

На правах рукописи

ПОЛУЭКТОВ Сергей Игоревич

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ЛЕЧЕНИЯ РАКА ПРЯМОЙ КИШКИ**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Ростов-на-Дону – 2020

РАБОТА ВЫПОЛНЕНА В ФЕДЕРАЛЬНОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ БЮДЖЕТНОМ УЧРЕЖДЕНИИ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (генеральный директор – член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор **О.И. Кит**)

Научный руководитель: член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Кит Олег Иванович

Официальные оппоненты: **Фролов Сергей Алексеевич** – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по научной работе

Гладышев Дмитрий Владимирович – доктор медицинских наук, Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 40 Курортного района», заместитель главного врача по хирургии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «___»_____2020 г. в _____ часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д.208.083.02 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.rnioi.ru ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан: «___»_____2020 г.

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций
доктор биологических наук, доцент

Е.А. Дженкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В настоящее время рак толстой и прямой кишки занимают 4 место по числу смертей у пациентов среди всех онкологических заболеваний по всему миру. По данным ВОЗ в 2018 году злокачественные опухоли этих нозологий стали причиной смерти порядка 10% всех онкологических больных. Говоря исключительно о раке прямой кишки, стоит отметить, что в 2018 году было зарегистрировано 704 376 новых случая заболевания по всему миру (3,9% от всех случаев диагностирования онкологических заболеваний) и 310 394 смертей от рака прямой кишки (3,2% соответственно) (Васильченко Н.Г., 2019).

По причине столь высокой распространённости поиск методов и подходов для лечения данной нозологии является одним из актуальных вопросов современной онкологии. Для лечения данного заболевания применяются следующие методы: лучевая терапия, химиотерапия, хирургия, иммунные вакцины и таргетные препараты. Однако наиболее часто применяемыми подходами являются химиолучевая терапия и хирургия, поскольку являются наиболее доступными, как для пациентов, так и для медицинских учреждений.

Лучевая терапия (ЛТ) при раке прямой кишки играет важную роль как в облегчении симптомов, так и в локальном контроле заболевания. Использование ЛТ исторически было ограничено в случаях рецидива у тех пациентов, которые ранее получали высокодозное облучение. В случае пациентов, ранее не подвергавшихся облучению, ЛТ может играть роль в увеличении доли пациентов, потенциально пригодных для радикальных операций (Romano G.M., 2019).

Комбинированное лечение снижает локорегионарные рецидивы, но общая выживаемость значимо не улучшается. Полный патологоморфологический ответ может быть отмечен не более чем в 10–25% случаев. Существенную проблему составляют радиорезистентные формы рака прямой кишки (Васильченко Н.Г., 2019).

В ответе опухолей на терапию большую роль, отводят мутациям в генах KRAS и TP53. Так в ряде исследований было показано, что при наличии у пациентов дикого типа гена p53 был хороший ответ на лучевую терапию (Sakai K., 2014). Значимыми мутациями в гене KRAS, обуславливающими плохой ответ опухолей на химиолучевую терапию, по мнению ряда авторов, считаются мутации в 12, 13 и 16 кодонах данного гена, хотя, по мнению других авторов, данные являются спорными (Duldulao M.P., 2013; Martellucci J., 2015).

Теме изменения уровня экспрессии отдельных генов и групп генов посвящено большое количество исследований. Особую роль в ответе опухолевых клеток на химиолучевую терапию отводят повышению экспрессии генов «стволовости» (OCT4) (You L., 2018), гена NDRG1 (N-Myc Downstream Regulated 1) (Kim S.C., 2018), а также семейства генов XRCC (X-ray repair cross-complementing protein 2, 3) (Dayde D., 2017).

В ряде публикаций, исследовавших профиль экспрессии отдельных видов микроРНК, было выявлено, что при лучевой терапии происходит увеличение уровня экспрессии следующих РНК-молекул: miR-1183, miR-1224-5p, miR-1246, miR-125a-3p, miR-125b, miR-125-b1, miR-1274b, miR-1290-3p, miR-145, miR-1471, miR-153, miR-16, miR-188-5p, miR-190b, miR-1909, miR-196b, miR-200c, miR-205-5p, miR-21, miR-21-5p, miR-215, miR-29b-2, miR-450a, miR-450b-5p, miR-483-5p, miR-490, miR-519c-3p, miR-561, miR-590-5p, miR-622, miR-630, miR-671-5p, miR-720, miR-765, miR-99, miR-99a, let-7c, let-7e, miR-492, miR-542-5p, miR-584, miR-483-5p, miR-144, miR-2110, miR-652, miR-375, miR-147b, miR-148a, miR-190, miR-26a/b, and miR-338-3p, miR-135b, miR-21 (Gaedcke J., 2012; Kim N.K., 2015; Azizian A., 2016; Lim S.H., 2015; Conde-Muñoz R., Cuadros M., Zambudio N., Segura-Jiménez I., Cano C., Palma P., 2015; Campayo M., Navarro A., Benítez J.C., Santasusagna S., Ferrer C., Monzó M., Cirera L., 2018).

