

ВЛИЯНИЕ АБЕРРАНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ПРЯМОЙ КИШКИ

Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г., Габричидзе П.Н., Донцов В.А., Легостаев В.М., Шляхова О.В., Лиман Н.А., Солнцева А.А., Васильева Е.О.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: k.denees@yandex.ru

Лучевая терапия - один из главных методов лечения опухолей прямой кишки. В современной радиотерапевтической практике отсутствие положительной реакции у больных на предоперационное облучение достаточно распространено, что обусловлено формированием радиорезистентности опухолевых клеток, ассоциированной с аномалиями на генетическом и эпигенетическом уровне. Так, ранее нами была выявлена связь транскрипционной активности генетических локусов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*, *CASP9* и *BCL2* с эффективностью лучевой терапии у больных раком прямой кишки. Поэтому целью исследования стала идентификация с помощью биоинформационного анализа микроРНК, таргетирующих гены *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*, *CASP9* и *BCL2*, и изучение влияния изменения экспрессии этих микроРНК на эффективность лучевой терапии опухолей прямой кишки. Биоинформационный поиск микроРНК, таргетирующих гены *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*, *CASP9* и *BCL2*, осуществляли с использованием модифицированного алгоритма TarPmiR и базы данных miRDB. Относительную экспрессию микроРНК оценивали методом RT-qPCR. Проведенный биоинформационный анализ позволил установить, что гены *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*, *CASP9* и *BCL2* таргетируются 1338 микроРНК, из которых валидированы в базе данных miRDB и обладают минимальной свободной энергией взаимодействия с мРНК 26 микроРНК (9 для *BCL2*, 2 для *BRCA2*, 12 для *CASP9*, 2 для *H2AX* и 1 для *RBBP8*). Профилирование экспрессии 26 микроРНК в нормальных и опухолевых тканях у больных раком прямой кишки с полным регрессом опухоли (группа 1, n=17) и с незначительным регрессом опухоли или отсутствием динамики (группа 2, n=15) позволило выявить 13 дифференциально экспрессирующихся микроРНК (miR-1249-5p, miR-6874-5p, miR-4728-5p, miR-6808-5p, miR-3202, miR-5195-3p, miR-6820-3p, miR-557, miR-6757-3p, miR-1273h-5p, miR-6737-5p, miR-130b и miR-6819-5p), регулирующих системы апоптоза и репарации ДНК, и ассоциированных с эффективностью/неэффективностью лучевой терапии опухолей прямой кишки.

Ключевые слова: рак прямой кишки, микроРНК, лучевая терапия, сигнальные пути, апоптоз, репарация ДНК, радиорезистентность.

INFLUENCE OF ABERRANT MICRORNA EXPRESSION ON RADIOTHERAPY EFFICIENCY FOR RECTAL TUMORS

Kutilin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G., Gabrichidze P.N., Dontsov V.A., Legostaev V.M., Shlyakhova O.V., Liman N.A., Solntseva A.A., Vasileva E.O.

National Medical Research Oncology Center, Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: k.denees@yandex.ru

Radiation therapy is one of the main methods in the treatment of rectal cancer, however, in oncological practice, there are often cases of non-response patients to preoperative radiation therapy, which is associated with the radioresistance of tumor cells, which depends on their genetic and epigenetic characteristics. Previously, it was shown that the expression of *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9*, *RBBP8* and *BCL2* genes affects the effectiveness of radiation therapy for rectal tumors. Therefore, the aim of the study was to identify, using bioinformatic analysis, microRNAs targeting genes *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9*, *RBBP8* and *BCL2*, and to study the effect of changes in the expression of these microRNAs on the effectiveness of rectal tumors radiation therapy. Bioinformatic search for microRNAs targeting genes *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9*, *RBBP8* and *BCL2* was carried out using a modified TarPmiR algorithm and the miRDB database. The relative expression of microRNA was assessed by the RT-qPCR method. The bioinformatic analysis performed made it possible to establish that genes *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9*, *RBBP8* and *BCL2* targeted by 1338 microRNAs, 26 microRNAs of which are validated in the miRDB database and have the minimum free energy of interaction with mRNA (9 for *BCL2*, 2 for *BRCA2*, 12 for *CASP9*, 2 for *H2AX* and 1 for *RBBP8*). Expression profiling of 26 miRNAs in normal and tumor tissues in patients with rectal cancer with complete tumor regression (group 1, n = 17) and with insignificant tumor regression or no dynamics (group 2, n = 15) made it possible to identify 13 differentially expressed miRNAs (miR-1249-5p, miR-6874-5p, miR-4728-5p, miR-6808-5p, miR-3202, miR-5195-3p, miR-6820-3p, miR-557, miR-6757-3p, miR-1273h-

5p,miR-6737-5p, miR-130b и miR-6819-5p), providing regulation of the DNA repair system and apoptosis, and associated with the efficacy / ineffectiveness of rectal tumors radiation therapy.

