

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ПРЯМОЙ КИШКИ

Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г., Павлятенко И.В., Савченко Д.А., Габричидзе П.Н., Гварамиа А.К., Шляхова О.В., Бабенков О.Ю.

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

Радиорезистентность опухолевых клеток, приводящая к неполному ответу опухоли на лечение, в настоящее время остается главной проблемой лучевой терапии злокачественных опухолей прямой кишки. За последние 30 лет был предложен ряд молекулярных маркеров в качестве предикторов ответа на лучевую терапию, однако ни один из них не вошел в клиническую практику. Соответственно, скрининг подобных маркеров остается актуальной задачей, для решения которой необходимо интегрировать данные по различным типам биомаркеров, полученным при проведении лучевой терапии по унифицированной схеме. Поэтому целью исследования стал поиск маркеров радиорезистентности опухолей прямой кишки на основании данных по вариации числа копий генов, экспрессии генов и микроРНК. В исследование было включено 75 больных раком прямой кишки и 30 условно-здоровых доноров. Лучевая терапия проводилась по схеме РОД = 2,4 Гр до СОД = 54 Гр на линейном ускорителе частиц Novalis TX. Показатели экспрессии генов и микроРНК определяли в образцах биопсии, показатель копийности – в образцах биопсии и внеклеточной ДНК методом Real-Time qPCR. Было показано, что эффективность лучевой терапии связана с aberrантной экспрессией 13 микро-РНК (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), которые обеспечивают эффективную регуляцию системы репарации ДНК (*BRCA-2, H2AX и RBBP-8*) и регуляцию апоптоза (*CASP-9 и BCL-2*). В свою очередь экспрессия генов, таргетируемых этими микроРНК, также может выступать в роли маркера чувствительности к лучевой терапии. В ходе исследования была подтверждена взаимосвязь между экспрессией и копийностью генов, что позволяет использовать показатель копийности генетических локусов *CASP-9, BCL-2, BRCA-2, H2AX и RBBP-8* также в качестве предикторов эффективности лучевой терапии в образцах биопсии, а показатель копийности генов *H2AX и RBBP-8* – в качестве маркеров эффективности лучевой терапии во вДНК больных раком прямой кишки.

Ключевые слова: копийность генов, экспрессия генов, микроРНК, лучевая терапия, радиорезистентность, апоптоз, репарация ДНК

GENETIC AND EPIGENETIC PREDICTORS OF RECTAL TUMORS RADIOTHERAPY EFFECTIVENESS

Kutilin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G., Pavlyatenko I.V., Savchenko D.A., Gabrichidze P.N., Gvaramiya A.K., Shlyakhova O.V., Babenkov O.Yu.

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

The main problem of rectal tumors radiation therapy remains the radioresistance of tumor cells, which leads to a low degree of tumor response to treatment. Over the past 30 years, a number of molecular markers have been proposed as predictors of response to radiation therapy, but none have entered clinical practice. Accordingly, the screening of such markers remains an urgent task, for the solution of which it is necessary to integrate data on various biomarkers types obtained during radiation therapy according to a unified scheme. Therefore, the aim of the study was to screen markers of rectal tumors radioresistance based on data on gene copy number, gene expression and microRNA. The study included 75 patients with diagnosed rectal cancer and 30 apparently healthy donors (without oncological pathology). Radiation therapy was carried out on Novalis TX according to the scheme SFD = 2.4 Gy to TFD = 54 Gy. Expression indicators of genes and microRNA were determined in biopsy samples, copy number in biopsy samples and extracellular DNA by the Real-Time qPCR method. It was shown that the effectiveness of radiation therapy is associated with the differential expression of 13 microRNAs (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), which provides efficient regulation of DNA double-strand break repair system (*BRCA2, H2AX and RBBP8*) and regulation of apoptosis (*CASP9 and BCL2*). In turn, the expression of genes targeted by these microRNAs can also act as a marker of sensitivity to radiation therapy. The study confirmed the relationship between gene expression and copy number, which makes it possible to use the copy number of genes *CASP-9, BCL-2, BRCA-2, H2AX и RBBP-8* also as predictors of radiation therapy

effectiveness in biopsy samples, and the copy number of genes *H2AX* and *RBBP-8* as a marker of radiation therapy effectiveness in cfDNA of rectal cancer patients.

Keywords: gene copy number variation, gene expression, microRNA, radiation therapy, radioresistance, apoptosis, DNA repair

Среди всех онкологических заболеваний в мире рак прямой кишки (РПК) занимает одну из лидирующих позиций по показателю летальности: в 2020 г. было зарегистрировано более 310 тыс. смертей от данной патологии [1].

Лучевая терапия (ЛТ) при РПК применяется для облегчения симптомов и локального контроля заболевания [2]. Протоколы ЛТ РПК сильно изменились за последнее десятилетие, но полный клинический ответ достигается лишь у небольшого числа пациентов. Главная причина плохого ответа опухолей на ЛТ – формирование радиорезистентности злокачественных клеток. За последние 30 лет был предложен значительный перечень молекулярных маркеров для предсказания ответа на ЛТ, однако ни один из них так и не вошёл в клиническую практику в 2021 г. Данное обстоятельство связано с неполнотой проведенных ранее исследований, которые оценивали лишь определенный класс биомаркеров (либо генетических, либо протеомных, либо эпигенетических), не оценивали эффективность, специфичность и чувствительность этих маркеров, а также использовали неунифицированные схемы лучевой терапии и были выполнены на незначительных по объему и неоднородных выборках [3; 4]. Всё это подчеркивает необходимость проведения комплексного сравнения и интегрирования различных типов молекулярных маркеров, полученных при проведении ЛТ по унифицированной схеме.

Поэтому целью исследования стал поиск маркеров радиорезистентности опухолей прямой кишки на основании данных по вариации числа копий генов, экспрессии генов и микроРНК.

Материалы и методы исследования

Клиническая характеристика пациентов. В исследование было включено 75 пациентов (16 женщин, 59 мужчин) с диагностированным РПК (возраст 31–81 год, медиана возраста 59,8±5 лет), проходивших в 2019–2021 гг. стационарное лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии», а также 30 условно-здоровых индивидуумов (без онкологической патологии). Выборку гистологически подтвержденных опухолей составили аденокарциномы (21 % локальные (T3N0M0), а 79 % – с метастазами в регионарные лимфатические узлы (T3N1-2M0)). ЛТ проводилось на линейном ускорителе частиц Novalis TX (разовая очаговая доза (РОД) 2,4 Гр до суммарной очаговой дозы (СОД) 54,0 Гр). Для выделения ДНК и РНК использовали парные фрагменты биопсии условно-нормальных и опухолевых тканей прямой кишки, полученные при видеокOLONоскопии (ВКС) до ЛТ.

Экстракция РНК, оценка экспрессии генов и микро-РНК. Образец ткани гомогенизировали методом механического воздействия с добавлением тризола (QIAzol, Qiagen). Выделение тотальной РНК проводили с помощью набора RNeasy Plus Universal Kits (Qiagen) по инструкции, предоставленной производителем. Для устранения контаминации геномной ДНК выделенную РНК обрабатывали ДНКазой-1. Реакцию синтеза комплементарной ДНК (кДНК) осуществляли при помощи набора «РЕВЕРТА-Л» (Интерлабсервис, Россия) по инструкции, предоставленной производителем.

Методом ПЦР в реальном времени (Real-Time qPCR, RT-qPCR) проводили оценку относительной экспрессии двадцати семи генов (табл. 1). Стабильность экспрессии для подбора референсных генов (*GAPDH*, *ACTB* и *B2M*) оценивали с помощью алгоритма, описанного нами ранее [5]. Высокоспецифичные синтетические олигонуклеотиды (праймеры) были разработаны с использованием программы Primer-3 и базы данных GenBank (National Center for Biotechnology Information) (табл. 1).

