



© М.И. Служев^{1,2}, М.И. Зарайский^{2,3}, В.В. Семиглазов^{1,2},
Т.Ю. Семиглазова^{1,3}, Е.В. Ткаченко¹, С.В. Кондратьев¹, Н.А. Бриш¹, Ю.В. Алексеева¹,
С.В. Абасова¹, А.С. Козюкалов¹, Ю.В. Петрик¹, А.Н. Сидорова¹

Пороговые уровни экспрессии генов опухолевого контроля и микроРНК в опухолевой и здоровой ткани у больных с колоректальным раком

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

© Maksim I. Sluzhev^{1,2}, Michail I. Zarskii^{2,3}, Vladislav V. Semiglazov^{1,2}, Tatiana Yu. Semiglazova^{1,3}, Elena V. Tkachenko¹, Sergei V. Kondratev¹, Nadezhda A. Brish¹, Yuliya V. Alekseeva¹, Sakiyat V. Abasova¹, Aleksandr S. Kozyukalov¹, Iurii V. Petrik¹, Aleksandra N. Sidorova¹

Threshold Expression Levels of Tumor Control Genes and microRNAs in Tumor and Healthy Tissue of Colorectal Cancer Patients

¹N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, St. Petersburg, the Russian Federation

²Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, the Russian Federation

³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, the Russian Federation

Введение. В опухолевом процессе при колоректальном раке (КРР) важное место занимают гены опухолевого контроля и микроРНК. Экспрессия этих генов отличается в опухолевой и здоровой тканях. Отсутствуют данные о пороговых уровнях экспрессии генов в опухоли и здоровой тканях на различных расстояниях.

Цель. Определить пороговые уровни экспрессии генов опухолевого контроля (*E2F1*, *E2F3*, *TGFB*, *NFKB*, *KLF-12*, *EGFR* и *MMP9*) и микроРНК (микроРНК-15, -16, -21, -34, -126, -128, -210 и -342) в опухолевой и здоровой тканях на расстоянии 5 и 10 см от опухоли у пациентов с КРР.

Материал и методы. В исследование включены 10 пациентов с КРР. Установление диагноза осуществляли с помощью ректороманоскопии или колоноскопии с биопсией опухолевой и здоровой ткани на расстоянии 5 см и 10 см от опухоли. В образцах изучали уровни экспрессии генов опухолевого контроля (*E2F1*, *E2F3*, *TGFB*, *NFKB*, *KLF-12*, *EGFR* и *MMP9*) и микроРНК (микроРНК-15, -16, -21, -34, -126, -128, -210 и -342).

Результаты. Определен пороговый уровень экспрессии гена микроРНК-21 равный 7,21 UE с чувствительностью 90 % и специфичностью 89,5 % ($p = 0,00004$), пороговый уровень экспрессии гена микроРНК-342 равный 16,04 UE с чувствительностью 90 % и специфичностью 84,2 % ($p = 0,00027$), пороговый уровень экспрессии гена *E2F3* равный 0,380 UE с чувствительностью 80 % и специфичностью 68,4 % ($p = 0,031$), пороговый уровень экспрессии гена *NFKB* равный 0,243 UE с чувствительностью 70 % и специфичностью 78,9 % ($p = 0,022$). Выявлено, что чем больше размер опухоли, тем меньше в ней уровень экспрессии генов микроРНК-21 и микроРНК-342 ($r = -0,991$, $p = 0,000015$ и $r = -0,908$, $p = 0,005$ соответственно).

Introduction. Tumor control genes and miRNAs play an important role in the tumor process in colorectal cancer (CRC). The expression of these genes differs in tumor and healthy tissues. There is no data on threshold levels of gene expression in tumors and healthy tissues at different distances.

Aim. The purpose of the study is to determine the threshold levels of expression of tumor control genes (*E2F1*, *E2F3*, *TGFB*, *NFKB*, *KLF-12*, *EGFR* and *MMP9*) and miRNAs (miRNA-15, -16, -21, -34, -126, -128, -210 and -342) in tumor and healthy tissues at distances of 5 and 10 cm from the tumor in CRC patients.

Materials and Methods. The study included 10 patients with colorectal cancer. Diagnosis was made by sigmoidoscopy or colonoscopy with biopsy of tumor and healthy tissue at a distance of 5 cm and 10 cm from the tumor. The samples were tested for the expression levels of tumor control genes. (*E2F1*, *E2F3*, *TGFB*, *NFKB*, *KLF-12*, *EGFR* and *MMP9*) and miRNAs (miRNA-15, -16, -21, -34, -126, -128, -210 and -342).

Results. The threshold expression level of the miRNA-21 gene was determined to be 7.21 REU with a sensitivity of 90 % and specificity 89.5 % ($p = 0.00004$); the threshold level of expression of the miRNA-342 gene was equal to 16.04 REU with a sensitivity of 90 % and a specificity of 84.2 % ($p = 0.00027$); threshold level of *E2F3* gene expression was equal to 0.380 REU with a sensitivity of 80 % and specificity of 68.4 % ($p = 0.031$); threshold level of *NFKB* gene expression was equal to 0.243 REU with a sensitivity of 70 % and specificity of 78.9 % ($p = 0.022$). It was found that the larger the tumor size, the lower the expression level of the miRNA-21 and miRNA-342 genes ($r = -0.991$, $p = 0.000015$ and $r = -0.908$, $p = 0.005$ respectively).

Выводы. Выявлены пороговые уровни в экспрессии генов *E2F3*, микроРНК-21, микроРНК-342 и *NFKB*. Повышенный уровень микроРНК-21 и сниженный уровень микроРНК-342 в здоровой ткани может быть фактором канцерогенеза и предиктором локального рецидива и прогрессирования. Эти данные могут быть использованы в клинических исследованиях оценки прогностической и предиктивной роли экспрессии генов.

Ключевые слова: микроРНК; колоректальный рак; пороговый уровень; экспрессия генов; микроРНК-21; микроРНК-342; *NFKB*

Для цитирования: Служев М.И., Зарайский М.И., Семиглазов В.В., Семиглазова Т.Ю., Ткаченко Е.В., Кондратьев С.В., Бриш Н.А., Алексеева Ю.В., Абасова С.В., Козюкалов А.С., Петрик Ю.В., Сидорова А.Н. Пороговые уровни экспрессии генов опухолевого контроля и микроРНК в опухолевой и здоровой ткани у больных с колоректальным раком. *Вопросы онкологии*. 2024; 70(4): 696-706. -DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-4-696-706

Conclusion. Threshold levels in the expression of the *E2F3*, miRNA-21, miRNA-342 and *NFKB* genes were identified. Increased levels of miR-21 and decreased levels of miR-342 in healthy tissue may be a factor in carcinogenesis and a predictor of local relapse and progression. These data can be used in clinical studies assessing the prognostic and predictive role of gene expression.

