

DOI: 10.7868/S0041377118100028

АНАЛИЗ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА

© M. A. Быстрыкова,¹ С. А. Кошкин,¹ А. В. Гаврилюков,² Е. Н. Толкунова^{1,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

² С.-Петербургский клинический научно-практический центр
специализированных видов медицинской помощи (онкологический),
Санкт-Петербург, 197758;

* электронный адрес: entolk62@mail.ru

Работа посвящена анализу экспрессии потенциальных дополнительных прогностических маркеров adenокарциномы толстой кишки человека в опухоли и прилежащей нормальной ткани, поиску взаимосвязи между уровнями их экспрессии. В образцах методом количественной ОТ-ПЦР проанализирована экспрессия потенциальных прогностических молекулярных маркеров (*IGFBP3*, *AhR*, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *HIF-1α*, *OCT4A*, *OCT4B* и *OCT4B1*). Обнаружена корреляция между экспрессией *IGFBP3* и *AhR*. Проведен нокаут гена *IGFBP3* в клетках первичной клеточной культуры adenокарциномы толстой кишки человека БСК 8 и проанализирована активность сигнального пути *AhR*. Повышение экспрессии *AhR* может являться дополнительным диагностическим критерием при постановке диагноза рака толстой кишки. Корреляции между уровнем экспрессии *HIF-1α*, *IGFPB3*, изоформами OCT4 и клинико-морфологической стадией болезни (TNM) не обнаружено. У нокаутных по гену *IGFBP3* клонов наблюдается увеличение времени удвоения и повышение устойчивости к цитостатику (5-фторурацилу) при модуляции активности диоксинового рецептора его агонистом (индол-3-карбинолом).

Ключевые слова: рак толстой кишки (колоректальный рак), прогностический маркер, рецептор ароматических углеводородов (*AhR*), связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 3 (*IGFBP3*), формы транскрипционного фактора OCT4 (OCT4A, OCT4B и OCT4B1), гипоксический фактор HIF-1α

Принятые сокращения: КРР — колоректальный рак, ОСК — опухолевые стволовые клетки, ОТ-ПЦР — обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией.

По данным Всемирной организации здравоохранения, рак толстой кишки — самая распространенная злокачественная опухоль органов желудочно-кишечного тракта. Среди основных проблем онкологии важное место занимает правильная оценка стадии заболевания, не всегда можно точно определить наличие отдаленных метастазов, что коренным образом влияет на тактику лечения и прогноз. Другой важной проблемой является индивидуальная резистентность опухоли к проводимому лечению. Выявление дополнительных прогностических маркеров колоректального рака (КРР) поможет в дальнейшем оценивать полную картину заболевания и в полной мере персонализировать проводимое лечение.

Известно, что ниша, обеспечивающая жизнедеятельность опухолевых стволовых клеток (ОСК) солидных опухолей, характеризуется состоянием гипоксии (Mathieu et al., 2011). Общепризнано, что устойчивость опухоли к терапии обеспечивается деятельностью ОСК, существующих в условиях гипоксии (Hoskin et al., 2003; Vaupel et al., 2007). Происходит накопление данных, подтверждающих роль транскрипционного фактора OCT4 в обеспечении свойств ОСК. Запуск механизмов детоксикации

клетки от химиотерапевтических агентов в опухолевых тканях, по всей вероятности, связан с увеличением активности рецептора поликиклических углеводородов *AhR* (Rushmore et al., 2002; Wang et al., 2005; Tompkins et al., 2010; Kurtova et al., 2015). Частым сопутствующим диагнозом для людей с КРР является сахарный диабет, поэтому возможно предположить также влияние белков семейства инсулиноподобных факторов роста на течение заболевания. Поставив задачу выяснить наличие взаимосвязи потенциальных дополнительных прогностических маркеров adenокарциномы толстой кишки человека (*IGFBP3*, *AhR*, *HIF-1α*, изоформы OCT4), мы провели нокаут гена *IGFBP3* в клетках adenокарциномы толстой кишки и сравнили экспрессию перечисленных маркеров в нокаутных клетках и в исходной клеточной линии.

Высокий уровень экспрессии гена *IGFBP3*, по данным литературы, связан с быстрым ростом (Sheen-Chen et al., 2009), неблагоприятным прогнозом (Yu et al., 1996) и меньшей выживаемостью больных раком молочной железы (Pankaj et al., 2015) и глиобластомой (Santosh et al., 2010). Два недавних крупных исследования позволяют считать повышенный уровень экспрессии гена *IGFBP3*

эффективным прогностическим фактором у пациентов, страдающих КРР. Высокий уровень экспрессии гена *IGFBP3*, выявленный при анализе мРНК из опухолевой и прилежащей нормальной тканей 202 пациентов с КРР, был связан с низкой 5-летней выживаемостью по сравнению с пациентами с низким уровнем экспрессии *IGFBP3* (Yamamoto et al., 2017). При анализе данных, полученных при исследовании 4042 мужчин старше 70 лет, оказалось, что высокий уровень *IGFBP3* в сыворотке крови статистически достоверно связан с риском КРР (Chan et al., 2018).

Что касается применимости HIF-1 α в качестве прогностического маркера, то исследование экспрессии в опухолевой ткани 43 пациентов фактора, индуцируемого гипоксией, показало, что *Glut-1* (ген-мишень HIF-1 α) может являться прогностическим маркером при карциноме почек (Ambrosetti et al., 2018). У пациентов с низкодифференцированными опухолями толстой кишки обнаружен повышенный уровень ядерного HIF-1 α в самой опухоли, в метастазах лимфатических узлов и в метастазах печени (Malfettone et al., 2012). Данные, полученные при исследовании 143 пациентов с КРР, показали, что HIF-1 α обеспечивает повышение экспрессии ESM-1, а высокий уровень ESM-1 достоверно коррелирует с размером опухоли, глубиной инвазии, отдаленным метастазированием (Kim et al., 2012).

Говоря о роли транскрипционного фактора OCT4 в обеспечении свойств ОСК, нужно подчеркнуть, что ген *POU5F1* (*OCT4*) кодирует три сплайсинг-варианта — OCT4A, OCT4B и OCT4B1; кроме этого, существует ряд псевдогенов *OCT4*, которые также кодируют белковые продукты (Jez et al., 2014). При анализе *OCT4* необходимо обращать внимание на экспрессию различных транскрипционных форм этого гена, чтобы предотвратить ошибочную интерпретацию результатов (Pouransani et al., 2016). Повышенный уровень *OCT4A* в медуллобластоме усиливает пролиферацию, способность генерации опухолевых клеток, значительно увеличивает агрессивность и инвазивную способность клеток (da Silva et al., 2017). *OCT4B1* экспрессируется на высоком уровне в клетках рака желудка и мочевого пузыря и может действовать как антиапоптотический фактор (Asadi et al., 2011; Asadzadeh et al., 2012; Mirzaei et al., 2014, 2017). Уровень экспрессии *OCT4B1* значительно выше в более злокачественных опухолях мозга, а *OCT4B*, наоборот, выше в опухолях с меньшей степенью малигнизации (Atlasi et al., 2008; Asadi et al., 2016). В здоровой ткани молочной железы *OCT4* или экспрессируется на очень низком уровне, или отсутствует. *OCT4B* экспрессируется на высоком уровне при лобулярном типе рака молочной железы, формы *OCT4A* и *OCT4B1* активно экспрессируются в протоковых (дуктальных) опухолях I и II стадий (Soheili et al., 2017).