Протоколы лечения рака прямой кишки сильно изменились за последние 10 лет и все еще находятся в состоянии постоянного совершенствования. Лучевая терапия явно снижает риск возникновения локального рецидива и вызывает уменьшение размеров опухоли. Однако полного клинического ответа удается достичь в крайне малом числе случаев. Основная проблема, в которой

заключается столь низкий ответ опухолей на лечение – радиорезистентность опухолевых клеток. Хотя ряд молекулярных биомаркеров были предложены в качестве предикторов ответа на химиолучевую терапию, однако ни один из них не дошел до клинической практики. Это можно объяснить несколькими причинами.

Во-первых, в большинстве исследований оценивается один тип биомаркеров, состоящий из профилей экспрессии генов, белков или микроРНК, без оценки их эффективности по сравнению с другими маркерами и с недостаточной чувствительностью и специфичностью. Таким образом, существует необходимость сравнивать и интегрировать различные типы биомаркеров из нескольких платформ.

Во-вторых, поскольку данное заболевание является гетерогенным очень сложно подобрать универсальный биомаркер, который смог бы прогнозировать успех лечения для всех пациентов.

В-третьих, существуют значительные различия в схемах лечения, включая режимы химиотерапии, дозы облучения и интервал между ними и хирургическим вмешательством, что может привести к различной реакции на терапию.

Таким образом, в настоящее время никакие прогностические молекулярные биомаркеры для ответа на лучевую терапию не являются достаточно надежными, чтобы иметь клиническую значимость. Можно предположить, что интеграция различных типов биомаркеров, использование методов визуализации, идентификация связей с биологией опухоли и строгая валидация (использованием образцов, отражающих гетерогенность заболевания), позволит разработать чувствительную и экономически эффективную панель молекулярных биомаркеров и улучшить персонализированную помощь при раке прямой кишки.

Степень разработанности темы

Исследование эффективности хирургических методов лечения колоректального рака в последнее время теряет свою актуальность и все реже встречается в литературе. В работе Х.Э. Джумабаева (2017) впервые в России произведено сравнение и анализ методики трансанальной тотальной

мезоректумэктомии (ТМЭ) и классической лапароскопической ТМЭ, изучены интра- и послеоперационные особенности, патоморфологические характеристики удаленного препарата прямой кишки, а так же функциональные результаты пациентов после трансанальной тотальной мезоректумэктомии и классической лапароскопической ТМЭ. На основании исследования определена категория пациентов, получающих наибольшее преимущество от выполнения трансанальной мезоректумэктомии. Работа посвящена только хирургическим аспектам лечения колоректального рака.

Новые подходы к химиотерапии колоректального рака связаны не только с новыми фармакологическими субстанциями, но и с разработкой новых способов введения лекарственных веществ. В работе М.В. Алексеева (2013) разработан новый метод лечения рака прямой кишки с применением химиотерапии с гипертермией. На основании экспериментальных исследований изучено влияние гипертермии на клетки аденокарциномы. Установлено, что нагревание культур клеток сопровождается частичным разрушением митохондрий. Следует отметить, что, по мнению автора, химиотерапия с гипертермией особенно эффективна при умеренно- и высокодифференцированных аденокарциномах, локализующихся в нижеампулярном отделе прямой кишки.

Прогноз течения аденокарциномы толстой кишки определяется: 1) пролиферативной активностью по индексу Ki-67; 2) способностью раковых клеток к хемотаксису; 3) состоянием системы репарации неспаренных нуклеотидов ДНК и не связан с уровнем дифференцировки клеток опухоли. К предиктивным факторам эффективности химиотерапии относятся ферменты, участвующие в метаболизме 5-фторпиримидинов (тимидин фосфорилаза, тимидилат синтаза). Г.А. Раскиным (2014) впервые показано, что способность клеток аденокарциномы толстой кишки к хемотаксису определяется степенью выраженности экспрессии рецептора к хемокину 4 типа. Продукция данного рецептора опухолевыми клетками чаще наблюдается при диссеминированной форме рака толстой кишки, чем при локализованной (90,0 и 41,0% случаев, соответственно, $p=0,019$).

Морфологическая гетерогенность аденокарциномы прямой кишки

изучена С.Р. Алтыбаевым (2018). Она проявляется наличием разных многоклеточных структур (железистых, криброзных) и дискретных клеток, сопряжена с иммунофенотипом опухолевых клеток и прогрессией опухолевой болезни. Впервые установлено, что с лимфогенным метастазированием преимущественно связаны фенотипические характеристики опухолевых элементов, располагающихся в серозной оболочке прямой кишки. Автором установлена взаимосвязь между иммуногистохимическими маркерами и прогрессией опухолевого процесса.