Keywords: miRNA; colorectal cancer; threshold level; gene expression; miRNA-21; miRNA-342; *E2F3*; *NFKB*

For Citation: Maksim I. Sluzhev, Michail I. Zaraiskii, Vladislav V. Semiglazov, Tatiana Yu. Semiglazova, Elena V. Tkachenko, Sergei V. Kondratev, Nadezhda A. Brish, Yuliya V. Alekseeva, Sakiyat V. Abasova, Aleksandr S. Kozyukalov, Iurii V. Petrik, Aleksandra N. Sidorova. Threshold expression levels of tumor control genes and microRNAs in tumor and healthy tissue of colorectal cancer patients. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2024; 70(4): 696-706. (In Rus).-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-4-696-706

✉ Контакты: Служев Максим Иванович, sluzhemaxim@mail.ru

Введение

Колоректальный рак (КРР) занимает большую долю в заболеваемости и смертности среди всех злокачественных новообразований [1]. Развитие КРР происходит в результате накопления множественных генетических и эпигенетических изменений в нормальной ткани толстой и прямой кишки [2]. Уровень этих изменений отличается в опухолевой и здоровой тканях [3]. Однако отсутствуют данные о пороговом уровне экспрессии различных генов в опухолевой и здоровой тканях на различном расстоянии от опухоли у пациентов с КРР.

В канцерогенезе КРР важную роль играют гены опухолевого контроля. Одним из таких генов является ген, регулирующий сигнальный путь фактора роста опухоли (*TGFβ*). *TGFβ* участвует в прогрессировании КРР через дедифференцировку неопухолевых стволовых клеток в опухолевые, а также через подавление противоопухолевого иммунитета [4].

Другая группа генов, участвующих в онкогенезе КРР, является семейство *E2F*. Дефект в работе семейства *E2F* может активировать или подавлять онкогены и онкосупрессоры опухолей на нескольких уровнях: транскрипции, посттранскрипционном, трансляции и белкового взаимодействия [5]. Например, было обнаружено, что повышенная экспрессия *E2F1* непосредственно связана с увеличением уровня апоптоза и обратно пропорциональна пролиферации клеток [6]. Было показано, что в опухолевых тканях повышенный уровень экспрессии гена *E2F3* сопровождается увеличенным уровнем пролиферативной активности опухолевых клеток при КРР [7].

Еще один важный ген, участвующий в воспалении, пролиферации и апоптозе клеток [8],

является *NFκB*. Ген *NFκB* — значимое звено в передаче сигналов, которые способствуют формированию метастатического процесса при КРР [9].

Одним из ключевых факторов, участвующих в онкогенезе КРР, является ген рецептора эпидермального фактора роста *EGFR*. *EGFR* — это трансмембранный гликопротеин с внутриклеточной тирозинкиназой, служащий рецептором для внеклеточных белковых лигандов [10]. Различные лиганды могут избирательно связываться с *EGFR* и активировать пути, участвующие в клеточном росте и пролиферации. Экспрессия *EGFR* происходит в большом проценте случаев КРР, наряду с этим повышенная экспрессия *EGFR* достоверно ассоциируется с неблагоприятным исходом и больше встречается при метастатическом заболевании [11].

В регуляцию пролиферации, развития сосудов и апоптоза также вносит вклад семейство Круппель-подобных транскрипционных факторов (*KLF*). Повышенный уровень *KLF12* при КРР связан с жизнеспособностью опухолевых клеток, образованием колоний, миграцией, инвазией опухолевых клеток и ангиогенезом [12].

Матриксная металлопротеиназа 9 (ММР9) по-другому носит название «желатиназа В», принимает участие в изменении структуры межклеточного матрикса. Обнаружено, что синтез протеина ММР9 повышен при распространенном и метастатическом КРР [13]. ММР9, изменяя внеклеточный матрикс, повышает проницаемость сосудов и, как следствие, способствует местной инвазии и отдаленному метастазированию КРР [14].

Большое влияние на онкогенез при КРР имеют микроРНК. МикроРНК включают в себя многочисленную группу некодирующих РНК, которые не являются матрицей для синтеза

протеинов. Патологическая экспрессия микроРНК является важным звеном онкогенеза при КРР. Условно микроРНК можно разделить на две группы: подавляющие и стимулирующие рост опухоли.

К первой группе можно отнести микроРНК-15, -34, -126, -128 и -342. Было показано, что повышенная экспрессия микроРНК-15 сопровождается ростом чувствительности опухолевых клеток толстой кишки к оксалиплатину и фторурацилу [15]. В клетках рака толстой кишки с мутацией p53 микроРНК-34 ослабляет передачу сигналов Wnt и уменьшает инвазивность этих клеток *in vitro* [16]. Повышение уровня микроРНК-126 нарушает жизнеспособность опухолевых клеток через запуск апоптоза и аутофагии, а также подавляет пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток при КРР [17]. Уровень микроРНК-128 снижен в

опухолевой ткани толстого кишечника, а при повышении микроРНК-128 наблюдается снижение жизнеспособности и колониеобразующей способности клеток рака толстой кишки за счет индукции апоптоза [18]. МикроРНК-342 ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток КРР [19]. Изменение гена микроРНК-342, например, с помощью метилирования, может способствовать развитию опухолевого процесса (19).

К группе, способствующей росту и развитию опухоли, относятся микроРНК-16, -21 и -210. Zhang с соавт. провели метаанализ, в котором выявили, что сниженный показатель экспрессии микроРНК-16 коррелировал с негативным прогнозом при солидных злокачественных новообразованиях [21]. При КРР наблюдается гиперэкспрессия микроРНК-21 и это связано с низкой выживаемостью [22]. Уровень микроРНК-210

Таблица 1. Характеристика пациентов

Характеристика	Значение
Возраст (лет)	61,5 ± 9,7
Мужчины (n)	4 (40 %)
Женщины (n)	6 (60 %)
Максимальный диаметр опухоли, (мм)	50 ± 25,2
N0 (n)	5 (50 %)
N+ (n)	5 (50 %)
Стадия I (n)	1 (10 %)
Стадия II (n)	2 (20 %)
Стадия III (n)	2 (20 %)
Стадия IV (n)	5 (50 %)
Low-grade	8 (80 %)
High-grade	2 (20 %)
M1 HEP	4 (40 %)
M1 PUL/PLE	2 (20 %)
Левая половина ободочной кишки, рак прямой кишки	7 (70 %)
Правая половина ободочной кишки	3 (30 %)
KRAS	
С мутацией	1 (10 %)
Без мутации	3 (30 %)
Статус не известен	6 (60 %)
NRAS	
С мутацией	1 (10 %)
Без мутации	3 (30 %)
Статус не известен	6 (60 %)
BRAF	
С мутациями	0 (0 %)
Без мутаций	4 (40 %)
Статус не известен	6 (60 %)
dMMR/MSI	
Присутствует	0 (0 %)
Отсутствует	4 (40 %)
Статус не известен	6 (60 %)

Примечание: N+ — наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах; Low-grade — низкая степень злокачественности; High-grade — высокая степень злокачественности; M1 HEP — наличие метастазов в печени; M1 PUL/PLE — наличие метастазов в легких и/или плевре.