Таблица 1

Синтетические олигонуклеотиды для определения экспрессии генов

№	Праймеры	Последовательности праймеров	№	Праймеры	Последовательности праймеров
1	BRCA1(F)	ACCTGTCTCCACAAAGTGTGA	30	BRIP1(R)	CTCATCTGCTGGTTTCCCACT
2	BRCA1(R)	ACACTGTGAAGGCCCTTTCT	31	CDK1(F)	AAGCCGGGATCTACCATAACC
3	BRCA2(F)	AGTTGGCTGATGGTGGATGC	32	CDK1(R)	CATGGCTACCACTTGACCTGT
4	BRCA2(R)	GGATCCACACCTGGAGTGTG	33	CDKN1B(F)	TAATTGGGGCTCCGGCTAAC
5	PTEN(F)	GGCACAAGAGGCCCTAGATA	34	CDKN1B(R)	GAAGAATCGTCGGTTGCAGGT
6	PTEN(R)	CATAGCGCCTCTGACTGGG	35	CCND1(F)	GATCAAGTGTGACCCGGACT
7	CASP3(F)	CTGGAATATCCCTGGACAACAGT	36	CCND1(R)	CTGGGGTCCATGTTCTGCT
8	CASP3(R)	TCGACATCTGTACCAGACCGA	37	CCND3(F)	GTGGAGACTGGCTCTGTTCCG
9	CASP8(F)	CTGAAGCAAACAGCCAGTGC	38	CCND3(R)	TCACATACTCCTCGTCAGGT
10	CASP8(R)	GACCTCAATTCTGATCTGCTCAC	39	FGFR2(F)	AACAGTCATCCTGTGCCGAA
11	GAPDH(F)	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	40	FGFR2(R)	TGGACTCAGCCGAAACTGTTA
12	GAPDH(R)	TCGCCCACTTGATTTTGGGA	41	KU70(F)	ACGTAGAGGGCGTTGATTGG
13	BAX(F)	GGGACGAACTGGACAGTAACA	42	KU70(R)	TGGCTACTGCTCACTTGGC
14	BAX(R)	GCTGCCACTCGGAAAAAGAC	43	RAD50(F)	GCGTGCGGAGTTTTGGAATAG
15	B2M(F)	AGATGAGTATGCCTGCCGTG	44	RAD50(R)	TTGAGCAACCTGGGATCGT
16	B2M(R)	CCATGATGCTGTTACATGTCTC	45	RAP80(F)	GAGTGAGCAGGAAGCTAGGG
17	BCL-2(F)	GGATCCAGGATAACGGAGGC	46	RAP80(R)	AGAAGGCCGGCAACTATTCA
18	BCL-2(R)	GAAATCAAACAGAGGCCGCA	47	RB1 (F)	TTGTAACGGGAGTCGGGAGA
19	CASP-9(F)	TGAGACCCTGGACGACATCT	48	RB1 (R)	TCAAACCTCAAGCCTGACGAGA
20	CASP-9(R)	TCCCTTTCACCGAAACAGCA	49	Rif1 (F)	GGCTGTTTCCATCGGTCACT
21	P53(F)	TTGGAACCTCAAGGATGCCCA	50	Rif1 (R)	CATACGACTGGTCAGAGTCAGG
22	P53(R)	CGGGAGGTAGACTGACCCT	51	RNF168(F)	GCCAGTTCGTCTGCTCAGTA
23	MDM2(F)	TAGGAGATTTGTTTGGCGTGC	52	RNF168(R)	CTGCCGCCACCTTGCTTAT
24	MDM2(R)	CCTGCTGATTGACTACTACAA	53	TGFB1(F)	TGGACATCAACGGGTTCACTAC
25	AKT1(F)	ATCGAACGCACSTTCCATGT	54	TGFB1(R)	CCATGAGAAGCAGGAAAGGC
26	AKT1(R)	AAACTCGTTCATGGTCACGC	55	TopBP1(F)	CCAACGAGTTCAGAAATGTCCAG
27	ATM(F)	TGCGTGGCTAACGGAGAAAA	56	TopBP1(R)	AACGCCACTAAAAGGGTCACA
28	ATM(R)	ATCACTGTCACTGCACTCGG	57	ACTB(F)	AACCGCGAGAAGATGACCC
29	BRIP1(F)	TTACCCGTACAGCTTGCTA	58	ACTB(R)	AGCACAGCCTGGTAGCAAC

Реакцию амплификации проводили в смеси, состоящей из 1x ПЦР-буфера, 0,2 мМ dNTP, 1,5 мМ MgCl₂, 0,6 мМ синтетических олигонуклеотидов, 0,1 U/мкл Taq-полимеразы и 15 нг комплементарной ДНК. Смесь инкубировали в Real-Time термоциклере Bio-Rad CFX 96 при следующих температурных условиях: 94 °С – 240 с и далее 39 повторов (циклов):

°C – 9 с, 57 °C – 25 с, 72 °C – 45 с. Относительную экспрессию генетических локусов (RE) рассчитывали по формуле $RE = E^{-\Delta\Delta C_t}$, учитывающей нормализацию по генам референсным генам (*GAPDH*, *ACTB* и *B2M*) и уровню мРНК соответствующих генов-мишеней в образцах нормальной ткани. Схема нормализации была следующей: 1 – расчёт среднего геометрического $C(t)$ референсных генов; 2 – вычисления дифференциальной разницы порогового цикла ($\Delta C(t)$): $C(t)_{target} - C(t)_{reference}$; 3 – медианы $\Delta C(t)$ каждого гена-мишени для условно-нормальной и опухолевой ткани; 4 – вычисление отношения $\Delta C(t)_{\text{медиана опухолевой ткани}} / \Delta C(t)_{\text{медиана нормальной ткани}}$ ($\Delta\Delta C(t)$); 5 – вычисление окончательного результата $E^{-\Delta\Delta C(t)}$. [6].

С помощью баз данных (MirTarBase, miRDB и TargetScan) были отобраны микро-РНК, ассоциированных с чувствительностью опухолевых клеток к ЛТ. В качестве референсной микроРНК использовали U6. Алгоритм Balcells I. использовали для разработки синтетических олигонуклеотидов. Выделенную суммарную РНК использовали в реакции обратной транскрипции со специфичными RT-праймерами, одновременно с полиаденилированием [7]. Изменение относительной экспрессии микроРНК также оценивали методом RT-qPCR.

Экстракция ДНК и определение вариаций числа копий генов (CNV). ДНК экстрагировали из фенол-хлороформной фазы реагента QIAzol (Quagen) по протоколу производителя. Из плазмы крови проводили выделение внеклеточной опухолевой ДНК (внДНК) при помощи набора «ДНК-Плазма-М» (Тест-Ген, Россия). Принцип выделения внДНК с использованием данного набора состоит в обратимом связывании нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц, после чего следуют этапы инкубаций, отмывок, высушивания и элюции (рис. 1). Перед использованием набора была проведена пред-подготовка образцов крови, 10 мл которой смешивали с 3 мл фосфатного буфера (pH 7,5) и центрифугировали 20 мин при 1500 об/мин и температуре 10 °C, разделяя, таким образом, плазму и фракцию клеток.