В результате так называемого диоксинового кризиса, разразившегося в конце 2010 г., внимание исследователей было привлечено к проблеме глобального загрязнения окружающей среды ксенобиотиками. Наибольшую угрозу представляет высокая канцерогенность диоксинов. На модели грызунов показано, что даже в низких дозах TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzopro-dioxin, диоксин, агонист AhR) действует как канцероген, вызывает рак легких, носовых раковин, твердого нёба, щитовидной железы, языка и кожи, является высокоэффективным промотором опухоли печени (Bock, Köhle, 2005; Knerr et al., 2006). Устойчивая активация AhR вызывает гепатомегалию, приводит к повышению частоты возникновения

опухолей крови и сарком (Viel et al., 2000). Обнаружена вовлеченность AhR в процессы метастазирования. Исследования *in vitro* выявили повышение уровня транскрипции гена *AhR* в клетках рака молочной железы (Diry et al., 2006) и рака желудка (Peng et al., 2009). Показано увеличение экспрессии AhR по мере прогрессирования гепатоклеточной карциномы (Liu et al., 2013). Высокая активность AhR была обнаружена в клеточных линиях рака предстательной железы человека (Ide et al., 2017), а также в самих опухолях предстательной железы человека, особенно с агрессивным фенотипом (Murray et al., 2014). Была обнаружена положительная корреляция между TDO2 (tryptophan 2,3-dioxygenase, агонистом AhR) и геном-мишенью AhR *CYP1B1* в тканях глиобластомы человека, что связывают с плохой выживаемостью у пациентов (Opitz et al., 2011).

AhR представляет собой активированный лигандом транскрипционный фактор, который димеризуется с ядерным транслокатором циклических углеводородов (ARNT). Этот комплекс связывается с элементом ответа на ксенобиотики (XRE), а затем запускает экспрессию генов-мишней, включая члены семейства цитохрома P450 (*CYP1*): *CYP1A1*, *CYP1A2* и *CYP1B1*, т. е. полициклические ароматические углеводороды и другие канцерогены, попадающие в организм, вызывают экспрессию белков семейства цитохрома P450 (CYP); ферменты CYP1A1 и CYP1A2, по-видимому, в основном участвуют в детоксикации и защите от рака, тогда как CYP1B1 генерирует токсичные метаболиты, которые способны повлиять на инициацию и прогрессирование рака (D'Uva et al., 2018).

Таким образом, целью данной работы стал анализ экспрессии и взаимосвязи потенциальных дополнительных прогностических маркеров adenокарциномы толстой кишки человека на примере *IGFBP3*, AhR (включая *CYP1A1* и *CYP1B1*), HIF-1 α и изоформ транскрипционного фактора OCT4 (OCT4A, OCT4B и OCT4B1). Согласно литературным данным, выбранные белки могут служить дополнительными прогностическими маркерами adenокарциномы толстой кишки человека. Под термином «прогностический маркер» понимают биомаркер, используемый для определения вероятности клинического события, рецидива или прогрессирования заболевания у пациента. Основными прогностическими маркерами являются размер опухоли, степень дифференцировки и наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах и отдаленных органах (печень, легкие, головной мозг и т. д.). Для осуществления персонифицированного подхода к лечению данных показателей недостаточно, поэтому ведется активный поиск дополнительных прогностических маркеров, которые могли бы полнее охарактеризовать данный клинический случай.

Материал и методика

Использованный материал представлял собой образцы adenокарциномы толстой кишки и прилежащей нормальной ткани 11 пациентов. Образцы были получены во время хирургических операций, осуществляемых в плановом порядке в ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)» (СПб. КНПЦСВМП(о), С.-Петербург). Работы, проводимые в рамках этого исследования, были одобрены этическим комитетом СПб. КНПЦСВМП(о). Все образцы были обез-

Клинико-морфологическое описание и локализация опухолей

| Пациент | TNM ^a | Локализация опухоли |
|---------|--|---------------------|
| ДВМ | T _{is} N ₀ M ₀ G ₁ | Ободочная кишка |
| ГНМ | T ₄ N ₀ M ₀ G ₂ | То же |
| ПТИ | T ₄ N ₀ M ₀ G ₂ | » |
| САА | T ₃ N ₀ M ₀ G ₁ | » |
| СГА | T ₃ N ₀ M ₀ G ₂ | » |
| ПВВ | T ₃ N ₀ M ₀ G ₂ | Слепая кишка |
| | T ₃ N ₁ M ₀ G ₂ | Ободочная кишка |
| ПСМ | T ₃ N ₁ M ₀ G ₂ | Слепая кишка |
| РВВ | T ₃ N ₁ M ₀ G ₃ | Ободочная кишка |
| КЛА | T ₃ N ₁ M ₀ G ₃ | То же |
| ХФС | T ₃ N ₁ M ₁ G ₂ | » |
| АЕВ | T ₃ N ₁ M ₁ G ₂ | » |

Примечание. ^aОсновные показатели классификации TNM: Т (tumor, опухоль) — описание размеров и степени инвазии первичной опухоли; N (nodus, лимфатическийузел) — описание количества пораженных регионарных лимфатических узлов для данной анатомической области; M (metastasis, метастаз) — наличие отдаленных метастазов.

личены и закодированы 3 буквами, ранжированы по степени тяжести и распространенности онкологического процесса согласно клинико-морфологической классификации TNM (данные представлены в таблице).

Также в исследовании использовали первичную клеточную линию adenокарциномы толстой кишки человека БСК 8 (Кошкин и др., 2016). Клетки культивировали при 37 °C в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (Gibco, США), в присутствии пенициллина и стрептомицина (Биолот, Россия). При достижении монослоя клетки рассевали в соотношении 1 : 3.

Выделение РНК и количественная ОТ-ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК из клеток и образцов ткани пациентов (с предварительной гомогенизацией) выделяли, используя набор реактивов RNeasyMiniKit (Qiagen, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (ThermoScientific, США). Раствор РНК хранили при -80 °C. Синтез кДНК проводили, используя набор реактивов ОТ M-MuLV-RN (Биолабмакс, Россия). На каждую реакцию обратной транскрипции в объеме 20 мкл брали по 0.5 мкг РНК. Синтезированную кДНК хранили при -20 °C. ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием набора реактивов BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмакс, Россия) по протоколу фирмы-производителя. На каждую реакцию количественной ПЦР в объеме 20 мкл брали по 1 мкл кДНК и 0.1 мкл 100 мкМ праймера. Амплификацию проводили на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Нормализацию экспрессии проводили по генам *GPDH* и *B2M*.

Получение клеточных клонов с нокаутом гена *IGFBP3* при помощи системы редактирования CRISPR/CAS9. Нокаут гена *IGFBP3* производили с использованием *IGFBP3* CRISPR/Cas9 Knockout (KO) Plasmid (h2) (Santa Cruz biotechnology, США), среды Opti-MEM без фенолового красного (Gibco, США) и реагента FuGENE (Promega, США) с учетом всех инст-

рукций фирм-производителей. Через 48 ч после трансфекции проводили отбор клеток, экспрессирующих EGFP, на приборе S3eCellSorter (Bio-Rad, США). Прибор позволил отобрать две различающиеся по силе экспрессии EGFP популяции клеток, которые культивировались раздельно.

Определение времени удвоения клеток. В течение 3 сут проводили подсчет количества клеток исходной линии и нокаутных клонов в камере Горяева. Расчет времени удвоения проводили по следующим формулам: $\mu = \frac{2.303 \cdot (\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1)}{t_2 - t_1}$ и $g = \frac{0.693}{\mu}$, где μ —

удельная скорость роста (ч^{-1}); N_2 — число клеток в единице объема в момент времени t_2 (клеток); N_1 — число клеток в единице объема в момент времени t_1 (клеток); t_1 и t_2 — моменты времени (ч); $t_1 < t_2$; g — время удвоения клеток (ч).

Определение устойчивости нокаутных клонов к цитостатикам. В среду культивирования вносили цитостатик (5-фторурацил), агонист диоксинового рецептора (индол-3-карбинол, CaymanChemical, США) в концентрации 100 мкМ или антагонист диоксинового рецептора (CH-223191, CaymanChemical, США) в концентрации 0.5 мкМ. Жизнеспособность клеток измеряли при помощи колориметрического теста МТТ через 24 ч. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Multiskan EX (ThermoElectron, США) при длине волнны 570 нм.