Таким образом, анализ известной литературы показал необходимость мультидисциплинарного подхода к изучению аспектов лечения и прогноза колоректального рака с углублением молекулярно-генетических исследований, позволяющих прогнозировать течение опухолевого процесса и ответ его на лечение.

Цель исследования

Поиск прогностических маркеров эффективности лечения рака прямой кишки.

Поставленная цель достигалась решением следующих **задач**:

1. Оценить общую и бессобытийную выживаемость пациентов с местно-распространенными формами рака прямой кишки с учетом стадии заболевания после комбинированного лечения.

2. Исследовать эффект от воздействия стандартных доз лучевой терапии в модельном эксперименте на культуре клеток, выявив молекулярно-генетические особенности, обеспечивающие выживаемость клеточных культур после облучения.

3. Оценить влияние транскрипционной активности генов, регулирующих репарацию ДНК, клеточный цикл и апоптоз на эффективность лучевой терапии опухолей прямой кишки.

Научная новизна исследования

Впервые в рамках модельного эксперимента выявлены особенности формирования радиорезистентности опухолевыми клетками дифференциальные для разных доз облучения.

Выявленный в модельном эксперименте перечень молекулярных маркеров был валидирован на образцах тканей и плазмы крови больных раком прямой кишки, что позволило сформировать панель молекулярных маркеров для малоинвазивного определения эффективности лучевой терапии.

Впервые исследованы изменение копийности генов в ткани опухолей прямой кишки и во вДНК плазмы крови и разработана панель генетических маркеров прогнозирования эффективности лучевой терапии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные имеют как фундаментальное (расширяют представления о механизмах устойчивости опухолевых клеток к лучевой терапии), так и прикладное значение (создают основу для создания панели биомаркеров радиорезистентности).

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой работы явилось последовательное применение методов научного познания. Работа выполнена в дизайне открытого сравнительного ретроспективного и проспективного рандомизированного исследования с использованием анамнестических, общеклинических, молекулярно-генетических и статистических методов исследования. В исследование были включены 641 пациент с местно-распространенными формами рака прямой кишки T3N0-2M0. Все пациенты получали неадьювантную лучевую терапию (10 сеансов лучевой терапии), а также пред- и послеоперационную химиотерапию. Диагноз у всех пациентов установлен на основании клинико-инструментального обследования и подтвержден морфологически. Статистическая обработка материала выполнялась при помощи программ Statistica 12.0, а также пакетов программного обеспечения с открытым исходным кодом (среды программирования R и пакетов для языка программирования Python с использованием библиотеки SciPy).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Селективное выживание опухолевых клеток в модельном эксперименте в условиях облучения на линейном ускорителе ассоциировано с повышенной копийностью и экспрессией генов BRCA2, H2AX, RBBP8 CASP9 и

сниженной копийностью и экспрессией гена BCL2.

2. Риск развития летального исхода, снижение общей выживаемости и низкая эффективность лучевой терапии у больных раком прямой кишки ассоциированы с повышением экспрессии и копийности генов BRCA2, H2AX, BCL2, RBBP8 в опухолевой ткани и снижением транскрипционной активности и копийности гена CASP9.

3. Показатели копийности только двух генетических локусов – H2AX и RBBP8 – во вДНК плазмы крови имеют высокий диагностический потенциал и позволяют диагностировать радиорезистентную форму рака прямой кишки.

Внедрение результатов исследования в практику здравоохранения

Результаты данного исследования используются в повседневной практике отделений абдоминальной онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Степень достоверности и апробация результатов

Определяется достаточным количеством обследованных больных в процессе исследования, формированием групп сравнения, адекватными методами исследования, корректными методами статистической обработки. Сформулированные в диссертации выводы, положения и практические рекомендации аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов выполненных исследований.

Апробация диссертации состоялась 23 июля 2020 года на заседании Ученого Совета при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 5 – в журналах, рецензируемых ВАК при Минобрнауки России и 1 входит в международную научную базу Scopus.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют пункту 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии,

морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» паспорта специальности 14.01.12-«онкология».

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 143 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов исследования, 4 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, включающего 40 отечественных источников и 91 зарубежный. Работа иллюстрирована 33 таблицами и 58 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Клиническая характеристика больных, методы лечения и исследований

В ретроспективное исследование были включены 561 пациент с местно-распространенными формами РПК T3N0-2M0.

В проспективное исследование был включено 30 пациентов (10 женщин, 20 мужчин) с диагностированным раком прямой кишки в возрасте от 31 до 81 года, проходивших стационарное лечение в ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России.

В качестве группы сравнения на этапе определения копийности генов во вндНК использован биологический материал (плазма крови) 30 условно-здоровых доноров (без онкопатологии) в возрасте от 30 до 79 года.