Keywords: rectal cancer, microRNA, radiation therapy, signaling pathways, apoptosis, DNA repair, radioresistance.

Среди онкологических заболеваний по числу летальных исходов 4-е место занимают злокачественные новообразования кишечника. В данной группе наибольший процент составляют опухоли прямой кишки [1; 2]. В настоящее время для лечения рака прямой кишки применяют комбинированные протоколы, отличающиеся от протоколов для других отделов кишечника, так как сочетают предоперационную лучевую терапию (в стандартном варианте - разовая очаговая доза (РОД) 2,4 Гр до суммарной очаговой дозы (СОД) 54 Гр) и последующее хирургическое вмешательство [3; 4]. Анализ результатов отечественной и мировой радиотерапевтической практики показывает наличие большого числа (до 30-40%) случаев с радиорезистентностью опухолей, обусловленной молекулярными (генетическими/эпигенетическими) аномалиями в опухолевых клетках, в частности aberrантной экспрессией определенных групп генов. Ранее нами было показано, что транскрипционная активность генетических локусов, регулирующих системы репарации (*RBBP8*, *H2AX*, *BRCA2*), пролиферации и апоптоза (*CASP9*, *BCL2*), связана с эффективностью проводимой лучевой терапии у больных раком прямой кишки [1]. Как известно, важнейшими регуляторами транскрипционной активности генов являются микроРНК, представляющие собой некодирующие одноцепочечные РНК, содержащие приблизительно два десятка нуклеотидов, осуществляющие регуляцию трансляции и деградации матричной РНК посредством связывания с комплементарными сайтами в нетранслируемых участках молекул последних, служащих их мишенями [5].

Поэтому целью исследования стало выявление с помощью биоинформационного анализа микроРНК, таргетирующих гены *RBBP8*, *H2AX*, *BRCA2*, *CASP9* и *BCL2*, и изучение влияния изменения экспрессии этих микроРНК на эффективность лучевой терапии опухолей прямой кишки.

Материалы и методы исследования

Биоинформационный поиск микроРНК, таргетирующих гены *RBBP8*, *H2AX*, *BRCA2*, *CASP9* и *BCL2*, осуществляли с использованием модифицированного алгоритма TarPmiR и базы данных miRDB. TarPmiR для прогнозирования сайта связывания мРНК и микроРНК использует алгоритм машинного обучения random forest («случайный лес»), сочетающий в себе метод случайных подпространств и метод бэггинга Бреймана. Результатом работы алгоритма является значение вероятности того, что обнаруженный сайт-мишень кандидат и есть истинный сайт-мишень [6; 7].

В исследовании участвовали 32 пациента (возраст от 45 до 65 лет), госпитализированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии» с диагнозом аденокарцинома прямой кишки (G1-2). До лучевой терапии (ЛТ) от этих пациентов при проведении видеокколоноскопии (ВКС) получали препараты биопсии - фрагменты немалигнизированных (нормальных) и опухолевых тканей прямой кишки. Фрагменты ткани, извлеченные во время биопсии, мгновенно замораживали при минус 195 °С и в последующем использовали для выделения суммарной РНК. ЛТ проводили по стандартной схеме - РОД 2,4 Гр, СОД 54,0 Гр - на линейном ускорителе частиц Novalis TX.

Препараты суммарной РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции в модификации [7]. Для выявления микроРНК и малой РНК U6 препараты суммарной РНК подвергали реакции обратной транскрипции (ОТ), которая проводилась одновременно с полиаденилированием РНК, с использованием специфичных RT-праймеров. Олигонуклеотидные праймеры были разработаны нами с использованием алгоритма предложенного Valcells I. [8]. Реакцию ОТ проводили в одном повторе, отдельно для каждой микроРНК, для этого использовали лиофилизированную смесь «Мастер-микс ОТ» («Вектор-Бест», Россия). ОТ проводили при 16 °С (15 минут), далее при 42 °С (15 минут), обратную транскриптазу инактивировали инкубацией при 95 °С в течение 2 минут [7].

