-TES-1* в образцах крови и опухоли больных ККР. Для стандартизации количества кДНК матрицы, полученной после реакции ОТ, и проверки специфичности ПЦР использовали ген «домашнего хозяйства» *HPRT* (Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase), присутствующий во всех клетках человека (см. табл. 2). Пробы, содержащие мРНК *HPRT*, использовали для детекции мРНК *OY-TES-1* методом однораундовой ПЦР. Реакцию ПЦР проводили в объеме 24 мкл на микропробирку (23 мкл реакционной смеси, 1 мкл



Рис. 1. Электрофореграмма с результатами постановки полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией: 1 – образец крови, содержащий мРНК гена *OY-TES-1*; 2, 3 – образцы крови, в которых мРНК *OY-TES-1* не обнаружена; 4 – маркер длины фрагментов от 400 до 1000 п. н.

Fig. 1. Electropherogram with the results of reverse transcription polymerase chain reaction: 1 – blood sample containing *OY-TES-1* mRNA; 2, 3 – blood samples in which *OY-TES-1* mRNA is not detected; 4 – fragment length marker from 400 to 1000 bp.

кДНК). Полученную реакционную смесь перемешивали и центрифугировали, затем поверх смеси наносили 1–2 капли минерального масла. Далее в амплификаторе «Терцик» (ЗАО «НПФ «ДНК-Технология», Россия) проводили амплификации со следующими условиями: 94°C – 1 мин (предварительная денатурация с использованием Taq Polymerase), 40 циклов (94°C – 30 сек, 60°C – 30 сек, 72°C – 40 сек, 72°C – 5 мин). Детекцию результатов ОТ-ПЦР осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле (1,5 %) в присутствии бромид этидия в концентрации 5 мкг/мл. Электрофореграмма результатов детекции мРНК *OY-TES-1* представлена на рис. 1.

Расчетная длина продукта ПЦР составила 421 п. н. Специфичность реакции подтверждали путем определения первичной структуры полученных фрагментов кДНК на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США) с использованием наборов реагентов DNA Extraction Kit (Fermentas, Латвия) и Big Dye Terminator (Applied Biosystems, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0. Обнаружение мРНК гена *OY-TES-1* оценивали как качественный признак – «есть» или «нет». Для анализа качественных признаков построены и проанализированы таблицы сопряженности. Для сравнения частоты встречаемости гена *OY-TES-1* и проверки наличия статистической взаимосвязи между относительной частотой встречаемости гена *OY-TES-1* и клиническими показателями больных ККР применяли критерий χ^2 и точный критерий Фишера. Анализ ассоциации 2 качественных признаков сводили к проверке гипотезы о независимости признаков. После построения таблиц сопряженности проводили их анализ и вычисляли меры ассоциации (сопряженности). Для статистически значимо связанных признаков проведен попарный анализ и оценена сила связи между 2 зависящими признаками с помощью коэффициента Крамера (от 0 до 1). Все виды статистического анализа выполнены

на уровне значимости 5 %, т. е. нуль-гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах и периферической крови 66 больных КРР до резекции опухоли показал, что мРНК гена *OY-TES-1* чаще обнаруживалась в опухолевых очагах по сравнению с образцами крови (60,6 и 13,6 % соответственно). Тандемное обнаружение мРНК гена *OY-TES-1* в образцах опухоли и крови наблюдали у 10,6 % больных. В крови здоровых волонтеров мРНК *OY-TES-1* не обнаруживали. Статистически значимой связи между полом пациентов и частотой обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* не установлено ($p > 0,05$). Тем не менее наблюдали выраженную тенденцию к повышению частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах и крови у мужчин по сравнению с женщинами. Статистически значимых изменений в частоте обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в образцах опухолевых очагов и крови в зависимости от возраста не выявлено ($p > 0,05$). Однако наблюдали тенденцию к снижению частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в крови при увеличении возраста больных (см. табл. 1).