В тестовую группу (для проверки способа диагностики радиорезистентности) вошли 50 пациентов с диагностированным раком прямой кишки в возрасте от 35 до 79 лет, проходивших стационарное лечение в ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России (рисунок 1).

По гистологической структуре преобладали аденокарциномы, из которых 80% случаев опухоли были с метастазами в регионарные лимфатические узлы (T₃N₁₋₂M₀) (таблица 1). Все пациенты, вошедшие в исследование, получали курс неoadьювантной химио-лучевой терапии в суммарной очаговой дозе 50 Гр, по 2 Гр в течение 5 недель. В качестве химиотерапии использовали 5-фторурацил с лейковарином или капецитобин в монорежиме.

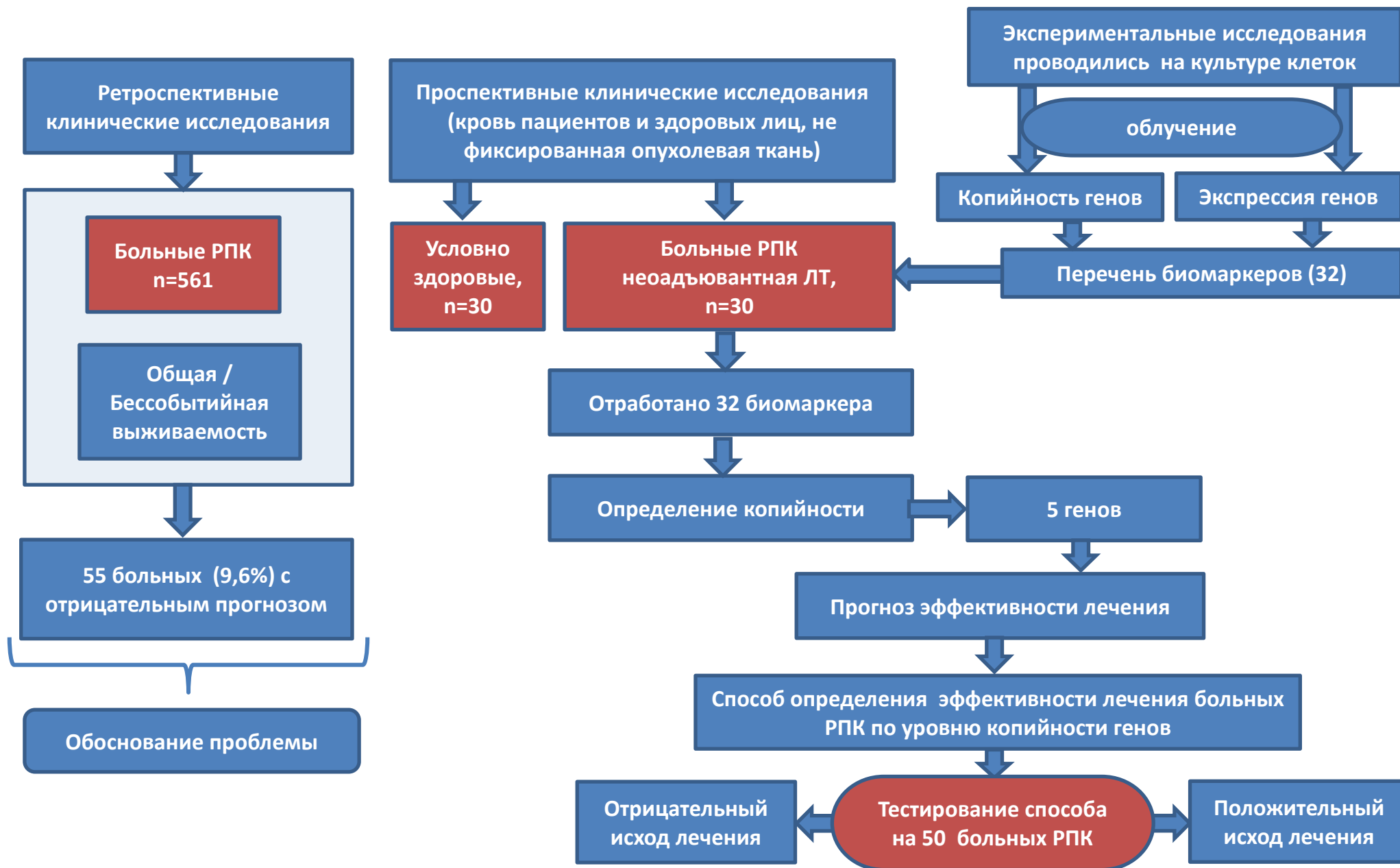


Рисунок 1. Дизайн исследования

Таблица 1 – Клиническая характеристика пациентов

Признак		Ретроспективная группа, n=561	Проспективная группа, n=30	Проспективная группа, n=50
Средний возраст, лет средн. (min–max)		58 (30–80)	61 (31–81)	55 (35–79)
Пол, абс. ч. (%)	мужской	294 (52,4)	20 (66,7)	27 (54,0)
	женский	267 (47,6)	10 (33,3)	23 (46,0)
Локализация опухоли, абс. ч. (%)	верхнеампулярный отдел	36 (6,4)	-	-
	среднеампулярный отдел	258 (46,0)	14 (46,7)	22 (44,0)
	нижнеампулярный отдел	267 (47,6)	16 (53,3)	28 (56,0)
Степень дифференцировки, абс. ч. (%)	G1	96 (17,1)	4 (13,3)	8 (16,0)
	G2	423 (75,4)	23 (76,7)	38 (76,0)
	G3	42 (7,5)	3 (10,0)	4 (8,0)
Клиническая стадия, абс. ч. (%)	IIIa	170 (30,3)	3 (10,0)	8 (16,0)
	IIIb	306 (54,5)	24 (80,0)	32 (64,0)
	IIIc	85 (15,2)	3 (10,0)	10 (20,0)

Хирургический этап лечения выполняли через 6–8 недель. В адьювантном режиме пациентам проводилась химиотерапия по схеме FOLFOX.

На первом этапе работы был проведен ретроспективный анализ эффективности комбинированного лечения больных РПК, проходившего на базе ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России в 2014–2015 гг. Критериями эффективности комбинированного лечения явились общая и бессобытийная выживаемость (свободная от летальных исходов и локорегионарных рецидивов). В ходе анализа было установлено, что доля выживших пациентов в последовательные интервалы времени снижалась. По Каплану-Мейеру 3-летняя выживаемость составляла 77,8%, а 5-летняя – 39,6%. Выживаемость пациентов ретроспективной группы зависела от стадии заболевания. За весь период наблюдения (69 мес.) среди пациентов с IIIa стадией заболевания число летальных исходов было 24,7%, с IIIb стадией – 40,5%, с IIIc стадией – 54,1%. Соответственно, выживаемость больных РПК за 5-летний период после