Относительную экспрессию микроРНК оценивали методом RT-qPCR. Постановку RT-qPCR каждого образца проводили в 3 повторах. Для подбора референсных локусов оценивали стабильность экспрессии микроРНК по алгоритму geNorm [9]. Первоначальный список предполагаемых референсных локусов для микро-РНК включал: miR-191; miR-23a и U6. С помощью geNorm для нормализации данных по экспрессии микроРНК был выбран U6. Нормализацию проводили по референсному локусу и уровню экспрессии соответствующих микроРНК в образцах нормальной ткани. Относительную экспрессию микроРНК (RE_{mir}) определяли по формуле $RE_{mir} = E^{-\Delta\Delta Ct}$, где E - вычисленная эффективность реакции амплификации [5].

Статистический анализ данных проводили с использованием языка программирования Python (библиотека SciPy). Различия между группами оценивались с использованием U-критерия Манна-Уитни, для корректировки множественного сравнения была применена поправка Бонферрони [7]. Также проводили анализ избыточной представленности микроРНК в сигнальных путях (ORA, Over-Representation Analysis). Этот метод определяет долю участия дифференциально экспрессирующихся микроРНК в определенных сигнальных путях, его результатом является получение списка наиболее значимых сигнальных путей. Статистическая значимость в ORA рассчитывалась с применением точного критерия Фишера [10].

Результаты исследования и их обсуждение

Биоинформационный поиск микроРНК, таргетирующих гены *RBBP8*, *H2AX*, *BRCA2*, *CASP9* и *BCL2*, с использованием модифицированного алгоритма TarPmiR, выявил 1338 микроРНК (рис. 1А), из которых валидированы в базе данных miRDB 86 микроРНК (рис. 1Б), в том числе 26 с минимальным значением термодинамического потенциала (свободной энергии) взаимодействия микроРНК и матричной РНК (табл. 1): 9 микроРНК, взаимодействующих с *BCL2*, 2 микроРНК, взаимодействующие с *BRCA2*, 12 микроРНК, взаимодействующих с *CASP9*, 2 микроРНК, взаимодействующие с *H2AX*, и 1 микроРНК, взаимодействующая с *RBBP8*.

Таблица 1

МикроРНК, таргетирующие гены *RBBP8*, *H2AX*, *BRCA2*, *CASP9* и *BCL2*, выявленные с использованием алгоритма TarPmiR*

МикроРНК	RefSeq id	Ген	Координаты в геноме		Энергия	AU	Длина участка связывания, п.н.	Участок связывания	Валидировано в miRDB
			start	end					
hsa-miR-1249-5p	NM_000633	BCL2	3468	3517	-30.1	0.382	49	3UTR	да
hsa-miR-6861-5p	NM_000633	BCL2	3474	3513	-29.6	0.368	20	3UTR	да
hsa-miR-8052	NM_000633	BCL2	4393	4412	-29.3	0.412	19	3UTR	да
hsa-miR-324-3p	NM_000633	BCL2	4680	4700	-28.6	0.618	20	3UTR	да
hsa-miR-6820-3p	NM_000633	BCL2	1670	1701	-28.1	0.456	31	3UTR	да
hsa-miR-4717-5p	NM_000633	BCL2	2322	2364	-28.0	0.368	18	3UTR	да
hsa-miR-3943	NM_000633	BCL2	2750	2774	-27.8	0.632	24	3UTR	да
hsa-miR-557	NM_000633	BCL2	2549	2584	-27.6	0.5	20	3UTR	да
hsa-miR-4690-5p	NM_000633	BCL2	2147	2172	-27.3	0.426	25	3UTR	да
hsa-miR-6757-3p	NM_000059	BRCA2	10786	10812	-25.7	0.412	26	3UTR	да
hsa-miR-7151-3p	NM_000059	BRCA2	10797	10825	-25.1	0.441	20	3UTR	да
hsa-miR-6779-5p	XM_011542273	CASP9	1482	1537	-34.3	0.441	35	3UTR	да
hsa-miR-1273h-5p	NM_032996	CASP9	2555	2590	-33.1	0.456	23	3UTR	да
hsa-miR-6812-5p	NM_001229	CASP9	2593	2622	-30.6	0.441	29	3UTR	да
hsa-miR-6737-5p	NM_032996	CASP9	1329	1347	-30.1	0.5	18	3UTR	да
hsa-miR-661	XM_011542273	CASP9	1516	1552	-29.8	0.456	36	3UTR	да
hsa-miR-6799-5p	NM_032996	CASP9	2609	2656	-29.7	0.574	23	3UTR	да
hsa-miR-6893-5p	NM_032996	CASP9	2442	2484	-28.5	0.574	42	3UTR	да
hsa-miR-6819-5p	NM_032996	CASP9	1329	1347	-27.0	0.5	18	3UTR	да
hsa-miR-6874-5p	NM_001278054	CASP9	2505	2535	-26.6	0.559	30	3UTR	да
hsa-miR-4728-5p	NM_001229	CASP9	2906	2925	-26.3	0.426	19	3UTR	да
hsa-miR-6808-5p	NM_032996	CASP9	1588	1610	-26.2	0.471	22	3UTR	да
hsa-miR-30b-3p	XM_011542273	CASP9	1967	1987	-25.6	0.485	20	3UTR	да
hsa-miR-3202	NM_002105	H2AFX	620	639	-20.3	0.221	19	3UTR	да
hsa-miR-5195-3p	NM_002105	H2AFX	1478	1504	-23.8	0.471	26	3UTR	да