При исследовании связи между частотой выявления мРНК *OY-TES-1* и локализацией опухоли установлено, что самая высокая частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* зафиксирована в образцах опухоли ободочной кишки (70,0 %), а самая низкая частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* — в образцах опухоли сигмовидного и ампулярного отделов кишки (58,0 и 59,0 % соответственно). Однако статистически значимая связь между частотой обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* и локализацией опухоли отсутствует ($p > 0,05$). В образцах периферической крови больных КРР зафиксирована сходная частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* при локализации опухоли в сигмовидной, слепой, ободочной кишке и ампулярном отделе прямой кишки.

Оценка частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в зависимости от стадии заболевания показала, что в опухолевых очагах мРНК гена *OY-TES-1* статистически значимо обнаруживали в 11 раз чаще на поздних (III+IV) стадиях опухоли по сравнению с ранними (I+II) стадиями ($p < 0,0001$), но частота обнаружения их мРНК в образцах крови имела лишь тенденцию к повышению ($p > 0,05$) (см. табл. 1). Повышение стадии развития опухоли было сопряжено с повышением частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в образцах опухолевых очагов больных КРР. Значение коэффициента Крамера было равно 0,61 для гена *OY-TES-1*, что соответствует средней силе связи.

При сравнении частот обнаружения мРНК *OY-TES-1* в опухолях с разной степенью дифференцировки кле-

ток было показано, что мРНК гена *OY-TES-1* полностью отсутствует в периферической крови больных КРР с высокой степенью дифференцировки (0 %), но с уменьшением степени дифференцировки опухоли частота обнаружения мРНК этого гена в крови имеет тенденцию к повышению от 0 до 7,1 % в умеренно-дифференцированных и от 0 до 31,5 % в низко-дифференцированных опухолевых образцах ($p > 0,05$). В образцах опухоли больных КРР наблюдали статистически значимое повышение частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* — до 73,6 % ($p = 0,023$) — при снижении степени дифференцировки (см. табл. 1). Снижение степени дифференцировки опухоли было сопряжено с повышением частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в образцах крови больных КРР. Значение коэффициента Крамера для гена *OY-TES-1* было равно 0,33, что соответствует слабой силе связи.

У больных КРР без метастазов наблюдали низкую частоту обнаружения мРНК *OY-TES-1* как в опухолевых очагах, так и в образцах крови (около 5 % случаев). Тестирование опухолевых очагов показало более высокую частоту выявления мРНК *OY-TES-1* как при метастазах в органах (в 16,5 раза по сравнению с отсутствием метастазов, $p < 0,0001$), так и при метастазах в лимфатических узлах (в 17,4 раза по сравнению с отсутствием метастазов, $p < 0,0001$). В периферической крови наблюдалась лишь тенденция к повышению частоты обнаружения мРНК *OY-TES-1* у больных с метастазами в органах по сравнению с больными без метастазов ($p > 0,05$). При наличии метастазов в лимфатических узлах мРНК *OY-TES-1* не выявлялась (рис. 2).

Анализ связи между обнаружением мРНК *OY-TES-1* и характером метастазирования показал, что наличие метастазов в лимфатических узлах сопряжено с повышением частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в образцах опухолевых очагов больных КРР. С помощью коэффициента Крамера была определена сила связи между обнаружением мРНК гена *OY-TES-1* и характером метастазирования. Коэффициент Крамера для гена *OY-TES-1* был равен 0,75, что соответствует сильной связи.

Кроме того, в опухолевых очагах больных КРР, получивших противоопухолевую терапию (лучевую, химио- или комбинированную химиолучевую терапию), частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* имела тенденцию к снижению по сравнению с частотой обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* у больных, не получивших противоопухолевую терапию ($p > 0,05$). Обратная ситуация наблюдалась в образцах периферической крови. Так, у больных, получивших противоопухолевую терапию (лучевую, химио- или комбинированную химиолучевую терапию), частота обнаружения гена *OY-TES-1* имела тенденцию к повышению по сравнению с частотой обнаружения

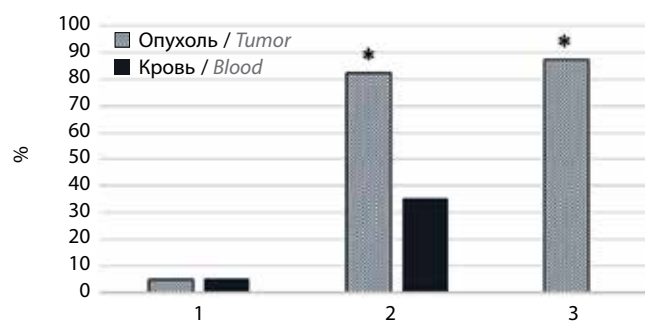


Рис. 2. Частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах и крови при наличии и отсутствии метастазов: 1 – отсутствие метастазов; 2 – метастазы в органы; 3 – метастазы в лимфатические узлы.