операции была при IIIa стадии – 75,3%, IIIb стадии – 59,5% и при IIIc стадии – 45,9%. С повышением стадии заболевания число летальных исходов статистически значимо увеличивалось ($p < 0,001$).

За 69 мес. наблюдения у пациентов с местно-распространенными формами рака прямой кишки после комбинированного лечения общее число локорегиональных рецидивов составило 51 (9,1%). По Каплану-Мейеру 3-летняя бессобытийная выживаемость составила 73,2%, а 5-летняя бессобытийная выживаемость – 39%.

Среди 561 пациентов с местно-распространенными формами рака прямой кишки, несмотря на комбинированное химиолучевое и оперативное лечение, были выделены 55 пациентов с неблагоприятным течением заболевания, у которых за 12 мес. после операции наблюдали летальный исход и/или местный рецидив. Поскольку оперативное лечение было радикальным, то причиной неблагоприятного течения заболевания могла быть радиорезистентность, составившая в исследуемой выборке 9,8%. Данная цифра подчеркивает необходимость выявления молекулярно-генетических маркеров радиорезистентных форм РПК.

На следующем этапе был проведен модельный эксперимент, который позволил установить, что пятидневная лучевая терапия культуры клеток при РОД 5 и 7 Гр с использованием ускорителя Novalis TX является достаточно эффективной и приводит к снижению общего количества опухолевых клеток (рисунок 2, таблица 2). Тем не менее, пятидневное облучение в дозах 5 и 7 Гр приводит к селективному выживанию определенного пула клеток, обладающих повышенной копийностью и экспрессией генов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*, *CASP9* и сниженной копийностью и экспрессией гена *BCL2*.

На основании данных полученных в модельном эксперименте для тестирования на пациентах проспективной группы ($n=30$) была использована панель, состоящая из 32 генетических локусов – *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*.