hsa-miR-130b-3p	NM_002894	RBBP8	3196	3215	-23.7	0.676	19	3UTR	да
-----------------	-----------	-------	------	------	-------	-------	----	------	----

* - представлены только микроРНК, валидированные в базе данных miRDB и с минимальной свободной энергией взаимодействия микроРНК и матричной РНК.

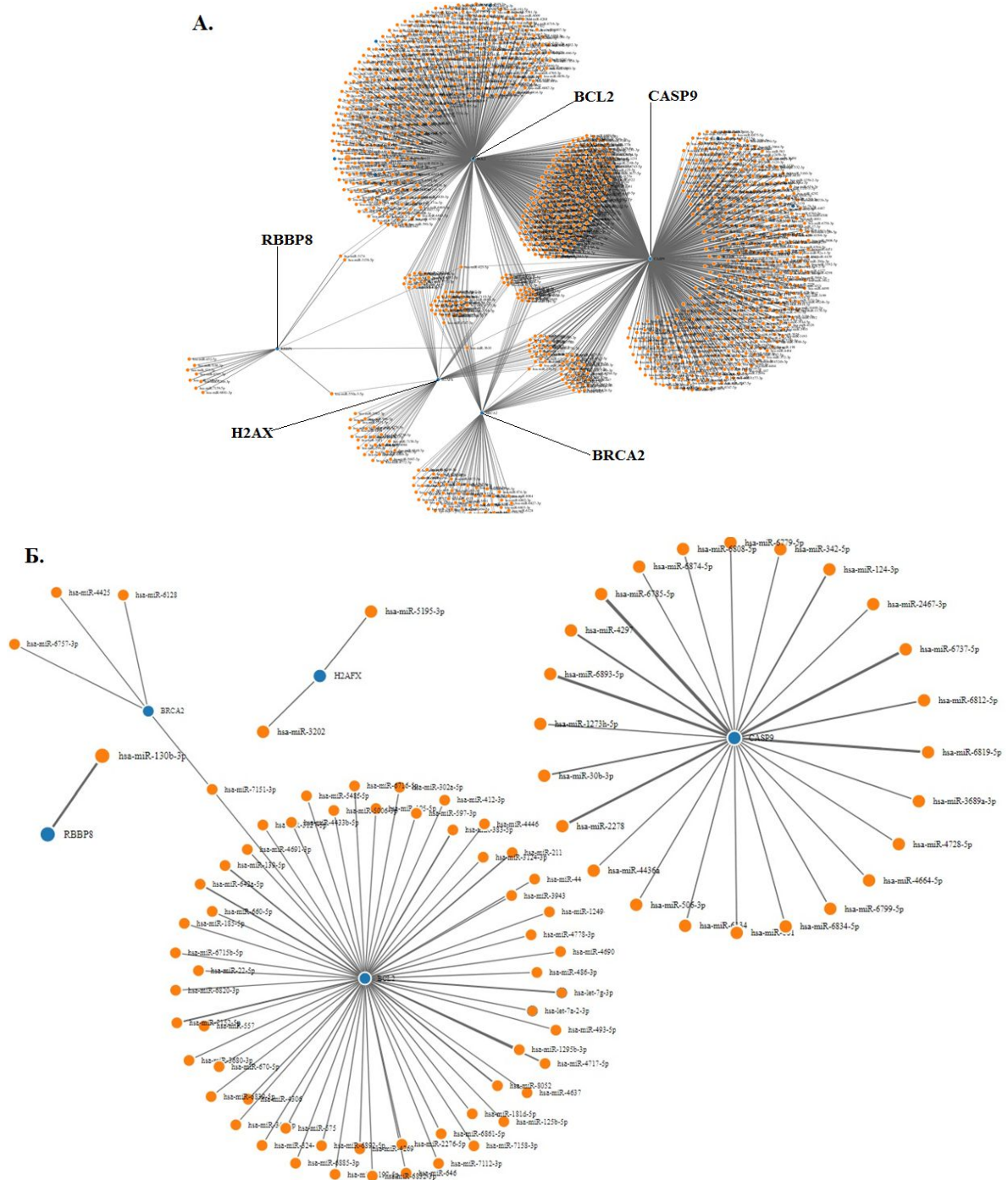


Рис. 1. А - все микроРНК, таргетирующие гены RBBP8, H2AX, BRCA2, CASP9 и BCL2, выявленные с использованием алгоритма TarPmiR. Б - микроРНК, выявленные с использованием алгоритма TarPmiR и валидированные в базе данных miRDB

Для 26 микроРНК, выявленных с использованием биоинформационных подходов, проведено профилирование экспрессии в нормальных и опухолевых тканях у больных раком прямой кишки.