Table 1. Patient Characteristics

Characteristic	Value
Age (years)	61.5 ± 9.7
Men (n)	4 (40 %)
Women(n)	6 (60 %)
Maximum tumor diameter, (mm)	50 ± 25.2
N0 (n)	5 (50 %)
N+ (n)	5 (50 %)
Stage I (n)	1 (10 %)
Stage II (n)	2 (20 %)
Stage III (n)	2 (20 %)
Stage IV (n)	5 (50 %)
Low-grade	8 (80 %)
High-grade	2 (20 %)
M1 HEP	4 (40 %)
M1 PUL/PLE	2 (20 %)
Left-side colon and rectal cancer	7 (70 %)
Right-side colon cancer	3 (30 %)
KRAS	
mutant	1 (10 %)
wild	3 (30 %)
unknown	6 (60 %)
NRAS	
mutant	1 (10 %)
wild	3 (30 %)
unknown	6 (60 %)
BRAF	
mutant	0 (0 %)
wild	4 (40 %)
unknown	6 (60 %)
dMMR/MSI	
mutant	0 (0 %)
wild	4 (40 %)
unknown	6 (60 %)

Note: N+ — presence of metastases in regional lymph nodes; Low-grade — low degree of malignancy; High-grade — high degree of malignancy; M1 HEP — presence of liver metastases; M1 PUL/PLE — presence of metastases in the lungs and/or pleura.

был повышен в плазме крови пациентов с КРР, и чем выше была стадия КРР, тем выше оказывался уровень микроРНК-210 [23].

Указанные ранее гены вносят существенный вклад в канцерогенез при КРР и могут служить отличительными характеристиками опухолевого процесса. Изучение порогового уровня генов микроРНК и опухолевого контроля на различных расстояниях от опухоли может стать основой для оценки ее диагностического и прогностического потенциала в качестве биомаркера КРР в опухолевой и здоровой тканях. Цель исследования — определить пороговые уровни экспрессии генов опухолевого контроля (*E2F1*, *E2F3*, *TGFB*, *NFKB*, *KLF-12*, *EGFR* и *MMP9*) и микроРНК (микроРНК-15, -16, -21, -34, -126, -128, -210 и -342) в опухолевой и здоровой тканях на расстоянии 5 и 10 см от опухоли у пациентов с КРР.

Материалы и методы

Пациенты. Исследование осуществлено согласно Хельсинкской декларации. С 02.2022 по 05.2022 в обсервационное исследование было включено 10 пациентов (4 мужчин и 6 женщин), которые соответствовали критериям включения и подписали информированное согласие. В исследование были включены мужчины и женщины в возрасте от 45 до 82 лет с подозрением на КРР, которым выполняли биопсию для подтверждения диагноза.

Клиническая характеристика пациентов. Общие характеристики пациентов представлены в табл. 1. Все пациенты с подтвержденным КРР получали соответствующее лечение в рамках клинических рекомендаций в зависимости от стадии заболевания и др. важных характеристик.

У всех пациентов была выполнена колоноскопия или ректороманоскопия с биопсией опухолевой ткани и здоровой ткани на расстоянии 5 и 10 см. Участок «здоровой» ткани определялся визуально врачом-эндоскопистом. В полученном материале (опухолевая ткань и здоровая ткань) изучали уровни экспрессии генов опухолевого контроля (*E2F1*, *E2F3*, *TGFB*, *NFKB*, *KLF-12*, *EGFR* и *MMP9*), относительно референц гена *GAPDH*, а также уровни экспрессии генов микроРНК (микроРНК-15, -16, -21, -34, -126, -128, -210 и -342), используя в качестве референц-гена малую ядерную РНК U6.

Анализ экспрессии генов. Анализ относительной экспрессии генов опухолевого контроля и генов микроРНК осуществляли согласно полуколичественному протоколу [24]. Тотальную РНК выделяли из образца ткани (биопсийный материал) с использованием реактива ExtractRNA (Евроген, Москва) согласно инструкции.

Изготовление копийной ДНК (кДНК). Для изготовления кДНК генов опухолевого контроля применяли набор для обратной транскрипции «ОТ-1» (Синтол, Москва) в модификации для гексануклеотидных праймеров, в соответствии с инструкцией. Изготовление кДНК генов микроРНК осуществляли с помощью технологии StemLoop со специфическими праймерами, отдельно для каждой микроРНК и гена сравнения U6 (см. приложение online*) с применением набора для обратной транскрипции «ОТ-1» (Синтол, Москва). Температурный профиль реакции был следующий: 16 °C — 30 мин., 42 °C — 30 мин., 85 °C — 5 мин.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). В качестве ПЦР смеси применяли 2,5 × реакционная смесь с интекалирующим красителем EVA Green (Синтол, Москва). Амплификацию осуществляли в режиме RealTime на приборе DTLite-4 (ДНК-Технология, Москва) по стандартной двухпраймерной схеме по полуколичественному протоколу. Праймеры для ПЦР представлены в приложении. Температурный профиль амплификации генов опухолевого контроля: 95 °C — 7 мин., затем 40 циклов (95 °C — 15 сек. и 56 °C — 1 мин.), для микроРНК: 95 °C — 5 мин., затем 45 циклов (95 °C — 15 сек. и 60 °C — 1 мин.). Оценку относительного уровня экспрессии генов осуществляли по протоколу ΔC_t и рассчитывали по формуле $2^{-(A-B)}$, где А — C_t гена микроРНК, а В — C_t гена U6. Полученные данные указывали в условных единицах экспрессии (УЕ).

Статистический анализ. Статистический анализ осуществляли непараметрическими методами. Тип распределения определили с помощью гистограмм распределения и критериев Шапиро – Уилка и Колмогорова – Смирнова. Категориальные данные представлены как частота и процент. Непрерывные переменные представлены как среднее ± стандартное отклонение или при применении непараметрических критериев — медиана и интерквартильный размах. Для определения достоверности разницы экспрессии генов на расстояниях 0, 5 и 10 см был использован тест Фридмана для повторных измерений, а далее — тест Вилкоксона для уточнения источника значимости. Для определения порогового уровня экспрессии генов был использован ROC анализ. Корреляции между размером опухоли, стадией, поражением лимфатических узлов и наличием отдаленных метастазов с одной стороны и всеми факторами с другой анализировали с использованием ранговой корреляции Спирмена. Уровень $p < 0,05$ считался статистически значимым. Для статистических тестов использовали программный пакет SPSS 23.0 (IBM, Чикаго, Иллинойс).

* Приложение доступно по ссылке <https://voprosyonkologii.ru/index.php/journal/article/view/4-24-Threshold/2039>

ROC-кривые были построены на сайте <https://www.bioinformatics.com.cn/en>, онлайн-платформе для анализа и визуализации данных.