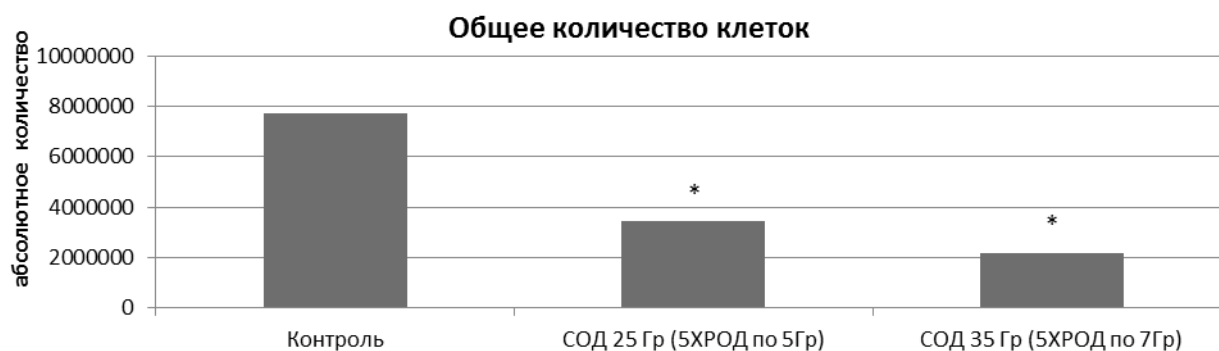
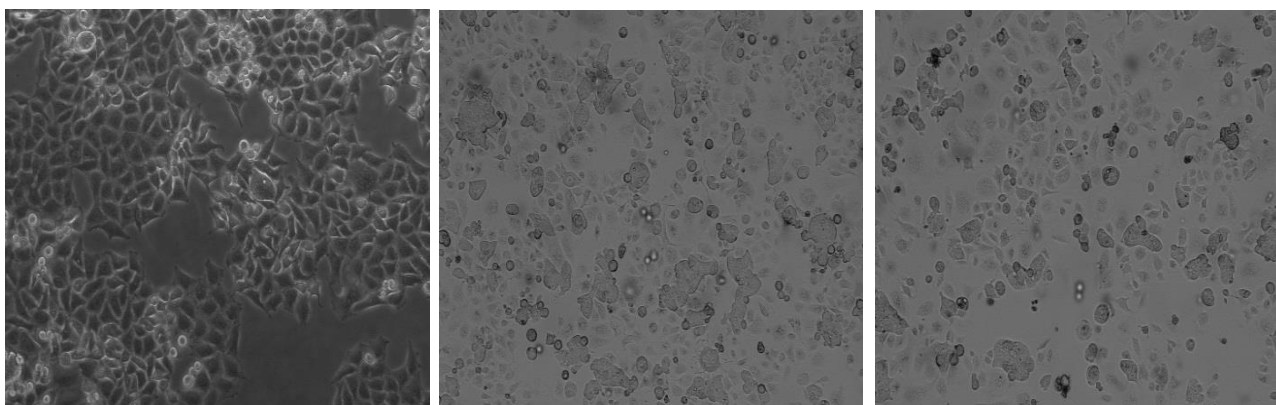


Рисунок 2. Микрофотография клеточного монослоя HT-29 после 5 дня облучения (слева направо: контроль – СОД 25 Gr – СОД 35 Gr и общее количество клеток.

* – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) относительно контроля

Таблица 2 – Показатели функционального состояния клеток HT-29 после различных режимов облучения

Показатель	Живые клетки	Ранний апоптоз	Поздний апоптоз/ некроз	Мёртвые клетки
Контроль, n=3	94,07±0,35	0,53±0,32	4,93±0,51	0,47±0,06
СОД 25 Gr (5 фракций по РОД=5 Gr, изoeffективная доза 37,5 Gr)	76,13±3,13	3,23±0,95	17,67±2,42	2,97±0,71
% отличия от контроля	-19	+509	+258	+532
	P=0,0006	P=0,0096	P=0,0009	P=0,0037
СОД 35 Gr (5 фракций по РОД=7 Gr, изoeffективная доза 49,6 Gr)	65,83±3,0	3,07±0,49	25,73±1,42	5,33±1,75
% отличия от контроля	-30	+479	+422	+1034
	P=0,0001	P=0,0017	P=0,000018	P=0,0086
% отличия от СОД 25 Gr	-14	-5	+46	+80

В ходе исследования на пациентах было выделено два кластера – две группы пациентов, отличающихся по транскрипционному профилю генов *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9*, *RBBP8* и *BCL2*. В первой группе у 81% пациентов повышена экспрессия гена *CASP9*, и у 100% снижена экспрессия генов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8* и *BCL2*. Во второй группе у 100% пациентов снижена экспрессия гена *CASP9* и у 93% повышена экспрессия генов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8* и *BCL2*.

Можно предложить, что в первой группе пациентов, где повышена экспрессия проапоптозного гена *CASP9*, и снижена экспрессия антиапоптозного гена (*BCL2*) и генов регулирующих репарацию ДНК (*BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*), воздействие лучевой терапии окажется более эффективным, в силу сниженной активности репарационной системы и повышенной чувствительности к стресс индуцированному апоптозу, чем во второй группе.

