

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-4-41-49>

Уровень копийности генетических локусов и малоинвазивная оценка эффективности лучевой терапии у больных раком прямой кишки

Д.С. Кутилин, М.А. Гусарева, Н.Г. Кошелева

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63

Контакты: Денис Сергеевич Кутилин k.denees@yandex.ru

Введение. Предоперационная лучевая терапия злокачественных опухолей прямой кишки не всегда эффективна, что связано с формированием радиорезистентности опухолевых клеток. Последняя может быть опосредована aberrантной копийностью генетических локусов.

Цель исследования – поиск молекулярно-генетических маркеров для малоинвазивной оценки эффективности лучевой терапии злокачественных опухолей прямой кишки.

Материалы и методы. Исследование проводили в 4 этапа: 1) биоинформационный анализ базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas) с использованием алгоритма GISTIC; 2) валидация данных биоинформационного анализа в модельном эксперименте на клеточной культуре; 3) исследование особенностей копийности генов, валидированных в модельном эксперименте, у пациентов с разным ответом на лучевую терапию; 4) определение показателя копийности генов во внеклеточной ДНК у пациентов с разным ответом на лучевую терапию. В исследовании добровольно участвовали 100 пациентов с аденокарциномой (G₁₋₂) прямой кишки, а также 30 условно здоровых индивидуумов. Радиотерапию осуществляли по стандартному протоколу (разовая очаговая доза 2,4 Гр, суммарная очаговая доза 54 Гр) на линейном ускорителе Novalis TX. Показатель относительной копийности генетических локусов оценивали методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Биоинформационный анализ выявил 32 локуса-кандидата. Валидация этих маркеров на клетках HT-29, подвергнутых облучению, показала, что уровень копийности *CASP9*, *BRCA2*, *H2AX* и *RBBP8* был повышен, а копийности *BCL2* снижен относительно клеток, не подвергнутых облучению. У 74 пациентов с частичным ответом на лучевую терапию было обнаружено повышение копийности *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8* и *BCL2*, что положительно коррелировало с показателем копийности этих генов во внеклеточной ДНК плазмы крови.

Заключение. Применение комплексного подхода, основанного на биоинформационном анализе базы данных TCGA, моделировании лучевой терапии на культуре клеток и валидации выявленных маркеров на образцах тканей и крови больных аденокарциномой прямой кишки, позволило выявить ассоциацию количества копий генов *RBBP8*, *BRCA2*, *H2AX* и *BCL2* с эффективностью предоперационной лучевой терапии.

Ключевые слова: рак прямой кишки, радиорезистентность, копийность генов, клеточные линии, апоптоз, репарация ДНК

Для цитирования: Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г. Уровень копийности генетических локусов и малоинвазивная оценка эффективности лучевой терапии у больных раком прямой кишки. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):41–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-41-49

Genetic locus copy number variation level and minimally invasive assessment of radiation therapy efficiency in rectal cancer patients

Denis S. Kutilin, Marina A. Gusareva, Natalia G. Kosheleva

National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14 Liniya St., Rostov-on-Don 344037, Russia

Contacts: Denis Sergeevich Kutilin k.denees@yandex.ru

Background. Preoperative radiation therapy of rectum malignant tumors is not always effective, which is associated with tumor cells radioresistance formation. The latter may be mediated by the aberrant copy number of genetic loci.

Aim. The screening of molecular genetic markers for a minimally invasive assessment of the radiation therapy effectiveness for rectum malignant tumors.

Materials and methods. The study was carried out in 4 stages: 1) bioinformatic analysis of TCGA (The Cancer Genome Atlas) databases using the GISTIC algorithm; 2) validation of bioinformatics analysis data in a model experiment on cell culture; 3) study of genes copy number features validated in a model experiment in patients with different responses to radiation therapy; 4) determination of the gene copy number in cell-free DNA in patients with different responses to radiation therapy. 100 patients with rectum adenocarcinoma (G_{1-2}), as well as 30 apparently healthy individuals, took part in the work. Radiotherapy was carried out according to the standard protocol (single focal dose 2.4 Gy, total focal dose 54 Gy) on a Novalis TX linear accelerator. The relative copy number of genetic loci was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction.

Results. Bioinformatic analysis revealed 32 candidate genetic loci. Validation of these markers on irradiated HT-29 cells showed that the copy number of *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9* and *RBBP8* genes was increased, while the copy number of *BCL2* gene was reduced relative to intact cells. In 74 patients with a partial response to radiation therapy, an increase in the copy number of *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8* and *BCL2* was found, which positively correlated with the copy number of these genes in blood plasma cell-free DNA.

Conclusion. The application of an integrated approach based on TCGA database bioinformatic analysis, radiation therapy modeling in cell culture and validation of the identified markers on tissue and blood samples of patients with rectal adenocarcinoma revealed *RBBP8*, *BRCA2*, *H2AX* and *BCL2* genes copy number association with the preoperative radiation therapy effectiveness.

Keywords: rectal cancer, radioresistance, gene copy number variation, cell lines, apoptosis, DNA repair

For citation: Kutilin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G. Genetic locus copy number variation level and minimally invasive assessment of radiation therapy efficiency in rectal cancer patients. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(4):41–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-41-49

Введение

Злокачественные опухоли прямой кишки относятся к широко распространенным заболеваниям. Каждый год в мире обнаруживают около 1 млн новых случаев рака прямой кишки (РПК), который занимает 3-е место в структуре онкологической заболеваемости и 4-е место в структуре смертности от злокачественных новообразований [1]. В последние десятилетия в лечении этой патологии применяются комбинированные подходы, в большинстве из которых лучевая терапия (ЛТ) зарекомендовала себя как неотъемлемая их часть наравне с химиотерапией и хирургическим вмешательством. В настоящее время ЛТ может быть представлена как неoadъювантная методика в самостоятельном виде (короткий курс) или в сочетании с химиотерапией (длинный курс). При стандартном протоколе ЛТ проводится с разовой очаговой дозой (РОД) 2,4 Гр до суммарной очаговой дозы (СОД) 54 Гр [2, 3]. Однако достигнуть полного патоморфологического ответа при такой схеме, к сожалению, удается далеко не всегда. Так, в метаанализе N. Hearn и соавт. [4], обобщающем опыт лечения 1817 пациентов, было показано, что частота полного патологического ответа может достигать лишь 25 % при СОД 54 Гр. Отсутствие у пациентов ответа на предоперационную ЛТ связано, как правило, с радиорезистентностью определенной группы опухолевых клеток [5]. Последняя может быть опосредована, в частности, аномальной копийностью генов (copy number variation, CNV), представляющей собой особый тип вариабельности генетической информации,

отражающий дозу гена (число его копий) и опосредованно влияющий на его транскрипционную активность [6, 7]. Уровень CNV можно определять во внеклеточной ДНК (внДНК), циркулирующей в плазме крови [8].