Уровень мРНК и оценку жизнеспособности клеток методом МТТ оценивали в пяти повторностях. Для выявления значимых различий между образцами экспериментальных и контрольных групп проводили дисперсионный анализ (ANOVA) в программе Statistica 6.0. Значения $P < 0.05$ были приняты как достоверные.

Результаты и обсуждение

При анализе опухолевого материала 11 пациентов у 7 наблюдали повышенную по сравнению с нормальным эпителием экспрессию *IGFBP3* на уровне мРНК в опухолевых тканях, у 1 пациента не выявили различия в экспрессии *IGFBP3* между нормой и опухолью (рис. 1). Для пациента ПВВ были исследованы 2 опухолевых образца разной локализации (слепая и ободочная кишка); данные образцы различаются по характеру экспрессии *IGFBP3*: в ободочной кишке наблюдается повышение уровня экспрессии *IGFBP3* относительно нормы, а в слепой — понижение. Это согласуется с данными Ямamoto с коллегами (Yamamoto et al., 2017), которые исследовали связь экспрессии на уровне мРНК *IGF* и *IGF*-связывающих белков типа 3 (*IGFBP3*) с клинико-патологическими характеристиками 202 пациентов с нелеченым КРР. В их исследованиях уровни экспрессии генов *IGF-2* и *IGFBP3* существенно не различались между опухолевой тканью и соседней нормальной слизистой оболочкой. Что касается ассоциации экспрессии генов и клинико-патологических характеристик, авторы сообщили, что экспрессия гена *IGFBP3* достоверно ассоциировалась с метастазами в лимфатические узлы. Эти данные позволяют считать повышенную экспрессию гена *IGFBP3* эффективным независимым прогностическим фактором у пациентов с КРР. Послеоперационная выживаемость была значительно хуже у пациентов с высокими уровнями экспрессии

IGFBP3 по сравнению с пациентами с низким уровнем экспрессии. Недостаточное число анализируемых нами образцов не позволяет пронаблюдать эту взаимосвязь.

Экспрессия AhR необходима для работы соответствующего сигнального пути, однако по уровню экспрессии нельзя судить об его активности. Поэтому активность сигнального пути AhR принято оценивать по уровням экспрессии его мишенией CYP1A1 и CYP1B1.

В образцах 9 пациентов уровень экспрессии AhR повышен в опухоли, для остальных образцов уровень экспрессии практически не различается в нормальной и опухолевой тканях (рис. 2). У пациента ПВВ уровень экспрессии AhR в опухоли ободочной кишки повышен, а в опухоли слепой кишки практически не отличается от нормы. Повышенный уровень экспрессии AhR не всегда ведет к повышению уровня экспрессии CYP1A1 и CYP1B1, но для 8 из 9 пациентов с повышенным уровнем экспрессии AhR характерно и ответное повышение уровня экспрессии CYP1A1 (рис. 3). В изменениях уровня CYP1B1 пока не было обнаружено закономерностей (рис. 4). Механизм регуляции CYP1B1 недавно был описан для КРР, было показано, что провоспалительный цитокин IL6 подавлял экспрессию микроРНК miR27b, «нанаправленной» на CYP1B1, посредством механизма метилирования ДНК (Patel et al., 2014). Также при анализе клинических образцов, характеризующихся повышенной экспрессией IL6, авторы обнаружили, что экспрессия CYP1B1, но не CYP1A1 была значительно увеличена в злокачественной ткани по сравнению с прилегающей нормальной тканью. Связаны ли наблюдаемые в тканях пациентов уровни CYP1B1 с повышенной экспрессией IL6, предстоит выяснить. По литературным данным известно, что фермент CYP1B1 сверхэкспрессируется в широком спектре опухолей и связан с ангиогенезом. Другие

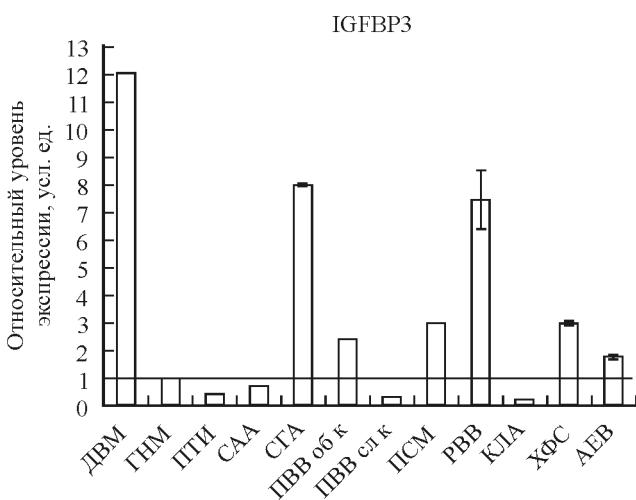


Рис. 1. Относительный уровень мРНК IGFBP3 в тканях пациентов.

Слева направо пациенты представлены по степени увеличения тяжести заболевания согласно клинико-морфологической классификации TNM. Все образцы были обезличены и закодированы 3 буквами. На этом и последующих графиках представлен уровень мРНК белка интереса в опухолевой ткани относительно нормальной ткани. Для каждого отдельного пациента уровень мРНК в нормальной ткани был взят за 1 (горизонтальная линия). Таким образом, столбцы, располагающиеся выше линии, указывают на повышение уровня экспрессии, ниже — на понижение уровня экспрессии.

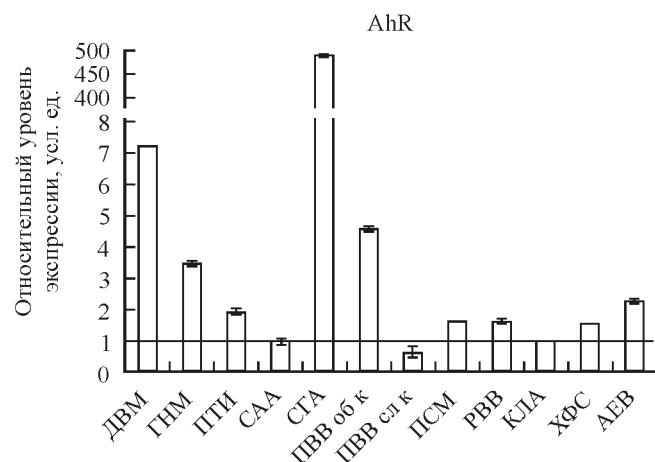


Рис. 2. Относительный уровень мРНК AhR в тканях пациентов.

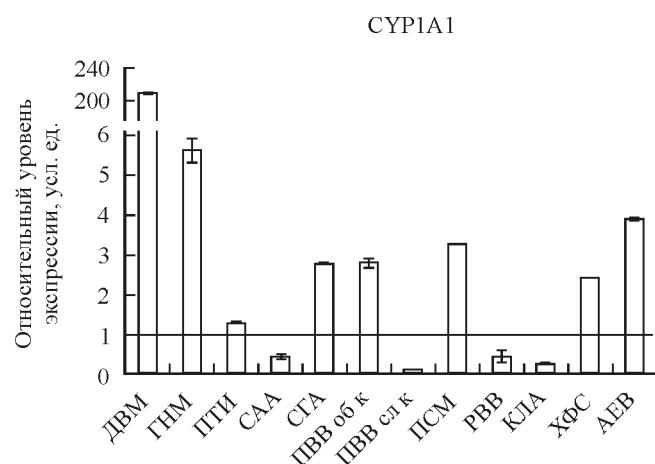


Рис. 3. Относительный уровень мРНК CYP1A1 в тканях пациентов.