Последующий анализ результатов лучевой терапии РПК у 30 пациентов проспективной группы позволил подтвердить это предположение. Так у 16 пациентов после лучевой терапии наблюдался полный регресс опухоли, при этом в их опухолевом биопсийном материале экспрессия генов *H2AX* и *RBBP8* была снижена, а экспрессия гена *CASP9* повышена относительно нормальной ткани. У 8 пациентов наблюдался незначительный регресс опухоли, а у 6 пациентов отсутствие регресса вообще, при этом у них статистически значимо экспрессия генов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8* и *BCL2* была выше, а гена *CASP9* ниже, чем экспрессия у пациентов с полным регрессом опухоли. С помощью регрессионного анализа Кокса была изучена статистическая значимость влияния показателя экспрессии генов, контролирующих репарацию ДНК, пролиферацию и апоптоз на общую и безрецидивную выживаемость. Было показано, что риск развития летального исхода больных раком прямой кишки после операции и снижение общей выживаемости пациентов при низкой эффективности лучевого лечения ассоциированы с повышением экспрессии генов *BRCA2*, *H2AX*, *BCL2*, *RBBP8* в опухолевой ткани и снижением транскрипционной активности гена *CASP9*. При наличии радиорезистентности снижение общей выживаемости больных раком прямой кишки было сопряжено с повышением в опухолевой ткани экспрессии гена *RBBP8* и снижением экспрессии гена *CASP9*. Риск развития рецидива после операции статистически

значимо повышался при усилении экспрессии гена *RBBP8* в опухолевой ткани. При низкой эффективности лучевого лечения усиление экспрессии гена *RBBP8* в опухолевой ткани явилось фактором риска рецидива заболевания в ближайшие три года после операции.

Поскольку, одним из механизмов регулирующих транскрипционную активность генов является изменение числа их копий (Кутилин Д.С., 2020), то у 30 пациентов проспективной группы в опухолевой и нормальной ткани прямой кишки был оценен показатель копийности генов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*, *BCL2* и *CASP9*. Между копийностью и экспрессией данных генов наблюдалась сильная положительная корреляция (аналогично установленной в модельном эксперименте). Копийность всех 5 генов также влияла на общую выживаемость, а на безрецидивную выживаемость – только гена *RBBP8*. При повышенной копийности генов *BRCA2*, *H2AX*, *BCL2*, *RBBP8* общая выживаемость больных РПК статистически значимо снижалась. Наибольшее влияние на общую выживаемость оказывала повышенная копийности гена *RBBP8*. Кроме того, при повышенной копийности гена *RBBP8* повышался риск развития локорегионального рецидива.

Таким образом, было установлено, что транскрипционная активность и копийность генов *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9*, *RBBP8* и *BCL2* ассоциирована с выживаемостью больных РПК и ответом на лучевую терапию, эффективность которой возрастала у пациентов с повышенной экспрессией и копийностью гена *CASP9* и сниженной экспрессией и копийностью *H2AX* и *RBBP8*, и наоборот эффективность терапии падала при повышенной экспрессии и копийности генов *H2AX*, *RBBP8*, *BRCA2* и *BCL2*.

Соответственно данные генетические локусы имеют большой потенциал в качестве молекулярных маркеров для прогнозирования чувствительности опухолей прямой кишки к лучевой терапии, однако этот потенциал ограничен достаточно высоким уровнем инвазивности при получении биоматериала. Возможное решение этой проблемы находится в переходе на исследование копийности генов во внеклеточной ДНК плазмы крови.

Показатели копийности генетических локусов *BRCA2*, *H2AX*, *BCL2*, *RBBP8* и *CASP9* в биопсийном материале, получаемом во время

видеоколоноскопии, имеют большой потенциал в качестве молекулярных маркеров для прогнозирования чувствительности опухолей прямой кишки к лучевой терапии, однако этот потенциал ограничен достаточно высоким уровнем инвазивности при получении биоматериала. Возможное решение этой проблемы находится в переходе на исследование копийности генов во внеклеточной ДНК плазмы крови.

К внеклеточной ДНК в организме следует относить: клеточную и митохондриальную ДНК из соматических и из опухолевых клеток, подвергающихся процессам апоптоза и некроза; ДНК из эритробластов, ядра которых энуклеируются в процессе дифференцировки в эритроциты, ДНК из лимфоцитов в процессе их апоптотической гибели после стимуляции, ДНК эмбрионов в крови матери, бактериальную и вирусную ДНК (Козлов В.А., 2013; Кутилин Д.С. и соавт., 2017).

При многих видах злокачественных опухолей определяется повышенный уровень внеклеточной ДНК (внДНК) в периферической крови. Прогресс заболевания часто связан с постепенным повышением уровня внДНК, также часто уровень внДНК возрастает при метастазировании опухоли, по сравнению со значениями в отсутствие последних.

У 30 больных РПК до ВКС и лучевой терапии путем венопункции собирали кровь, и далее из плазмы выделяли внДНК. Опираясь на данные чувствительности к лучевой терапии (у 16 пациентов после лучевой терапии наблюдался полный регресс опухоли, у 8 пациентов наблюдался незначительный регресс опухоли, у 6 пациентов регресс отсутствовал), проводилось определение относительной копийности генов *BRCA2*, *H2AX*, *BCL2*, *RBBP8* и *CASP9* во внДНК плазмы крови (рисунок 3).

