

Для цитирования: Кручинина М.В., Кручинин В.Н., Громов А.А., Шашков М.В., Соколова А.С., Яковина И.Н., Шестов А.А. Жирные кислоты мембран эритроцитов и сыворотки крови как биомаркеры для диагностики ранних стадий колоректального рака. Сибирский онкологический журнал. 2022; 21(2): 65–80. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-65-80
For citation: Kruchinina M.V., Kruchinin V.N., Gromov A.A., Shashkov M.V., Sokolova A.S., Yakovina I.N., Shestov A.A. Fatty acids of erythrocyte membranes and blood serum as biomarkers for early detection of colorectal cancer. Siberian Journal of Oncology. 2022; 21(2): 65–80. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-65-80

ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И СЫВОРОТКИ КРОВИ КАК БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАННИХ СТАДИЙ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

М.В. Кручинина^{1,2}, В.Н. Кручинин³, А.А. Громов¹, М.В. Шашков⁴,
А.С. Соколова⁵, И.Н. Яковина⁶, А.А. Шестов⁷

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»,
г. Новосибирск, Россия¹

Россия, 630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1. E-mail: kruchmargo@yandex.ru¹

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,
г. Новосибирск, Россия.²

Россия, 630091, г. Новосибирск, ул. Красный проспект, 52²

ФГБНУ «Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН», г. Новосибирск, Россия³

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 13³

ФГБНУ «Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН», г. Новосибирск, Россия⁴

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 5⁴

ФГБНУ «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН»,
г. Новосибирск, Россия⁵

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 9⁵

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный технический университет», г. Новосибирск, Россия⁶

Россия, 630073, г. Новосибирск, пр. К. Маркса, 20⁶

Медицинский факультет Перельмана, Университет Пенсильвании, г. Филадельфия, США⁷

США, 3400, г. Филадельфия, Civic Center Blvd⁷

Аннотация

Цель исследования – выявить перечень жирных кислот (ЖК) мембран эритроцитов и сыворотки крови, которые могут служить потенциальными биомаркерами ранних стадий колоректального рака. **Материал и методы.** Обследованы 65 пациентов с KPP I–II стадий (средний возраст – 63,3 ± 9,6 года), из них 30 мужчин, 35 женщин, и 35 человек группы сравнения, сопоставимых по возрасту и полу. Исследование состава жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови проведено с помощью ГХ/МС системы на основе трех квадруплей Agilent 7000B (США). Для статистической обработки использованы методы программного обеспечения MATLAB (R2019a, MathWorks) и языка программирования R: Т-тест, анализ главных компонент (PCA), Fold Change, Volcano plot, метод машинного обучения (Random Forest), ROC-анализ, построение тепловых карт (Heatmap). **Результаты.** У пациентов с KPP I–II стадий выявлено снижение уровней насыщенных, отдельных мононенасыщенных и высокодостоверное повышение большей части уровней полиненасыщенных ЖК с преобладанием омега-3. Для большей части уровней жирных кислот достоверные различия в группах касались мембран эритроцитов с той же тенденцией в сыворотке крови. Уровни эритроцитарных миристиновой, пентадекановой, 7-пальмитолеиновой, отношения насыщенные/полиненасыщенные ЖК (содержание которых достоверно ниже при KPP I–II стадий, чем в контроле) и уровни α-линоленовой, эйкозапентаеновой, докозапентаеновой, докозагексаеновой, суммы омега-3 ЖК, EPA + DHA, докодиеновой, дигомо-γ-линоленовой, докозатетраеновой ЖК (содержание которых достоверно выше при KPP, чем у здоровых) являются дифференцирующими при различии больных KPP I–II стадий и здоровых лиц. В сыворотке крови уровень биомаркеров имели следующие ЖК: арахидоновая, миристиновая, докозагексаеновая, сумма омега-3 ПНЖК, отношение омега-6/омега-3 ПНЖК, пентадекановая, докозапентаеновая и докодиеновая. Модель, включающая перечень жирных кислот (C14:0, C15:0, C16:1;7, C18:3 n-3, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C20:5 n-3, C22:4 n-6, C22:5 n-3, C22:6 n-3, сумма омега-3, омега-3(EPA + DHA), отношение насыщенные/полиненасыщенные

ЖК, обеспечила AUC 0,916 со специфичностью 0,90, чувствительностью 0,95 при различении пациентов с KPP I–II стадий от здоровых лиц. **Заключение.** Изучение уровней и соотношений жирных кислот в мембранах эритроцитов и сыворотке крови следует считать перспективным направлением в поиске биомаркеров для ранней диагностики KPP.

Ключевые слова: ранняя диагностика, колоректальный рак, жирные кислоты, липидомика, эритроциты, сыворотка крови.

FATTY ACIDS OF ERYTHROCYTE MEMBRANES AND BLOOD SERUM AS BIOMARKERS FOR EARLY DETECTION OF COLORECTAL CANCER

M.V. Kruchinina^{1,2}, V.N. Kruchinin³, A.A. Gromov¹, M.V. Shashkov⁴,
A.S. Sokolova⁵, I.N. Yakovina⁶, A.A. Shestov⁷

Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia¹

175/1, B. Bogatkova St., 630089, Novosibirsk, Russia. E-mail: kruchmargo@yandex.ru¹

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia²

52, Krasny Prospect, 630091, Novosibirsk, Russia²

Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia³

13, Ac. Lavrentieva Ave., 630090, Novosibirsk, Russia³

Boreskov Institute of Catalysis, Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia⁴

5, Ac. Lavrentieva Ave., 630090, Novosibirsk, Russia⁴

N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia⁵

9, Ac. Lavrentieva Ave., 630090, Novosibirsk, Russia⁵

Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia⁶

20, K. Marx Ave., 630073, Novosibirsk, Russia⁶

Perelman Center for Advanced Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA⁷

Civic Center Blvd, 3400, Philadelphia, USA⁷

Abstract

The aim of the study was to identify fatty acids (FA) of erythrocyte membranes and blood serum, which can serve as potential biomarkers for early detection of colorectal cancer. **Material and Methods.** The study involved 65 patients with stage I-II CRC (mean age $63,3 \pm 9,6$ years (30 men, 35 women) and 35 people in the comparison group, matched by age and sex. The composition of fatty acids of erythrocyte membranes and blood serum was studied using a GC/MS system based on three Agilent 7000B quadrupoles (USA). Methods of the MATLAB software (R2019a, MathWorks) and the R programming language were used for statistical processing: T-test, unsupervised principal component analysis (PCA), Fold Change, Volcano plot, machine learning method (Random Forest), ROC analysis, Heatmaps. **Results.** Patients with stage I-II CRC showed a decrease in the level of saturated, individual monounsaturated fatty acids and a highly significant increase in the most of the polyunsaturated fatty acids with a predominance of omega-3. For most of the fatty acid levels, significant differences in erythrocyte membranes and serum between the groups were found. The levels of erythrocyte myristic, pentadecanoic, 7-palmitoleic, saturated/polyunsaturated FA ratios (the content of which was significantly lower at stages I-II CRC than those in the control) and the levels of α -linolenic, eicosapentaenoic, docosapentaenoic, docosahexaenoic, the amount of omega-3 FA, EPA + DHA, docodienic, dihomo- γ -linolenic, docatetraenoic fatty acids (the content of which was significantly higher in colorectal cancer than those in healthy subjects) were the most discriminating parameters in distinguishing patients with I-II stage CRC and healthy individuals. In the blood serum, the level of biomarkers had the following fatty acids: arachidonic, myristic, docosahexaenoic, the amount of omega 3 PUFA, the ratio of omega 6/omega 3 PUFA, pentadecanoic, docosapentaenoic, and docodiene. A model that included a list of fatty acids, such as C14:0, C15:0, C16:1; 7, C18:3 n-3, C20: 2 n-6, C20:3 n-6, C20:5 n-3, C22:4 n-6, C22:5 n-3, C22:6 n-3, sum of omega-3, omega-3 (EPA + DHA), and saturated / polyunsaturated fatty acids ratio provided AUC 0,916 with a specificity of 0,90 and sensitivity of 0,95 in distinguishing patients with stage I-II CRC from healthy individuals. **Conclusion.** The study of the levels and ratios of fatty acids in erythrocyte membranes and blood serum should be considered a promising trend in the search for biomarkers for the early diagnosis of colorectal cancer.

Key words: early diagnostics, colorectal cancer, fatty acids, lipidomics, erythrocytes, blood serum.

Введение

В мире колоректальный рак (КРР) является 3-м по распространенности типом рака и 4-й ведущей причиной смерти от рака [1]. Около 85 % КРР считаются спорадическими, и развитие рака с прогрессией от аденомы до инвазивного рака обычно занимает около 10 лет [2]. Ранняя диагностика является ключом к долгосрочному выживанию пациентов. Из-за отсутствия методов ранней диагностики менее 40 % пациентов с КРР выявляются на ранней стадии. Колоноскопия является золотым стандартом для точной диагностики КРР, но ее инвазивный характер, высокая стоимость, иногда труднодоступность ограничивают ее широкое применение [3]. В клинической практике также используются некоторые биомаркеры опухоли, такие как раковоэмбриональный антиген (РЭА), опухолевая М2-пируваткиназа кала, анализ кала на скрытую кровь (FOBT), однако недостаточная чувствительность и специфичность, эпизодичность истечения крови из новообразования или его отсутствие снижают эффективность данных методов диагностики [4]. Поэтому разработка эффективных молекулярных биомаркеров для диагностики ранних стадий КРР и предрака становится все более важной.

Рак как метаболическое заболевание характеризуется биохимическими превращениями в клетках, необходимыми для поддержания их более высоких пролиферативных показателей и противодействия сигналам гибели клеток с измененным потоком по ключевым метаболическим путям, таким как гликолиз и цикл трикарбоновых кислот. Метабомика позволяет количественно измерить динамический многопараметрический метаболический ответ живых систем на патофизиологические стимулы или генетическую модификацию. Эта технология широко использовалась для идентификации биомаркеров на основе метаболитов при различных формах рака [5–7].