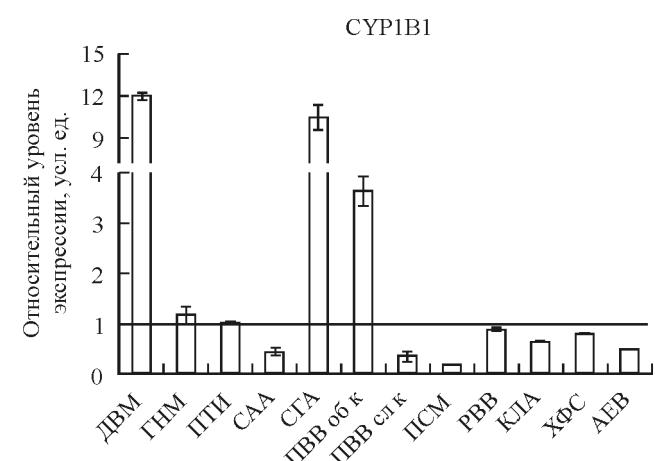


Рис. 4. Относительный уровень мРНК CYP1B1 в тканях пациентов.

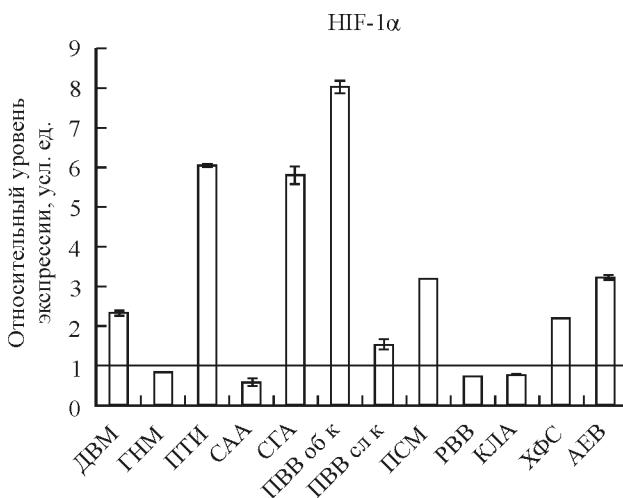


Рис. 5. Относительный уровень мРНК HIF-1 α в тканях пациентов.

известные протуморогенные активности CYP1B1 основаны на метаболической биоактивации ксенобиотиков и стероидных гормонов и их модификации в канцерогенные производные. Исследования *in vivo* продемонстрировали защитную антираковую роль других членов семейства CYP1 (CYP1A1 и CYP1A2), что указывает на то, что специфичность ингибиторов семейства CYP1 должна быть тщательно учтена при разработке потенциальных стратегий химиопрофилактики (Patel et al., 2014).

Что касается экспрессии гипоксического фактора HIF-1 α , то у 7 пациентов была отмечена его повышенная экспрессия. У пациента ПВВ уровень HIF-1 α оказался повышен для обеих локализаций опухоли (рис. 5). Повышенный уровень HIF-1 α , регистрируемый с помощью иммуногистохимических методов, является отрицательным прогностическим маркером выживаемости пациентов, больных КРР (Baba et al., 2009). В то же время увеличение количества мРНК гена HIF-1 α не является маркером плохого прогноза (Furlan et al., 2011). Исследования генов, отвечающих на воздействие гипоксии (Li et al., 2009), проведенные на клетках глиомы, показали повышение экспрессии HIF-2 α как при нормоксии, так и при гипоксических условиях в стволовых клетках глиомы по сравнению с нестволовыми клетками в культуре. Повышение уровня HIF-1 α было отмечено для стволового клеточного компонента лимфомы и острого миелоцитарного лейкоза (Wang et al., 2011). Поскольку условия гипоксии необходимы для функционирования ОСК, участники данного сигнального пути могут стать специфической мишенью для разработки терапии, нацеленной на подавление роста стволового компонента опухоли. Наблюданное нами повышение уровня экспрессии гипоксического фактора HIF-1 α в ткани опухоли вполне согласуется с имеющимися данными, касающимися ключевой роли факторов гипоксии для солидных опухолей. Тем не менее необходимо проведение дополнительных исследований влияния гипоксии *in vitro* на опухолевые клетки.

Анализ образцов, полученных от разных пациентов, показал крайнюю гетерогенность экспрессии мРНК различных форм транскрипционного фактора OCT4 (рис. 6, а—в). Уровень экспрессии OCT4A был повышен по сравнению с нормой у 7 пациентов (рис. 6, а). Для 6 из этих 7 образцов был также повышен уровень OCT4B1

(рис. 6, в). Зависимости между паттернами экспрессии различных форм и стадией заболевания не выявляется, возможно из-за малого количества проанализированных образцов. Данные, однако, очень интересны, так как согласуются с нашей гипотезой о том, что OCT4A, OCT4B и OCT4B1, скорее всего, экспрессируются лишь в небольшом пуле клеток, так называемом стволовом компоненте опухоли. Уровни экспрессии сильно варьируют как у пациентов с одной клинической стадией, так и в поряд-

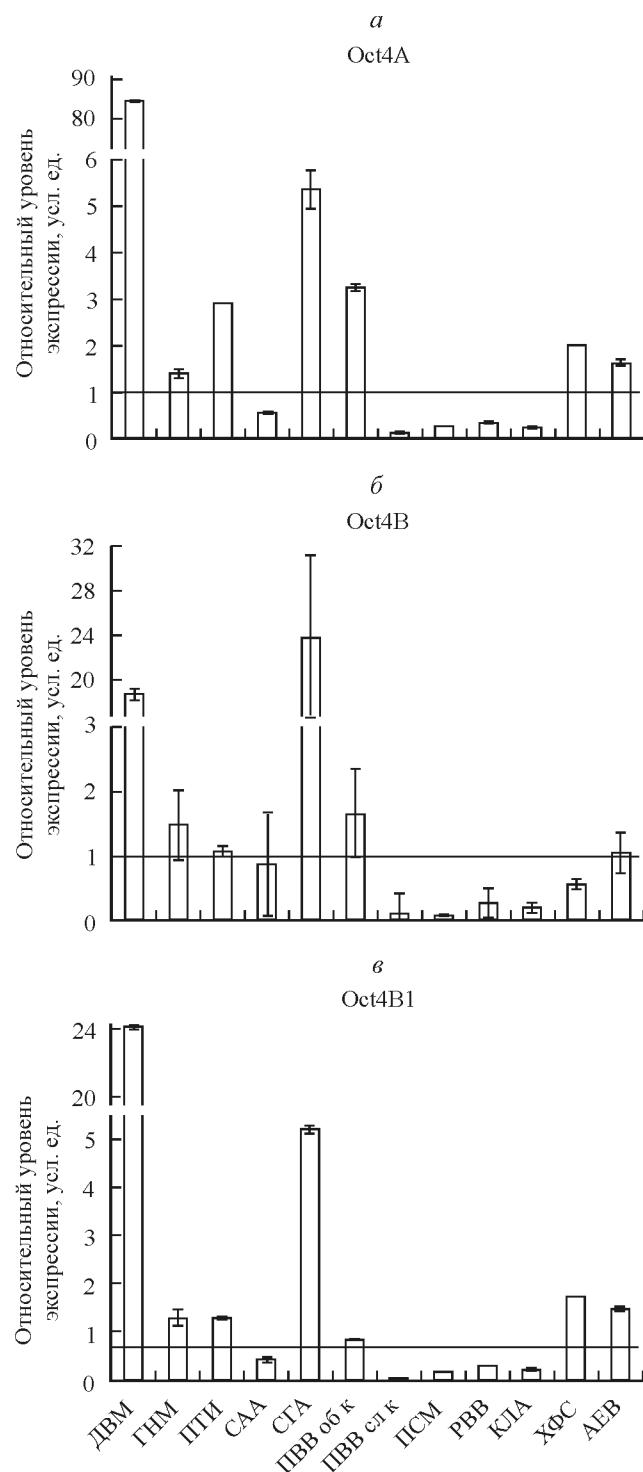


Рис. 6. Относительный уровень мРНК OCT4A (а), OCT4B (б) и OCT4B1 (в) в тканях пациентов.