Анализ результатов ЛТ опухолей прямой кишки у 32 больных позволил разделить их на 2 группы. У 17 больных после ЛТ был зафиксирован полный регресс опухоли (группа 1), у 8 больных был зафиксирован незначительный регресс опухоли, и у 7 больных отсутствовала динамика изменения размера опухоли (группа 2). В этих двух группах пациентов наблюдалась дифференциальная экспрессия ряда микроРНК (как относительно нормальной ткани, так и относительно каждой из групп). Так, у больных с незначительным регрессом опухоли или отсутствием динамики после лучевой терапии (n=15) выявлено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение экспрессии miR-1249 в 2,5 раза относительно экспрессии в нормальной ткани и в 2,3 раза относительно экспрессии в опухолевой ткани больных с полным регрессом опухоли, снижение экспрессии miR-6820 в 1,7 раза относительно экспрессии в нормальной ткани и в 1,6 раза относительно экспрессии в опухолевой ткани у больных с полным регрессом опухоли, снижение miR-4717 в 2,5 раза относительно нормальной ткани, снижение hsa-miR-3943 в 3,3 раза по сравнению с уровнем экспрессии в нормальной ткани, снижение miR-557 в 2,5 раза относительно нормальной ткани и в 2,3 раза относительно пациентов с полным регрессом опухоли, при этом наблюдается увеличение экспрессии hsa-miR-4690-5p в 2,1 раза относительно нормальной ткани (рис. 2).

Также у больных с полным регрессом опухоли была снижена экспрессия miR-4717 в 1,8 раза ($p < 0,05$) относительно уровня экспрессии в нормальной ткани прямой кишки. Данные микроРНК (miR-557, miR-1249, miR-6820, miR-4717, miR-3943), за исключением miR-4717, в опухолевой ткани у больных с незначительным регрессом опухоли или отсутствием динамики обладают преимущественно сниженной экспрессией как относительно нормальной ткани, так и относительно опухолевой ткани пациентов с полным регрессом опухоли после лучевой терапии. Эти микроРНК таргетируют антиапоптозный ген *BCL2*, и их сниженная активность может способствовать сохранению на повышенном уровне транскрипционной активности этого гена-мишени. *BCL2* кодирует белок, участвующий в подавлении апоптоза двумя путями: во-первых, этот белок изменяет проницаемость мембран митохондрий и предотвращает выход из них цитохрома C, тем самым останавливая активацию каспазного каскада; во-вторых, он инактивирует белок CED4 (фактор активации апоптоза) [11]. Соответствующий эффект увеличения экспрессии гена *BCL2* у пациентов с незначительным регрессом опухоли или отсутствием динамики после лучевой терапии мы и обнаружили в предыдущем исследовании [1].