Целью исследования стал поиск молекулярно-генетических маркеров для малоинвазивной оценки эффективности ЛТ злокачественных опухолей прямой кишки.

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели исследование проводили в 4 этапа. На 1-м этапе был выполнен биоинформационный анализ базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas) для выявления аномального показателя CNV генов, ассоциированных с чувствительностью к ЛТ. На 2-м этапе была проведена валидация данных биоинформационного анализа в модельном эксперименте на клеточной культуре. На 3-м этапе были исследованы особенности CNV генов, валидированных в модельном эксперименте у пациентов, чувствительных и резистентных к проводимой ЛТ. На 4-м этапе проведено определение показателя CNV генов во внДНК пациентов, чувствительных и резистентных к проводимой ЛТ.

В исследование были включены 100 пациентов в возрасте 45–65 лет с аденокарциномой (G_{1-2}) прямой кишки, которые проходили лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России в 2019–2021 гг., а также 30 условно здоровых доноров (без онкологических

заболеваний). ЛТ проводили по стандартному протоколу (РОД 2,4 Гр, СОД 54 Гр) на линейном ускорителе Novalis TX (Varian, США). Пациенты, проходившие лечение, были распределены на группы в зависимости от ответа на ЛТ (подробнее см. в разделе «Результаты и обсуждение») (см. таблицу).

Распределение пациентов по группам в зависимости от ответа на лучевую терапию, n

Distribution of patients into groups depending on radiation therapy response, n

Ответ на лучевую терапию Radiation therapy response	2019 г. 2019	2020 г. 2020	2021 г. 2021
Полный ответ (TRG ₁₋₂) Full response (TRG ₁₋₂)	11	6	9
Частичный ответ/отсутствие ответа (TRG ₃₋₅) Partial response/no response (TRG ₃₋₅)	30	28	16
Всего пациентов Total number of patients	41	34	25

Модельный эксперимент был выполнен на культуре клеток человеческой аденокарциномы кишечника НТ-29. Для выращивания клеток использовали стандартные условия культивирования: питательная среда RPMI-1640 с 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гарамицина, инкубация в стерильных плоскодонных флаконах при 5 % CO₂, 95 % влажности и 37 °C [9].

Для моделирования ЛТ использовали 2 схемы облучения — обе по 5 фракций через 24 ч: 1) РОД 5 Гр, изоэффективная СОД 37,5 Гр; 2) РОД 7 Гр, изоэффективная СОД 49,6 Гр. Радиотерапию проводили на линейном ускорителе Novalis TX (Varian, США) [8]. Ежедневно через 60 мин после ЛТ во всех флаконах меняли питательную среду и определяли общее количество клеток, а также количество мертвых клеток (в заменяемой среде) с помощью камеры Горяева. После 5 фракций ЛТ и проведения визуализации под микроскопом клетки НТ-29 удаляли с подложки плоскодонного флакона раствором Трипсина/Версена [10].

Для выделения ДНК из ткани или суспензии клеток использовали набор «ДНК-сорб В» (ООО «ИнтерЛабСервис, Россия»). Для экстракции вДНК из плазмы крови применяли набор реагентов «ДНК-Плазма-М» (ООО «ТестГен», Россия). Перед экстракцией вДНК образцы крови смешивали с 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,5), содержащим 150 мМ NaCl и 50 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, в соотношении 3:1, и далее отделяли плазму от клеточной фракции путем центрифугирования (1/3 ч, 400 g, 15 °C) [11].

Уровень относительной CNV генов определяли методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Дизайн последовательностей синтетических олигонуклеотидов (праймеров) для целевых локусов *ATM*, *AKT*, *BRIP*, *BRCA1/2*, *CDK1*, *CDKN1B*, *CCND1/3*, *HIST1*, *H2AX*, *KU70*, *EXO1*, *FGFR2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAP80*, *RNF168*, *RIF1*, *TOPB1*, *TP53*, *XRCC4*, *BAX*, *CASP8/3/9*, *MDM2*, *BCL2*, *RBBP8*, *EP-300*, *CFLIP*, *LIG4* и референсных локусов *ACTB*, *B2M*, *GAPDH* был осуществлен с помощью онлайн-сервиса Primer-Blast и базы данных GenBank NCBI (National Center for Biotechnological Information, Национальный центр биотехнологической информации США). Относительную CNV генов вычисляли по формуле [9]:

$$rCN = rCN_o / rCN_n = 1,92^{-\Delta Ct \text{ (опыт)}} / 1,92^{-\Delta Ct \text{ (контроль)}},$$

где rCN — CNV генов в опухолевой ткани относительно нормальной (или в облученных клетках относительно интактных); rCN_o — CNV генов в опухолевой ткани относительно референсного гена (или в облученных клетках относительно референсного гена); rCN_n — CNV генов в нормальной ткани относительно референсного гена (или в интактных клетках относительно референсного гена); Ct — значение порогового цикла амплификации гена в режиме реального времени; ΔCt — разница среднего геометрического Ct исследуемого гена и среднего геометрического Ct референсного гена; 1,92 — значение эффективности амплификации в режиме реального времени, рассчитанное как 10^{-1/k}, где k = (Ct + b) / logP₀ (b — коэффициент уравнения аппроксимации экспериментальных данных, P₀ — относительная концентрация) [9].