ке увеличения степени злокачественности опухолей. В образце ДВМ содержание продукта ПЦР *OCT4A* более чем в 80 раз больше в опухоли, чем в нормальной слизистой, а в образце ХФС — в 2 раза, тогда как для формы *OCT4B1* показано превышение в 24 и 2 раза соответственно для этих же образцов. Данные согласуются с результатами, полученными для рака легкого, где также было отмечено повышение уровня экспрессии *OCT4A* и *OCT4B1* в опухолевой ткани (Li et al., 2016). Авторы показали повышенный уровень экспрессии *OCT4* в опухолевой ткани. Также было показано понижение пролиферации и увеличение апоптоза, вызываемого гефитинибом, при нокдауне *OCT4*. Это позволило им предположить возможное участие *OCT4* в обеспечении лекарственной резистентности клеток опухоли к ингибиторам тирозиновых киназ. Исследования экспрессии *OCT4* в опухолевых образцах тканей пациентов, больных раком молочной железы (Gwak et al., 2017), показали, что экспрессия *OCT4* связана с агрессивным фенотипом, экспрессией *ALDH1*, устойчивостью к тамоксифену и является хорошим предиктивным и прогностическим маркером в подгруппе опухолей молочной железы, положительных на рецептор гормонов.

Говоря о повышенном уровне экспрессии формы *OCT4B1*, хочется сослаться на недавнюю работу Мирзая с коллегами (Mirzaei et al., 2017), которые отмечают, что *OCT4B1* экспрессируется как в опухолевых, так и в нормальных тканях и обладает антиапоптотическими свойствами, позволяя раковым клеткам избежать апоптоза. На основе исследования трех клеточных линий разного опухолевого происхождения авторы заключают, что супрессия *OCT4B1* приводит к апоптозу в опухолевых клеточных линиях, вызывая даун-регуляцию 25 исследованных антиапоптотических генов, что делает *OCT4B1* потенциальной мишенью при разработке новых терапевтических средств борьбы с раком.

Возможно, для того чтобы оценить уровень экспрессии анализируемых факторов в нормальной ткани, для каждого пациента ее необходимо было бы сравнивать со средним референсным «образцом нормального эпителия кишки». Но такой задачи мы не ставили, хотя и предполагаем, что используемая нами «нормальная» ткань пациента может считаться таковой только условно, так как наход-

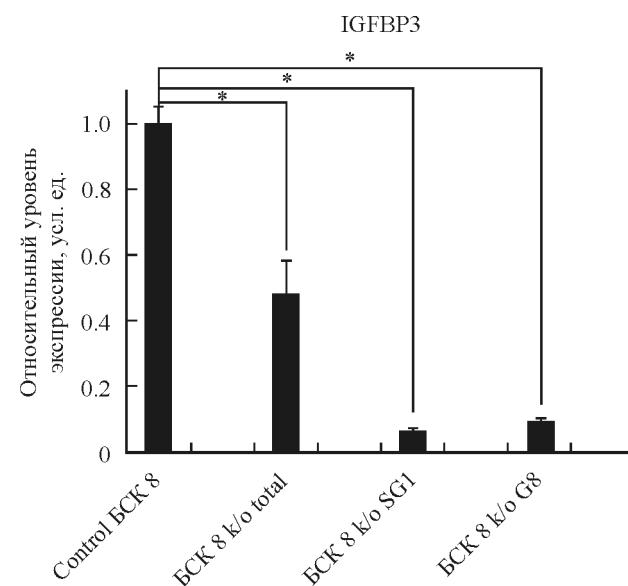


Рис. 7. Относительный уровень мРНК *IGFBP3* в клетках линии BSK 8.

Здесь и далее: control BSK 8 — исходная культура, BSK 8 k/o total — общая популяция нокаутных клонов, BSK 8 k/o SG1, BSK 8 k/o G8 — нокаутные клонсы. $n = 3$, звездочка — $P < 0.05$.

дится под влиянием близлежащей опухолевой ткани. На разнознность данных могла повлиять не только разница в экспрессии, но и количество (доля) стволового компонента как в целом в опухоли, так и в части образца, взятого для исследования.

Переходя к описанию результатов, полученных при сравнении клеток исходной линии с клетками клонов, в которых методом геномного редактирования был получен нокаут гена *IGFBP3*, нужно отметить, что существенное понижение экспрессии *IGFBP3* наблюдали для клонов BSK 8 k/o SG1 и BSK 8 k/o G8, в то время как при анализе смешанной популяции клеток с нокаутированным геном снижение уровня экспрессии составило порядка 50 % (рис. 7). Различный уровень экспрессии *IGFBP3*, вероятно, отражает гетерогенность опухолевых клеток в культуре и их разную реакцию на введение путем транс-

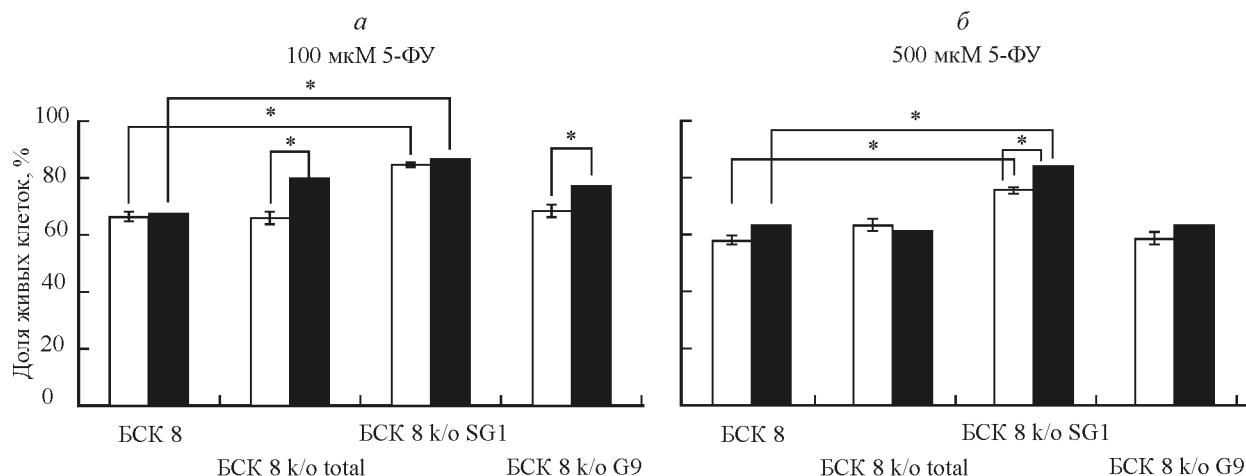


Рис. 8. Влияние индол-3-карбинола на устойчивость к 5-фторурацилу клеток линии BSK 8.

Белые столбики — клетки, обработанные 5-фторурацилом; черные столбики — клетки, обработанные 5-фторурацилом и индол-3-карбинолом. $n = 3$, звездочка — $P < 0.05$.