Состав жирных кислот (ЖК) сывороточных липидов считается надежным показателем, отражающим потребление ЖК в течение нескольких недель или месяцев [8, 9]. Изменения состава ЖК в эритроцитах происходят в более отдаленные сроки, чем в сыворотке крови [10]. Несмотря на то, что в литературе имеются сведения о связи заболевания КРР с составом, а также с уровнем ЖК в сыворотке и мембранах эритроцитов [11–13], неясно, возможно ли использование отдельных видов ЖК как биомаркеров в диагностике ранних стадий КРР и предрака.

Цель исследования – выявить перечень жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови, которые могут служить потенциальными биомаркерами ранних стадий колоректального рака.

Материал и методы

Обследованы 65 пациентов с впервые выявленным КРР I–II стадий: I стадия – у 12, II – у 53

больных, из них 30 мужчин, 35 женщин (средний возраст – $63,3 \pm 9,6$ года), и 35 человек группы сравнения, сопоставимых по возрасту и полу (средний возраст – $61,7 \pm 7,5$ года, 18 мужчин, 17 женщин). Больные КРР наблюдались в ГБУЗ НСО «Новосибирский областной онкологический диспансер» и обследованы в соответствии с существующими клиническими рекомендациями, включая методы визуализации, маркеры опухоли в сыворотке крови и кале, с обязательным гистологическим подтверждением диагноза (у 44 больных – умереннодифференцированная, у 6 – высокодифференцированная, у 3 – низкодифференцированная аденокарцинома). Обследованные не принимали препараты и пищевые добавки, содержащие полиненасыщенные жирные кислоты. Стадия опухоли толстой кишки уточнена после операции при морфологическом исследовании операционного материала с учетом наличия метастазов в регионарных лимфатических узлах или обнаружения отдаленных метастазов в соответствии с классификацией по TNM.

Опухоли локализовались в различных отделах кишки: в слепой кишке ($n=7$), восходящем отделе ($n=2$) и поперечно-ободочной кишке ($n=4$), нисходящем отделе и в сигмовидной кишке ($n=17$), в прямой кишке ($n=32$). У 3 пациентов с КРР диагностирована первично-множественная локализация образований в толстой кишке.

В качестве группы сравнения были отобраны лица, у которых при обследовании в ГБУЗ НСО «НООД» и НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Новосибирск-Главный ОАО «РЖД» были исключены злокачественные новообразования, без манифестирующей патологии внутренних органов. Пациенты исключались из исследования, если они получали какие-либо добавки омега-3 полиненасыщенных жирных кислот или статины, имели гиперлипидемию, которая могла потребовать лекарственной коррекции, какие-либо значительные отклонения, по данным исследования общего анализа крови или биохимии, или имели холестериновые камни в желчном пузыре, поскольку эти факторы оказывают существенное влияние на профиль ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов [8]. Лица, включенные в группу сравнения, вели здоровый образ жизни, в большинстве не курили, употребляли алкоголь в дозах, не превышающих 20 г в сут в пересчете на чистый этанол, не чаще 1–2 раз в течение месяца.

Индекс массы тела (ИМТ) высчитывался как масса тела (кг)/рост (в метрах в квадрате). Курение и употребление алкоголя представлены как статус текущего употребления (Т), употребления в прошлом (П) и отсутствие вообще (О) – Т/П/О в процентах от общего числа лиц в группе. Показатели красной крови, биохимические параметры определены стандартными методами.

Забор крови у пациентов и ее исследование осуществляли при поступлении в стационар до прове-

дения всех видов терапии после ночного голодания (12–14 ч): 8–9 мл – в пробирку без антикоагулянта для получения сыворотки и 8–9 мл – в пробирку с 3,8 % раствором цитрата натрия (0,129 моль/л, соотношение цитрата к количеству крови 1:9) для последующего получения взвеси эритроцитов. Для получения сыворотки проводили центрифугирование цельной крови при 2000 об/мин в течение 20 мин, затем сыворотку переносили в пробирки меньшего объема для исследования.

Исследование состава жирных кислот сыворотки крови и мембран эритроцитов (с их предварительным выделением) проведено с помощью газовой хроматографии/масс-спектрометрии – ГХ/МС системы на основе 3 квадрупольной Agilent 7000B (США). Концентрации жирных кислот выражали в относительных процентах. Предел обнаружения жирной кислоты ~1 мкг на образец. Кроме содержания отдельных ЖК, определяли суммарное содержание насыщенных, ненасыщенных, полиненасыщенных (ПНЖК), омега-3 ПНЖК, омега-6 ПНЖК, их соотношения [14]. Подробное описание пробоподготовки для определения состава жирных кислот представлено в работе [15].

Статистическая обработка данных и вычисления с помощью метода машинного обучения (Random Forest) проводились с применением программного обеспечения MATLAB (R2019a, MathWorks) и языка программирования R с использованием стандартных библиотек обучающих классификаций и наборов инструментов статистики. Random Forests – это комбинация предикторов дерева решений. Каждое дерево зависит от значений случайного вектора, выбираемого независимо и с одинаковым распределением для всех деревьев в лесу. Детали и основы метода Random Forests, используемые в этой статье, описаны в публикации [16].

Неконтролируемый анализ главных компонент (РСА) использовался для визуализации изменений в общем метаболическом паттерне между группами и кластеризации групп из-за размера набора данных. РСА выполняли с использованием количественных липидомных данных ГХ-МС. Липидомные тепловые карты (heatmaps) для жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови были созданы на основе количественного анализа данных ГХ-МС для визуализации метаболических паттернов.

Статистически значимые различия были выявлены с использованием двустороннего t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений, в случаях отклонения распределения от нормального использовали непараметрические критерии (U-критерий Манна–Уитни). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05 и значения $p \leq 0,05$ считались значимыми.

Исследование одобрено комитетом биомедицинской этики Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины (29.11.2016; протокол № 123). Все обследуемые подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты

Обследуемые обеих групп не различались по возрасту, полу, индексу массы тела (табл. 1). Вместе с тем, в группе с КРР оказалось больше курящих в настоящем и прошлом, меньше не куривших в течение жизни ($p < 0,0001$). Пациенты с КРР чаще употребляли алкоголь в анамнезе ($p < 0,001$), среди них оказалось достоверно меньше не употребляющих алкоголь ($p < 0,05$). Показатели липидного профиля сыворотки крови достоверно не различались в группах. Выявлены отличия в показателях красной крови: уровни гемоглобина, цветового показателя, гематокрита оказались выше, а количество ретикулоцитов, СОЭ – выше у пациентов с КРР, чем в группе сравнения ($p < 0,0001–0,01$).

Суммарное содержание насыщенных жирных кислот оказалось достоверно ниже в мембранах эритроцитов пациентов с КРР I–II стадий, чем у здоровых лиц ($p = 0,008$), в сыворотке крови отмечена та же тенденция, не достигающая уровня достоверности (табл. 2). При этом уровень миристиновой кислоты C14:0 оказался достоверно ниже как в мембранах эритроцитов ($p < 0,0001$), так и в сыворотке ($p = 0,03$). Для пентадекановой C15:0, гексадекановой C16:0, маргариновой C17:0 кислот достоверное снижение отмечено лишь в мембранах эритроцитов; в сыворотке отмечена та же тенденция. Содержание стеариновой ЖК C18:0 оказалось достоверно ниже в сыворотке крови ($p = 0,04$) с тем же трендом в эритроцитах. Уровень арахидиновой кислоты C20:0 имел тенденцию к снижению в мембранах клеток красной крови и сыворотке у пациентов с КРР по сравнению с контролем.

Суммарное содержание полиненасыщенных ЖК у пациентов с КРР I–II стадий оказалось достоверно выше в мембранах эритроцитов ($p < 0,0001$), с той же тенденцией в сыворотке крови. Подобное повышение обеспечивалось преимущественно за счет полиненасыщенных ЖК (суммарное содержание мононенасыщенных ЖК в группах не различалось), которые оказались достоверно повышенными как в мембранах эритроцитов ($p < 0,0001$), так и в сыворотке крови ($p = 0,02$). Основную роль в обнаруженном преобладании ПНЖК играли омега-3 и омега-6 с большим увеличением первых, что отразилось в снижении соотношения омега-6/омега-3 у пациентов с КРР по сравнению со здоровыми как в мембранах эритроцитов ($p = 0,006$), так и в сыворотке крови ($p < 0,0001$).

Снижение уровня насыщенных и повышение ненасыщенных ЖК сказались на изменении их соотношений – данный индекс оказался достоверно

Таблица 1/Table 1

Показатели общего анализа крови у больных колоректальным раком I–II стадий и лиц группы сравнения
Indicators of the general blood analysis in patients with colorectal cancer stages I–II and healthy controls

Показатель/Indicator	Группа сравнения/ Comparison group (n=35)	Группа больных с ранними стадиями KPP/ Group of patients with early CRC stages (n=65)
Возраст (годы)/Age (years)	61,7 ± 7,5	63,3 ± 9,6
Пол (мужчины/женщины)/Gender (men/women)	18/17	30/35
Курение Т/П/О (%) /Smoking C/P/A (%)	5,7/17,4/ 80	21,5**/33,8**/32,3***
Алкоголь Т/П/О (%) /Alcohol C/P/A (%)	22,8/25,7/57,1	30,7/53,8**/32,3*
Индекс массы тела (кг/м²)/Body mass index (kg/m²)	25,5 ± 3,2	24,8 ± 3,6
Количество эритроцитов (×10 ¹² /л)/ RBC count (×10 ¹² /L)	4,62 ± 0,32	4,41 ± 0,56
Уровень гемоглобина (г/л)/Hemoglobin level (g/l)	142,44 ± 8,29	118,7 ± 22,9***
Цветовой показатель/Color indicator	0,94 ± 0,01	0,89 ± 0,13***
Гематокрит (%) /Hematocrit (%)	44,2 ± 2,1	37,5 ± 10,2**
СОЭ (мм/ ч) /ESR (mm/h)	10,4 ± 3,4	27,9 ± 19,5***
Ретикулоциты (%) /Reticulocytes (%)	0,00 ± 0,00	2,08 ± 1,85
Общий холестерин (мг/дл) /Total cholesterol (mg/dl)	180,8 ± 20,4	182,7 ± 49,8
ХС ЛПВП (мг/дл) /HDL cholesterol (mg/dl)	54,4 ± 10,3	56,47 ± 23,8
ХС ЛПНП (мг/дл) /LDL cholesterol (mg/dl)	95,5 ± 10,1	111,3 ± 11,3
Триглицериды (мг/дл) /Triglycerides (mg/dl)	131,8 ± 41,4	134,6 ± 56,7

Примечание: * – достоверность различий от группы сравнения (p<0,05); ** – p<0,01; *** – p<0,0001; Т/П/О – текущее/прошлое/отсутствие.