Для определения вариаций числа копий генов (CNV) были разработаны последовательности 37 пар синтетических олигонуклеотидов, включая 3 пары для референсных генетических локусов *ACTB*, *B2M* и *GAPDH* (табл. 2). Для дизайна праймеров использовали собственный скрипт на языке R и базу данных NCBI GenBank. CNV определяли методом RT-qPCR в трех технических повторах. Относительную копиюность (RCN) рассчитывали по формуле $RCN_x = 2^{-\Delta C(t)}$, где $\Delta C(t) = C(t)_{\text{исследуемого гена}} - C(t)_{\text{референсного гена}}$, вычисляли медиану $RCN_{\text{оп}}$ опухолевых образцов и медиану $RCN_{\text{норм}}$ нормальных для каждого гена и соотношение: $RCN_{\text{оп}}/RCN_{\text{норм}}$.

Статистический и биоинформационный анализ выполняли на языке R в среде RStudio версии 8.10.173.987. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро – Уилка ($n < 50$), значимость межгрупповых различий определяли с использованием критерия

Манна – Уитни (поправка Бонферрони), анализ взаимосвязей исследуемых показателей проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена (r).

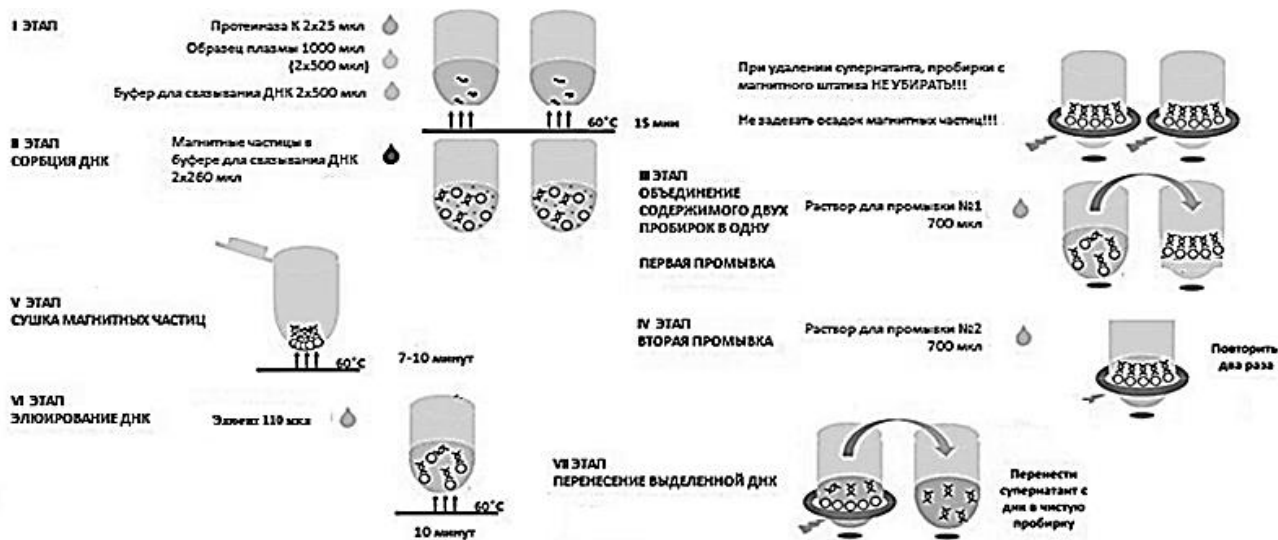


Рис. 1. Схема экстракции вДНК из плазмы крови

Для кластерного анализа использовали параметры Hierarchical Clustering и Euclidean distance. Группировку генетических локусов по выполняемым ими биологическим функциям осуществляли с помощью алгоритма FMD (Functional module detection). Q -value вычисляли с помощью одностороннего точного критерия Фишера (поправка Бенджамини – Хохберга) [8]. Биоинформационный поиск микроРНК осуществляли по реверсированному алгоритму TarPmiR, в основе которого лежит алгоритм машинного обучения random forest (объединяет метод случайных подпространств и метод бэггинга Бреймана), позволяющий прогнозировать сайт связывания матричной РНК и микроРНК [9].

Таблица 2

Последовательности синтетических олигонуклеотидов
для определения вариаций числа копий генов

№	Название олигонуклеотида	Последовательности олигонуклеотидов	№	Праймеры	Последовательности олигонуклеотидов
1	AKT1_F	ATGGACAGGGAGAGCAAAGT	38	Rif1_R	TCCAAGTCTCCAACAGCGG
2	AKT1_R	TGATGCACCAGCTGACAGG	39	RNF168_F	TGAGGGGAGGAGAGGACTTG
3	ATM_F	GCAAAAACCAAAATGTATCAGCCTCA	40	RNF168_R	AGGCAAACAGGAATACCCCG
4	ATM_R	GACCAAACACTACTGATTTCTGTCAT	41	TGFB1_F	TTGAGACTTTTCCGTTGCCG
5	BRIP1_F	GAAGAACTTGTACGCCTGGGG	42	TGFB1_R	GAGGGCTGGTCCGGAATG
6	BRIP1_R	TCTTGTATTAGTTCTCGGGCTGTG	43	TopBP1_F	TGGGCGGACGAGTATACAGA
7	BRCA1_F	GTAGCCSCTTGGTTTCCGTG	44	TopBP1_R	AGGTTTCTTCAGGTTTGCAGC
8	BRCA1_R	CCSTTCCCGGGACTCTACT	45	TP53_F	GGTCCGTGGGTTGGTAGTTT
9	BRCA-2_F	TGCATCCCTGTGTAAGTGCAT	46	TP53_R	GTGTGGGATGGGGTGAGATT
10	BRCA-2_R	ACGTACTGGGTTTTAGCAAGC	47	XRCC4_F	CAGACTGGTTTCTTCAACCT
11	CDK1_F	CAGGGGATTGTGTTTTGCACT	48	XRCC4_R	TCTGCAGGTGCTCATTTTTGG
12	CDK1_R	ACCACTATTCCACTTGCCTCAT	49	BAX_F	GCCTCTCTCCTACTTTGGG
13	CDKN1B_F	TCGGGGTCTGTGCTTTTGG	50	BAX_R	AAACACAGTCCAAGGCAGC
14	CDKN1B_R	CTCCCGTTAGACACTCGCAC	51	CASP8_F	TCTTTATGATATTGGGGAACAACCTG
15	CCND1_F	GGTGAACAAGCTCAAGTGGAAC	52	CASP8_R	GTTCTTGCTTCTTTGCGGA
16	CCND1_R	CCGGCCAGGGTCACTAA	53	CASP3_F	ATGCAGCAAACCTCAGGGAA
17	CCND3_F	TTCCACGGTTGCTACATCGT	54	CASP3_R	TTCACCATGGCTCAGAAGCA