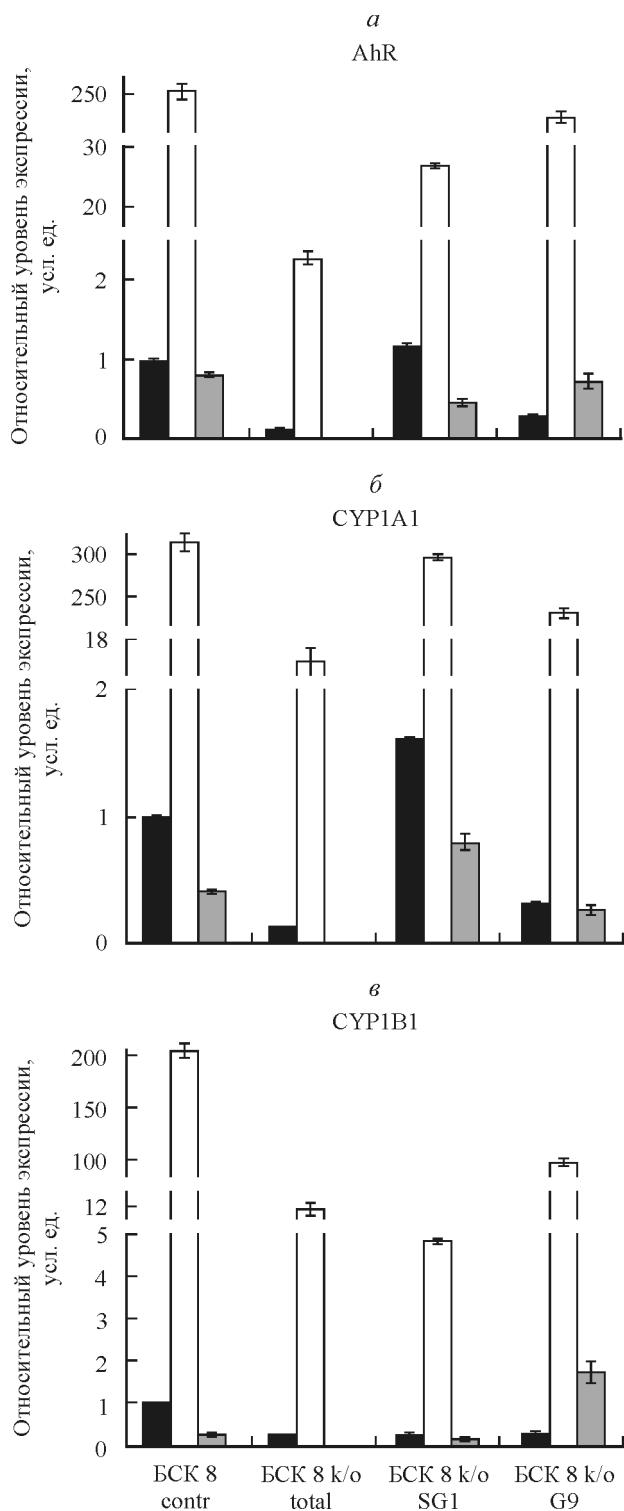


Рис. 9. Относительный уровень мРНК AhR, CYP1A1 и CYP1B1 в клетках линии БСК 8.

Черные столбки — контрольные клетки; белые столбки — клетки, обработанные агонистом диоксинового рецептора индол-3-карбинолом; серые столбки — клетки, обработанные антагонистом диоксинового рецептора CH-223191. n = 3, P < 0.05.

фекции редактирующей конструкции, призванной привести к нокауту гена. Нокаутные клонны морфологически не отличались от исходной клеточной линии.

Интересно отметить, что отобранные нокаутные клонны характеризуются большим временем удвоения. Особо-

менно заметное замедление роста характерно для клеток клона, характеризующегося при сортировке клеток наиболее сильной экспрессией зеленого флуоресцентного белка — БСК 8 k/o SG1, оно составило 46.5 ч, тогда как исходные клетки линии БСК 8 имели время удвоения 23.3 ч. Несомненно, это отражает серьезные изменения, произошедшие в результате нокаута гена *IGFBP3* в клетках. Скорость роста клона БСК 8 k/o G9 больше скорости роста клеток исходной линии. Сравнение времени удвоения тотальной популяции нокаутных клеток показало незначительное увеличение времени удвоения (23.3 ч по сравнению с 20.6 ч у исходной клеточной линии БСК 8). Незначительную разницу можно объяснить высокой гетерогенностью клонов, составляющих тотальную популяцию нокаутных клеток. Мы можем сделать вывод о том, что используемая система редактирования позволяет получать различные по уровню экспрессии белка клонны и что необходимо при возможности работать с отдельными клонами после их селекции, тщательной характеристики и сравнения.

В качестве цитостатика, применяемого для лечения колоректального рака, был выбран препарат из группы антагонистов пирамидинов 5-фторурацил (5-ФУ). Заметное изменение выживаемости нокаутных клонов было обнаружено при концентрациях 5-ФУ, равных 100 и 500 мкМ (рис. 8).

Использование агониста AhR — индол-3-карбинола — в концентрации 100 мкМ для обработки полученных клонов и исходной линии БСК 8 показало, что под воздействием агониста у общей популяции нокаутных клеток (БСК 8 k/o total) и клона БСК 8 k/o G9 повышается резистентность к 5-ФУ в концентрации 100 мкМ, а у клона БСК 8 k/o SG1 — и к повышенной концентрации 5-ФУ 500 мкМ. Использование для обработки клеток антагониста AhR CH-223191 в концентрации 0.5 мкМ не влияет на резистентность клеток линии БСК 8 и нокаутных клонов к 5-ФУ (100 мкМ). Таким образом, мы можем наблюдать повышение резистентности нокаутных по *IGFBP3* клонов к цитостатику 5-ФУ при воздействии агониста диоксинового рецептора. Для клона БСК 8 k/o SG1 влияние нокаута на резистентность к 5-ФУ наблюдается и без воздействия агониста, но добавление индол-3-карбинола дополнительно увеличивает ее. Эти данные позволяют предположить, что нокаут некоторым неустановленным образом усиливает стволовые характеристики исследуемых опухолевых клеток, поскольку именно стволовому компоненту опухоли свойственны повышенная устойчивость к цитостатикам и лекарственная устойчивость в целом.

Анализ экспрессии мРНК AhR, CYP1A1 и CYP1B1 в клонах первичной клеточной культуры БСК 8 не позволяет увидеть простую закономерность влияния нокаута *IGFBP3* на активность сигнального пути диоксинового рецептора (рис. 9). Для клона БСК 8 k/o G9 и общей нокаутной клеточной популяции наблюдалось угнетение экспрессии AhR и как следствие — снижение экспрессии следующего звена сигнального пути (CYP1A1), эта тенденция сохранялась и при воздействии агониста (антагониста) диоксинового рецептора. У клона БСК 8 k/o SG1 нокаут гена *IGFBP3* приводил к повышению уровня экспрессии AhR, экспрессия CYP1A1 также повышалась — в нативном состоянии и при обработке агонистом и антагонистом диоксинового рецептора. В результате нокаута происходит общее снижение экспрессии CYP1B1 в нативном состоянии и при обработке агонистом диоксино-вого рецептора.

Обобщая представленные данные, мы делаем следующие заключения. Повышение экспрессии AhR может являться дополнительным диагностическим критерием в постановке диагноза рака толстой кишки. Данный критерий обладает достаточно высокой чувствительностью в выявлении злокачественной трансформации слизистой оболочки толстой кишки (в 9 из 12 случаев он был повышен в 1.5 раза и более). Для определения степени специфичности критерия необходимо определить уровень экспрессии AhR при различных патологических состояниях, связанных с повреждением слизистой оболочки толстой кишки (воспалительные заболевания, инфекционные поражения и т. д.), а также в злокачественных опухолях других локализаций. Что касается наблюдаемого повышения экспрессии HIF-1 α в опухолях 7 пациентов, то мы не обнаружили связи уровня экспрессии с диагностируемой стадией заболевания (по классификации TNM).

Нокаут по *IGFBP3* приводит к общему снижению экспрессии CYP1B1 в нативном состоянии и при обработке агонистом, что указывает на наличие связи между изучаемыми сигнальными путями, предоставляя потенциальную возможность модулировать чувствительность различных опухолевых клонов к лучевой и химиотерапии. Уровень экспрессии CYP1A1 меняется при изменении уровня экспрессии AhR в нокаутных клонах, т. е. нарушения связи экспрессии этих факторов в нокаутных клетках не происходит. Увеличение времени удвоения одного из клонов (в 2 раза) может являться одним из признаков повышения стволовых свойств опухолевых клеток. Два из трех клонов при активации диоксинового рецептора (индол-3-карбинолом) проявляют повышенную устойчивость к цитостатику (5-ФУ). Это косвенно говорит о возможном пути адаптации опухолевых клеток с низким уровнем *IGFBP3* к воздействию химиотерапии. По морфологии нокаутные по *IGFBP3* клонсы не отличаются от исходной линии аденокарциномы толстой кишки БСК 8. Наличия корреляции между уровнем экспрессии *IGFPB3*, изоформ OCT4 и клинико-морфологической стадией болезни (TNM) обнаружено не было.