Статистический анализ выполняли с помощью прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2013, IBM SPSS Statistics 23.0, языка программирования Python (библиотека SciPy) и языка R. Для построения тепловых карт и диаграмм Венна использовали собственные скрипты на языке R. Для идентификации областей генома, размер которых значительно увеличивался или уменьшался в ряде образцов опухолей, использовали данные TCGA и применяли алгоритм GISTIC [7].

Результаты и обсуждение

На 1-м этапе с использованием алгоритма GISTIC и открытой базы данных был проведен анализ областей генома, размер которых значительно изменялся (увеличивался или уменьшался) в ряде образцов опухолей. Анализ позволил выявить 32 локуса-кандидата (представлены на рис. 1). Выявленные гены-кандидаты вовлечены в регуляцию систем репарации ДНК, клеточного цикла и апоптоза.

Портал общих данных по геномным данным /
Genomic data common data portal

Пакет TGGABiolinks (Rstudio) /
Package TGGABiolinks (Rstudio)

GISTIC

AKT, ATM, BRIP, BRCA1, BRCA2, CDK1,
CDKN1B, CCND1, CCND3, EXO1, FGFR2,
HIST1, H2AX, KU70, PTEN, RAD50, RAP80,
RIF1, RNF168, TOPB1, TP53, XRCC4, BAX,
CASP8, CASP3, CASP9, MDM2, BCL2,
RBBP8, EP300, LIG4, C-FLIP

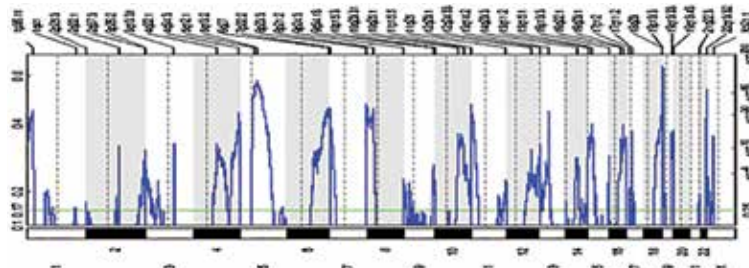
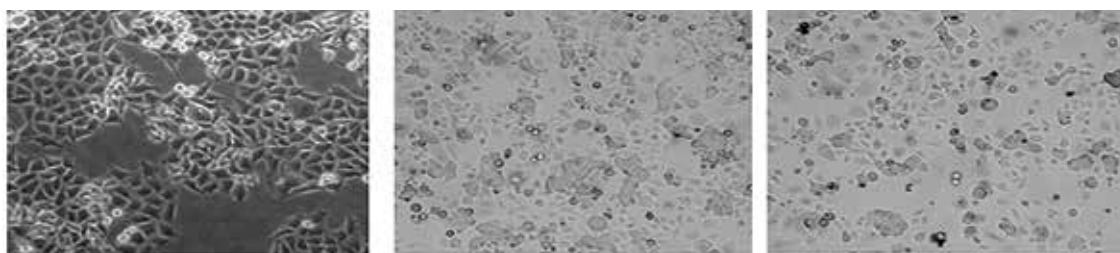


Рис. 1. Биоинформационный скрининг маркеров

Fig. 1. Bioinformatic screening of markers

a



б

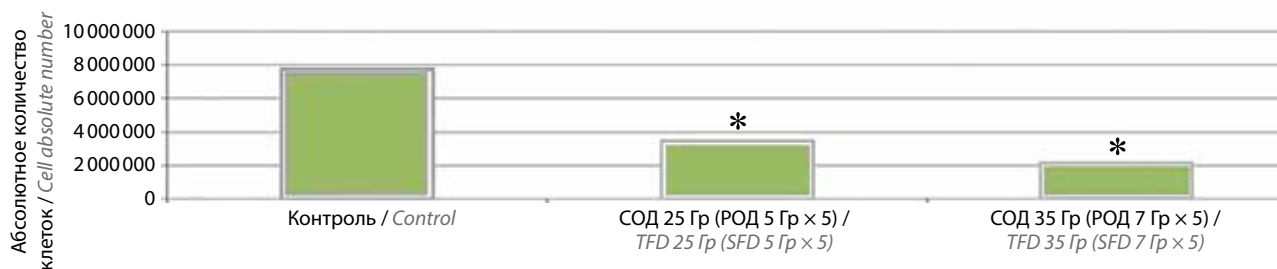


Рис. 2. Монослой клеток HT-29, интактных и после 5 фракций лучевой терапии (слева направо — контроль; СОД 25 Гр; СОД 35 Гр) (а); общее количество клеток в контроле и после облучения (б). СОД — суммарная очаговая доза; ПОД — разовая очаговая доза. * $p < 0,05$

Fig. 2. Monolayer of HT-29 cells, intact and after 5 fractions of radiation therapy (from left to right — control; TFD 25 Gy; TFD 35 Gy) (a); cells total number in control and after radiation therapy (b). TFD — total focal dose; SFD — single focal dose. * $p < 0,05$

На 2-м этапе была проведена валидация кандидатов в предикторы радиорезистентности/радиочувствительности на образцах клеточной линии, интактных и подвергнутых облучению.

После 5 фракций ЛТ в дозе 5 Гр (СОД 25 Гр) выявлено значительное снижение общего количества клеток — на 56 % ($p < 0,05$), после 5 фракций ЛТ в дозе 7 Гр (СОД 35 Гр) — значительное снижение общего количества клеток — на 72 % ($p < 0,05$) (рис. 2). Соответственно, СОД 35 Гр оказалась более губительна для опухолевых клеток, чем СОД 25 Гр (элиминирующий эффект последней был на 16 % менее выражен, $p < 0,05$).

Молекулярно-генетическое исследование интактных клеток и подвергнутых ЛТ клеток позволило получить данные о дифференциальном показателе уровня относительной CNV 32 генов.