Note: * – significance of differences from the comparison group (p<0.05); ** – p<0.01; *** – p<0.0001; C/P/A – current/past/absence.

Таблица 2/Table 2

Уровни жирных кислот в мембранах эритроцитов и сыворотке крови у пациентов с KPP I–II стадий и лиц группы сравнения (M ± SD; Me (25 %; 75 %))

Levels of fatty acids in erythrocyte membranes and blood serum in patients with stage I–II CRC and healthy controls (M ± SD; Me (25 %; 75 %))

Жирные кислоты (%) / Fatty acids (%)	Мембраны эритроцитов/RBC membranes			Сыворотка крови/Blood serum		
	Группа сравнения/ Comparison group (n=35)	Группа KPP I–II стадий/ Group CRC I–II stages (n=65)	Критерий Манна–Уитни/ Mann–Whitney test	Группа сравнения/ Comparison group (n=35)	Группа KPP I–II стадий/ Group CRC I–II stages (n=65)	Критерий Манна–Уитни/ Mann–Whitney test
Омега-6 ПНЖК/ Omega-6 PUFA	22,57 ± 8,14 23,57 (17,9; 27,8)	27,69 ± 6,76 28,78 (23,6; 32,6)	p=0,0001	36,69 ± 8,33 38,48 (31,7; 45,3)	39,50 ± 6,68 40,18 (34,6; 42,7)	p=0,002
Омега-3 ПНЖК (ЭПК+ДГК)/ Omega-3 PUFA (EPA + DHA)	2,58 ± 1,36 2,39 (1,89; 3,14)	3,93 ± 1,63 3,73 (2,71; 5,27)	p=0,0001	1,48 ± 1,05 1,37 (0,61; 1,94)	2,26 ± 1,13 1,89 (1,51; 2,77)	p=0,0001
Омега-6/омега-3 ПНЖК/ Omega-6/omega-3 PUFA	6,58 ± 3,04 5,87 (4,53; 8,11)	5,56 ± 2,31 5,08 (3,87; 6,54)	p=0,006	24,4 ± 17,5 16,74 (14,2; 33,8)	14,95 ± 7,5 14,67 (8,78; 19,04)	p=0,0001
Насыщенные/ненасыщенные жирные кислоты/ Saturated/unsaturated fatty acids	1,43 ± 0,93 1,04 (0,86; 1,97)	1,13 ± 0,69 0,89 (0,78; 1,18)	p=0,014	0,61 ± 0,24 0,55 (0,47; 0,70)	0,56 ± 0,19 0,51 (0,43; 0,59)	p=0,0008
Насыщенные/полиненасыщенные жирные кислоты/ Saturated/polyunsaturated fatty acids	2,36 ± 1,66 1,82 (1,42; 3,01)	1,71 ± 1,03 1,30 (1,14; 1,88)	p=0,001	0,96 ± 0,39 0,94 (0,69; 1,22)	0,84 ± 0,19 0,76 (0,63; 0,92)	p>0,1

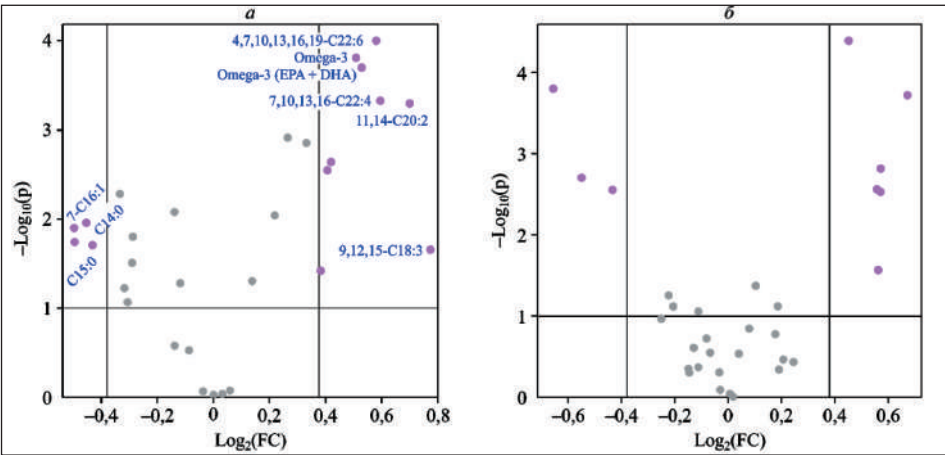


Рис. 1. Использование вулканной диаграммы к уровням ЖК мембран эритроцитов (а) и сыворотки крови (б), их соотношений для различия больных КРР I–II стадий и здоровых лиц. График рассеяния для большого массива данных – это комбинация кратных изменений и t-тестов. Ось x – это log (кратных изменений); ось y – log10 (значение «р») и основана на скорректированных значениях «р»

Fig. 1. The use of the Volcanic diagram to the levels of fatty acids of erythrocyte membranes (a) and blood serum (b), their ratios to distinguish of patients with colorectal cancer I–II stage from healthy individuals. The Volcano plot is a combination of fold change and t-tests. Note, the X-axis is log (Fold Change), Y-axis is – log10 («p» value), and is based FDR adjusted «p» values

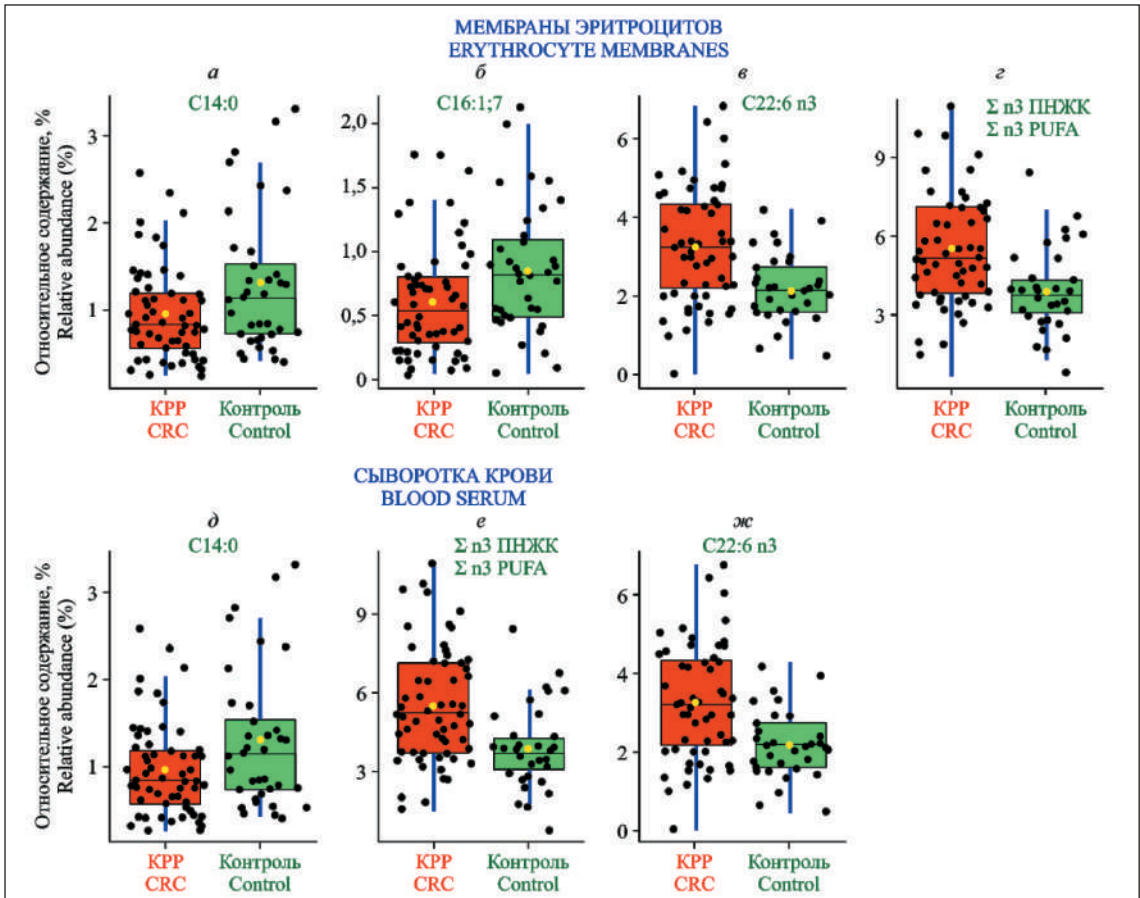


Рис. 2. Уровни ЖК мембран эритроцитов (сверху) и сыворотки крови (снизу), отвечающих критериям биомаркеров, у больных КРР I–II стадий и в группе сравнения. Уровни жирных кислот в мембранах эритроцитов: а – C14:0 (миристиновой); б – C16:1;7 (7-пальмитоолеиновой); в – C22:6 n3 (докозагексаеновой); г – суммарное содержание омега 3 ПНЖК. Уровни ЖК в сыворотке крови: д – C14:0 (миристиновой); е – суммарное содержание омега 3 – ПНЖК; ж – C22:6 n3 (докозагексаеновой)

Fig. 2. Levels of FA of erythrocyte membranes (top) and blood serum (bottom) meeting the criteria for biomarkers in patients with colorectal cancer I–II stage and in the comparison group. Levels of fatty acids in erythrocyte membranes: а – C14:0 (myristic), б – C16:1;7 (7-palmitooleic), в – C22:6 n3 (docosahexaenoic), г – total content of omega 3 PUFA. Serum fatty acids levels: д – C14:0 (myristic), е – total content of omega 3 PUFA, ж – C22:6 n3 (docosahexaenoic)

ниже у пациентов с КРР, чем в контроле, как в эритроцитах, так и в сыворотке крови ($p=0,014$, $p=0,0008$ соответственно). Соотношение насыщенные/полиненасыщенные ЖК было достоверно ниже только в мембранах эритроцитов ($p<0,001$), с той же тенденцией в сыворотке крови.