*Статистически значимые различия в частоте обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах по сравнению с больными, не имеющими метастазов ($p < 0,05$).

Fig. 2. Detection frequency of *OY-TES-1* mRNA in tumor and blood in the presence and absence of metastases: 1 – absence of metastases; 2 – metastases to organs; 3 – metastases to lymph nodes.

*Statistically significant differences in the detection frequency of mRNA of the *OY-TES-1* gene in tumor as compared with patients without metastases ($p < 0,05$).

мРНК этого гена у больных, не получивших никакой противоопухолевой терапии ($p > 0,05$) (см. табл. 1).

Обсуждение

Ранее было показано, что мРНК *OY-TES-1* обнаруживается при КРР в опухолевых клетках. Полученные нами результаты соответствуют данным L. Vin и соавт., которые обнаружили мРНК *OY-TES-1* в опухолях больных КРР в 73,3 % случаев [9]. Проведенное нами сравнение частоты обнаружения мРНК *OY-TES-1* у больных КРР с разной степенью тяжести болезни показало, что на поздних стадиях развития опухоли и при низкодифференцированных опухолях она может достигать 88 %. Метастазирующие опухоли также характеризуются высокой частотой экспрессии мРНК *OY-TES-1*, которая была на порядок выше, чем у больных КРР без метастазов.

Кроме того, продемонстрировано наличие мРНК *OY-TES-1* не только в опухоли, но и в крови больных КРР. Частота выявления мРНК *OY-TES-1* в периферической крови была значительно ниже, чем в опухолевых очагах. Однако у каждого 3-го больного КРР с метастазами обнаруживалась мРНК *OY-TES-1*. Чаще всего ее находили в крови при одновременном выявлении в опухоли. Но в 2 случаях мРНК *OY-TES-1* обнаружили только в крови, что, вероятно, связано с высокой гетерогенностью опухолей по экспрессии гена *OY-TES-1*, и взятый для анализа участок опухоли мог не содержать клеток, экспрессирующих *OY-TES-1*. Сходные случаи известны для других раковоассоциированных генов [1]. Выход мРНК *OY-TES-1* в кровь

может быть связан с разрушением части опухолевых клеток в процессе опухолевого роста или с секретацией опухолевыми клетками внеклеточных везикул, несущих мРНК. Заметим, что противоопухолевая терапия приводила в наших наблюдениях к тенденции к снижению частоты встречаемости мРНК *OY-TES-1* в опухолевых очагах и тенденции к повышению частоты ее обнаружения в периферической крови больных.

Ранее L. Vin и соавт. [9] провели сравнение частоты обнаружения мРНК *OY-TES-1* с ИГХ-определением белка *OY-TES-1* в опухолевой ткани и показали, что белок выявляется только в 44 % проб, положительных по мРНК *OY-TES-1* (20 из 45 проб). Это свидетельствует о более высокой чувствительности ПЦР по сравнению с ИГХ-определением *OY-TES-1*. Тем не менее по мере повышения тяжести заболевания наблюдалось увеличение частоты экспрессии белка *OY-TES-1*, сходное с увеличением частоты встречаемости мРНК *OY-TES-1*, зарегистрированным в нашей работе.

При исследовании связи между частотой выявления мРНК *OY-TES-1* и локализацией опухоли обнаружена тенденция к повышению исследованного показателя при опухоли ободочной кишки по сравнению с другими отделами кишечника. Известно, что опухоли разной локализации отличаются между собой по мутационному статусу генов и экспрессионному профилю [12–14]. Возможно также, что выявленная тенденция связана с особенностями микрофлоры различных отделов кишечника, что может повышать злокачественность опухоли [15, 16] и проявляться в тенденции к увеличению частоты выявления в опухолевых клетках мРНК гена *OY-TES-1*.