По уровню CNV в подвергнутых облучению и интактных клетках было выделено 4 кластера генов (рис. 3). На разных уровнях кластеризации обнаружено сходство по уровню CNV ряда генов в подвергнутых облучению и интактных клетках. Подобный эффект наша исследовательская группа наблюдала и ранее, объяснив его изначальной гетерогенностью клеточной линии HT-29 по CNV определенных генетических локусов, т. е. наличием клонов клеток с разным уровнем данного показателя по исследуемым локусам [6]. Внутриопухолевая гетерогенность при РПК до лечения очевидна. Так, в работе L.M. Frydrych и соавт. было показано, что ректальные опухоли состоят из множества генетически различных субклонов, которые могут содержать мутации или aberrантное количество копий генов, что может способствовать вариациям выживаемости в ответ на неоадьювантную

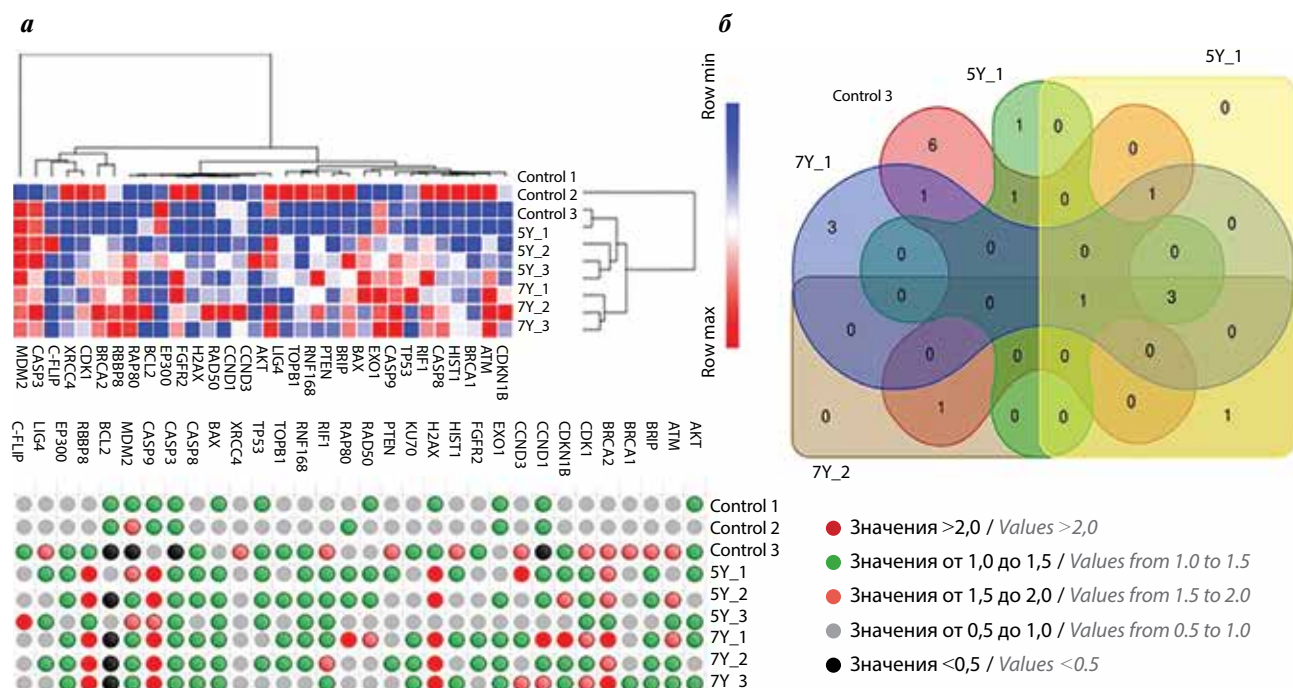


Рис. 3. Дифференциальный уровень копийности генов в подвергнутых облучению и интактных клетках HT-29 (9 групп: 3 контрольных (control 1–3), 3 облученных в дозе 5 Гр (5Y_1–3) и 3 в дозе 7 Гр (7Y_1–3): а – тепловая карта и кластерный анализ данных копийности генов; б – диаграмма Эдвардса–Венна

Fig. 3. Copy number variation differential level in irradiated and intact HT-29 cells (9 groups: 3 controls (control 1–3), 3 irradiated at a dose of 5 Gy (5Y_1–3) and 3 at a dose of 7 Gy (7Y_1–3)): a) heat map and cluster analysis of copy number variation data; б) Edwards–Venn diagram

химиолучевую терапию. По данным авторов, устойчивые к ЛТ субклоны содержат мутации в генах *TP53*, *APC*, *ABCA13*, *MUC16* и *THSD4*, а также изменения количества копий этих генов [12]. Соответственно, проводимая ЛТ создает условия для выживания только клеток с определенным (абберантным) уровнем CNV генов [6] и определенным набором полиморфизмов.

В клетках HT-29, выживших после ЛТ при СОД 25 Гр, показатель CNV генов *RBBP8* и *CASP9* был увеличен статистически значимо ($p < 0,005$) по сравнению с интактными клетками – в 1,6 и 1,5 раза соответственно. В клетках, выживших после облучения при СОД 35 Гр, были увеличены показатели CNV генов *BRCA2* в 2,5 раза ($p < 0,05$), *H2AX* в 3,2 раза ($p < 0,005$), *CASP9* в 1,6 раза ($p < 0,05$), *RBBP8* в 1,6 раза ($p < 0,05$) и снижен показатель CNV *BCL2* в 3,6 раза ($p < 0,005$) относительно интактных клеток (рис. 4).

Вероятно, что выжившие после ЛТ клетки HT-29 изначально имели более стабильную систему восстановления повреждений ДНК благодаря большому числу копий локусов *RBBP8*, *BRCA2* и *H2AX*, а также более чувствительную систему инициации апоптоза благодаря большому числу копий проапоптозного гена *CASP9* и меньшему числу копий антиапоптозного гена *BCL2*.

Поиску молекулярных маркеров радиорезистентности РПК на клеточных линиях посвящено не очень

большое число работ. Так, в работе S. C. Kim и соавт. (2018) показано, что экспрессия мРНК 5 генов – *NDRG1*, *ERRFI1*, *H19*, *MPZL3* и *UCA1* – сильно повышена в клеточных линиях радиорезистентного РПК. Перечень генетических локусов отличается от выявленного нами паттерна, что, вероятно, обусловлено использованием разных клеточных линий (SNU-61R80Gy, SNU-283R80Gy, SNU-503R80Gy вместо HT-29) и разных показателей (экспрессия вместо копийности) [13].