Анализ уровней отдельных жирных кислот в составе ненасыщенных выявил следующие закономерности. Содержание двух мононенасыщенных ЖК в мембранах эритроцитов C16:1;7 Цис-7-гексадекановой (7-Пальмитоолеиновой) и C16:1;9 Цис-9-гексадекановой (9-Пальмитоолеиновой) оказалось достоверно ниже у пациентов с КРР, чем в контроле ($p<0,001$ и $p=0,003$ соответственно).

Содержание большей части ПНЖК было достоверно выше у пациентов с КРР, чем у здоровых лиц. При этом для докодиеновой C20:2 n-6, арахидоновой C20:4 n-6, докозапентаеновой C22:5 n-3 и докозагексаеновой C22:6 n-3 такое повышение с высокой степенью достоверности выявлено как в мембранах эритроцитов, так и в сыворотке крови. Для ряда других ПНЖК – α -линоленовой

C18:3 n-3, дигомо- γ -линоленовой C20:3 n-6, эйкозапентаеновой C20:5 n-3, докозатетраеновой C22:4 n-6 – достоверное повышение выявлено лишь в мембранах эритроцитов, с той же тенденцией в сыворотке крови.

Таким образом, у пациентов с КРР I–II стадий выявлено снижение насыщенных, отдельных мононенасыщенных и высокодостоверное повышение большей части полиненасыщенных ЖК с преобладанием омега-3. Для большей части уровней жирных кислот достоверные различия в группах касались мембран эритроцитов, с той же тенденцией в сыворотке крови.

На следующем этапе проведено выявление жирных кислот, являющихся значимыми в различении пациентов с КРР I–II стадий от здоровых лиц. Для анализа произведена стандартизация уровней жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови. Использование Т-теста для различения состава ЖК в мембранах эритроцитов и сыворотке крови пациентов с КРР I–II стадий и здоровых позволило получить отчетливое дифференцирование

Таблица 3/Table 3

Жирные кислоты мембран эритроцитов и их соотношения – потенциальные биомаркеры для различения больных КРР I–II стадий и здоровых лиц (данные получены при использовании Volcano plot)

Fatty acids of erythrocyte membranes and their ratios – potential biomarkers for distinguishing between I–II stages of colorectal cancer and healthy individuals (data obtained using the Volcano plot)

Название жирных кислот/ Name of fatty acids	Кратность изменений/ Fold Change (FC)	$\log_2(FC)$	Значения «p»/ «p» values (raw. p val)	$-\log_{10}(p)$
C14:0 Тетрадекановая (Миристиновая)/ Tetradecanoic (Myristic)	0,73083	–0,45238	0,010939	1,961
C15:0 Пентадекановая/Pentadecanoic	0,70887	–0,49641	0,018081	1,7428
C16:1;7 Цис-7-гексадекановая (7-Пальмитоолеиновая)/ cis-7-hexadecanoic (7-Palmitoleic)	0,70948	–0,49516	0,012252	1,9118
C18:3;6,9,12 (n-3) Октадекатриеновая (α -Линоленовая)/ Octadecatrienic (α -linolenic)	1,7134	0,77683	0,021849	1,6606
C20:2;11,14 (n-6) Докодиеновая/Docodienic	1,6252	0,70061	4,9579E-4	3,3047
C20:3;8, 11,14 (n-6) Дигомо- γ -линоленовая/Dihomo- γ -linolenic	1,3284	0,40968	0,0028182	2,55
C20:5;5,8,11,14,17 (n-3) Эйкозапентаеновая/Eicosapentaenoic	1,3028	0,38164	0,037067	1,431
C22:4;7,10,13,16 (n-6) Докозатетраеновая/Docosatetraenoic	1,5109	0,59537	4,7204E-4	3,326
C22:5;7,10,13,16,19 (n-3) Докозапентаеновая/Docosapentaenoic	1,3366	0,41858	0,0022657	2,6448
C22:6;4,7,10,13,16,19 (n-3) Докозагексаеновая/Docosahexaenoic	1,4973	0,58232	9,7487E-5	4,0111
Омега-3 ПНЖК/Omega-3 PUFA	1,4201	0,50599	1,488E-4	3,8274
Омега-3 ПНЖК (ЭПК+ДГК)/ Omega-3 PUFA (EPA + DHA)	1,4431	0,52921	1,984E-4	3,7025
Насыщенные/полиненасыщенные жирные кислоты/ Saturated/polyunsaturated fatty acids	0,73997	–0,43446	0,019511	1,7097

уровней ЖК в исследуемых группах. Применение Fold Change (30%-threshold) для уровней ЖК сыворотки крови подтвердило возможность точного различия метаболитов между группами.

Использование графика рассеяния для большого массива данных (вулканной диаграммы – Volcano plot) позволило выявить 13 параметров – отдельных ЖК мембран эритроцитов и их соотношений, и 9 – сыворотки крови, которые дают возможность точно различить больных KPP I–II стадий от здоровых лиц и могут рассматриваться как потенциальные биомаркеры (рис. 1). На рис. 2 представлены коробчатые диаграммы уровней отдельных ЖК мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с KPP I–II стадий (красный цвет) и у здоровых лиц (зеленый цвет), которые отвечают критериям биомаркеров.

Перечень 13 параметров, представляющих уровни отдельных ЖК мембран эритроцитов и их соотношения, которые отвечают требованиям для дифференцирующих биомаркеров (больные

KPP I–II стадий против здоровых лиц), представлены в табл. 3. Данные получены при применении Volcano plot.

При этом уровни эритроцитарных миристиновой, пентадекановой, 7-пальмитолеиновой, отношения насыщенные/полиненасыщенные ЖК (содержание которых достоверно ниже при KPP I–II стадий, чем в контроле) и уровни α -линоленовой, эйкозапентаеновой, докозапентаеновой, докозагексаеновой, суммы омега-3 ПНЖК, эйкозапентаеновой+докозапентаеновой (EPA + DHA), докодиеновой, дигомо- γ -линоленовой, докозатетраеновой ЖК (содержание которых достоверно выше при KPP, чем у здоровых) являются дифференцирующими при различии больных KPP I–II стадий от здоровых лиц. Коробчатые диаграммы для отдельных ЖК, претендующих на роль биомаркеров, представлены на рис. 3 (уровни ЖК показаны до и после нормализации).

Уровни 9 ЖК сыворотки крови, которые дифференцируют пациентов с KPP I–II стадий от здоровых лиц, представлены в табл. 4. В сыворотке крови уровень биомаркеров для различия больных KPP I–II стадий от здоровых лиц имели следующие ЖК: арахидоновая, миристиновая, докозагексаеновая, сумма омега-3 ПНЖК, отношение омега-6 к омега-3 ПНЖК, пентадекановая, докозапентаеновая и докодиеновая. Пример нормализации уровня арахидоновой кислоты сыворотки крови представлен на рис. 4.

Корреляции уровней жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с ранними стадиями KPP между собой представлены на рис. 5. Выявлено наличие кластеров ЖК с высокой и очень высокой силой положительной связи: суммарные содержания ненасыщенных, полиненасыщенных, омега-3, омега-6, EPA+DHA, C20:4 n-6, C22:5 n-3, C22:6 n-3 коррелировали между собой. Напротив, отношения насыщенные/ненасыщенные, насыщенные/полиненасыщенные, сумма насыщенных ЖК, C18:0, C20:0 отрицательно коррелировали с суммой мононенасыщенных ЖК.

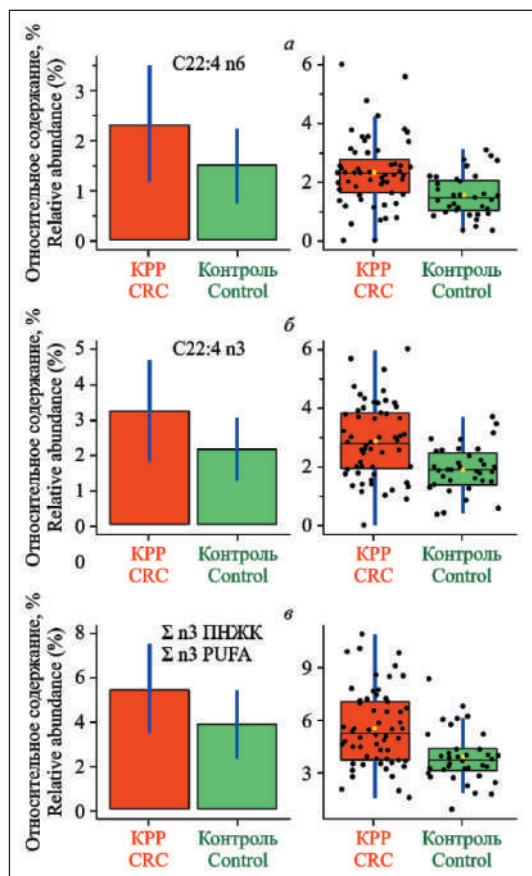


Рис. 3. Коробчатые диаграммы уровней докозатетраеновой (а), докозагексаеновой (б), суммы омега-3 ПНЖК (в) в мембранах эритроцитов у пациентов с I–II стадиями KPP (красные столбцы) и здоровых лиц (зеленые столбцы) (представлены начальные данные – рисунки слева и нормализованные – рисунки справа)

Fig. 3. Box diagrams of levels of docosahexaenoic (a), docosapentaenoic (b), total content of omega-3 PUFA (c) in erythrocyte membranes in patients with colorectal cancer I–II stage (red columns) and healthy individuals (green columns) (initial data – figures on the left and normalized – figures on the right)

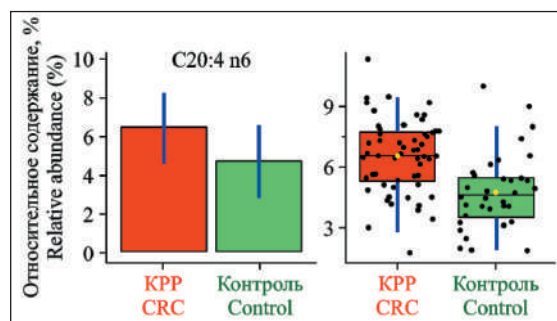


Рис. 4. Пример нормализации уровня арахидоновой кислоты сыворотки крови (слева – уровни до, справа – после нормализации значений)