Результаты

Оценка уровней экспрессии генов опухолевого контроля и микроРНК. Для определения достоверности разницы экспрессии генов в опухолевой ткани и здоровой ткани на расстояниях 5 и 10 см от опухоли был применен тест Фридмана для повторных измерений, а затем — тест Вилкоксона для указания источника значимости. Статистически значимая разница экспрессии генов в опухолевой ткани (0 см) и здоровой ткани на расстояниях 5 и 10 см от опухоли была обнаружена для микроРНК-21, микроРНК-342, *E2F3* и *NFκB* (табл. 2).

Определение порогового уровня экспрессии генов опухолевого контроля и микроРНК. Для определения порогового уровня микроРНК-21, микроРНК-342, *E2F3* и *NFκB* был использован ROC анализ (рис. 1).

Анализ ROC кривой показал, что уровни экспрессии генов микроРНК-21, микроРНК-342, *E2F3* и *NFκB* могут дифференцировать опухолевую ткань толстого кишечника от здоровой ткани (на расстоянии 5 и 10 см от опухоли) с AUC 0,971 (95 % ДИ 0,920–1,000) для микроРНК-21, AUC 0,918 (95 % ДИ 0,794–1,000) для микроРНК-342, AUC 0,750 (95 % ДИ 0,542–0,953) для *E2F3* и AUC 0,763 (95 % ДИ 0,538–0,989) для *NFκB* (табл. 3)

При пороговом значении 7,21 УЕ чувствительность и специфичность уровня экспрессии гена микроРНК-21 были 90 % и 89,5 % ($p = 0,00004$). При пороговом значении 16,04 УЕ чувствительность и специфичность уровня экспрессии гена микроРНК-342 были 90 % и 84,2 % ($p = 0,0003$). При пороговом значении 0,380 УЕ чувствительность и специфичность уровня экспрессии гена *E2F3* были 80 % и 68,4 % ($p = 0,031$). При пороговом значении 0,243 УЕ чувствительность и специфичность уровня экспрессии гена *NFκB* были 70 % и 78,9 % ($p = 0,022$).

Таблица 2. Статистически значимая разница экспрессии генов в опухолевой ткани (0 см) и здоровой ткани на расстояниях 5 и 10 см от опухоли, согласно тесту Фридмана и Вилкоксона

Ген	МикроРНК-21	МикроРНК-342	<i>E2F3</i>	<i>NFκB</i>
Медиана ± интерквартильный размах 0 см	16,65 [11,61; 38,12]	5,67 [3,23; 12,22]	0,269 [0,157; 0,515]	0,183 [0,084; 0,437]
Медиана ± интерквартильный размах 5 см	3,88 [1,97; 5,19]	19,13 [17,15; 49,37]	0,537 [0,342; 1,157]	0,468 [0,298; 0,679]
Медиана ± интерквартильный размах 10 см	2,83 [1,57; 6,28]	25,99 [17,81; 57,87]	0,435 [0,278; 0,661]	0,435 [0,218; 0,520]
Тест Фридмана	$p = 0,008^*$	$p = 0,016^*$	$p = 0,018^*$	$p = 0,011^*$
Тест Вилкоксона с поправкой Бонферрони 0 против 5 см	$p = 0,009^*$	$p = 0,005^*$	$p = 0,028$	$p = 0,047$
Тест Вилкоксона с поправкой Бонферрони 0 против 10 см	$p = 0,012^*$	$p = 0,038$	$p = 0,110$	$p = 0,110$
Тест Вилкоксона с поправкой Бонферрони 5 против 10 см	$p = 0,594$	$p = 0,441$	$p = 0,510$	$p = 0,093$

Примечание: * — статистически значимо.

Table 2. Statistically significant difference in gene expression in tumor tissue (0 cm) and healthy tissue at distances of 5 and 10 cm from the tumor according to the Friedman and Wilcoxon test

Gene	<i>miRNA-21</i>	<i>miRNA-342</i>	<i>E2F3</i>	<i>NFκB</i>
Median ± interquartile range 0 cm	16.65 [11.61; 38.12]	5.67 [3.23; 12.22]	0.269 [0.157; 0.515]	0.183 [0.084; 0.437]
Median ± interquartile range 5 cm	3.88 [1.97; 5.19]	19.13 [17.15; 49.37]	0.537 [0.342; 1.157]	0.468 [0.298; 0.679]
Median ± interquartile range 10 cm	2.83 [1.57; 6.28]	25.99 [17.81; 57.87]	0.435 [0.278; 0.661]	0.435 [0.218; 0.520]
Friedman test	$p = 0.008^*$	$p = 0.016^*$	$p = 0.018^*$	$p = 0.011^*$
Wilcoxon test with Bonferroni correction 0 vs 5 cm	$p = 0.009^*$	$p = 0.005^*$	$p = 0.028$	$p = 0.047$
Wilcoxon test with Bonferroni correction 0 vs 10 cm	$p = 0.012^*$	$p = 0.038$	$p = 0.110$	$p = 0.110$
Wilcoxon test with Bonferroni correction 5 vs 10 cm	$p = 0.594$	$p = 0.441$	$p = 0.510$	$p = 0.093$

Note: * — statistically significant.

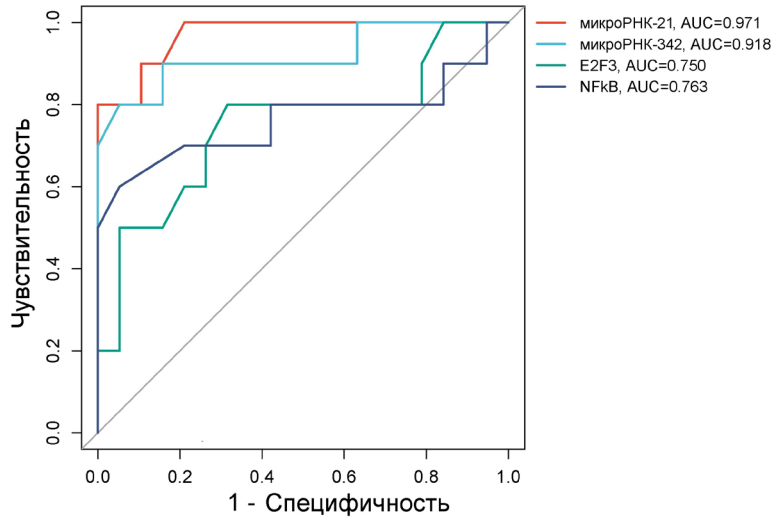


Рис. 1. ROC кривые для пороговых уровней экспрессии *microRNA-21*, *microRNA-342* и *NFkB*
 Fig. 1. ROC curves for threshold expression levels of *microRNA-21*, *microRNA-342* and *NFkB*