18	CCND3_R	ACACAGCAGCTCCATACTCG	55	CASP-9_F	CTCCACTTCCCCTGAAGACG
19	EXO1_F	GTTACCCGTGTTCTGCGTTG	56	CASP-9_R	CTGGGTGTGGCAAACCTAGA
20	EXO1_R	GAACCCACCCATTAGCCTCC	57	MDM2_F	TCTTTGGGACCCATCTACCT
21	FGFR2_F	CAAGGACCACTCTTCTGCGT	58	MDM2_R	AGAATGCTTTAGTCCACCTAACCTT
22	FGFR2_R	CTTGAATGGCAACGTCCTC	59	BCL-2_F	GAGTGGGATGCGGGAGATG
23	HIST1 H2_F	CGTGCTACTGCCAAGAAGA	60	BCL-2_R	GGTGAAGGGCGTCAGGTG
24	HIST1 H2_R	AGCCTTTGGTTCCTTTGGGAT	61	RBBP-8_F	ACCGAGGATTTGGCACTCTG
25	H2AX_F	AGGCCTCCCAGGAGTACTAA	62	RBBP-8_R	TCCGAGATTGCCTCGGGATT
26	H2AX_R	CTGAAGCGGCTCAGCTCTTT	63	EP300_F	TCGGCGAATTTGTGCTCTTG
27	KU70_F	AAGATCATAAGCAGTGATCGAGA	64	EP300_R	CCTTTTTCTCTTCGCCGGGT
28	KU70_R	TCCAGTCTCTGTAAGACGTA	65	LIG4_F	GGGTAAAGGATCACGGGGTG
29	PTEN_F	GTCCAGAGCCATTTCCATCCT	66	LIG4_R	CCAGACCCAACACGAGAGAG
30	PTEN_R	TGTCATGTCTGGGAGCCTGT	67	C-FLIP_F	GGCTCCCAGAGTGTGTATGG
31	RAD50_F	TGGCTGGCAGGATCTTTGG	68	C-FLIP_R	GGCCTCTGACACCACATAG
32	RAD50_R	GCTTAACTGAGGCCGAAGCA	69	GAPDH_F	GCTGAACGGGAAGCTCACT
33	RAP80_F	CAGATGTACTGGCCACTCGG	70	GAPDH_R	GCAGTTTTTCTAGACGGCAG
34	RAP80_R	CAGTGCCTAGATGTGTCCCC	71	ACTB_F	CACCCTGAAGTACCCCATCG
35	RB1_F	TCCGGTTTTTCTCAGGGGAC	72	ACTB_R	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAG
36	RB1_R	CAGCGAGCTGTGGAGGAG	73	B2M_F	TGAGTGCTGTCTCCATGTTGA
37	Rif1_F	GGCTGTTTCCATCGGTCCT	74	B2M_R	ATTCTCTGCTCCCCACCTCT

Для оценки участия дифференциально экспрессирующихся микроРНК в ключевых клеточных сигнальных путях проводили ORA (Over-Representation Analysis). Статистическую значимость в ORA рассчитывали с применением точного критерия Фишера [10].

Результаты исследования и их обсуждение

Эффективность ЛТ у больных РПК и aberrantная экспрессия генов. Данные по экспрессии 27 генетических локусов в образцах биопсии опухолевой ткани прямой кишки использовали в кластерном анализе (параметры [Hierarchical Clustering&Euclidean distance]), позволившем определить наличие двух крупных кластеров, соответствующим двум группам пациентов. В первой группе у 79 % пациентов была повышена экспрессия гена *CASP9*, у 95 % снижена экспрессия генов *BCL-2*, *BRCA-2*, *H2AX* и *RBBP-8*. Во второй группе у 100 % пациентов снижена экспрессия *CASP-9* и у 91 % повышена экспрессия *BCL-2*, *BRCA-2*, *H2AX* и *RBBP-8*.

Генетические локусы также были разделены на кластеры по выполняемым функциям: 1) регуляция репарации ДНК (*BRCA-2*, *H2AX*, *RBBP-8*), 2) регуляция реализации проапоптозных сигналов (*CASP-9*), 3) ингибирование проапоптозных сигналов (*BCL-2*). Межгенные взаимодействия и их сила, вычисленные с помощью алгоритма GIANT [11], представлены на рис. 2. С помощью другого биоинформационного алгоритма, основанного на методе машинного обучения Gene Multiple Association Network Integration, были оценены особенности взаимодействия между генетическими локусами (определена функция конкретного локуса в составе сложной сигнальной сети из множества генетических локусов) *CASP-9*, *BCL-2*, *BRCA-2*, *H2AX*, *RBBP-8* и *SPO-11*, *FKBP-8*, *RAD-50*, *SPGF-25*, *PNCA3*, *CASP-6*, *BRCA-1*, *MND-1*, *APPL-1*, *MRE-11A*, *NBN*, *TP-53*, *BP-1*, *RAD-51*, *MDC-1*, *DFNA64*, *APAF-1*, *BIK*, *ATM*, *CMM6*, *AGEL* (табл. 3).

Таблица 3

Межгенные взаимодействия для локусов *BCL-2*, *BRCA-2*, *H2AX*, *CASP-9*, *RBBP-8*.

Ген	Индекс	Функция
<i>RBBP-8</i>	0.6478	Регуляция клеточного цикла, уровня повреждения ДНК и репарации ДНК
<i>BRCA-2</i>	0.6189	Регуляция гомологичной рекомбинации
<i>H2AFX</i>	0.5411	Контроль клеточного цикла и конформации ДНК, контроль уровня повреждения ДНК и регуляция репарации ДНК, регуляция клеточного ответа на ионизирующее излучение
<i>BCL-2</i>	0.5340	Регуляция апоптоза в ответ на повреждение ДНК и воздействие радиации
<i>CASP-9</i>	0.5034	Активация эндопептидазы цистеинового типа, запуск апоптоза и клеточный ответ на воздействие радиации

Из представленных в табл. 3 функций генов ключевыми являются регуляция апоптоза и репарации ДНК, изменение конформации ДНК и регуляция клеточного цикла.

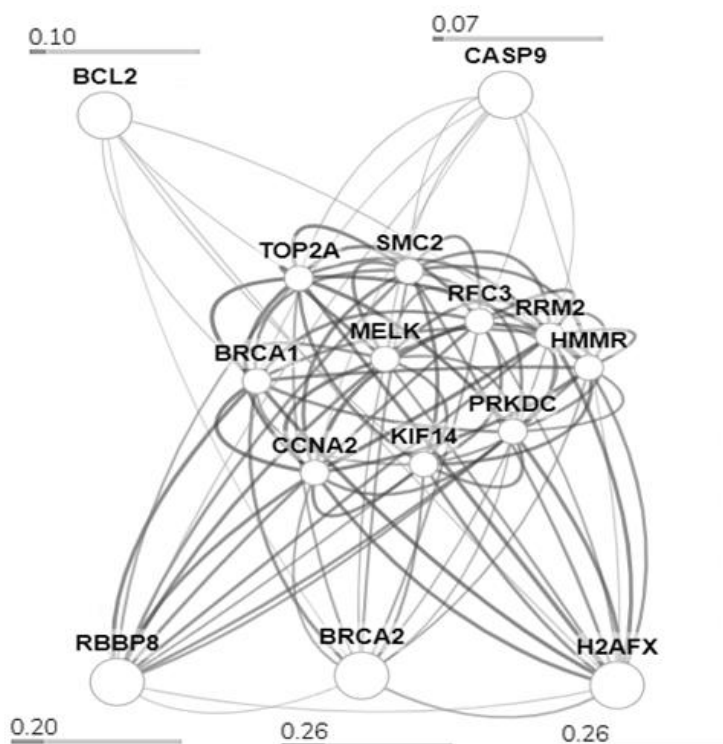


Рис. 2. Визуализация межгенного взаимодействия, его направленности и силы для локусов *CASP-9*, *BCL-2*, *BRCA-2*, *H2AX* и *RBBP-8* в тканях прямой кишки

Очевидно, что в силу ингибирования репарационной системы ДНК (*BRCA-2*, *H2AX*, *RBBP-8*) и повышения чувствительности к стресс-индуцированному апоптозу (аберрантная экспрессия *CASP-9* и *BCL-2*) воздействие ЛТ должно быть более эффективным в первой группе, чем во второй группе. Это предположение подтвердил анализ результатов ЛТ 75 больных РПК.

Так, у 20 больных РПК был зафиксирован полный ответ на ЛТ. При этом в опухолевом биопсийном материале у этих пациентов экспрессия *H2AX* и *RBBP-8* была снижена в 3,30 и 2,50 раза ($p < 0,005$), а экспрессия *CASP-9* повышена в 4,80 раза ($p < 0,005$). У 30 больных РПК был зафиксирован частичный ответ на ЛТ, а у 25 больных – отсутствие ответа на ЛТ вообще. При этом в опухолевом биопсийном материале у этих пациентов статистически значимо ($p <$

0,005) была повышена экспрессия *BCL-2*, *BRCA-2*, *H2AX*, *RBBP-8* в 3,30; 2,00; 7,00 и 7,50 раза соответственно и снижена экспрессия *CASP-9* в 4,4 раза (рис. 3).