Fig. 4. An example of normalization of serum arachidonic acid levels (on the left – the levels before, on the right – after the normalization of values)

Таблица 4/Table 4

Жирные кислоты сыворотки крови и их соотношения – потенциальные биомаркеры для различения больных KPP I–II стадий и здоровых лиц (данные получены при использовании Volcano plot)

Serum fatty acids and their ratios – potential biomarkers for distinguishing between colorectal cancer stage I–II and healthy individuals (data obtained using the Volcano plot)

Название жирных кислот/ Name of fatty acids	Кратность изменений/ Fold Change (FC)	log ₂ (FC)	Значения «p»/ «p» values (raw. p val)	–log ₁₀ (p)
C20:4;5,8,11,14 (n-6) Эйкозатетраеновая (Арахидоновая)/ Eicosatetraenoic (Arachidonic)	1,3652	0,44906	3,9083E-5	4,408
C14:0 Тетрадекановая (Миристиновая)/ Tetradecanoic (Myristic)	0,63296	–0,65982	1,6257E-4	3,789
C22:6;4,7,10,13,16,19 (n-3) Докозагексаеновая/Docosahexaenoic	1,592	0,670088	1,9712E-4	3,7053
Омега-3 ПНЖК/ Omega-3 PUFA	1,4809	0,56643	0,0015021	2,8233
Омега-6/омега-3 ПНЖК/ Omega-6/omega-3 PUFA	0,68248	–0,55113	0,001928	2,7149
Омега-3 ПНЖК (ЭПК+ДГК)/ Omega-3 PUFA (EPA + DHA)	1,4663	0,55223	0,0027073	2,5675
C15:0 Пентадекановая/Pentadecanoic	0,73958	–0,43522	0,0027106	2,5669
C22:5;7,10,13,16,19 (n-3) Докозапентаеновая/Docosapentaenoic	1,4851	0,57054	0,0028467	2,5457
C20:2;11,14 (n-6) Докодиеновая/Docodienic	1,4713	0,55707	0,02684	1,5712

Метод главных компонент (РСА-анализ) позволил выявить паттерны жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови для лиц группы сравнения и с KPP I–II стадий (рис. 6). Кроме перечня ЖК, которые являются общими для обеих групп, определяются ЖК, которые ассоциированы только с KPP или здоровыми лицами. Heatmap обеспечила визуализацию различий жирнокислотных профилей как мембран эритроцитов, так и сыворотки крови у пациентов обследованных групп (рис. 7).

Проведение ROC-анализа продемонстрировало перспективы использования даже отдельных ЖК как мембран эритроцитов, так и сыворотки крови из числа претендующих на роль биомаркеров для различения больных KPP I–II стадий и здоровых лиц (рис. 8). Характеристики ранжируются на основе площади под кривой ROC (AUC ROC), Т-теста или Log₂-кратного изменения (FC). Для ЖК мембран эритроцитов AUC составила: для докозагексаеновой – 0,735, докозатетраеновой – 0,725, суммы полиненасыщенных ЖК – 0,711, суммы докозагексаеновой и эйкозапентаеновой ЖК – 0,737. Для жирных кислот сыворотки крови уровни AUC оказались следующими: для арахидоновой – 0,758, для миристиновой – 0,713, для докозагексаеновой 0,724, суммы омега-3 ПНЖК – 0,712.

Использование панели ЖК, состоящей из вышепредставленных биомаркеров, обеспечило высокую диагностическую точность различения больных KPP I–II стадий от здоровых лиц. Модель,

включающая уровни жирных кислот C14:0, C15:0, C16:1;7, C18:3 n-3, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C20:5 n-3, C22:4 n-6, C22:5 n-3, C22:6 n-3, сумма омега-3, омега-3 (EPA + DHA), отношение насыщенные/полиненасыщенные ЖК, обеспечила AUC 0,916 со специфичностью 0,90, чувствительностью 0,95 при дифференцировании пациентов с KPP I–II стадий от здоровых лиц.

Обсуждение

На 1-е место по значимости в различении больных KPP I–II стадий от здоровых выходят омега-3 ПНЖК, особенно докозагексаеновая (C22:6 n3), суммарное содержание эйкозапентаеновой (C20:5 n3) и докозагексаеновой (C22:6 n3), а также сумма всех омега-3 ПНЖК как в мембранах Эр, так и сыворотке крови. Их повышение преобладает над повышением омега-6 ПНЖК (C20:2 n6, C22:3 n6, C22:4 n6), особенно в сыворотке крови.

Только в сыворотке крови отмечено высокодоверное повышение уровня арахидоновой кислоты C20:4 n6 (p<0,00003) у пациентов с KPP по сравнению со здоровыми. Вносят вклад в различение больных I–II ст. KPP от здоровых насыщенные ЖК – миристиновая (C14:0), пентадекановая (C15:0), мононенасыщенная пальмитолеиновая (7-C16:1), но он существенно меньше, чем у ПНЖК.

Снижение насыщенных ЖК, возможно, происходит в результате их расхода в процессе аци-

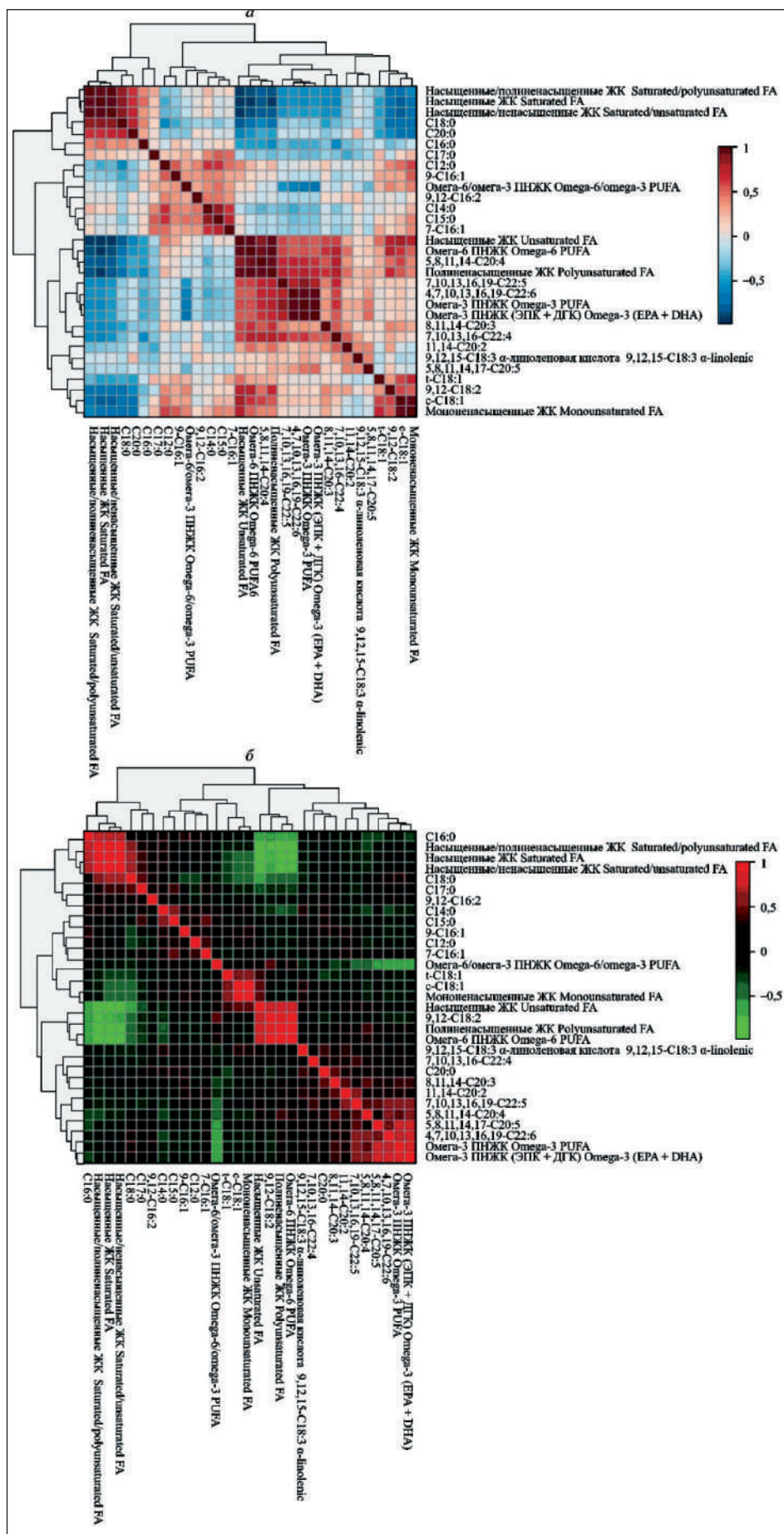


Рис. 5. Корреляции уровней жирных кислот мембран эритроцитов (а) и сыворотки крови (б) у больных КРР I–II стадий между собой. Цветами обозначен характер связи: для мембран эритроцитов – оттенки коричневого цвета – положительная корреляция; оттенки синего цвета – отрицательная корреляция. Для сыворотки крови – оттенки красно-коричневого цвета – положительная корреляция; оттенки зеленого цвета – отрицательная корреляция. Интенсивность цвета отражает силу связи между параметрами