В данной работе было показано, что повышение экспрессии AHR может являться дополнительным диагностическим критерием в постановке диагноза рака толстой кишки. Данный критерий обладает достаточно высокой чувствительностью (в 9 из 12 случаев он был повышен в 1.5 раза и более). Наличие корреляции между уровнем экспрессии *IGFPB3*, изоформы Oct4 и клинико-морфологической стадией болезни (TNM) не обнаружено. Наличие корреляции между уровнем экспрессии *IGFPB3*, HIF-1 α , изоформы OCT4 и клинико-морфологической стадией болезни (TNM) не обнаружено.

В результате нокаута по *IGFBP3* клетки приобретают свойства, характерные для ОСК: увеличивается время удвоения нокаутного по *IGFBP3* клона (в 2 раза), при активации диоксинового рецептора (индол-3-карбинолом) повышается устойчивость к цитостатику (5-фторурацилу). Это косвенно говорит о возможном пути адаптации опухолевых клеток с низким уровнем *IGFBP3* к воздействию химиотерапии.

Нокаут по *IGFBP3* приводит к общему снижению экспрессии CYP1B1 в нативном состоянии и при обработке агонистом, что указывает на наличие связи между изучаемыми сигнальными путями и потенциально дает возможность модулировать активность различных опухолевых клонов к химиотерапии.

Поиск молекулярных высокоэффективных маркеров злокачественности опухолевого процесса является одним из основных направлений исследований в современной онкологии. Обнаруженные нами связи сигнальных путей IGF и AhR необходимо изучить на субпопуляции ОСК, что позволит использовать участников этих сигнальных путей в качестве дополнительных прогностических маркеров и потенциальных мишенией при терапии аденокарциномы толстой кишки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-50-00068 «Молекулярно-клеточные технологии для лечения социально значимых заболеваний»).

Список литературы

- Kooshkin S. A., Ivanova M. A., Timin G. V., Rykov I. V., Chistyakova I. A., Tolkunova E. N. 2016. Повышенная лекарственная устойчивость раковых стволовых клеток в условиях гипоксии. Вестн. Чуваш. гос. пед. ун-та им. И. Я. Яковleva. 92 (4) : 23—33. (Kooshkin S. A., Ivanova M. A., Timin G. V., Rykov I. V., Chistyakov I. A., Tolkunova E. N. 2016. Increased drug resistance in cancer stem cells under the conditions of hypoxia. I. Ya. Yakovlev Chuvash State Pedagogical Univ. Bull. 92 (4) : 23—33.)
- Ambrosetti D., Dufies M., Dadone B., Durand M., Borchiellini D., Amiel J., Pouyssegur J., Rioux-Leclercq N., Pages G., Burrel-Vandenbos F., Mazure N. M. 2018. The two glycolytic markers GLUT1 and MCT1 correlate with tumor grade and survival in clear-cell renal cell carcinoma. PLoS ONE. 13.
- Asadi M. H., Khalifeh K., Mowla S. J. 2016. OCT4 spliced variants are highly expressed in brain cancer tissues and inhibition of OCT4B1 causes G2/M arrest in brain cancer cells. J. Neurooncol. 130 : 455—463.
- Asadi M. H., Mowla S. J., Fathi F., Aleyasin A., Asadzadeh J., Atlasi Y. 2011. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, is highly expressed in gastric cancer and acts as an antiapoptotic factor. Int. J. Cancer. 128 : 2645—2652.
- Asadzadeh J., Asadi M. H., Shakhssalim N., Rafiee M. R., Kalhor H. R., Tavallaei M., Mowla S. J. 2012. A plausible anti-apoptotic role of up-regulated OCT4B1 in bladder tumors. Urol. J. 9 : 574—580.
- Atlasi Y., Mowla S. J., Ziae S. A., Gokhale P. J., Andrews P. W. 2008. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. Stem Cells. 26 : 3068—3074.
- Baba Y., Noshio K., Shima K., Irahara N., Chan A. T., Meyerhardt J. A., Chung D. C., Giovannucci E. L., Fuchs C. S., Ogino S. 2010. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. Amer. J. Pathol. 176 : 2292—2301.
- Bock K. W., Kohle C. 2005. Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis. Biochem. Pharmacol. 69 : 1403—1408.
- Chan Y. X., Alfonso H., Paul Chubb S. A., Ho K. Y., Gerard Fegan P., Hankey G. J., Golledge J., Flicker L., Yeap B. B. 2018. Higher *IGFBP3* is associated with increased incidence of colorectal cancer in older men independently of IGF1. Clin. Endocrinol. (Oxford). 88 : 333—340.
- da Silva P. B., Teixeira Dos Santos M. C., Rodini C. O., Kaid C., Pereira M. C., Furukawa G., da Cruz D. S. G., Goldfeder M. B., Rocha C. R. R., Rosenberg C., Okamoto O. K. 2017. High OCT4A levels drive tumorigenicity and metastatic potential of medulloblastoma cells. Oncotarget. 8 : 19 192—19 204.
- Diry M., Tomkiewicz C., Koehle C., Coumoul X., Bock K. W., Barouki R., Transy C. 2006. Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. Oncogene. 25 : 5570—5574.