Следующим этапом работы стало исследование с участием пациентов. По эффективности ЛТ 100 больных РПК были разделены на 2 группы: 1-я группа – с полным ответом на ЛТ (26 пациентов), 2-я группа – с частичным ответом на ЛТ либо его отсутствием (74 пациента). Наиболее широко распространенными системами оценки ответа на ЛТ являются степени регрессии опухоли (tumor regression grade, TRG) в соответствии с критериями А. М. Mandard или О. Dworak. Однако до сих пор нет единого мнения относительно того, какой из них является наиболее точным и наиболее клинически значимым для прогноза [14]. В нашем исследовании мы приняли систему TRG, предложенную А. М. Mandard и соавт. [15], сгруппировав пациентов с TRG_{1–2} в группу с полным ответом, а с TRG_{3–5} в группу с частичным ответом/отсутствием ответа. В этих группах пациентов

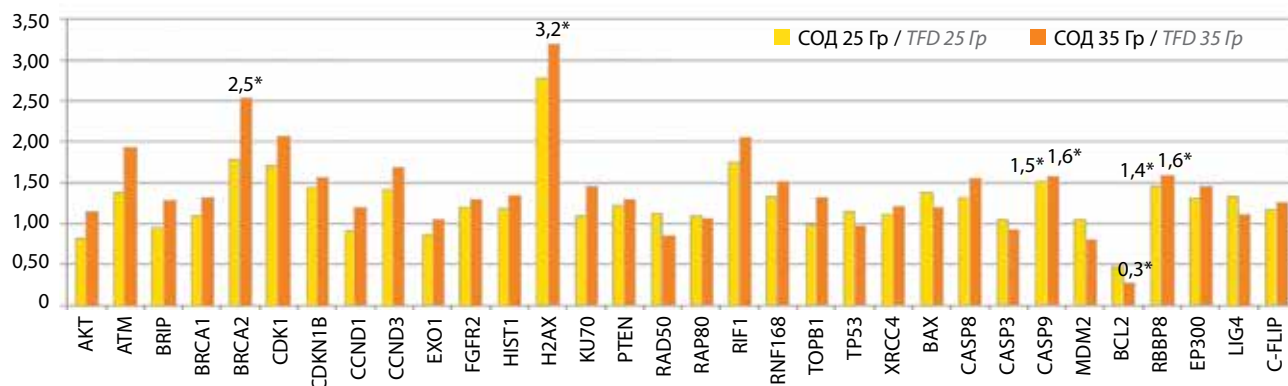


Рис. 4. Уровень копийности генетических локусов в клетках HT-29 с повышенной устойчивостью к радиотерапии (после облучения в дозах 5 и 7 Гр в течение 5 дней). *Статистически значимые различия с интактными (контрольными) клетками, $p < 0,05$

Fig. 4. The level of copy number variation genetic loci in HT-29 cells with increased radiotherapy resistance (after irradiation at doses of 5 and 7 Gy for 5 days). *Statistically significant differences relative to intact (control) cells, $p < 0,05$

определяли уровень CNV только для локусов, показавших статистически значимые изменения в модельном эксперименте.

Так, у пациентов 1-й группы ($n = 26$) в опухолевом биопсийном материале был понижен уровень CNV по локусам *H2AX* и *RBBP8* в 5,0 ($p < 0,005$) и 2,0 ($p < 0,05$) раза соответственно, а уровень CNV по локусу *CASP9* был повышен в 4,0 раза ($p < 0,005$) относительно показателей в нормальной ткани пациентов (рис. 5).

У пациентов 2-й группы ($n = 74$) был повышен уровень CNV локусов *BRCA2* в 2,9 раза ($p < 0,005$), *H2AX* в 2,1 раза ($p < 0,05$), *RBBP8* в 3,0 раза ($p < 0,005$) и *BCL2* в 3,2 раза ($p < 0,005$) относительно показателей в нормальной ткани. При этом был увеличен уровень относительной CNV *BRCA2* в 2,9 раза ($p < 0,05$), *H2AX* в 10,5 раза ($p < 0,005$), *RBBP8* в 6,0 раза ($p < 0,05$) и *BCL2* в 2,7 раза ($p < 0,05$) и снижен уровень относительной CNV гена *CASP9* в 5,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с 1-й группой пациентов (см. рис. 5).

Количество исследований, подобных нашему (этап, выполненный с участием пациентов), невелико. Большинство исследований посвящено колоректальному раку (причем с помощью метода aCGH) [16], и лишь немногие сосредоточены на РПК, особенно немногочисленны работы, анализирующие геномный дисбаланс при РПК во взаимосвязи с ответом на ЛТ [17].

По данным литературы [17, 18], наиболее частыми молекулярными изменениями, характерными для этих опухолей, являются амплификации в областях хромосомных плеч 7p и 7q, 8q, 13q, 20p и 20q и делеции в участках 1p, 8p, 17p, 18p, 18q и 22q. В работе С. Molinari и соавт. 38 % опухолей продемонстрировали амплификацию на плече хромосомы 20q, где картировано несколько онкогенов-кандидатов, связанных с повышенной пролиферативной активностью, снижением выживаемости и прогрессированием при раке (например, *ZNF217*, *CYP24* и *AURKA*)

[19]. По данным этих же авторов, разница в геномной нестабильности между чувствительными и резистентными клетками может быть связана с тем, что гены, участвующие в репарации ДНК, митотических контрольных точках и детоксикации канцерогенов, часто также участвуют в ответе на ЛТ, которая воздействует на пролиферирующие клетки и повреждает ДНК. Так, обнаруженные изменения в области 7q36.1–7q36.3 (у невосприимчивых к терапии пациентов) кажутся интересными, поскольку там картируется ряд важных генов, участвующих в транскрипции, межклеточной передаче сигналов, обеспечении стабильности хромосом и репарации ДНК, росте клеток, дифференцировке и онкогенной трансформации, например *MLL3* и *XRCC2* [20]. Также амплификация областей 13q у нечувствительных к ЛТ представляет особый интерес из-за релевантности ряда генов, расположенных в этих областях: 1) *Wave3* (способствует инвазии опухолевых клеток и метастазированию); 2) *XPO4* (экспортин, играет основную роль в ядерно-цитоплазматическом перемещении Smad3); 3) *APC6/CDC16* (субъединица комплекса, способствующего прохождению анафазы) [19]. Более того, гены *GPC5*, *GPC6*, *HS6ST3*, располагающиеся в этих хромосомных участках, играют роль в контроле клеточного деления и регуляции роста, миграции и хромосомной нестабильности. Еще 2 гена, *CLDN10* и *ABCC4*, локализованные в 13q31–34, могут быть вовлечены в развитие резистентности к терапии [19].