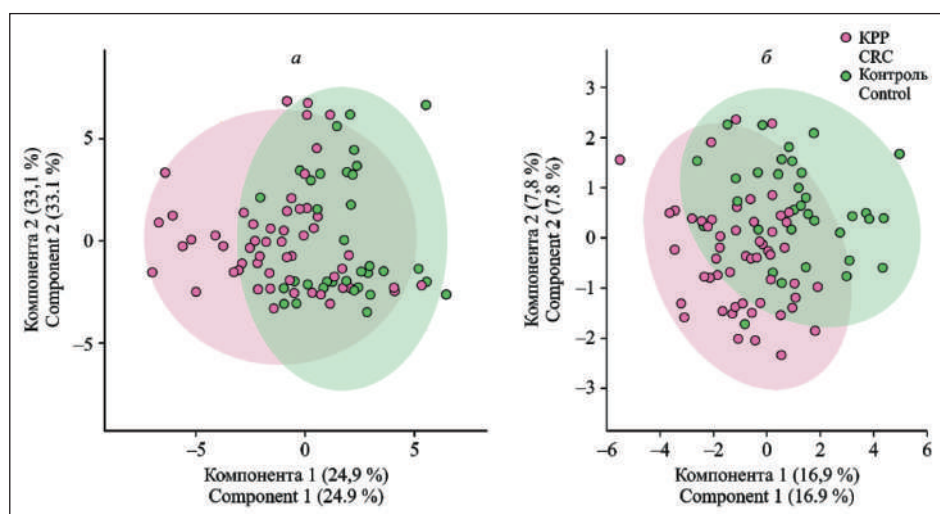


Рис. 6. Метод главных компонент (PCA) в различении жирных кислот мембран эритроцитов (а) и сыворотки крови (б) у больных КРР I–II стадий и здоровых лиц. Красные точки ассоциированы с ЖК у пациентов с I–II стадиями КРР; зеленые – у здоровых лиц

Fig. 6. Principal component analysis (PCA) in distinguishing between fatty acids of erythrocyte membranes (a) and blood serum (b) in patients with colorectal cancer I–II stage and healthy individuals. Red points are associated with FA for patients with stages 1–2 of colorectal cancer, green points are associated with healthy individuals

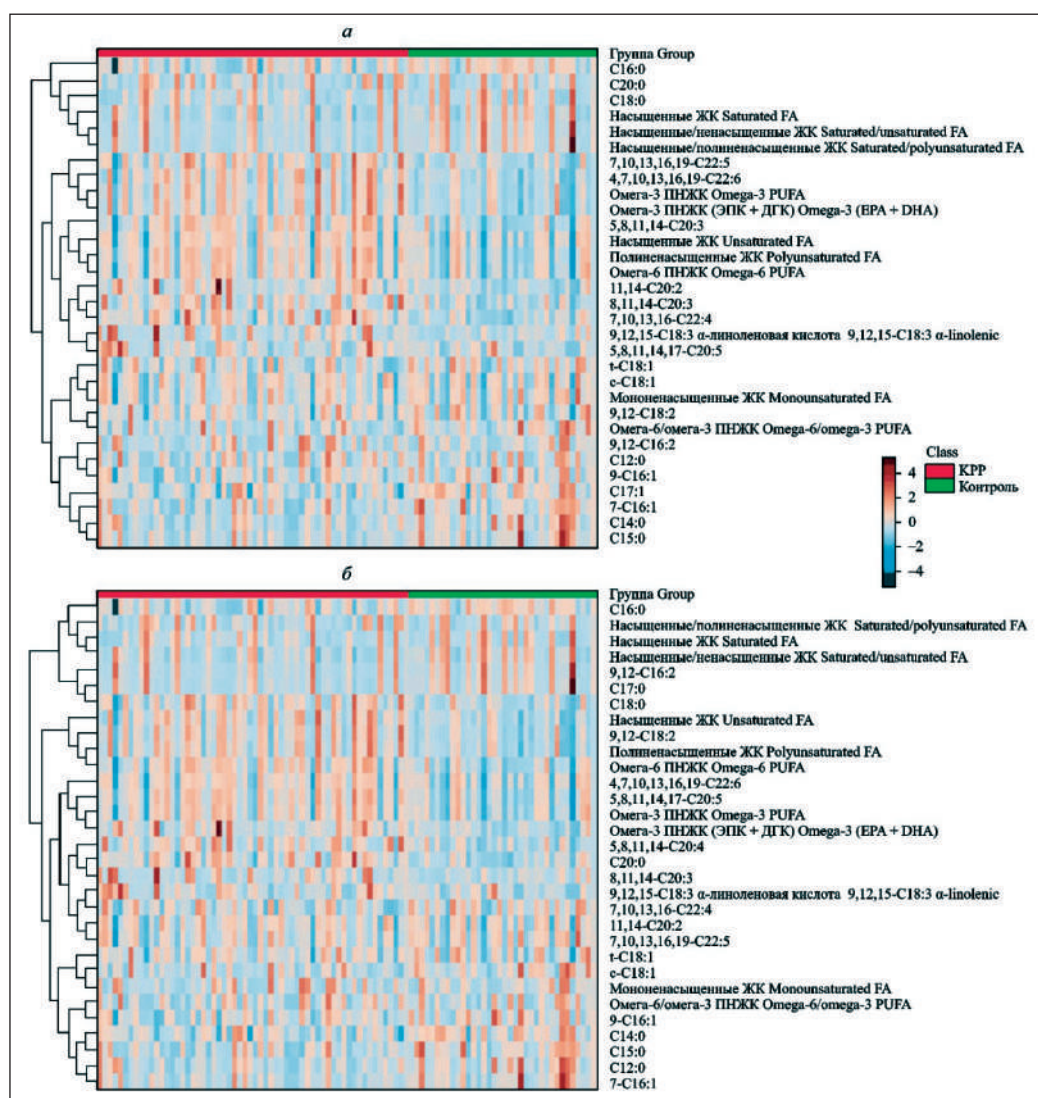


Рис. 7. Heatmap, обеспечивающая визуализацию жирнокислотных профилей мембран эритроцитов (а) и сыворотки крови (б) у больных КРР

I–II стадий (красная полоса сверху) и группы сравнения (зеленая полоса сверху). Цветовая гамма отражает степень представленности метаболита в данной группе (красно-коричневый диапазон – высокие уровни метаболита; сине-голубой – низкие уровни ЖК) Fig. 7. Heatmap, which provides visualization of fatty acid profiles of erythrocyte membranes (a) and blood serum (b) for patients with colorectal cancer I–II stage (red bar top) and healthy controls (green bar top). The color scale reflects the degree of representation of the metabolite in this group (red-brown range – high levels of metabolite; blue-blue – low levels of fatty acids)

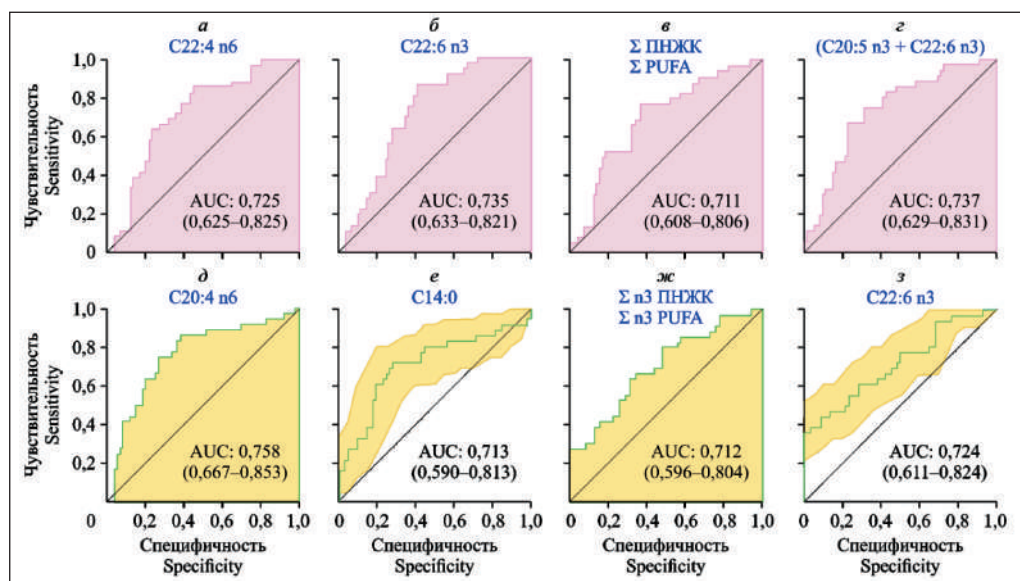


Рис. 8. ROC-анализ по использованию уровней отдельных ЖК мембран эритроцитов и сыворотки крови для дифференцирования больных КРР I–II стадий от здоровых лиц

Fig. 8. ROC analysis using the levels of individual fatty acids of erythrocyte membranes and blood serum to differentiate patients with colorectal cancer I–II stage from healthy individuals

лирования, посттрансляционной модификации секретируемых сигнальных белков Hedgehog (Hh), Wnt, что приводит к значительному возрастанию активности последних с последующим влиянием на пролиферацию, дифференциацию и миграцию клеток [17].

Расходование миристиновой кислоты происходит и для синтеза фермента N-миристоилтрансферазы, необходимого для работы антиоксиданта FSP1, который защищает раковые клетки от ферроптоза (гибели клеток в присутствии железа из-за разрушения липидов в составе мембраны), что обеспечивает устойчивость опухолевых клеток [18]. Очевидно, вносит вклад и повышенная активность фермента стеароил-КоА-десатуразы-1 (жирный ацил-Δ9-десатурирующий фермент), который превращает насыщенные жирные кислоты в мононенасыщенные жирные кислоты [19].

Вклад стеароил-КоА-десатуразы в распространение клеток рака зависит от МНЖК (в т. ч. наиболее распространенной олеиновой ЖК – C18:1 n-9), подавляющих передачу сигналов PTEN/Akt и регулирующих эпителиально-мезенхимальный переход. PTEN, классический ген-супрессор опухолей, является наиболее важным негативным регулятором сигнального пути PI3K/Akt [20]. Показано, что потеря функции PTEN способствует прогрессированию КРР. Снижение уровня МНЖК, по данным настоящего исследования, может быть обусловлено их избыточным расходом в связи с подавлением сигнальных путей PI3K/Akt [21].

L. Varó et al. было показано, что сниженные уровни линолевой кислоты в мембранах эритроцитов могут повышать активность ферментативной системы – десатуразы α-6-ЖК в печени, приводя

к значительному повышению уровня арахидоновой кислоты [22]. F. Veglia et al. установили, что полиморфноядерные миелоидные супрессорные клетки (PMN-MDSC), которые являются патологически активированными нейтрофилами и имеют решающее значение для регуляции иммунных реакций при раке, исключительно активируют транспортный белок жирных кислот 2 (FATP2). Основной механизм подавляющей активности, опосредованной FATP2, заключался в повышенном поглощении линолевой, арахидоновой кислот и синтезе простагландина E2 [23].