Таким образом, можно сделать вывод, что транскрипционный профиль локусов *BCL-2*, *BRCA-2*, *H2AX*, *CASP-9* и *RBBP-8* ассоциирован с эффективностью ЛТ, которая возрастает у больных РПК с гиперэкспрессией *CASP-9* и гипоэкспрессией *H2AX* и *RBBP-8*, и, наоборот эффективность ЛТ падает при гиперэкспрессии генов *BCL-2*, *H2AX*, *RBBP-8* и *BRCA-2*.

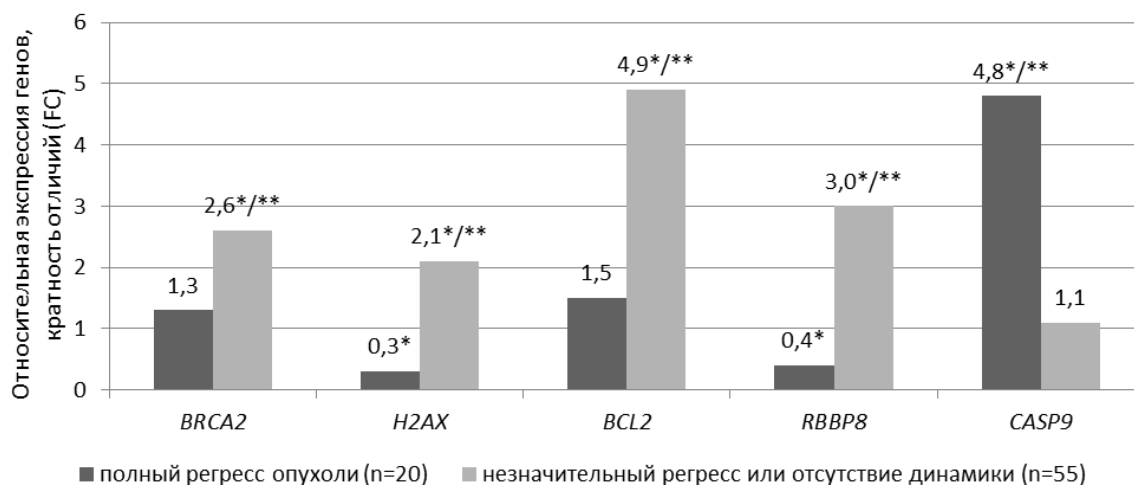


Рис. 3. Транскрипционный профиль опухолевой ткани в двух группах больных РПК (с полным регрессом – группа 1, незначительным регрессом или его отсутствием – группа 2)

* – статистически значимые отличия относительно условно-нормальной ткани прямой кишки ($p < 0,005$), ** – межгрупповые статистически значимые отличия ($p < 0,005$)

Экспрессия микроРНК и эффективность ЛТ РПК. МикроРНК являются важнейшими регуляторами уровня матричных РНК (мРНК), осуществляя регуляцию их трансляции и деградации путем взаимодействия с комплементарными участками нетранслируемых регионов их молекул [1]. С помощью модифицированного биоинформационного алгоритма TarPmiR были выявлены 1338 микроРНК таргетирующих гены *BCL-2*, *BRCA-2*, *H2AX*, *CASP-9* и *RBBP-8*. Из этих микроРНК только 86 были валидированы в базе данных miRDB (рис. 4), в том числе 26 микроРНК, образующие наиболее прочные комплексы с соответствующими генами-мишенями (минимальная свободная энергия взаимодействия в паре микроРНК-мРНК): 9 микроРНК для гена *BCL-2*, 2 микроРНК для *BRCA-2*, 12 микроРНК для *CASP-9*, 2 микроРНК для *H2AX* и 1 микроРНК для гена *RBBP-8* (табл. 4).

Таблица 4

МикроРНК, выявленные с использованием алгоритма TarPmiR*

МикроРНК	Ref_Seq_id	Ген-мишень	Координаты в геноме		Энергия	Участок связывания	miRDB
			начало	конец			
miRNA-1249-5p	NM_000633	<i>BCL-2</i>	3468	3517	-30.1	3' UTR	+
miRNA-6861-5p	NM_000633	<i>BCL-2</i>	3474	3513	-29.6	3' UTR	+
miRNA-8052	NM_000633	<i>BCL-2</i>	4393	4412	-29.3	3' UTR	+
miRNA-324-3p	NM_000633	<i>BCL-2</i>	4680	4700	-28.6	3' UTR	+

В группе больных с незначительным регрессом опухоли/отсутствием динамики после ЛТ (n = 55, группа с плохим ответом на ЛТ) обнаружено статистически значимое ($p < 0,005$) снижение экспрессии miRNA-1249-5p и miRNA-6820-3p в 2,21 и 2,04 раза соответственно относительно нормальной ткани, снижение экспрессии miRNA-6820-3p в 1,80 раза относительно пациентов с полным регрессом опухоли, снижение экспрессии miRNA-4717-5p, miRNA-3943 и miRNA-557 в 2,51; 3,33 и 2,50 раза соответственно относительно нормальной ткани, снижение экспрессии miRNA-557 в 2,25 раза относительно пациентов с полным регрессом опухоли (n = 20, группа с полным ответом на ЛТ). Также обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение экспрессии miRNA-4690-5p в 2,1 раза относительно нормальной ткани. Экспрессия miRNA-4717-5p также снижена в 1,67 раза ($p < 0,05$) относительно нормальной ткани у пациентов с полным регрессом опухоли (рис. 5).

miRNA-3943, miRNA-1249, miRNA-6820, miRNA-4717 и miRNA-557, таргетирующие ген *BCL-2*, в опухолевой ткани у больных с плохим ответом на ЛТ преимущественно гипоэкспрессированы как относительно нормальной ткани, так и относительно опухолевой ткани пациентов с полным ответом на ЛТ. Соответственно, сниженная экспрессия этих микроРНК может приводить к увеличению экспрессии гена *BCL-2*, продукт которого ингибирует активность каспаз и, как следствие, апоптоз [12]. Данное обстоятельство согласуется с показанным на рис. 3, то есть эффектом увеличения экспрессии гена *BCL-2* у пациентов с плохим ответом на ЛТ.

У больных второй группы экспрессия miRNA-6757 в опухолевой ткани статистически значимо ($p < 0,05$) ниже, в 5,00 раз и 4,40 раза относительно собственной нормальной ткани и опухолевой ткани пациентов с полным ответом на ЛТ соответственно. Ген *BRCA-2* является мишенью данной микроРНК, и её снижение должно приводить к увеличению экспрессии этого гена (рис. 3). Экспрессия miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-661, miRNA-4728, miRNA-30b и miRNA-6808 статистически значимо ($p < 0,05$) снижена в 2,5; 3,3; 1,7; 5,0; 1,8 и 5,0 раза соответственно в опухолевой ткани пациентов с полным ответом на ЛТ относительно нормальной ткани.