Известно, что часто существует корреляция между числом копий гена и уровнем его экспрессии, поскольку дисбаланс ДНК, по-видимому, оказывает прямое влияние на нарушение регуляции транскрипционного профиля опухолевых клеток. Исследования сигнатур экспрессии генов у пациентов с РПК, подвергнутых неoadъювантной терапии, показали, что разные подходы дают разные наборы генов, которые могут предсказывать ответ. Были идентифицированы

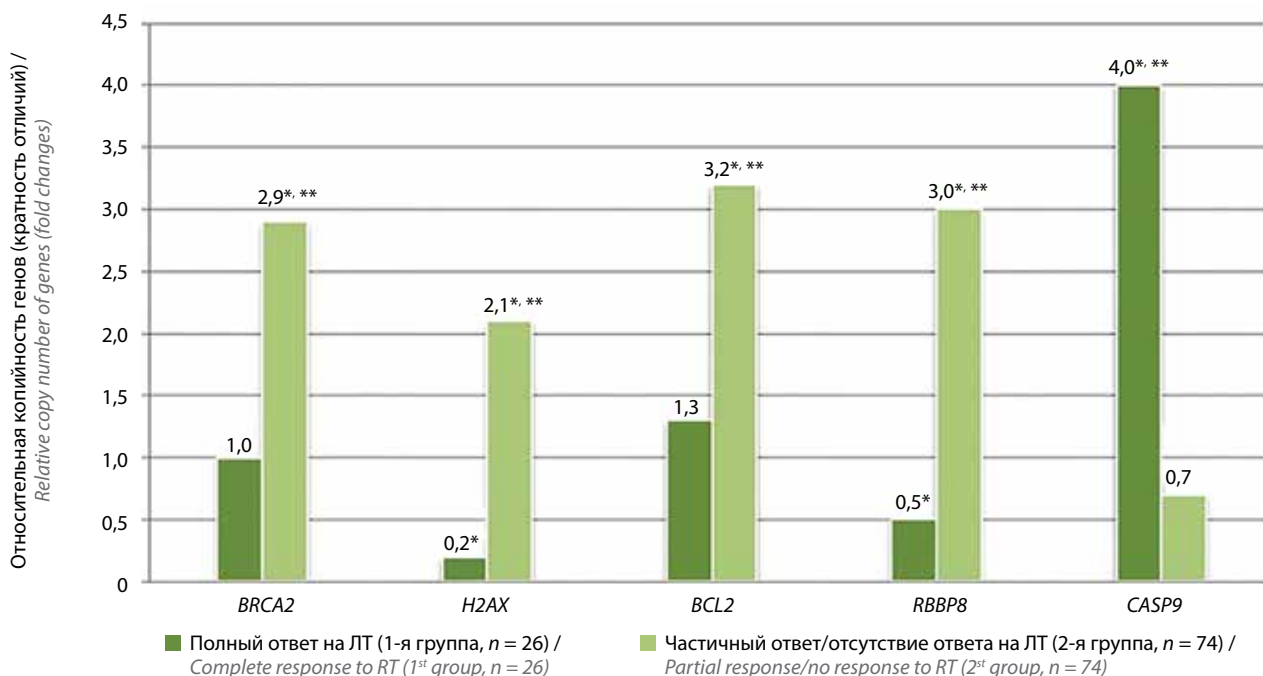


Рис. 5. Уровень относительной копийности генетических локусов у больных раком прямой кишки с полным ответом и частичным ответом/отсутствием ответа на лучевую терапию (ЛТ). *Статистически значимые различия при сравнении с неопухолевой тканью, $p < 0,005$; **статистически значимые отличия 1-й группы от 2-й группы, $p < 0,005$

Fig. 5. The level of genetic loci relative copy number in rectal cancer patients with a complete response and partial response/no response to radiation therapy (RT). *Statistically significant differences relative to non-tumor tissue, $p < 0.005$; **statistically significant differences of the 1st group from the 2nd group, $p < 0.005$

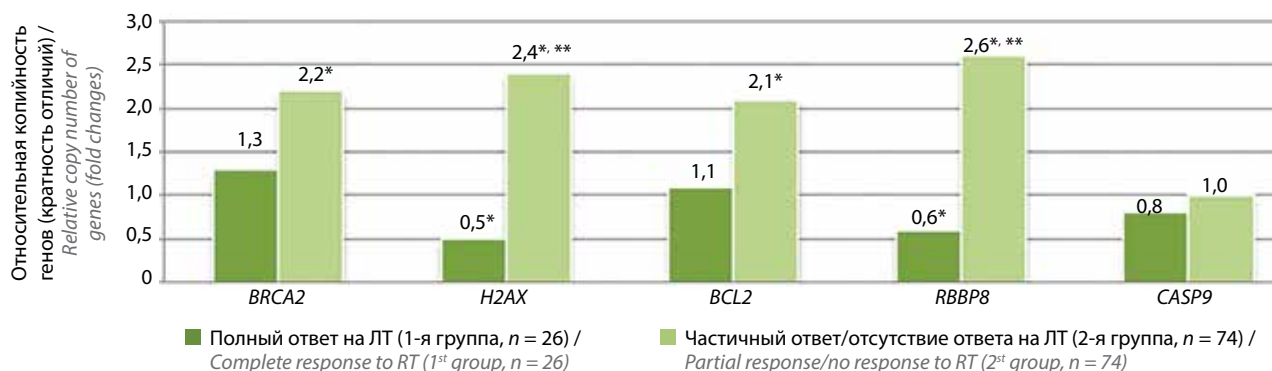


Рис. 6. Особенности вариации числа копий 5 генов во внеклеточной ДНК плазмы крови у пациентов с разной чувствительностью к радиотерапии. *Статистически значимые различия с показателями условно здоровых доноров, $p < 0,05$; **статистически значимые различия с 1-й группой пациентов, $p < 0,005$