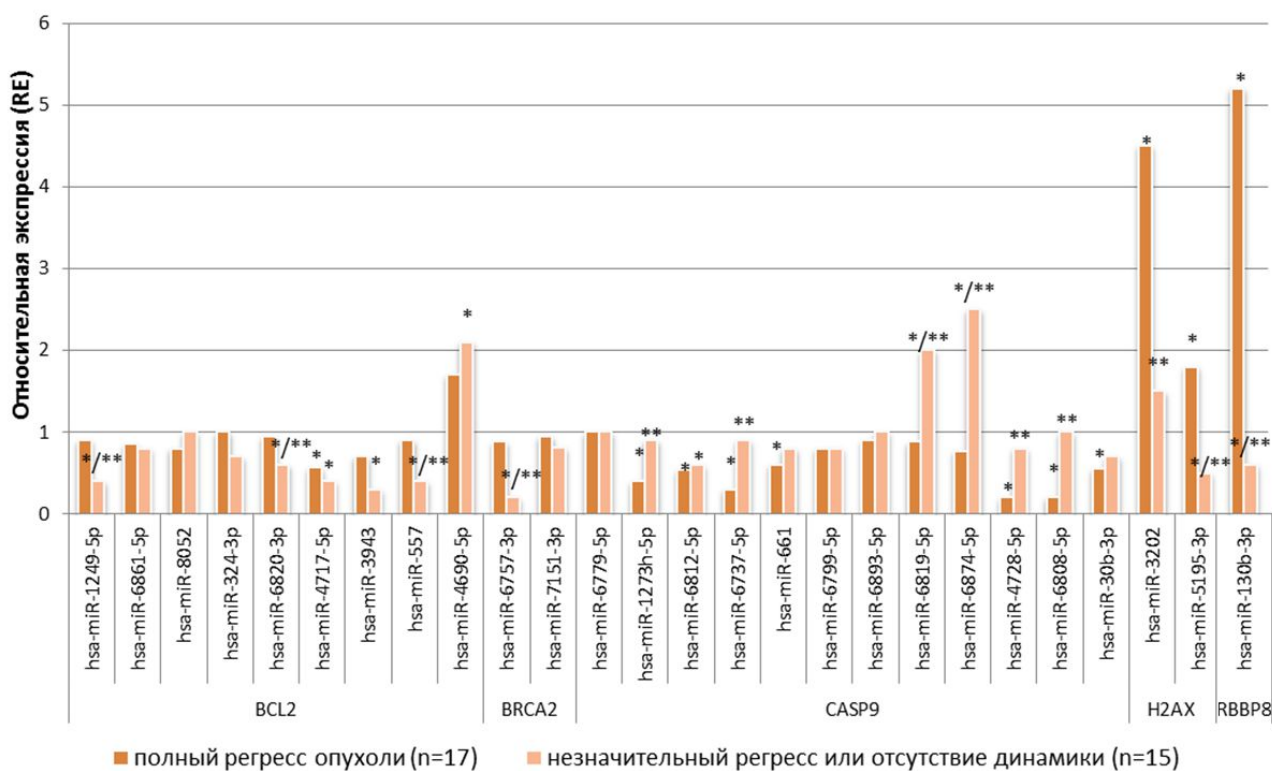


Рис. 2. Уровень экспрессия микроРНК в ткани опухоли прямой кишки больных с полным регрессом (группа 1) или его отсутствием (группа 2). * – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) относительно уровня экспрессии в нормальной ткани, ** – статистически значимые отличия ($p < 0,005$) экспрессии микроРНК в опухолевой ткани пациентов группы 2 от группы 1

Также в опухолевой ткани у больных с незначительным регрессом опухоли или отсутствием динамики после лучевой терапии обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение экспрессии микроРНК-6757 в 5,0 раз относительно уровня экспрессии в нормальной ткани и в 4,4 раза относительно экспрессии в опухолевой ткани у больных с полным регрессом опухоли. Данная микроРНК таргетирует ген *BRCA2*, и её снижение теоретически должно способствовать увеличению экспрессии *BRCA2*, что показано нами ранее [1].

Экспрессия miR-1273h, miR-6737, miR-661, miR-4728, miR-6808 и miR-30b статистически значимо ($p < 0,05$) снижена в 2,5; 3,3; 1,7; 5,0; 5,0 и 1,8 раза в опухолевой ткани у больных с полным регрессом опухоли относительно нормальной ткани. При этом уровень экспрессии miR-1273h в 2,3 раза, miR-6819 в 2,3 раза, miR-6737 в 3,0 раза, miR-6874 в 3,3 раза, miR-4728 в 4,0 раза и miR-6808 в 5,0 раз статистически значимо ($p < 0,05$) выше в опухолевой ткани у больных с незначительным регрессом опухоли/ отсутствием динамики после лучевой терапии относительно аналогичных показателей в опухолевой ткани больных с полным регрессом опухоли. Следует отметить, что hsa-miR-6812-5p статистически значимо

($p < 0,005$) снижает экспрессию в опухолевой ткани пациентов группы 1 и 2 в 1,9 и 1,7 раза соответственно относительно нормальной ткани прямой кишки. Указанные выше микроРНК таргетируют ген каспазы-9, и теоретически их высокая экспрессия у больных с незначительным регрессом опухоли/ отсутствием динамики должна способствовать снижению экспрессии этого гена, а их более низкая экспрессия у больных с полным регрессом опухоли, наоборот, должна способствовать повышенному уровню транскрипционной активности гена инициаторной каспазы-9, выполняющей критическую для запуска апоптоза функцию. Дифференциальная экспрессия *CASP9* в этих двух группах больных была обнаружена в нашем предыдущем исследовании [1].