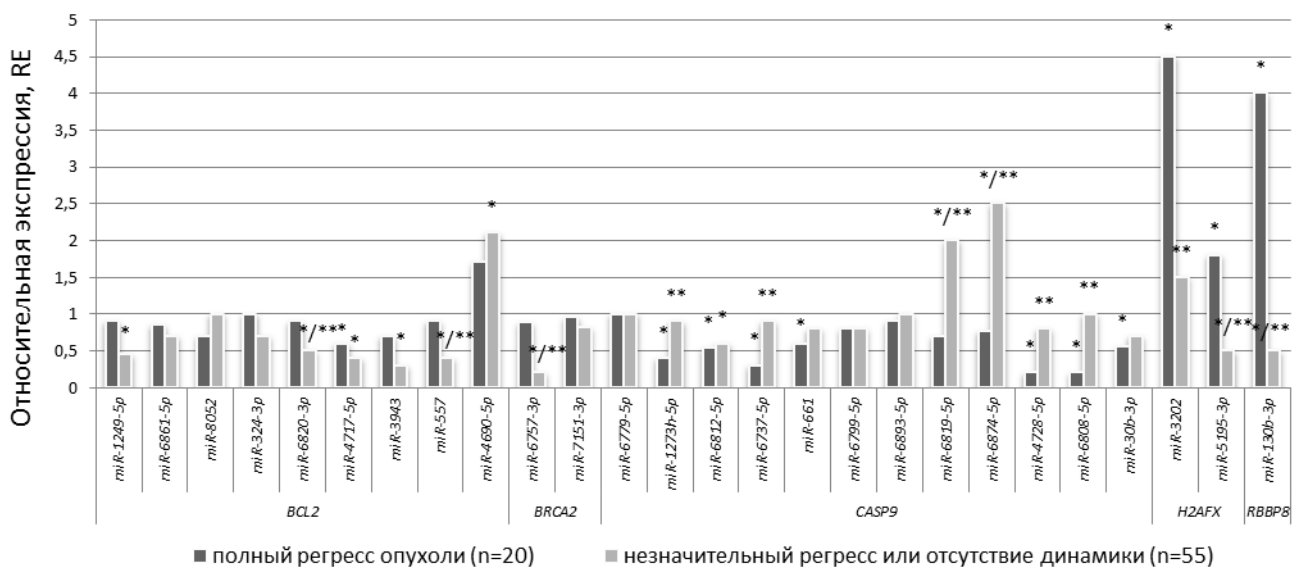


Рис. 5. Экспрессионный профиль микроРНК у больных РПК с полным регрессом опухоли или его отсутствием. * – статистически значимые отличия относительно нормальной ткани ($p < 0,05$), ** – межгрупповые статистически значимые отличия ($p < 0,005$)

У больных РПК группы 1 (полный ответ на ЛТ) выявлены статистически значимые ($p < 0,05$) изменения в экспрессии микроРНК miRNA-3202 и miRNA-5195. Так, в опухолевой ткани экспрессия miRNA-3202 была в 4,50 раза выше, чем в нормальной ткани, и в 3,00 раза выше, чем экспрессии в опухолевой ткани у больных РПК группы 2. Экспрессия miRNA-5195 была в 1,81 раза выше по сравнению с нормальной тканью и в 3,59 раза выше, чем экспрессия в опухолевой ткани у больных РПК группы 2 (рис. 5). Эти две микроРНК таргетируют мРНК H2AFX гистонового белка H2AX, который запускает процесс изменения конформации хроматина при повреждении ДНК под воздействием ЛТ [13]. Поэтому гипер-экспрессия miRNA-3202 и miRNA-5195 может способствовать гипоекспрессии H2AX, и наоборот.

В опухолевой ткани у больных РПК с плохим ответом на ЛТ обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение экспрессии miRNA-1273h в 2,30 раза, miRNA-4728 в 4,00 раза, miRNA-6819 в 2,90 раза, miRNA-6737 в 3,00 раза, miRNA-6874 в 3,30 раза и miRNA-6808-5p в 5,00 раз относительно опухолевой ткани пациентов с полным ответом на ЛТ. При этом экспрессия miRNA-6812 статистически значимо ($p < 0,005$) снижена в опухолевой ткани пациентов групп с полным и плохим ответом на ЛТ в 1,9 и 1,7 раза соответственно относительно нормальной ткани прямой кишки. CASP9 является геном-мишенью данных микроРНК, а их высокий уровень экспрессии приводит к снижению уровня мРНК каспазы-9 (инициаторной каспазы), необходимой для инициации апоптозного каскада.

Также в ходе проведенного исследования установлено, что в опухолевой ткани у больных группы 1 статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивается экспрессия miRNA-130b в 4,01 раза относительно нормальной ткани. При этом наблюдается снижение экспрессии

данной микроРНК в 2,00 раза в опухолевой ткани у больных группы 2. Соответственно, у больных группы 1 экспрессия miRNA-130b в 8.02 раза выше ($p < 0,05$) по сравнению с экспрессией у больных группы 2, что может способствовать снижению транскрипционной активности гена *RBBP-8* (регулирует пролиферацию клеток) у больных с полным ответом на ЛТ и повышению его экспрессии у больных РПК с плохим ответом на ЛТ (рис. 3).

МикроРНК имеют множество мишеней [14], поэтому для дифференциально экспрессирующихся микроРНК в опухолевых тканях двух групп больных РПК был проведен Over-Representation Analysis (ORA, табл. 5).

Таблица 5

Представленность в сигнальных путях микроРНК с дифференциальной экспрессией

Сигнальный путь/ процесс	<i>P-value</i>	микроРНК
Сигнальный каскад Notch	0,0019	miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b
RIG-I-подобного рецептора сигнальный путь	0,0025	miRNA-1249; miRNA-6820; miRNA-557; miRNA-6757; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b
Wnt -сигнальный путь	0,0059	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
p53-сигнальный каскад	0,0062	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
IL-17 сигнальный путь	0,0083	miRNA-1249; miRNA-6820; miRNA-557; miRNA-6757; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b
Толл-подобного рецептора сигнальный путь	0,0291	miRNA-1249; miRNA-6820; miRNA-557; miRNA-6757; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b
NOD-подобного рецептора сигнальный путь	0,0337	miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b ; miRNA-1249; miRNA-6820; miRNA-557; miRNA-6757; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-6874; miRNA-4728
TGF-beta сигнальный путь	0,0354	miRNA-1249; miRNA-6820; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b
VEGF сигнальный путь	0,0410	miRNA-1249; miRNA-6820; miRNA-6757; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b
Сигнальные пути сфинголипидов	0,0155	miRNA-1249; miRNA-6820; miRNA-557; miRNA-6757; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b
Функционирование сплайсосомы	0,0170	miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-6757; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-6874; miRNA-4728; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b
Сигнальные каскады эпителиальных клеток при инфекции <i>H. pylori</i>	0,0013	miRNA-1249; miRNA-6820; miRNA-557; miRNA-6757; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b
Окислительное фосфорилирование	0,0067	miRNA-1249; miRNA-6757; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-6874; miRNA-4728; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b
Переваривание и всасывание белков	0,0008	miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-6757; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b
Убиквитин-опосредованный протеолиз	0,0461	miRNA-1249; miRNA-6820; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-6874; miRNA-4728; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b
Апоптоз	0,0007	miRNA-1249; miRNA-6820; miRNA-557; miRNA-6757; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b

Результаты ORA показывают, что дифференциально экспрессирующиеся в двух группах больных микроРНК, помимо регуляции транскрипционной активности генов *BCL-2*, *CASP-9*, *BRCA-2*, *H2AX* и *RBBP-8* участвуют в контроле над ключевыми для выживания и пролиферации опухолевых клеток сигнальными путями (табл. 5). Таким образом, устойчивость и чувствительность опухолевой ткани прямой кишки, определяющая эффективность лучевой терапии, также связана с дифференциальной экспрессией микроРНК miRNA-6820, miRNA-557, miRNA-6757, miRNA-1249, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-6874, miRNA-4728, miRNA-6808, miRNA-3202, miRNA-5195-3p и miRNA-130b.