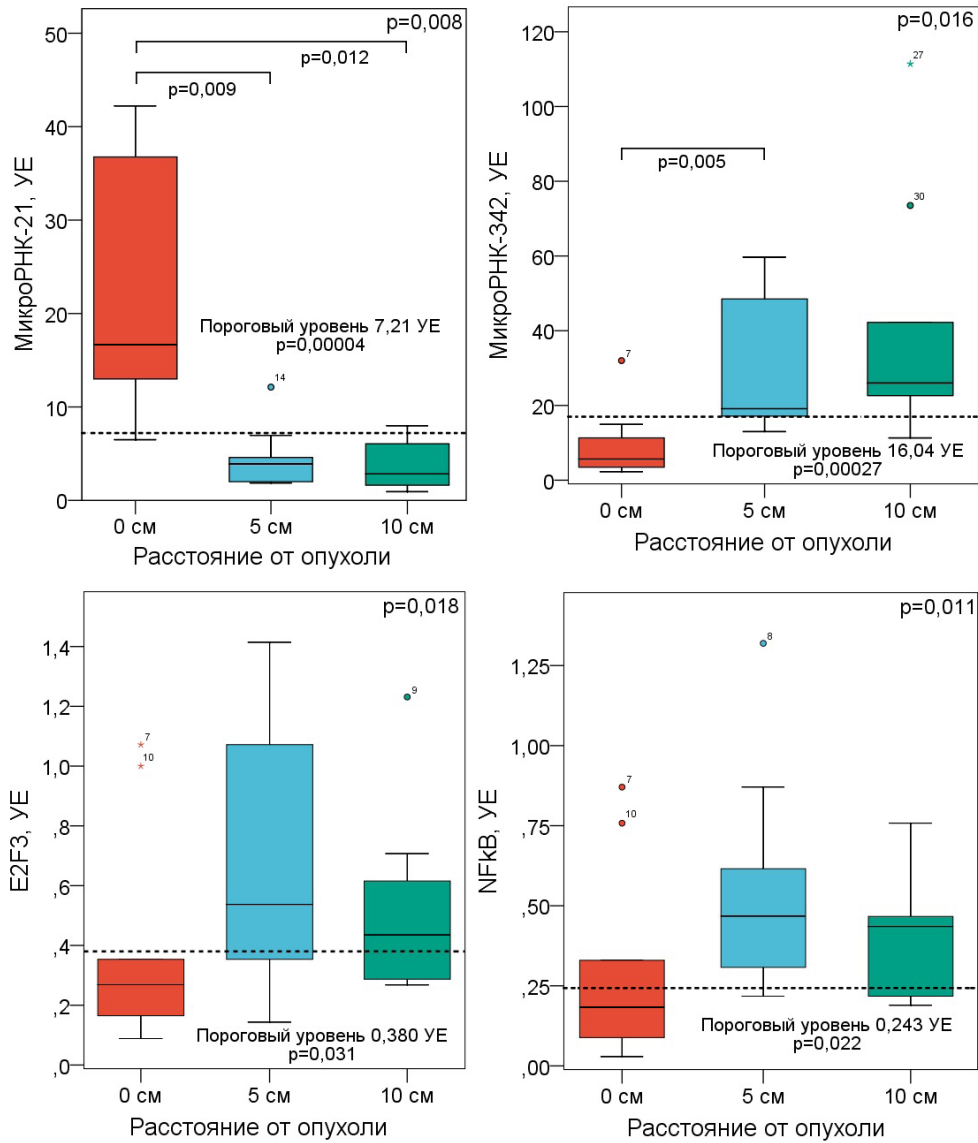


Рис. 2. Уровни экспрессии гена микроРНК-21, микроРНК-342, E2F3 и NFkB в опухолевой ткани (0 см) и здоровой тканях на расстоянии 5 и 10 см, пороговые уровни экспрессии гена микроРНК-21, микроРНК-342, E2F3 и NFkB
 Fig. 2. Gene expression levels of *microRNA-21*, *microRNA-342*, E2F3 and NFkB in tumor tissue (0 cm) and healthy tissue at 5 and 10 cm, threshold gene expression levels of *microRNA-21*, *microRNA-342*, E2F3 and NFkB

Таблица 3. Диагностическая ценность изученных пороговых уровней экспрессий генов

Ген	<i>МикроРНК-21</i>	<i>МикроРНК-342</i>	<i>E2F3</i>	<i>NFκB</i>	
AUC	0,971	0,918	0,75	0,763	
95 % ДИ	Нижняя граница	0,92	0,794	0,542	0,538
	Верхняя граница	1	1	0,953	0,989
Значение p	0,00004	0,0003	0,031	0,022	
Пороговый уровень, УЕ	7,21	16,04	0,38	0,243	
Чувствительность (%)	90	90	80	70	
Специфичность (%)	89,5	84,2	68,4	78,9	
ППЗ (%)	81,8	75	57,1	63,6	
НПЗ (%)	94,4	94,1	86,7	83,3	
Точность (%)	94,7	83,6	50	52,6	

Примечание: AUC (area under curve) — площадь под кривой, ДИ — доверительный интервал, ППЗ — положительное прогностическое значение (истинно положительный результат), НПЗ — негативное прогностическое значение (истинно отрицательный результат), УЕ — условных единиц

Table 3. Diagnostic value of the studied threshold gene expression levels

Gene	<i>miRNA-21</i>	<i>miRNA-342</i>	<i>E2F3</i>	<i>NFκB</i>
AUC	0.971	0.918	0.75	0.763
95 % CI	Lower limit	0.92	0.794	0.538
	Upper limit	1	1	0.989
p Value	0.00004	0.0003	0.031	0.022
Threshold level, REU	7.21	16.04	0.38	0.243
Sensitivity (%)	90	90	80	70
Specificity(%)	89.5	84.2	68.4	78.9
PPV (%)	81.8	75	57.1	63.6
NPV (%)	94.4	94.1	86.7	83.3
Accuracy (%)	94.7	83.6	50	52.6

Note: AUC (area under curve) — area under the curve, CI — confidence interval, PPV — positive predictive value (true positive result), NPV — negative predictive value (true negative result), REU — relative expression unit.