Fig. 6. Features of 5 genes copy number variation in blood plasma cell-free DNA in patients with different sensitivity to radiotherapy. *Statistically significant differences relative to conditionally healthy donors, $p < 0.05$; **statistically significant differences relative to the 1st group of patients, $p < 0.005$

гены, участвующие в общих молекулярных путях и клеточных процессах, в том числе участвующие в репарации повреждений ДНК, организации микротрубочек, апоптозе, транскрипции, росте клеток, метаболизме лекарств и транспортных функциях. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы: между реагирующими и не реагирующими на ЛТ пациентами имеются различия в количестве копий генов, участвующих в реакции на повреждение ДНК, транскрипции, регуляции клеточного цикла и апоптоза [19].

J.K. Douglas и соавт. сравнивали генетические вариации у пациентов с РПК с полным и частичным ответом на химиолучевую терапию с помощью высокопроизводительного секвенирования. Были идентифицированы 195 вариантов в 83 генах. У пациентов с частичным ответом были обнаружены мутации в 4 генах, не мутировавших у пациентов с полным ответом: *KDM6A*, *ABL1*, *DAXX-ZBTB22* и *KRAS* [21].

Заключительной частью нашего исследования стало изучение возможности применения выявленных

генетических локусов в малоинвазивной диагностике с использованием вДНК из плазмы крови (венепункция у больных перед ЛТ). Источниками вДНК в организме позвоночных животных и человека являются клеточная и митохондриальная ДНК из соматических и опухолевых клеток, подвергшихся процессам апоптоза/некроза, ДНК из эритробластов и лимфоцитов, а также ДНК микроорганизмов [22].

На данном этапе исследования мы использовали препараты вДНК из плазмы крови, полученной до ЛТ у 100 больных РПК, а также препараты вДНК из плазмы крови 30 условно здоровых доноров. Во вДНК групп пациентов и условно здоровых доноров проводилось определение CNV локусов *CASP9*, *BRCA2*, *H2AX*, *BCL2* и *RBBP8*.

Во вДНК пациентов 1-й группы ($n = 26$) выявленный уровень CNV *H2AX* был в 2,0 раза ($p < 0,05$) ниже и *RBBP8* в 1,7 раза ($p < 0,05$) ниже, чем во вДНК группы условно здоровых доноров. По уровню CNV генов *BRCA2*, *BCL2* и *CASP9* значимых отличий между условно здоровыми донорами и пациентами 1-й группы выявлено не было. Во вДНК пациентов 2-й группы ($n = 74$) показатель CNV *BRCA2* был в 2,2 раза ($p < 0,05$) выше, *H2AX* в 2,4 раза ($p < 0,05$), *RBBP8* в 2,6 раза ($p < 0,05$) и *BCL2* в 2,1 раза ($p < 0,05$) выше, чем во вДНК группы условно здоровых доноров. При этом во вДНК показатель CNV только для 2 локусов статистически значимо ($p < 0,005$) от-

личался между группами пациентов: CNV гена *H2AX* ниже в 4,9 раза, а гена *RBBP8* в 4,2 раза в 1-й группе относительно 2-й (рис. 6).

Корреляционный анализ показал, что между уровнем CNV во вДНК и уровнем CNV в опухолевой ткани у больных РПК обеих групп наблюдалась сильная положительная корреляция ($r > 0,84$). Соответственно, повышенный уровень CNV генов, регулирующих репарацию ДНК и пролиферацию во вДНК плазмы крови у больных РПК с частичным ответом/отсутствием ответа на ЛТ, и пониженный уровень CNV этих генов у больных РПК с полным ответом на ЛТ отражают уровень их CNV в тканях опухоли, где обеспечивается соответствующий уровень транскрипционной активности исследованных генетических локусов, что и приводит в итоге к дифференциальной эффективности проводимой ЛТ в двух группах больных РПК.

Заключение

Таким образом, применение комплексного подхода, основанного на биоинформационном анализе базы данных TCGA, моделировании ЛТ на культуре клеток и валидации выявленных маркеров на образцах тканей и крови больных аденокарциномой прямой кишки, позволило выявить ассоциацию количества копий генов *RBBP8*, *BRCA2*, *H2AX* и *BCL2* с эффективностью предоперационной ЛТ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г. и др. Генетические и эпигенетические предикторы эффективности лучевой терапии опухолей прямой кишки. Современные проблемы науки и образования 2021;4. Доступно по: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=30963>. DOI: 10.17513/spno.30963
Kutulin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G. et al. Genetic and epigenetic predictors of rectal tumors radiotherapy effectiveness. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education 2021;4. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=30963> (In Russ.). DOI: 10.17513/spno.30963
2. Romano G.M., Bianco F., De Franciscis S., Belli A. The management of recurrent rectal cancer: a European perspective. In: Comprehensive Rectal Cancer Care. Ed. by M. Kwaan, A. Zbar. Springer, Cham: 2019. P. 521–536. DOI: 10.1007/978-3-319-98902-0_27
3. Cammà C., Giunta M., Fiorica F. et al. Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: a meta-analysis. JAMA 2000;284(8):1008–15. DOI: 10.1001/jama.284.8.1008
4. Hearn N., Atwell D., Cahill K. et al. Neoadjuvant radiotherapy dose escalation in locally advanced rectal cancer: a systematic review and meta-analysis of modern treatment approaches and outcomes. Clin Oncol (R Coll Radiol) 2021;33(1):e1–e14. DOI: 10.1016/j.clon.2020.06.008
5. Sun W., Li G., Wan J. et al. Circulating tumor cells: a promising marker of predicting tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemo-radiation therapy. Oncotarget 2016;7(43):69507–17. DOI: 10.18632/oncotarget.10875
6. Кутилин Д.С., Кошелева Н.Г., Гусарева М.А. и др. Копийность генов как фактор радиорезистентности клеток аденокарциномы толстой кишки линии HT-29. Современные проблемы науки и образования 2019;5. Доступно по: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29224>. DOI: 10.17513/spno.29224
Kutulin D.S., Kosheleva N.G., Gusareva M.A. et al. Gene copy number variation as a factor of radioresistance of colon adenocarcinoma cells of the line HT-29. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education 2019;5. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29224>. (In Russ.). DOI: 10.17513/spno.29224
7. Kutulin D.S., Tsandekova M.R., Porkhanova N.V. Features of the copy number variation of certain genes in tumor cells in patients with serous ovarian adenocarcinoma. Bull Exp Biol Med 2021;170(3):332–9. DOI: 10.1007/s10517-021-05062-1
8. Цандекова М.Р., Порханова Н.В., Кит О.И., Кутилин Д.С. Малоинвазивная молекулярная диагностика серозной аденокарциномы яичника высокой и низкой степени злокачественности. Онкогинекология 2021;4(40):35–49. DOI: 10.52313/22278710_2021_4_35
Tsandekova M.R., Porkhanova N.V., Kit O.I., Kutulin D.S. Minimally invasive molecular diagnostics of serous ovarian adenocarcinoma of high and low malignancy. Onkoginekologiya = Oncogynecology 2021;4(40):35–49. (In Russ.). DOI: 10.52313/22278710_2021_4_35