- D'Uva G., Baci D., Albini A., Noonan D. M. 2018. Cancer chemoprevention revisited: Cytochrome P450 family 1B1 as a target in the tumor and the microenvironment. *Cancer Treat Rev.* 63 : 1—18.
- Furlan D., Sahnane N., Carnevali I., Cerutti R., Bertoni F., Kwee I., Uccella S., Bertolini V., Chiaravalli A. M., Capella C. 2008. Up-regulation of the hypoxia-inducible factor-1 transcriptional pathway in colorectal carcinomas. *Hum. Pathol.* 39 : 1483—1494.
- Gwak J. M., Kim M., Kim H. J., Jang M. H., Park S. Y. 2017. Expression of embryonal stem cell transcription factors in breast cancer: Oct4 as an indicator for poor clinical outcome and tamoxifen resistance. *Oncotarget.* 8 : 36 305—36 318.
- Hoskin P. J., Sibtain A., Daley F. M., Wilson G.D. 2003. GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *Br. J. Cancer.* 89 : 1290—1297.
- Ide H., Lu Y., Yu J., Noguchi T., Kanayama M., Muto S., Yamaguchi R., Kawato S., Horie S. 2017. Aryl hydrocarbon receptor signaling involved in the invasiveness of LNCaP cells. *Hum. Cell.* 30 : 133—139.
- Jez M., Ambady S., Kashpur O., Grella A., Malcuit C., Vilner L., Rozman P., Dominko T. 2014. Expression and differentiation between OCT4A and its pseudogenes in human ESCs and differentiated adult somatic cells. *PLoS ONE.* 9.
- Kim J. H., Park M. Y., Kim C. N., Kim K. H., Kang H. B., Kim K. D., Kim J. W. 2012. Expression of endothelial cell-specific molecule-1 regulated by hypoxia inducible factor-1 α in human colon carcinoma: impact of ESM-1 on prognosis and its correlation with clinicopathological features. *Oncol. Rep.* 28 : 1701—1708.
- Knerr S., Schaefer J., Both S., Mally A., Dekant W., Schrenk D. 2006. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced cytochrome P450s alter the formation of reactive oxygen species in liver cells. *Mol. Nutr. Food. Res.* 50 : 378—384.
- Kurtova A. V., Xiao J., Mo Q., Pazhanisamy S., Krasnow R., Lerner S. P., Chen F., Roh T.T., Lay E., Ho P. L., Chan K. S. 2015. Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. *Nature.* 517 : 209—213.
- Li B., Yao Z., Wan Y., Lin D. 2016. Overexpression of OCT4 is associated with gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 7 : 77 342—77 347.
- Li Z., Bao S., Wu Q., Wang H., Eyler C., Sathornsumetee S., Shi Q., Cao Y., Lathia J., McLendon R. E., Hjelmeland A. B., Rich J. N. 2009. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell.* 15 : 501—513.
- Liu Z., Wu X., Zhang F., Han L., Bao G., He X., Xu Z. 2013. AhR expression is increased in hepatocellular carcinoma. *J. Mol. Histol.* 44 : 455—461.
- Malfettone A., Silvestris N., Paradiso A., Mattioli E., Simone G., Mangia A. 2012. Overexpression of nuclear NHERF1 in advanced colorectal cancer: association with hypoxic microenvironment and tumor invasive phenotype. *Oncol. Rep.* 92 : 296—303.
- Mathieu J., Zhang Z., Zhou W., Wang A. J., Heddleston J. M., Pinna C. M., Hubaud A., Stadler B., Choi M., Bar M., Tewari M., Liu A., Vessella R., Rostomily R., Born D., Horwitz M., Ware C., Blau C. A., Cleary M. A., Rich J. N., Ruohola-Baker H. 2011. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res.* 71 : 4640—4652.
- Mirzaei M. R., Mahmoodi M., Hassanshahi G., Ahmadi Z. 2017. Down-regulation of anti-apoptotic genes in tumor cell lines is facilitated by suppression of OCT4B1. *Adv. Med. Sci.* 62 : 97—102.
- Mirzaei M. R., Najafi A., Arababadi M. K., Asadi M. H., Mowla S. J. 2014. Altered expression of apoptotic genes in response to OCT4B1 suppression in human tumor cell lines. *Tumour Biol.* 35 : 9999—10 009.
- Murray I. A., Patterson A. D., Perdew G. H. 2014. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat. Rev. Cancer.* 14 : 801—814.
- Opitz C. A., Litzenburger U. M., Sahm F., Ott M., Tritschler I., Trump S., Schumacher T., Jestaedt L., Schrenk D., Weller M., Ju gold M., Guillemin G. J., Miller C. L., Lutz C., Radlwimmer B., Lehmann I., von Deimling A., Wick W., Platten M. 2011. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* 478 : 197—203.
- Pankaj J., Kumari J. R., Kim W., Lee S. A. 2015. Insulin-like growth factor-1, IGF-binding protein-3, C-peptide and colorectal cancer: a case-control study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 16 : 3735—3740.
- Patel S. A., Bhambra U., Charalambous M. P., David R. M., Edwards R. J., Lightfoot T., Boobis A. R., Gooperham N. J. 2014. Interleukin-6 mediated upregulation of CYP1B1 and CYP2E1 in colorectal cancer involves DNA methylation, miR27b and STAT3. *Br. J. Cancer.* 111 : 2287—2296.
- Peng T. L., Chen J., Mao W., Liu X., Tao Y., Chen L. Z., Chen M. H. 2009. Potential therapeutic significance of increased expression of aryl hydrocarbon receptor in human gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 15 : 1719—1729.
- Poursani E. M., Mohammad Soltani B., Mowla S. J. 2016. Differential expression of OCT4 pseudogenes in pluripotent and tumor cell lines. *Cell J.* 18 : 28—36.
- Rushmore T. H., Kong A. N. 2002. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab.* 3 : 481—490.
- Santosh V., Arivazhagan A., Sreekanthreddy P., Srinivasan H., Thota B., Srividya M. R., Vrinda M., Sridevi S., Shailaja B. C., Samuel C., Prasanna K. V., Thennarasu K., Balasubramaniam A., Chandramouli B. A., Hegde A. S., Somasundaram K., Kondaiah P., Rao M. R. 2010. Grade-specific expression of insulin-like growth factor-binding proteins-2, -3, and -5 in astrocytomas: IGFBP-3 emerges as a strong predictor of survival in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19 : 1399—1408.
- Sheen-Chen S. M., Zhang H., Huang C. C., Tang R. P. 2009. Insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast cancer: analysis with tissue microarray. *Anticancer Res.* 29 : 1131—1135.
- Soheili S., Asadi M. H., Farsinejad A. 2017. Distinctive expression pattern of OCT4 variants in different types of breast cancer. *Cancer Biomark.* 18 : 69—76.
- Tompkins L. M., Li H., Li L., Lynch C., Xie Y., Nakanishi T., Ross D. D., Wang H. 2010. A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells. *Biochem. Pharmacol.* 80 : 1754—1761.
- Vaupel P., Mayer A. 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 26 : 225—239.
- Viel J. F., Arveux P., Baverel J., Cahn J. Y. 2000. Soft-tissue sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma clusters around a municipal solid waste incinerator with high dioxin emission levels. *Amer. J. Epidemiol.* 152 : 9—13.
- Wang H. X., Liu X., Xu C. J., Ma X. C., Long J. E., Li D. 2005. Induction of liver cytochrome P450 1A2 expression by flutamide in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 26 : 1382—1386.
- Wang Y., Liu Y., Malek S. N., Zheng P., Liu Y. 2011. Targeting HIF-1 α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell.* 8 : 399—411.
- Yamamoto N., Oshima T., Yoshihara K., Aoyama T., Hayashi T., Yamada T., Sato T., Shiozawa M., Yoshikawa T., Morinaga S., Rino Y., Kunisaki C., Tanaka K., Akaike M., Imada T., Masuda M. 2017. Clinicopathological significance and impact on outcomes of the gene expression levels of IGF-1, IGF-2 and IGF-1R, IGFBP-3 in patients with colorectal cancer: overexpression of the IGFBP-3 gene is an effective predictor of outcomes in patients with colorectal cancer. *Oncol. Lett.* 13 : 3958—3966.
- Yu H., Levesque M. A., Khosravi M. J., Papanastasiou-Diamandi A., Clark G. M., Diamandis E. P. 1996. Associations between insulin-like growth factors and their binding proteins and other prognostic indicators in breast cancer. *Br. J. Cancer.* 74 : 1242—1247.

ANALYSIS OF ADDITIONAL PROGNOSTIC MARKERS
OF HUMAN COLON ADENOCARCINOMA

M. A. Bystryakova,¹ S. A. Koshkin,¹ A. V. Gavrilyukov,² E. N. Tolkunova^{1,}*

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

² St. Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Medical Care (Oncology-Oriented),

St. Petersburg, 197758;

* e-mail: entolk62@mail.ru

The work is devoted to the analysis of the potential additional prognostic markers expression of human colon adenocarcinoma in the tumor and adjacent normal tissue and the search for the relationship between them. The expression of potential prognostic molecular markers (IGFBP3, AhR, CYP1A1, CYP1B1, HIF-1 α , OCT4A, OCT4B, and OCT4B1) was analyzed by quantitative RT-PCR in the samples. A correlation was found between the expression of IGFBP3 and AhR. The knockout of the IGFBP3 gene was carried out in the primary cell cultures of human colon adenocarcinoma BSK 8, the activity of the AhR signal pathway was analyzed. Increased AhR expression may be an additional diagnostic criterion in the diagnosis of colon cancer. The presence of correlation between the level of expression of HIF-1 α , IGFPB3, OCT4 isoforms and clinico-morphological stage of disease (TNM) is not detected. There is decreased cell growth rate and increased resistance to cytostatics in knockout clones.

Key words: colon cancer, prognostic marker, aryl hydrocarbon receptor (AhR), insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3), isoforms of OCT4 (OCT4A, OCT4B, OCT4B1), hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1A)