Результаты сопоставления частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в крови и опухоли больных, получавших комбинированную противоопухолевую терапию, и больных, не получавших никакой противоопухолевой терапии, позволяют предположить, что противоопухолевая терапия может привести к транскрипционной активации и индукции экспрессии мРНК гена *OY-TES-1* [17]. Ранее было показано, что получение химиотерапии улучшает выживаемость больных немелкоклеточным раком легкого, в чьих опухолевых образцах была обнаружена мРНК СТ-генов [18]. Следовательно, можно предположить, что наличие мРНК гена *OY-TES-1* в крови больных КРР, прошедших курсы химиотерапии, также является благоприятным признаком.

Статистический анализ полученных результатов продемонстрировал значимую связь между частотой выявления мРНК *OY-TES-1*, стадией развития опухоли, степенью дифференцировки опухоли и характером метастазирования у больных КРР. Это позволяет рассматривать факт обнаружения мРНК гена

OY-TES-1 при КРР как возможный маркер неблагоприятного прогноза течения заболевания.

Закключение

Определение мРНК *OY-TES-1* методом ОТ-ПЦР показало ее присутствие как в опухолях, так и в периферической крови больных КРР. Установлена значимая связь между частотой выявления мРНК *OY-TES-1* и стадией развития опухоли, степенью диф-