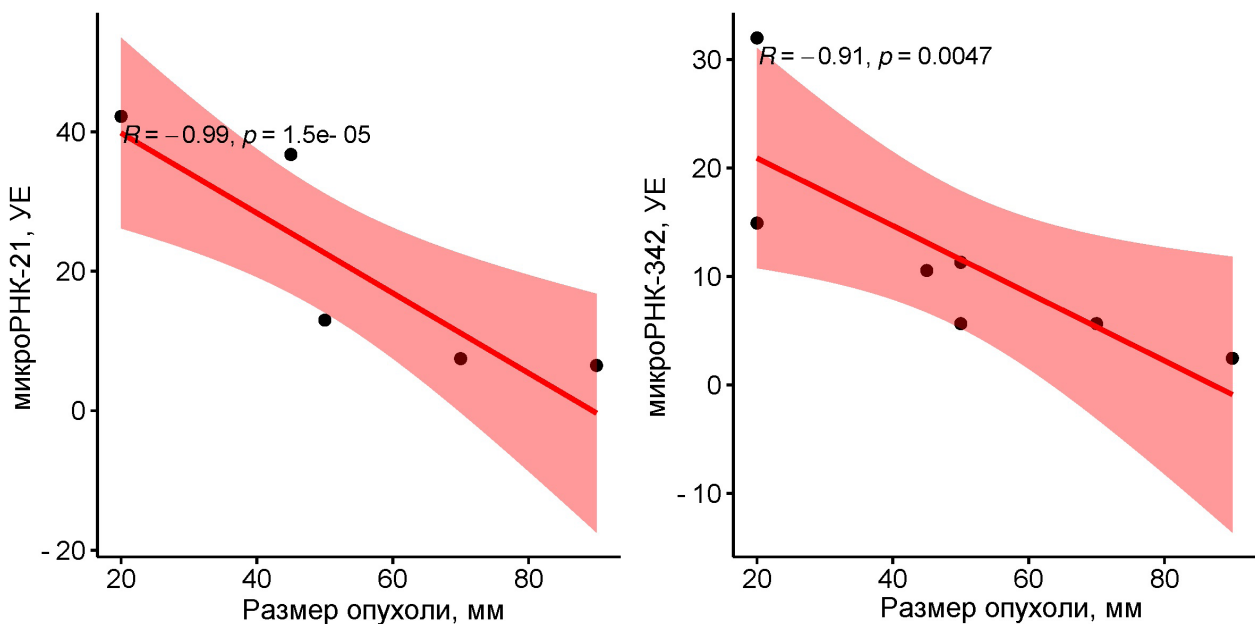


Рис. 3. Корреляция уровня экспрессии микроРНК-21 и микроРНК-342 с размером опухоли
Fig. 3. Correlation of microRNA-21 and microRNA-342 expression levels with tumor size

Уровни экспрессии генов микроРНК-21, микроРНК-342, *E2F3* и *NFkB* в опухолевой ткани и здоровой тканях на расстояниях 5 и 10 см с пороговыми значениями представлены на рис. 2.

Перекрестный сравнительный анализ клинических данных и уровней экспрессии генов. При корреляционном анализе клинических данных и уровней экспрессии исследуемых генов обнаружены статистически значимые корреляции.

Выявлена отрицательная корреляция между размером опухоли и уровнем экспрессии генов микроРНК-21 и микроРНК-342 в опухоли (микроРНК-21 (0 см) и микроРНК-342 (0 см)) ($r = -0,991$, $p = 0,000015$ и $r = -0,908$, $p = 0,005$ соответственно) (рис. 3).

Также найдена отрицательная корреляция между стадией и уровнем микроРНК-342 (0 см) ($r = -0,830$, $p = 0,011$) и положительная корреляция с уровнем *E2F1* на расстоянии 5 см от опухоли (*E2F1* (5 см)) ($r = 0,779$, $p = 0,023$).

Перекрестный сравнительный анализ уровня экспрессии генов. При многофакторном анализе корреляций уровней экспрессии исследуемых генов между собой обнаружены статистически значимые корреляции.

В ходе анализа корреляций экспрессий генов в опухолевой и здоровой тканях на расстоянии 5 и 10 см выделены группы с множественными корреляциями (см. приложение online). Группа микроРНК-15 и микроРНК-128 имеют 4 положительные корреляции, 5 отрицательных корреляций между микроРНК-128 и *E2F3*, 4 отрицательные корреляции между микроРНК-15 и *EGFR*, 3 отрицательные корреляции микроРНК-15 с *KLF12*, 5 положительных корреляций между *E2F3* и *NFkB*. При анализе корреляций генов только из опухолевых образцов (см. приложение online) обнаружен комплекс генов *KLF12*, *TGFb*, *EGFR*, *MMP9* и *E2F1* с положительными корреляциями друг с другом.

Обсуждение

Настоящая работа посвящена изучению порогового уровня экспрессии генов микроРНК и опухолевого контроля в опухолевой и здоровой ткани на расстоянии 5 и 10 см от опухоли. Были обнаружены значимые различия в экспрессии генов микроРНК-21, микроРНК-342, *E2F3* и *NFkB* в опухолевой и здоровой тканях на расстоянии 5 и 10 см от опухоли. В нашей работе не выявлено различий в экспрессии генов опухолевого контроля *TGFb*, *NFkB*, *KLF-12*, *EGFR* и *MMP9*, а также экспрессии генов микроРНК-15, -16, -34, -126, -128 и микроРНК-210.

Уровень экспрессии гена микроРНК-21 был выше в опухолевой ткани, по сравнению со здоровой тканью на расстоянии 5 и 10 см от опу-

холи. Аналогичные результаты были получены в прошлой работе [24]. Определен пороговый уровень экспрессии гена микроРНК-21 равный 7,21 УЕ. Экспрессия гена микроРНК-21 выше этого уровня в здоровой ткани может говорить о наличии потенциала развития опухоли в данной области. Это лишь пилотное исследование, однако выявление повышения микроРНК-21 в здоровой ткани кишечника может диктовать необходимость более тщательного наблюдения за такими пациентами в будущем. Также в нашей работе было обнаружено, что уровень экспрессии гена микроРНК-21 в опухолевой ткани обратно коррелировал с размером опухоли (рис. 3). Это можно объяснить тем, что чем больше опухоль, тем меньше в ней делящихся клеток [25]. Основное деление опухолевых клеток может происходить на периферии опухоли, а не в ее центре и сопровождается повышением уровня микроРНК-21. Однако по мере роста опухоли относительная доля делящихся клеток может снижаться так же, как и уровень микроРНК-21. Учитывая все вышесказанное, микроРНК-21 может иметь важную роль на ранних стадиях развития опухоли, а также в «горячих» метастазах, где происходит большое количество делений.

Уровень экспрессии гена микроРНК-342 был ниже в опухолевой ткани, по сравнению со здоровой тканью на расстоянии 5 и 10 см от опухоли. Определено пороговое значение экспрессии гена микроРНК-342 равное 16,04 УЕ. Уменьшение активности гена микроРНК-342 ниже этого значения в перифокальной от опухоли ткани потенциально может способствовать распространению опухолевого процесса [19, 20]. Обнаружено, что чем больше был размер опухоли, тем меньше в ней уровень экспрессии гена микроРНК-342 (рис. 3). В последующем следует попробовать использовать определение уровня микроРНК-342 в первичной опухолевой ткани в качестве прогностического маркера.

Изменение экспрессии генов опухолевого контроля может способствовать началу и развитию опухолевого процесса. Уровень экспрессии *E2F3* в опухолевой ткани оказался ниже, чем в здоровой ткани, с порогом 0,38 УЕ. Гиперэкспрессия *E2F3* в опухолевых тканях КРР связано с повышенной пролиферацией и плохим прогнозом [7]. Гиперэкспрессия *E2F3* и пролиферация клеток здоровой ткани может быть риском опухолевого перерождения и прогрессирования.