Показана активация синтеза ПНЖК, ассоциированная с канцерогенезом. R.M. Kortlever et al. выявили, что два онкогена KRAS и MYC, значимых для КРР, взаимодействуют, что приводит к немедленному переходу к развитию высокопролиферативных и инвазивных аденокарцином, которые характеризуются выраженной воспалительной, ангиогенной и иммуносупрессивной стромой [24]. MYC индуцирует белок транскрипционного стерол-регулируемого фактора (transcription factor sterol-regulated element-binding protein) SREBP1, и они взаимодействуют для активации синтеза жирных кислот из глюкозы и глутамина и регуляции удлинением цепи жирных кислот [25].

Ацил-КоА-связывающий белок (АСВР) высоко экспрессируется в опухолевых клетках, и, связываясь с ацил-КоА, он автономно поддерживает высокие скорости пролиферации, стимулирование роста опухоли, приводя к снижению выживаемости пациентов. АСВР поддерживает рост опухоли, контролируя доступ длинноцепочечных жирных ацил-КоА к митохондриям и способствуя их окислению, что обеспечивает высокие энергетические потребности опухолевых клеток [26].

Одним из факторов, ведущих к нарастанию уровня жирных кислот при развитии опухолевого процесса, следует считать повышение активности синтазы жирных кислот – фермента FASN при KPP, а также активацию гена LUR1, регулятора поглощения липидов 1, который активирует гены белков, непосредственно участвующих в поглощении липидов из внеклеточного пространства [27].

В ряде исследований показано изменение роли ПНЖК, в т. ч. омега-3, в канцерогенезе в зависимости от их концентрации. Известно, что омега-3 ПНЖК в мембране могут конкурировать с омега-6 ПНЖК в качестве субстратов ферментов циклооксигеназы и липоксигеназы, они могут уменьшить продукцию производных омега-6 – эйкозаноидов, таких как PGE2, LTB4, которая требуется для нормальной функции Т-клеток. Кроме того, при низкой концентрации омега-3 ПНЖК могут связываться с PPAR-γ для регулирования уровней IL-8, iNOS и MMP-1, что приводит к ингибированию пролиферации клеток, они также могут увеличить ROS с нарастанием апоптоза клеток. При высокой концентрации омега-3 ПНЖК могут встраиваться в мембранные фосфолипиды, изменяя текучесть липидного бислоя, в результате чего происходит ингибирование пролиферации Т-клеток. Высокие уровни n-3 ПНЖК могут подавлять иммунную среду посредством изменений в производстве цитокинов, пролиферации Т-клеток и опосредуемой Т-клеточной цитотоксичности. Кроме того, C22:6 n-3 также может исключительно подавлять регуляторную функцию Т-лимфоцитов [28].

Другие авторы обнаружили, что высокая активность воспаления и канцерогенез, вызванные диетическим C22: 6 n-3, были связаны с измененными популяциями Т-клеток CD8 +, активацией CD69 +, экспрессией FoxP3 и активностью клеток FoxP3 + CD25 + CD4 + Treg, экспрессирующих L-селектин. Эти данные свидетельствуют о том, что высокие дозы потребления ДНА могут способствовать ослаблению иммунной функции [29].

Высокие уровни омега-3 ПНЖК нарушают липидные «плоты» с последующим изменением структуры белковой композиции, локализованной в липидном слое внутренней части мембраны, и ингибируют реакции Т-киллеров. Кроме того, активные формы кислорода, ROS, повышенная продукция которых приводит к оксидативному стрессу, могут вызвать окисление ДНК, что приводит к повреждению всех четырех оснований и молекулы дезоксирибозы, провоцируя возникновение генетических мутаций и инициирование канцерогенеза колоректального рака [30].

Вероятно, омега-3 ПНЖК обладают протективным эффектом в отношении развития предопухолы, что продемонстрировано в 6 исследованиях по использованию омега-3 ПНЖК у пациентов со спорадическими колоректальными аденомами. Результаты этих исследований показали снижение

индекса пролиферации эпителиальных клеток слизистой оболочки на 13–70 % по сравнению с группой плацебо [31]. Канцерогенез, по-видимому, обуславливает изменение роли ПНЖК, которые уже на ранних стадиях обеспечивают промоцию опухолевого процесса.

Данные нашей работы позволяют сделать выводы о наличии значимых различий между здоровыми донорами и пациентами с KPP I–II стадий, а также выявить жирные кислоты, отвечающие требованиям для дифференцирующих биомаркеров. Ограничениями настоящего этапа исследований являются небольшая численность обследованных, отсутствие групп сравнения – пациентов с доброкачественными заболеваниями – аденомами и полипами толстой кишки, проспективного наблюдения, внутренней и внешней валидации. Тем не менее изучение уровней и соотношений жирных кислот в мембранах эритроцитов и сыворотке крови следует считать перспективным направлением в поиске биомаркеров для ранней диагностики KPP.

Заключение

Таким образом, у пациентов с KPP I–II стадий выявлено снижение насыщенных, отдельных мононасыщенных и высокодостоверное повышение большей части полиненасыщенных ЖК с преобладанием омега-3. Для большей части уровней жирных кислот достоверные различия в группах касались мембран эритроцитов с той же тенденцией в сыворотке крови.

Уровни эритроцитарных миристиновой, пентадекановой, 7-пальмитолеиновой, отношения насыщенные/полиненасыщенные ЖК (содержание которых достоверно ниже при KPP I–II стадий, чем в контроле) и уровни α-линоленовой, эйкозапентаеновой, докозапентаеновой, докозагексаеновой, суммы омега-3 ЖК, EPA + DHA, докодиеновой, дигомо-γ-линоленовой, докозатетраеновой ЖК (содержание которых достоверно выше при KPP, чем у здоровых) являются дифференцирующими при различении больных KPP I–II стадий от здоровых лиц.