Влияние копииности генов на эффективность ЛТ РПК. Несмотря на то, что нами показана возможность использования показателя транскрипционной активности генов *H2AX*,

BRCA-2, *CASP-9*, *RBBP-8*, *BCL-2* и ряда микроРНК в оценке эффективности ЛТ РПК следует учитывать, что экспрессия генов и микроРНК является не особо стабильным показателем и способна изменяться в организме пациентов в широком диапазоне под влиянием различных факторов. К тому же матричная РНК во внеклеточной среде быстро разрушается РНКазами [15], что делает невозможным построение подходов малоинвазивной диагностики на её основе. Соответственно, требуется переход на более устойчивый в биологических жидкостях организма молекулярный маркер. CNV (copy number variation, показатель копийности генов) может быть одним из подобных маркеров, не подверженным быстрой деградации в плазме крови. Снижение или повышение числа копий определенного гена, как правило, приводит к изменению уровня экспрессии продукта этого гена – мРНК, протеина или микроРНК [16].

У 20 больных РПК первой группы в опухолевом биопсийном материале наблюдалось двукратное снижение числа копий генов *H2AX* и *RBBP-8* ($p < 0,05$), а также почти четырехкратное увеличение числа копий гена *CASP-9* ($p < 0,05$) относительно нормальной ткани. У 55 больных второй группы наблюдалось двукратное увеличение числа копий генов *BRCA-2* и *H2AX*, трехкратное увеличение числа копий гена *RBBP-8* и четырехкратное увеличение числа копий гена *BCL-2* ($p < 0,005$) относительно условно-нормальной ткани, а также четырехкратное снижение числа копий гена *CASP-9* относительно пациентов первой группы (рис. 6).

Между CNV и транскрипционной активностью исследованных генетических локусов обнаружена сильная положительная корреляция: для первой группы среднее значение $r = 0,908$, для второй группы среднее значение $r = 0,847$. Также было оценено влияние копийности генов на выживаемость больных РПК.

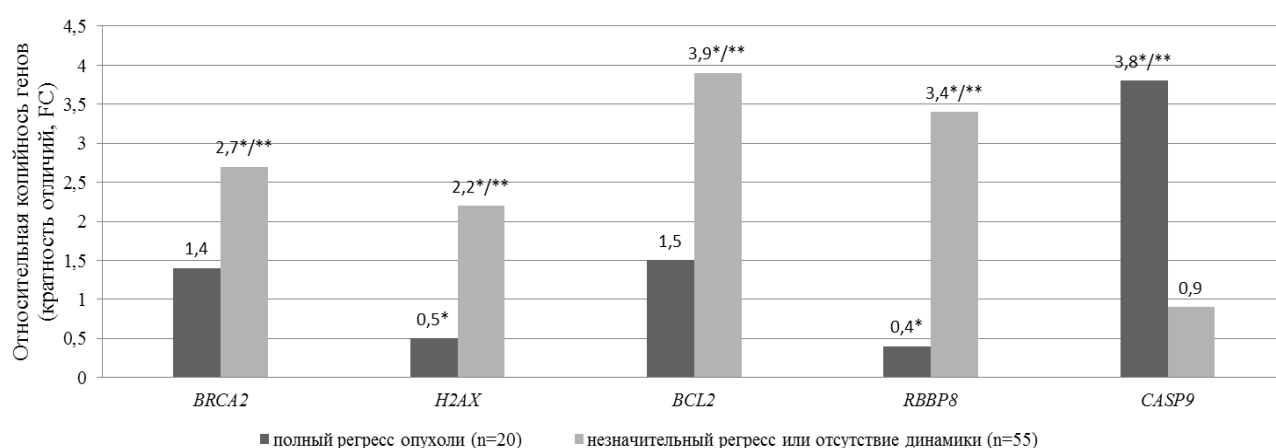


Рис. 6. Относительная копийность генетических локусов в опухолевой ткани прямой кишки у больных с полным и плохим ответом на лучевую терапию. * – статистически значимые отличия относительно нормальной ткани ($p < 0,005$), ** – межгрупповые статистически значимые отличия ($p < 0,05$)

В ходе исследования удалось установить, что на общую выживаемость больных РПК статистически значимо влиял показатель CNV 5 генетических локусов - *BRCA-2*, *RBBP-8*, *CASP-9*, *H2AX* и *BCL-2* (табл. 6).

Таблица 6

Показатель CNV и общая выживаемость больных РПК
(однофакторный регрессионный анализа Кокса)

Локус	<i>B</i>	Отношение шансов	Статистика Wald	Значимость, <i>p</i>
<i>BRCA-2</i>	3,85	7,1	4,47	0,0115
<i>H2AX</i>	5,79	6,7	5,21	0,0322
<i>CASP-9</i>	-1,99	0,2	6,55	0,0221
<i>BCL-2</i>	3,15	3,9	6,41	0,0470
<i>RBBP-8</i>	4,88	10,1	3,82	0,0289

Также установлено, что чем выше число копий генов *BRCA-2*, *H2AX*, *BCL-2* и *RBBP-8* и ниже число копий гена *CASP-9* ($p < 0,05$) в опухолевой ткани по отношению к нормальной ткани, тем выше риск летального исхода. При этом увеличение числа копий *RBBP-8* и уменьшение числа копий гена *CASP-9* в опухолевой ткани сопряжено со снижением общей выживаемости больных РПК при наличии нечувствительности к ЛТ (табл. 7).

Таблица 7

Показатель CNV и общая выживаемость больных РПК с учетом чувствительности к ЛТ
(регрессионный анализ)

Локус	β	Отношение шансов	Статистика Wald	Значимость, <i>p</i>
<i>BRCA-2</i>	5,00	5,8	3,95	0,4250
<i>H2AX</i>	7,01	6,1	4,11	0,1042
<i>CASP-9</i>	-2,11	0,1	7,12	0,0079
<i>BCL-2</i>	3,60	2,9	3,14	0,1197
<i>RBBP-8</i>	4,11	6,1	6,44	0,0390

Методом математического моделирования было предсказано, что общая выживаемость больных РПК в течение 36 месяцев после операции будет снижаться со значения 100 % при достижении в образцах опухоли медианы показателя CNV_{BRCA-2} величины более 1,9 до 87,5 %, CNV_{H2AX} более 1,4 до 91,1 %, CNV_{BCL-2} более 3,0 до 94,2 % и CNV_{RBBP-8} более 2,0 до 65,4 %. Таким образом, число копий генов *BRCA-2*, *H2AX*, *BCL-2*, *RBBP-8* и *CASP9* математически связано с риском развития летального исхода и снижением общей выживаемости больных РПК при плохом ответе на ЛТ.

Следующим этапом работы было тестирование показателя CNV *BRCA-2*, *H2AX*, *BCL-2*, *RBBP-8* и *CASP-9* во вДНК больных РПК и условно-здоровых доноров. К вДНК относят ядерную и митохондриальную ДНК клеток, подвергшихся процессам апоптоза, ДНК из лимфоцитов и ДНК различных микроорганизмов [16].

У 30 доноров и 75 больных РПК (до ЛТ и колоноскопии) из плазмы крови выделяли вДНК и определяли показатель числа копий генетических локусов *BRCA-2*, *H2AX*, *BCL-2*, *RBBP-8* и *CASP-9*. До ЛТ во вДНК больных РПК группы № 1 обнаружено снижение числа копий генов *H2AX* и *RBBP-8* в 2,03 ($p < 0,005$) и 1,74 ($p < 0,005$) раза соответственно относительно группы условно-здоровых доноров. До лучевой терапии во вДНК больных

РПК группы № 2 обнаружено увеличение числа копий генов *BRCA-2*, *H2AX*, *RBBP-8* и *BCL-2* в 2,25 ($p < 0,005$) раза, в 2,41 ($p < 0,05$) раза, в 2,63 ($p < 0,05$) и 2,17 ($p < 0,005$) раза соответственно относительно группы условно-здоровых доноров (рис. 7).