Уровень экспрессии *NFkB* в опухолевой ткани оказался ниже, чем в здоровой ткани, с порогом 0,243 УЕ. *NFkB* связан с поддержанием миграции и выживании опухолевых клеток [9]. Повышенный уровень *NFkB* в здоровых тканях может способствовать развитию опухолевого процесса.

При анализе корреляций уровня экспрессии генов микроРНК и опухолевого контроля (см. приложение online) выделены групповые закономерности. Группа с экспрессией генов микроРНК-15 и микроРНК-128 имеют 4 положительные корреляции между собой. Это соотносится с их общей опухоль-супрессирующей ролью [15, 18]. Выявлено 5 отрицательных корреляций между микроРНК-128 и *E2F3*. Это может подтверждать их противоположные функции в канцерогенезе КРР [7, 18]. При анализе корреляций только в опухолевом материале (см. приложение online) к обнаружена группа *KLF12*, *TGFB*, *EGFR*, *MMP9* и *E2F1*. Всех их объединяет способность инициировать и поддерживать канцерогенез при КРР.

Таким образом, обнаружены значимые пороговые уровни для экспрессии гена микроРНК-21, микроРНК-342, *E2F3* и *NFkB*, которые могут послужить дополнительным маркером дифференцировки опухолевой ткани от здоровой, а также могут дать дополнительный прогностический потенциал.

Заключение

Обнаружен повышенный уровень экспрессии микроРНК-21 и пониженный уровень экспрессии микроРНК-342, *E2F3* и *NFkB* в опухолевой ткани, по сравнению с здоровой тканью у пациентов с КРР. Определены их пороговые уровни экспрессии для опухолевой ткани. Это дает дополнительную возможность разграничить опухолевую и здоровую ткань на расстоянии 5 и 10 см от опухоли не только морфологически, но и молекулярно-генетически. Гиперэкспрессия микроРНК-21 в опухолевой ткани может сопровождаться опухолевым ростом, включая рост в метастатических очагах, и иметь отрицательный прогностический потенциал. Сниженный уровень экспрессии гена микроРНК-342 в опухолевой ткани кишечника может говорить о распространенном злокачественном процессе и быть связан с плохим прогнозом у пациентов с КРР. Гиперэкспрессия микроРНК-21 и гипоекспрессия микроРНК-342 в здоровой ткани могут быть связаны с повышенным риском локального рецидива и прогрессирования опухоли. Увеличение уровня экспрессии *E2F3* и *NFkB* на расстоянии 5 и 10 см от опухоли может быть предиктором опухолевого изменения, местного рецидива и прогрессирования злокачественного новообразования. Экспрессия гена *E2F3* связана с *NFkB*, который вовлечен в появление устойчивости к химиотерапии, и его гиперэкспрессия может быть негативным прогностическим фактором.

Большое количество корреляций обнаружено в группе *KLF12*, *TGFB*, *EGFR*, *E2F1* и *MMP9*.

Все эти гены способствуют развитию и прогрессированию КРР. В будущих исследованиях стоит учитывать результаты экспрессии этих генов в комплексе.

Комплексный анализ экспрессий генов микроРНК и опухолевого контроля в опухолевой и здоровой ткани на до- или интраоперационном этапах может иметь прогностический потенциал. Вероятно, чем больше разница между экспрессионными панелями опухолевой и здоровой тканей, тем меньше риск возникновения локальных рецидивов.

Полученные результаты могут быть основой для будущих клинических исследований, определяющих прогностическую и предиктивную значимость экспрессионных панелей генов, которые участвуют в канцерогенезе КРР, в опухолевой, здоровой тканях кишечника, а также метастатических очагах.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование осуществлено согласно Хельсинкской декларации в редакции 2013 г. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова, № 261 от 31.01.2022. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki (2013). The study was approved by the ethics committee of the N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, Protocol No 261, dated 31.02.2022. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Финансирование

Работа проводилась без привлечения финансирования в рамках темы Госзадания «Значение феномена коэкспрессии генов микроРНК и факторов транскрипции сигнальных путей *NFkB* и *KLF* в реализации патологических процессов».

Financing

The work was carried out without funding as part of the State Assignment «The significance of the phenomenon of co-expression of microRNA genes and transcription factors of the *NFkB* and *KLF* signalling pathways in the implementation of pathological processes».

Участие авторов

Служев М.И., Зарайский М.И. — разработка концепции научной работы, составление черновика рукописи; Семиглазов В.В., Ткаченко Е.В. — анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания; Семиглазова Т.Ю. — окончательное утверждение публикуемой версии рукописи; Кондратьев С.В., Бриш Н.А., Алексеева Ю.В. — критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания;

Абасова С.В., Козюкалов А.С., Петрик Ю.В., Сидорова А.Н. — существенный вклад в получение и анализ результатов данной работы.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

Authors' contributions

Sluzhev M.I., Zaraiskii M.I. — developed the concept of the scientific work and compiled a draft manuscript;

Semiglazov V.V., Tkachenko E.V. — analyzed the scientific work and critically revised it, introducing valuable intellectual content;

Semiglazova T.Yu. — gave final approval of the published version of the manuscript;

Kondratev S.V., Brish N.A., Alekseeva Yu.V. — critically revised the manuscript, introducing valuable intellectual content;

Abasova S.V., Kozyukalov A.S., Petrik I.V., Sidorova A.N. — made a significant contribution to obtaining and analyzing work results.