В сыворотке крови уровень биомаркеров имели следующие ЖК: арахидоновая, миристиновая, докозагексаеновая, сумма омега-3 ПНЖК, отношение омега-6/омега-3 ПНЖК, пентадекановая, докозапентаеновая и докодиеновая. Модель, включающая перечень жирных кислот C14:0, C15:0, C16:1;7, C18:3 n-3, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C20:5 n-3, C22:4 n-6, C22:5 n-3, C22:6 n-3, сумма омега-3, омега-3 (EPA+DHA), отношение насыщенные/полиненасыщенные ЖК, обеспечила AUC 0,916 со специфичностью 0,90, чувствительностью 0,95 при различении пациентов с KPP I–II стадий от здоровых лиц. Полученные данные свидетельствуют о перспективности исследования изучаемых показателей как возможных маркеров для ранней диагностики KPP.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136(5): 359–86. doi: 10.1002/ijc.29210.
2. Garborg K., Holme O., Løberg M., Kalager M., Adami H.O., Bretthauer M. Current status of screening for colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2013; 24(8): 1963–72. doi: 10.1093/annonc/mdt157.
3. Brenner H., Arndt V., Stürmer T. Cost-effectiveness of colonoscopy in screening for colorectal cancer. *Arch Intern Med*. 2002; 162(19): 2249. doi: 10.1001/archinte.162.19.2249.
4. Pignone M., Rich M., Teutsch S.M., Berg A.O., Lohr A.N. Screening for colorectal cancer in adults at average risk: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2002; 137(2): 132–41. doi: 10.7326/0003-4819-137-2-200207160-00015.
5. Bian X., Qian Y., Tan B., Li K., Hong X., Wong C.C., Fu L., Zhang D., Li D., Wu J.-L. In-depth mapping carboxylic acid metabolome reveals the potential biomarkers in colorectal cancer through characteristic fragment ions and metabolic flux. *Anal Chim Acta*. 2020; 1128: 62–71. doi: 10.1016/j.aca.2020.06.064.
6. Monedeiro F., Monedeiro-Milanowski M., Ligor T., Buszewski B. A Review of GC-Based Analysis of Non-Invasive Biomarkers of Colorectal Cancer and Related Pathways. *J Clin Med*. 2020; 9: 3191–224. doi: 10.3390/jcm9103191.
7. Sun L., Kang Q., Pan Y., Li N., Wang X., He Y., Wang H., Yu D., Xie H., Yang L., Lu Y., Jin P., Sheng J. Serum metabolite profiling of familial adenomatous polyposis using ultra performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Cancer Biol Ther*. 2019; 20(7): 1–12. doi: 10.1080/15384047.2019.1595277.
8. Arab L., Akbar J. Biomarkers and the measurement of fatty acids. *Public Health Nutr*. 2002; 5: 865–71. doi: 10.1079/phn2002391.
9. Zeleniuch-Jacquotte A., Chajes V., Van Kappel A.L., Riboli E., Toniolo P. Reliability of fatty acid composition in human serum phospholipids. *Eur J Clin Nutr*. 2000; 54: 367–72. doi: 10.1038/sj.ejcn.1600964.
10. Katan M.B., van Birgelen A., Deslypere J.P., Penders M., van Staveren W.A. Biological markers of dietary intake, with emphasis on fatty acids. *Ann Nutr Metab*. 1991; 35: 249–52. doi: 10.1159/000177653.
11. Mika A., Kobiela J., Czumaj A., Chmielewski M., Stepnowski P., Sledzinski T. Hyper-Elongation in Colorectal Cancer Tissue – Cerotic Acid is a Potential Novel Serum Metabolic Marker of Colorectal Malignancies. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 41(2): 722–30. doi: 10.1159/000458431.
12. Rifkin S.B., Shrubsole M.J., Cai Q., Smalley W.E., Ness R.M., Swift L.L., Zheng W., Murff H.J. PUFA levels in erythrocyte membrane phospholipids are differentially associated with colorectal adenoma risk. *Br J Nutr*. 2017; 117(11): 1615–22. doi: 10.1017/S0007114517001490.
13. Crotti S., Agnoletto E., Cancemi G., Di Marco V., Traldi P., Pucciarelli S., Nitti D., Agostini M. Altered plasma levels of decanoic acid in colorectal cancer as a new diagnostic biomarker. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2016; 408(23): 6321–8. doi: 10.1007/s00216-016-9743-1.
14. Kang J.X., Wang J. A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. *BMC Biochem*. 2005; 6: 5–13. doi: 10.1186/1471-2091-6-5.
15. Shashkov M.V., Sidelnikov V.N. Properties of columns with several pyridinium and imidazolium ionic liquid stationary phases. *J Chromatogr A*. 2013; 1309: 56–63. doi: 10.1016/j.chroma.2013.08.030.
16. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning*. 2001; 45: 5–32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>.
17. Gradilla A.-C., Sanchez-Hernandez D., Brunt S., Scholpp L. From top to bottom: Cell polarity in Hedgehog and Wnt trafficking. *BMC Biology*. 2018; 16: 37–46. doi: 10.1186/s12915-018-0511-x.
18. Doll S., Freitas F.P., Shah R., Aldrovandi M., da Silva M.C., Ingold I., Goya Grocin A., Xavier da Silva T.N., Panzilius E., Scheel C.H., Mourao A., Buday K., Sato M., Wanning J., Vignane T., Mohana V., Rehberg M., Flatley A., Schepers A., Kurz A., White D., Sauer M., Sattler M., Tate E.W., Schmitz W., Schulze A., O'Donnell V., Proneth B., Popowicz G.M., Pratt D.A., Angeli J.P.F., Conrad M. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*. 2019; 575(7784): 693–8. doi: 10.1038/s41586-019-1707-0.
19. Igal R.A. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31: 1509–15. doi: 10.1093/carcin/bgq131.
20. Danielsen S.A., Eide P.W., Nesbakken A., Guren T., Leithe E., Lothe R.A. Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1855: 104–21. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.09.008.
21. Zhou X.P., Loukola A., Salovaara R., Nystrom-Lahti M., Peltomäki P., de laChapelle A., Aaltonen L.A., Eng C. PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. *Am J Pathol*. 2002; 161: 439–47. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64200-9.
22. Baro L., Hermoso J.C., Nunez M.C., Jimenez-Rios J.A., Gil A. Abnormalities in plasma and red blood cell fatty acid profiles of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1998; 77: 1978–83. doi: 10.1038/bjc.1998.328.
23. Veglia F., Tyurin V.A., Blasi M., De Leo A., Kossenkova A.V., Donthireddy L., To T.K.J., Schug Z., Basu S., Wang F., Ricciotti E., Di Russo C., Murphy M.E., Vonderheide R.H., Lieberman P.M., Mulligan C., Nam B., Hockstein N., Masters G., Guarino M., Lin C., Nefedova Y., Black P., Kagan V.E., Gabrilovich D.I. Fatty acid transport protein 2 reprograms neutrophils in cancer. *Nature*. 2019; 569(7754): 73–8. doi: 10.1038/s41586-019-1118-2.
24. Kortlever R.M., Sodin N.M., Wilson C.H., Burkhart D.L., Pellegrinet L., Swigart L.B., Littlewood T.D., Evan G.I. Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell*. 2017; 171: 1301–15. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.013.
25. Singh K.B., Hahn E.R., Kim S.H., Wendell S.G., Singh S.V. A novel metabolic function of Myc in regulation of fatty acid synthesis in prostate cancer. *Oncogene*. 2021; 40(3): 592–602. doi: 10.1038/s41388-020-01553-z.
26. Duman C., Yaqubi K., Hoffmann A., Acikgoz A.A., Korshunov A., Bendszus M., Herold-Mende C., Liu H.K., Alfonso J. Acyl-CoA-Binding Protein Drives Glioblastoma Tumorigenesis by Sustaining Fatty Acid Oxidation. *Cell Metabolism*. 2019; 30(2): 274–89. doi: 10.1016/j.cmet.2019.04.004.
27. Aregger M., Lawson K.A., Billmann M., Costanzo M., Tong A.H.Y., Chan K., Rahman M., Brown K.R., Ross C., Usaj M., Nedyalkova L., Sizova O., Habsid A., Pawling J., Lin Z.-Y., Abdouni H., Wong C.J., Weiss A., Mero P., Dennis J.W., Gingras A.C., Myers C.L., Andrews B.J., Boone C., Moffat J. Systematic mapping of genetic interactions for de novo fatty acid synthesis identifies C12orf49 as a regulator of lipid metabolism. *Nature Metabolism*. 2020; 2: 499–513. doi: 10.1038/s42255-020-0211-z.
28. Yessoufou A., Ple A., Moutairou K., Hichami A., Khan N.A. Docosahexaenoic acid reduces suppressive and migratory functions of CD4+ CD25+ regulatory T-cells. *J Lipid Res*. 2009; 50: 2377–88. doi: 10.1194/jlr.M900101-JLR200.
29. Woodworth H.L., McCaskey S.J., Durancic D.M., Clinthorne J.F., Langohr I.M., Gardner E.M., Fenton J.I. Dietary fish oil alters T lymphocyte cell populations and exacerbates disease in a mouse model of inflammatory colitis. *Cancer Res*. 2010; 70(20): 7960–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1396.
30. Ohmori H., Fujii K., Kadachi Y., Mori S., Nishiguchi Y., Fujiwara R., Kishi S., Sasaki T., Kuniyasu H. Elaidic Acid, a Trans-Fatty Acid, Enhances the Metastasis of Colorectal Cancer Cells. *Pathobiology*. 2017; 84(3): 144–51. doi: 10.1159/000449205.
31. Cockbain A.J., Toogood G.J., Hull M.A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut*. 2012; 61: 135–49. doi: 10.1136/gut.2010.233718.

Поступила/Received 21.06.2021

Одобрена после рецензирования/Revised 06.10.2021

Принята к публикации/Accepted 27.10.2021

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кручинина Маргарита Витальевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией гастроэнтерологии, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Новосибирск, Россия). E-mail: kruchmargo@yandex.ru. ORCID: 0000-0003-0077-3823.

Кручинин Владимир Николаевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН «Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН» (г. Новосибирск, Россия). Researcher ID: AAC-3686-2019. ORCID: 0000-0002-9905-9031.

Громов Андрей Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (г. Новосибирск, Россия). ORCID: 0000-0001-9254-4192

Шашков Михаил Вадимович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН «Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН» (г. Новосибирск, Россия). ORCID: 0000-0001-9022-1525

Соколова Анастасия Сергеевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН» (г. Новосибирск, Россия). ORCID: 0000-0001-5227-9996.

Яковина Ирина Николаевна, кандидат технических наук, руководитель СКБ РИИ, доцент кафедры вычислительной техники, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный технический университет» (г. Новосибирск, Россия). ORCID: 0000-0002-3265-8865.

Шестов Александр Александрович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Медицинский факультет Перельмана, Университет Пенсильвании (г. Филадельфия, США).

ВКЛАД АВТОРОВ

Кручинина Маргарита Витальевна: разработка концепции научной работы, статистическая обработка, составление рукописи, ее критический пересмотр, коррекция фрагментов статьи.

Кручинин Владимир Николаевич: анализ научной работы, подготовка иллюстративного материала, проработка аспектов обсуждения.

Громов Андрей Александрович: разработка дизайна исследования, критический анализ материалов статьи, составление черновика рукописи.

Шашков Михаил Вадимович: измерение уровней жирных кислот, обработка и интерпретация полученных результатов, составление черновика рукописи.

Соколова Анастасия Сергеевна: подготовка биологических образцов, интерпретация полученных результатов, критический анализ материалов статьи, составление черновика рукописи.

Яковина Ирина Николаевна: разработка концепции научной работы, статистическая обработка, составление черновика рукописи.

Шестов Александр Александрович: статистическая обработка, анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Финансирование

Работа выполнена в рамках темы государственного задания «Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их диагностике, профилактике и лечению», Рег. № 122031700094-5.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Margarita V. Kruchinina, MD, DSc, Head of the Laboratory of Gastroenterology, Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the RAS; Associate Professor of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk, Russia). E-mail: kruchmargo@yandex.ru. ORCID: 0000-0003-0077-3823.

Vladimir N. Kruchinin, PhD, Senior Researcher, Rzhzanov Institute of Semiconductor Physics, Siberian Branch of the RAS (Novosibirsk, Russia). Researcher ID: AAC-3686-2019. ORCID: 0000-0002-9905-9031.

Andrey A. Gromov, MD, PhD, Senior Researcher, Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the RAS (Novosibirsk, Russian). ORCID: 0000-0001-9254-4192.

Mikhail V. Shashkov, PhD, Senior Researcher, Boreskov Institute of Catalysis, Siberian Branch of the RAS (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0001-9022-1525.

Anastasiya S. Sokolova, PhD, Senior Researcher, N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the RAS (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0001-5227-9996.

Irina N. Yakovina, PhD, Head of SKB RII, Associate Professor of Department of Computing Engineering, Novosibirsk State Technical University (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0002-3265-8865.

Aleksander A. Shestov, PhD, Senior Researcher, Perelman School of Medicine, Perelman Center for Advanced Medicine, University of Pennsylvania (Philadelphia, USA).

AUTHOR CONTRIBUTION

Margarita V. Kruchinina: study conception and design, statistical data analysis, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript for important intellectual content, editing of the manuscript.

Vladimir N. Kruchinin: analysis of scientific work, preparation of illustrative material, study of aspects of the discussion.

Andrey A. Gromov: research design development, critical revision of the manuscript for important intellectual content, drafting of the manuscript.

Mikhail V. Shashkov: measurement of fatty acid levels, data interpretation and analysis, drafting the manuscript.

Anastasiya S. Sokolova: preparation of biological samples, data interpretation, critical revision of the manuscript for important intellectual content, drafting of the manuscript.

Irina N. Yakovina: study conception, statistical data analysis, drafting of the manuscript.

Aleksander A. Shestov: statistical processing, data analysis, critical revision with the introduction of valuable intellectual content.

Funding

The study was carried out within the framework of the project “Epidemiological monitoring of the state of public health and the study of molecular genetic and molecular biological mechanisms for the development of common diseases in Siberia to improve approaches to their diagnosis, prevention and treatment”, No. 122031700094-5.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.