Только для двух генетических локусов (*H2AX* *RBBP-8*) обнаружено статистически значимое ($p < 0,005$) пяти- и четырехкратное отличие в числе копий во вДНК плазмы крови у больных РПК с полным ответом от больных РПК с плохим ответом на ЛТ. Соответственно, показатели копийности генов *H2AX* и *RBBP-8* во вДНК больных РПК обладают наибольшим потенциалом в качестве молекулярных маркеров для определения степени ответа на лучевую терапию.

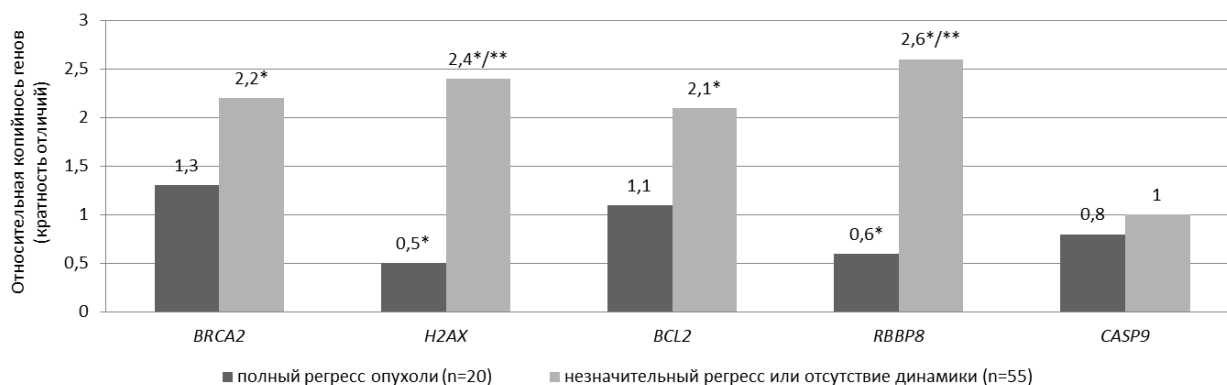


Рис. 7. CNV во вДНК у больных РПК относительно CNV во вДНК условно-здоровых доноров. * – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) относительно условно-здоровых доноров, ** – статистически значимые отличия ($p < 0,005$) от группы № 1

Также опираясь на данные корреляционного анализа (средняя величина r для копийности во вДНК и экспрессии в тканях исследуемых генов была выше 0,752), можно сделать вывод, что у больных РПК во вДНК показатель CNV генов, регулирующих репарацию ДНК и пролиферацию (*BRCA-2*, *H2AX*, *BCL-2*, *RBBP-8*) отражает уровень их CNV в тканях опухоли, где CNV, в свою очередь, регулирует уровень транскрипционной активности этих генов и в целом обеспечивает молекулярную основу чувствительности/резистентности к ЛТ.

Заключение

Таким образом, проведенный нами комплексный скрининг генетических и эпигенетических предикторов эффективности лучевой терапии опухолей прямой кишки позволил установить, что эффективность ЛТ РПК зависит от уровня экспрессии 13 микроРНК (miRNA-3202, miRNA-5195, miRNA-130b, miRNA-1249, miRNA-4728, miRNA-6820, miRNA-6757, miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-6819, miRNA-557, miRNA-6874, miRNA-6808.), обеспечивающих эффективную регуляцию системы репарации ДНК (*BRCA-2*, *H2AX* и *RBBP-8*) и апоптоза (*CASP-9* и *BCL-2*). В свою очередь, экспрессия генов, таргетируемых этими

микроРНК, также может выступать в роли маркера чувствительности к ЛТ. Подтвержденная в ходе исследования взаимосвязь между экспрессией и копийностью генов позволяет использовать показатель копийности генов *BCL-2*, *CASP-9*, *BRCA-2*, *H2AX* и *RBBP-8*, также в качестве предиктора эффективности ЛТ во образцах биопсии, а показатель копийности генов *H2AX* и *RBBP-8* в качестве маркера эффективности ЛТ во вДНК больных РПК.

Исследование выполнено в рамках госзадания «Поиск предикторов радиорезистентности рака прямой кишки и разработка персонифицированных неоадъювантных терапевтических подходов».

Список литературы

1. 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. Влияние aberrантной экспрессии микроРНК на эффективность лучевой терапии опухолей прямой кишки // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 6; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=30384> (дата обращения: 15.04.2021).
2. Romano G.M., Bianco F., De Franciscis S., Belli A. The Management of Recurrent Rectal Cancer: A European Perspective. In: Kwaan M., Zbar A. (eds) Comprehensive Rectal Cancer Care. Springer, Cham; 2019. P. 521–536.
3. Li X.F., Jiang Z., Gao Y., Li C.X., Shen B.Z. Combination of three-gene immunohistochemical panel and magnetic resonance imaging-detected extramural vascular invasion to assess prognosis in non-advanced rectal cancer patients. World J. Gastroenterol. WJG. 2016. V. 22. P. 8576–8583.
4. Sun W., Li G., Wan J., Zhu J., Shen W., Zhang Z. Circulating tumor cells: A promising marker of predicting tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemo-radiation therapy. Oncotarget. 2016. V. 7 (43). P. 69507–69517.
5. Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Солдатова К.И. Изучение стабильности экспрессии референсных генетических локусов при малигнизации тканей толстой кишки // 5-я итоговая научная сессия молодых учёных РостГМУ: сборник материалов ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. Ростов н/Д: изд-во РостГМУ, 2018. С. 33–34.
6. Kutilin D.S. Regulation of gene expression of cancer/testis antigens in colorectal cancer patients. Molecular Biology. 2020. V. 54 (4). P. 520–534.
7. 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.

8. Krishnan A., Zhang R., Yao V., Theesfeld C.L., Wong A.K., Tadych A., Volfovsky N., Packer A., Lash A., Troyanskaya O.G. Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience*. 2016. V. 19 (11). P. 1454–1462.
9. Ding J., Li X., Hu H. TarPmiR: a new approach for microRNA target site prediction. *Bioinformatics*. 2016. V. 32 (18). P. 2768–2775.
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- W116.
11. Greene C.S., Krishnan A., Wong A.K., Ricciotti E., Zelaya R.A., Himmelstein D.S., Zhang R., Hartmann B.M., Zaslavsky E., Sealfon S.C., Chasman D.I., FitzGerald G.A., Dolinski K., Grosser T., Troyanskaya O.G. Understanding multicellular function and disease with human tissue-specific networks. *Nature Genetics*. 2015. DOI: 10.1038/ng.3259w.
12. 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.
13. Scully R., Xie A. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat. Res.* 2013. V. 750 (1–2). P. 5–14.
14. 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.
15. Bryzgunova O.E., Laktionov P.P. Extracellular nucleic acids in urine: sources, structure, diagnostic potential. *Acta Naturae*. 2015. V. 7 (3). P. 48–54.
16. Кошелева Н.Г., Гусарева М.А., Удаленкова И.А., Фатькина Н.Б., Легостаев В.М., Шляхова О.В., Лиман Н.А., Карнаухова Е.А., Крохмаль Ю.Н., Кутилин Д.С. Показатель копийности генов во внеклеточной днк плазмы крови как маркер для малоинвазивной оценки эффективности лучевой терапии опухолей прямой кишки // *Современные проблемы науки и образования*. 2020. № 6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=30396> (дата обращения: 15.04.2021).