All authors approved the final version of the article before publication and agreed to be responsible for all aspects of the work, ensuring proper study and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2022: 252.-URL: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2021/10/zabol.-i-smertn.-2019-elektr.versiya.pdf>. [Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O. Malignant neoplasms in Russia in 2021 (morbidity and mortality). Moscow: P.A. Herzen MNIIOI - branch of FGBU «NMRC Radiology» of the Ministry of Health of Russia. 2022: 252.-URL: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2021/10/zabol.-i-smertn.-2019-elektr.versiya.pdf>. (In Rus)].
- Kim J., Kim H., Lee M.S., et al. Transcriptomes of the tumor-adjacent normal tissues are more informative than tumors in predicting recurrence in colorectal cancer patients. *J Transl Med.* 2023; 21(1): 209.-DOI: 10.1186/s12967-023-04053-2.
- Lin D., Fan W., Zhang R., et al. Molecular subtype identification and prognosis stratification by a metabolism-related gene expression signature in colorectal cancer. *J Transl Med.* 2021; 19(1): 279.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02952-w>.
- Shen X., Su Z., Dou Y., Song X. A novel investigation into an E2F transcription factor-related prognostic model with seven signatures for colon cancer patients. *IET Syst Biol.* 2023; 17(4): 187-97.-DOI: <https://doi.org/10.1049/syb2.12069>.
- Xanthoulis A., Kotsinas A., Tiniakos D., et al. The relationship between E2F family members and tumor growth in colorectal adenocarcinomas: a comparative immunohistochemical study of 100 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014; 22(6): 471-7.-DOI: <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3182598198>.
- Yao H., Lu F., Shao Y. The E2F family as potential biomarkers and therapeutic targets in colon cancer. *PeerJ.* 2020; 8: e8562.-DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.8562>.
- Shamekhi S., Abdolalizadeh J., Ostadrahimi A., et al. Apoptotic effect of *saccharomyces cerevisiae* on human colon cancer SW480 cells by regulation of Akt/NF- κ B signaling pathway. *Probiotics & Antimicro Prot.* 2020; 12(1): 311-9.-DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09528-7>.
- Jana A., Krett N.L., Guzman G., et al. NF κ B is essential for activin-induced colorectal cancer migration via upregulation of PI3K-MDM2 pathway. *Oncotarget.* 2017; 8(23): 37377-93.-DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16343>.
- Murphrey M.B., Quaim L., Varacallo M. Biochemistry, epidermal growth factor receptor. in: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2023 (2023.09.30).-URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482459/>.
- del Carmen S., Corchete L.A., Gervas R., et al. Prognostic implications of EGFR protein expression in sporadic colorectal tumors: Correlation with copy number status, mRNA levels and miRNA regulation. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 4662.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61688-7>.
- Wu C.C., Hou B.C., Yang Y.H., et al. Circ_0084188 promotes colorectal cancer progression by sponging miR-654-3p and regulating kruppel-like factor 12. *KJMS.* 2023. (30.09.2023).-URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/kjm2.12749>.
- Li Z.L., Wang Z.J., Wei G.H., et al. Changes in extracellular matrix in different stages of colorectal cancer and their effects on proliferation of cancer cells. *WJGO.* 2020; 12(3): 267-75.-DOI: <https://doi.org/10.4251/wjgo.v12.i3.267>.
- Jiang K., Chen H., Fang Y., et al. Exosomal ANGPTL1 attenuates colorectal cancer liver metastasis by regulating Kupffer cell secretion pattern and impeding MMP9 induced vascular leakiness. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021; 40(1): 21.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01816-3>.
- Liu L., Wang D., Qiu Y., et al. Overexpression of microRNA-15 increases the chemosensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil and oxaliplatin by inhibiting the nuclear factor- κ B signalling pathway and inducing apoptosis. *Exp Ther Med.* 2017. (15.07.2021).-URL: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2017.5675>.
- Kim N.H., Kim H.S., Kim N.G., et al. p53 and MicroRNA-34 are suppressors of canonical wnt signaling. *Sci Signal.* 2011; 4(197): ra71-ra71.-DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001744>.
- Huang M.Y., Yuan W., Wu S., et al. RhoA: The key signaling pathway of microRNA-126 in suppressing the epithelial-mesenchymal transition, proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2017: 133-133.
- Chang Y., Zhang Q., Dong Z., et al. MicroRNA-128 inhibits the development of human colon cancer by targeting Rho family GTPase 3. *J Taibah Univ SCI.* 2022; 16(1): 139-46.-DOI: <https://doi.org/10.1080/16583655.2022.2027692>.
- Yang H., Li Q., Niu J., et al. microRNA-342-5p and miR-608 inhibit colon cancer tumorigenesis by targeting NAA10. *Oncotarget.* 2016; 7(3): 2709-20.-DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6458>.
- Kashani E., Hadizadeh M., Chaleshi V., et al. The differential DNA hypermethylation patterns of microRNA-137 and microRNA-342 locus in early colorectal lesions and tumours. *Biomolecules.* 2019; 9(10): 519.-DOI: <https://doi.org/10.3390/biom9100519>.
- Zhang W., Zhou F., Jiang D., et al. Association of the expression level of miR-16 with prognosis of solid cancer patients: a meta-analysis and bioinformatic analysis. *Dis Markers.* 2020; 2020: 1-9.-DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8815270>.

21. You C., Jin L., Xu Q., et al. Expression of miR-21 and miR-138 in colon cancer and its effect on cell proliferation and prognosis. *Oncol Lett.* 2019; 17(2): 2271-7.-DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9864>.
22. Sabry D., El-Deek S.E.M., Maher M., et al. Role of miRNA-210, miRNA-21 and miRNA-126 as diagnostic biomarkers in colorectal carcinoma: impact of HIF-1 α -VEGF signaling pathway. *Mol Cell Biochem.* 2019; 454(1): 177-89.-DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3462-1>.
23. Sazanov A.A., Kiselyova E.V., Zakharenko A.A., et al. Plasma and saliva miR-21 expression in colorectal cancer patients. *J Appl Genetics.* 2017; 58(2): 231-7.-DOI: <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0379-9>.
24. Служев М.И., Зарайский М.И., Семиглазов В.В., et al. Сравнительный анализ профилей экспрессии генов опухолевого контроля и микроРНК в опухолевой и перифокальной ткани у пациентов с колоректальным раком. *Сибирский онкологический журнал.* 2022; 21(2): 55-64. [Sluzhev M.I., Zарайский M.I., Semiglazov V.V., et al. Comparative analysis of tumor control gene and microRNA expression profiles in tumor and adjacent tissues in patients with colorectal cancer. *Sib Onkol Zh.* 2022; 21(2): 55-64. (In Rus)].
25. Dang C., Gilewski T.A., Surbone A., Norton L. Growth curve analysis. in: Holland-Frei Cancer Medicine 6th edition. *BC Decker.* 2003. (22.09.2023).-URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13434/>.

Поступила в редакцию / Received / 27.12.2024

Прошла рецензирование / Reviewed / 18.01.2024

Принята к печати / Accepted for publication / 22.02.2024

Сведения об авторах / Author Information / ORCID

Максим Иванович Служев / Maksim I. Sluzhev / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6346-1029>, SPIN-code: 7816-5007.

Михаил Игоревич Зарайский / Michail I. Zaraiskii / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7605-4369>, SPIN-code: 7722-6396.

Владислав Владимирович Семиглазов / Vladislav V. Semiglazov / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8825-5221>, SPIN-code: 6786-9577.

Татьяна Юрьевна Семиглазова / Tatiana Yu. Semiglazova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4305-6691>, SPIN-code: 9773-3759.

Елена Викторовна Ткаченко / Elena V. Tkachenko / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6375-8335>, SPIN-code: 3925-8660.

Сергей Вальерьевич Кондратьев / Sergei V. Kondratev / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7266-1604>.

Надежда Александровна Бриш / Nadezhda A. Brish / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6995-1048>, SPIN-code: 4291-9496.

Юлия Владимировна Алексеева / Yuliya V. Alekseeva / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5609-1237>, SPIN-code: 5787-5740.

Сакият Валериевна Абасова / Sakiyat V. Abasova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0235-5879>.

Александр Сергеевич Козюкалов / Aleksandr S. Kozyukalov / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0005-7895-3383>.

Юрий Владимирович Петрик / Iurii V. Petrik / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0538-7369>, SPIN-code: 2559-4294.

Александра Николаевна Сидорова / Aleksandra N. Sidorova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8286-8302>, SPIN-code: 9022-4125.