9. Kutilin D. Genetic and epigenetic bases of prostate tumor cell radioresistance. *Klin Onkol* 2021;34(3):220–34. DOI: 10.48095/ccko2021220
10. Кутилин Д.С., Кошелева Н.Г., Максимов А.Ю. и др. Влияние различных доз лучевой терапии на выживаемость клеток аденокарциномы толстой кишки линии HT-29. *Современные проблемы науки и образования* 2019;3. Доступно по: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28918>. DOI: 10.17513/spno.28918
Kutilin D.S., Kosheleva N.G., Maksimov A.Yu. et al. Effects of various radiotherapy doses on survival of colon adenocarcinoma cells line HT-29. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* = Modern problems of science and education 2019;3. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28918> (In Russ.). DOI: 10.17513/spno.28918
11. Тамкович С.Н., Брызгунова О.Е. Циркулирующие НК в крови больных раком желудка и толстой кишки. *Клинические исследования* 2005;51(3):321–8.
Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E. Circulating NK in the blood of patients with stomach and colon cancer. *Klinicheskie issledovaniya* = Clinical studies 2005;51(3):321–8. (In Russ.).
12. Frydrych L.M., Ulintz P., Bankhead A. et al. Rectal cancer sub-clones respond differentially to neoadjuvant therapy. *Neoplasia* 2019;21(10):1051–62. DOI: 10.1016/j.neo.2019.08.004
13. Kim S.C., Shin Y.K., Kim Y.A. et al. Identification of genes inducing resistance to ionizing radiation in human rectal cancer cell lines: re-sensitization of radio-resistant rectal cancer cells through down regulating NDRG1. *BMC Cancer* 2018;18(1):594. DOI: 10.1186/s12885-018-4514-3
14. Ghadimi B.M., Grade M., Difilippantonio M.J. et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23(9):1826–38. DOI: 10.1200/JCO.2005.00.406
15. Mandard A.M., Dalibard F., Mandard J.C. et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994;73(11):2680–6. DOI: 10.1002/1097-0142(19940601)73:11<2680::aid-cncr2820731105>3.0.co;2-c
16. Camps J., Grade M., Nguyen Q.T. et al. Chromosomal breakpoints in primary colon cancer cluster at sites of structural variants in the genome. *Cancer Res* 2008;68(5):1284–95. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2864
17. Grade M., Gaedcke J., Wangsa D. et al. Chromosomal copy number changes of locally advanced rectal cancers treated with preoperative chemoradiotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;193(1):19–28. DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2009.03.016
18. Diep C.B., Kleivi K., Ribeiro F.R. et al. The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45(1):31–41. DOI: 10.1002/gcc.20261
19. Molinari C., Ballardini M., Teodorani N. et al. Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study. *Radiat Oncol* 2011;6:161. DOI: 10.1186/1748-717X-6-161
20. Ashktorab H., Schäffer A.A., Darempouran M. et al. Distinct genetic alterations in colorectal cancer. *PLoS One* 2010;5(1):e8879. DOI: 10.1371/journal.pone.0008879
21. Douglas J.K., Callahan R.E., Hothem Z.A. et al. Genomic variation as a marker of response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. *Mol Cell Oncol* 2020;7(3):1716618. DOI: 10.1080/23723556.2020.1716618
22. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии. *Медицинская иммунология* 2013;15(5):399–412. DOI: 10.15789/1563-0625-2013-5-399-412
Kozlov V.A. Free extracellular DNA is normal and pathological. *Meditsinskaya immunologiya* = Medical Immunology 2013;15(5):399–412. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2013-5-399-412

Вклад авторов

Д.С. Кутилин: разработка дизайна исследования, проведение молекулярных исследований и биоинформационного анализа, написание текста рукописи;

М.А. Гусарева: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;

Н.Г. Кошелева: написание текста рукописи.

Authors' contribution:

D.S. Kutilin: development of study design, conducting molecular studies and bioinformatic analysis, writing the text of the manuscript;

M.A. Gusareva: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained;

N.G. Kosheleva: writing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.С. Кутилин / D.S. Kutilin: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

М.А. Гусарева / M.A. Gusareva: <https://orcid.org/0000-0002-9426-9662>

Н.Г. Кошелева / N.G. Kosheleva: <https://orcid.org/0000-0001-7630-1502>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания «Поиск предикторов радиорезистентности рака прямой кишки и разработка персонализированных неoadъювантных терапевтических подходов».

Funding. The study was carried out within the framework of the state task “Search for radioresistance predictors of rectal cancer and personalized neoadjuvant therapeutic approaches development”.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. На проведение исследования получено разрешение этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (протокол № 14).

Compliance with patient rights and principles of bioethics. Permission for the study was obtained from the ethical committee of the National Medical Research Center for Oncology of the Ministry of Health of Russia (protocol No. 14).

Статья поступила: 01.09.2022. **Принята к публикации:** 28.10.2022.

Article received: 01.09.2022. **Accepted for publication:** 28.10.2022.