В опухолевой ткани у пациентов с полным регрессом опухоли обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение экспрессии микроРНК *miR-3202* и *miR-5195* в 4,5 и 1,8 раза соответственно относительно экспрессии в нормальной ткани и в 3,0 и 3,6 раза соответственно относительно экспрессии в опухолевой ткани у пациентов с незначительным регрессом опухоли/отсутствием динамики после лучевой терапии. Эти две микроРНК таргетируют *H2AFX (H2AX)* - ген, который кодирует гистоновый белок, инициирующий ремоделирование хроматина при двуцепочечных разрывах в ДНК, вызванных ионизирующим облучением. Такое ремоделирование хроматина позволяет белку *BRCA1/2* связаться с участком ДНК, на котором произошел двуцепочечный разрыв [12; 13]. Соответственно, повышенная экспрессия *miR-3202* и *miR-5195* у больных с полным регрессом опухоли будет способствовать сниженной экспрессии гена *H2AX*, а обратный эффект будет наблюдаться у больных с незначительным регрессом опухоли/ отсутствием динамики после лучевой терапии, что находит подтверждение в результатах исследования Кутилина Д.С. и соавторов [1], выполненного в 2019 году.

Также обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) повышение уровня экспрессии *miR-130b* в 5,2 раза в опухолевой ткани у больных с полным регрессом опухоли и снижение в 1,7 раза в опухолевой ткани у больных с незначительным регрессом опухоли или отсутствием динамики относительно нормальной ткани прямой кишки. При этом у больных первой группы экспрессия *hsa-miR-130b-3p* была в 8,7 раза выше ($p < 0,05$) по сравнению с больными второй группы. Это, очевидно, способствовало снижению экспрессии гена *RBBP8* у больных первой группы и повышению его экспрессии у больных второй группы, показанному в работе Кутилина Д.С. и соавторов [1]. Данный ген кодирует белок, регулирующий пролиферацию клеток [14].

Как известно, микроРНК имеют множество мишеней [5; 15], поэтому для дифференциально экспрессирующихся (*hsa-miR-130b-3p*, *hsa-miR-6819-5p*, *hsa-miR-1249-5p*, *hsa-miR-6874-5p*, *hsa-miR-4728-5p*, *hsa-miR-6808-5p*, *hsa-miR-3202*, *hsa-miR-5195-3p*, *hsa-*

miR-6820-3p, hsa-miR-557, hsa-miR-6757-3p, hsa-miR-1273h-5p, hsa-miR-6737-5p) в опухолевых тканях двух групп пациентов микроРНК был проведен анализ избыточной представленности микроРНК в сигнальных путях (ORA, Over-Representation Analysis). Результаты анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2

Представленность (over-represented) дифференциально экспрессирующихся микроРНК в сигнальных путях (KEGG Pathways)

Сигнальный путь	P-value	Кол-во miRNA	микроРНК
Переваривание и всасывание белков	0,0005	11	miRNA-130b, miRNA-557, miRNA-3202, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-6757, miRNA-5195, miRNA-1249
Апоптоз	0,0006	11	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-130b
Сигнальные каскады эпителиальных клеток при инфекции <i>Helicobacter pylori</i>	0,0010	11	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Сигнальный путь Notch	0,0023	10	miRNA-1249, miRNA-557, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Сигнальный путь RIG-I-подобного рецептора	0,0027	10	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-130b
Сигнальный путь Wnt	0,0060	13	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-6874, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Сигнальный путь p53	0,0061	13	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-6874, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Окислительное фосфорилирование	0,0062	11	miRNA-1249, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-6874, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Сигнальный путь IL-17	0,0079	11	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-130b
Метаболизм лекарств	0,0094	8	miRNA-1249, miRNA-557, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-130b
Сигнальные пути сфинголипидов	0,0173	12	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Некроптоз	0,0174	12	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Сплайсосома	0,0180	12	miRNA-1249, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-6874, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Транспорт РНК	0,0228	12	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-6874, miRNA-130b
Сигнальный путь Toll-подобного рецептора	0,0262	10	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-130b
Сигнальный путь NOD-	0,0318	12	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757,

подобного рецептора			miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-6874, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-130b
Биогенез рибосом	0,0360	9	miRNA-1249, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Сигнальный путь TGF-beta	0,0386	11	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Клеточное старение	0,0396	13	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-6874, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Сигнальный путь нейротрофина	0,0404	12	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Сигнальный путь ABC транспортеров	0,0431	6	miRNA-557, miRNA-1273h, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-5195, miRNA-130b
Сигнальный путь VEGF	0,0444	9	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-6757, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-130b
Формирование плотных контактов	0,0453	12	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-6874, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Цитомегаловирусная инфекция человека	0,0469	13	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-6874, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b
Убиквитин-опосредованный протеолиз	0,0481	11	miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-6874, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-130b

Как видно из представленных в таблице 2 данных, дифференциально экспрессирующиеся в двух группах пациентов микроРНК, помимо регуляции транскрипционной активности генов *RBBP8*, *H2AX*, *BRCA2*, *CASP9* и *BCL2*, участвуют в следующих ключевых сигнальных путях и биологических процессах: апоптоз, окислительное фосфорилирование, убиквитин-опосредованный протеолиз, формирование клеточных плотных контактов, сигнальный путь VEGF, сигнальный путь Toll-подобного рецептора и NOD-подобного рецептора, сигнальный путь Notch и Wnt, сигнальный путь p53 и др. (табл. 2, рис. 3).