ференцировки опухоли и характером метастазирования у больных КРР. Кроме того, повышение или понижение частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в крови может указывать на локализацию метастазов (в органах и лимфатических узлах соответственно). Это позволяет рассматривать факт обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* при КРР как возможный маркер неблагоприятного прогноза течения заболевания.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Liu W-S. Mammalian Sex Chromosome Structure, Gene Content, and Function in Male Fertility. *Annu Rev Anim Biosci* 2019;15(7):103–24. DOI: 10.1146/annurev-animal-020518-115332
- Голышко П.В., Новиков Д.В., Ананьев С.В. и др. Раково-тестикулярные гены в крови и опухоли больных колоректальным раком. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):19–24. DOI: 10.17650/1726-9784-2015-14-1-19-24 Golyshko P.V., Novikov D.V., Ananiev S.V. et al. Cancer-testicular genes in the blood and tumors of patients with colorectal cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2015;14(1):19–24. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2015-14-1-19-24.
- Gu L., Sang M., Yin D. et al. MAGE-A gene expression in peripheral blood serves as a poor prognostic marker for patients with lung cancer. *Thorac Cancer* 2018;9(4):431–8. DOI: 10.1111/1759-7714.12571
- Kanemori Y., Ryu J.H., Sudo M. et al. Two functional forms of ACRBP/sp32 are produced by pre-mRNA alternative splicing in the mouse. *Biol Reprod* 2013;88:105. DOI: 10.1095/biolreprod.112.107425
- Cen Y.H., Guo W.W., Luo B. et al. Knockdown of OY-TES-1 by RNAi causes cell cycle arrest and migration decrease in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2012;36:917–22. DOI: 10.1042/CBI20120037
- Bin L., Xiang Y., Jing L. et al. Cancer-testis Antigen OY-TES-1 Expression and Immunogenicity in Hepatocellular Carcinoma. *Current Medical Science* 2020;40:719–28. DOI: 10.1007/s11596-020-2241-x
- Lin L., Nong W., Luo B. et al. Cancer-testis antigen ACRBP expression and serum immunoreactivity in ovarian cancer: its association with prognosis. *Immunity, Inflammation and Disease* 2021;9(4):1759–70. DOI: 10.1002/iid3.534
- Kazemi-oula G., Ghafouri-Fard S., Mobasheri M.B. et al. Upregulation of RHOXF2 and ODF4 Expression in Breast Cancer Tissues. *Cell Journal* 2015;17:471–7. DOI:10.22074/CELLJ.2015.8
- Bin L., Xiang Y., Rong F. et al. Cancer testis antigen OY-TES-1 expression and serum immunogenicity in colorectal cancer: its relationship to clinicopathological parameters. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6(12):2835–45.
- Хилал Н.Р., Новиков Д.В., Новиков В.В., Караулов А.В. Раково-тестикулярные гены при раке толстой кишки. *Терапевтический архив* 2017;113–7. DOI: 10.17116/terarkh2017895113-117
- Hilal N.R., Novikov D.V., Novikov V.V., Karaulov A.V. Cancer-testicular genes in colon cancer. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive* 2017;113–7. (In Russ.). DOI: 10.17116/terarkh2017895113-117
- Калугин А.В., Новиков Д.В., Мамаева М.Е. и др. Присутствие мРНК раково-тестикулярных генов в опухоли и периферической крови больных раком эндометрия. *Российский биотерапевтический журнал* 2022;21(2):33–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-33-39 Kalugin A.V., Novikov D.V., Mamaeva M.E. et al. Cancer-testis genes mRNA presence in tumor lesion and peripheral blood of endometrial cancer patients. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2022;21(2):33–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-33-39
- Maus M.K., Hanna D.L., Stephens C.L. et al. Distinct gene expression profiles of proximal and distal colorectal cancer: implications for cytotoxic and targeted therapy. *Pharmacogenomics J* 2015;15(4):354–62. DOI: 10.1038/tpj.2014.73
- Birkenkamp-Demtroder K., Olesen S.H., Sorensen F.B. et al. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 2005;54(3):374–84. DOI: 10.1136/gut.2003.036848
- Missiaglia E., Jacobs B., D'Ario G. et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann Oncol* 2014;25(10):1995–2001. DOI: 10.1093/annonc/mdl275
- Xu S.Z., Ding Z.J., Zhang S.F. et al. Propensity score matching-based analysis of short-term outcomes of Laparoscopic-assisted Natural Orifice Specimen Extraction for left colorectal cancer radical resection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2016;96(20):1578–81. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2016.20.007
- Dejea C.M., Wick E.C., Hechenbleikner E.M. et al. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(51):18321–6. DOI: 10.1073/pnas.1406199111
- Almutairi M.H., Alrubie T.M., Almutairi B.O. et al. The Expression Patterns of Human Cancer-Testis Genes Are Induced through Epigenetic Drugs in Colon Cancer Cells. *Pharmaceutical* 2022;15(11):1319. DOI: 10.3390/ph15111319
- Thomas J., Starmans M.H.W., Yao-Tsang C. et al. The Role of Cancer-Testis Antigens as Predictive and Prognostic Markers in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* 2013;8(7):e67876. DOI: 10.1371/journal.pone.0067876

Вклад авторов

Н.Р. Хилал: написание текста рукописи, получение данных для анализа, статистический анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;

Д.В. Новиков: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;

В.Н. Якимов: статистический анализ полученных данных;

Р.Г. Пегов: сбор биологического материала;

В.В. Новиков: разработка дизайна исследования, редактирование текста рукописи.

Author's contributions

N.R. Hilal: writing the text of the manuscript, obtaining data for analysis, statistical analysis of the obtained data, review of publications on the topic of the article;

D.V. Novikov: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained;

V.N. Yakimov: statistical analysis of the data obtained;

R.G. Pegov: collection of biological material;

V.V. Novikov: research design development, manuscript editing.

ORCID авторов /ORCID of authors

Н.Р. Хилал / N.R. Hilal: <https://orcid.org/0000-0001-8367-6118>

Д.В. Новиков / D.V. Novikov: <https://orcid.org/0000-0001-7049-6935>

В.Н. Якимов / V.N. Yakimov: <https://orcid.org/0000-0001-7150-7851>

Р.Г. Пегов / R.G. Pegov: <https://orcid.org/0000-0003-1614-9347>

В.В. Новиков / V.V. Novikov: <https://orcid.org/0000-0002-2449-7213>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients signed informed consent to participate in the study.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 15.02.2023. Принята в печать: 12.07.2023

Article received: 15.02.2023. Accepted for publication: 12.07.2023