Рис. 3. Облако категорий (wordcloud of categories) сигнальных путей дифференциально экспрессирующихся микроРНК (100 категорий с наименьшим значением P-value)

Заключение

Данное исследование выявило, что эффективность ЛТ опухолей прямой кишки может быть ассоциирована с дифференциальной экспрессией 13 микроРНК (miRNA-130b, miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-557, miRNA-6874, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195), которая обеспечивает эффективную регуляцию системы восстановления двухцепочечных разрывов ДНК (увеличение экспрессии *BRNACA2*, *H2AX* и *RNABBP8* при снижении экспрессии miRNA-6757, miRNA-3202, miRNA-5195 и miRNA-130b, и наоборот) и регуляцию апоптоза (увеличение экспрессии *CASP9* при снижении экспрессии miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-661, miRNA-4728 и miRNA-6808, снижение экспрессии *BCL2* при повышении экспрессии miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-557, и наоборот).

Исследование выполнено в рамках гос. задания «Поиск предикторов радиорезистентности рака прямой кишки и разработка персонализированных неoadъювантных терапевтических подходов».

Список литературы

1. Кутилин Д.С., Кошелева Н.Г., Гусарева М.А., Харагезов Д.А., Донцов В.А., Полуэктов С.И., Зема Т.В., Лиман Н.А., Шляхова О.В., Удаленкова И.А. Влияние транскрипционной активности генов, регулирующих репарацию ДНК, на эффективность лучевой терапии

опухолей прямой кишки. *Современные проблемы науки и образования*. 2019. № 6. [Электронный ресурс]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29353> (дата обращения: 23.11.2020).

2. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никипелова Е.А., Комарова Е.Ф., Козлова Л.С., Таварян И.С., Аверкин М.А., Черярина Н.Д. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015. № 2 (114). С. 40-45.

3. Fazeli M.S., Keramati M.R. Rectal cancer: a review. *Med. J. Islam Repub. Iran*. 2015. V. 29. P. 171.

4. Glimelius B. The Swedish Approach. In: Kwaan M., Zbar A. (eds). *Comprehensive Rectal Cancer Care*. Springer, Cham, 2019. P. 335-353.

5. Кутилин Д.С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком // *Молекулярная биология*. 2020. Т. 54. № 4. С. 580-595.

6. Ding J., Li X., Hu H. TarPmiR: a new approach for microRNA target site prediction. *Bioinformatics*. 2016. V. 32 (18). P. 2768-2775.

7. Димитриади Т.А., Бурцев Д.В., Дженкова Е.А., Кутилин Д.С. Дифференциальная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях разной степени тяжести // *Успехи молекулярной онкологии*. 2020. № 7 (2). P. 47-61.

8. Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC biotechnology*. 2011. V. 11 (1). P. 70.

9. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002. V. 3. research0034.1.

10. Backes C., Khaleeq Q.T., Meese E., Keller A. miEAA: microRNA enrichment analysis and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2016. V. 44 (W1). P. W110-6.

11. Urbańska K., Orzechowski A. Unappreciated Role of LDHA and LDHB to Control Apoptosis and Autophagy in Tumor Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2019. V. 20 (9). P. 2085.

12. Ayoub N., Jeyasekharan A.D., Bernal J.A., Venkitaraman A.R. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature*. 2008. V. 453 (7195). P. 682-686.

13. Scully R., Xie A. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat. Res*. 2013. V. 750 (1-2). P. 5-14.

14. Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г., Габричидзе П.Н., Донцов В.А., Легостаев В.М., Шляхова О.В., Лиман Н.А., Солнцева А.А., Крохмаль Ю.Н. Аберрантная

транскрипционная активность генов как фактор радиорезистентности клеток линии НТ-29. Современные проблемы науки и образования. 2020. № 3. [Электронный ресурс]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29831> (дата обращения: 23.11.2020).

15. Abdelsattar Z.M., Wong S.L., Regenbogen S.E., Jomaa D.M., Hardiman K.M., Hendren S. Colorectal cancer outcomes and treatment patterns in patients too young for average-risk screening. Cancer. 2016. V. 122. P. 929-934.