До лучевой терапии во внДНК больных РПК с последующим полным регрессом опухоли обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение копийности генов *BRCA2*, *RBBP8* и *CASP9* в 1,9 раза, 1,8 раза и 5,0 раза соответственно относительно группы условно-здоровых доноров. При этом копийность генов *H2AX* и *BCL2* не отличалась от копийности в группе условно-здоровых доноров. До лучевой терапии во внДНК больных РПК с последующим незначительным регрессом опухоли обнаружено статистически

значимое ($p < 0,05$) увеличение копийности генов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8* и *BCL2* в 4,7 раза, в 12,9 раза, в 21,6 раз и в 2,8 раза соответственно относительно группы условно-здоровых доноров. При этом копийность гена *CASP9* не отличалась от копийности в группе условно-здоровых доноров.

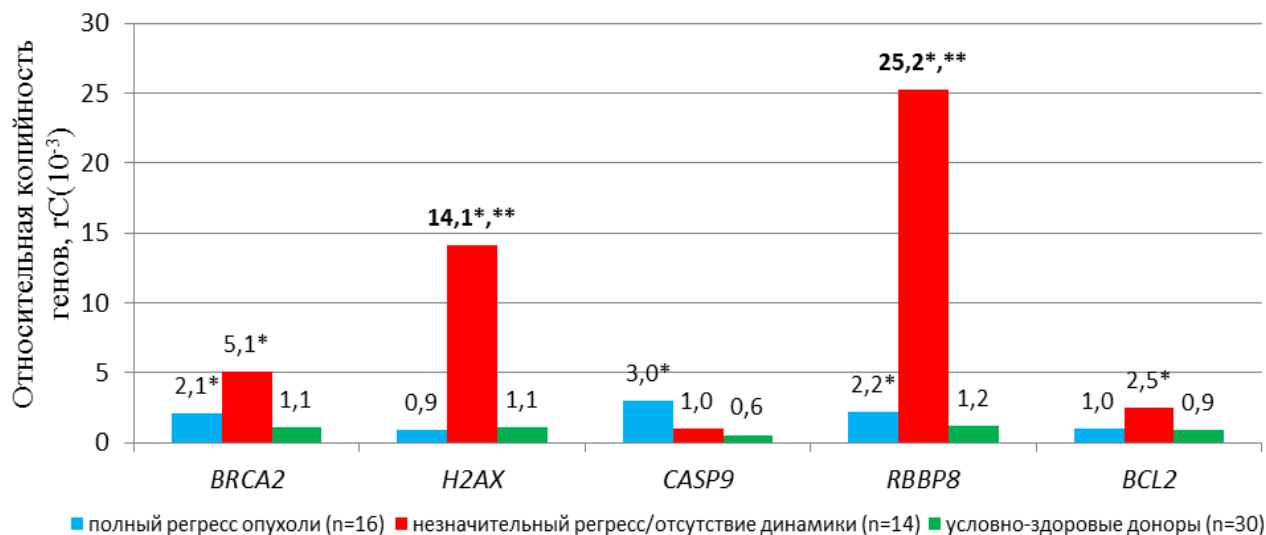


Рисунок 3. Показатель относительной копийности генетических локусов во вДНК плазмы крови у условно-здоровых доноров и у больных РПК чувствительных и резистентных к лучевой терапии. * – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) относительно группы условно-здоровых доноров, ** – статистически значимые отличия ($p < 0,005$) относительно группы с полным регрессом

Повышенную копийность некоторых генов, регулирующих репарацию ДНК, в группе пациентов с полным регрессом опухоли можно объяснить несколькими факторами. Во-первых, повышенным уровнем вДНК у больных раком относительно условно-здоровых доноров. Во-вторых, особенностями деградации клеток как опухолевых, так и здоровых и особенностями транслокации нуклеиновых кислот в плазму у разных людей.

Тем не менее, между копийностью генов во вДНК плазмы крови и опухолевой тканью у больных РПК наблюдалась сильная положительная корреляция: для гена *BRCA2* $r = 0,758$ и $r = 0,890$; для гена *H2AX* $r = 0,818$ и $r = 0,880$; для гена *RBBP8* $r = 0,646$ и $r = 0,970$; для гена *BCL2* $r = 0,840$ и $r = 0,894$ и для гена *CASP9* $r = 0,961$ и $r = 0,977$ соответственно для пациентов с полным регрессом и незначительным регрессом опухоли. При этом копийности генов, регулирующих репарацию ДНК и пролиферацию (*BRCA2*, *H2AX*, *BCL2*, *RBBP8*) была выше, а копийность про-апоптозного гена *CASP9* была ниже у больных

РПК с незначительным регрессом опухоли по сравнению с больными РПК с полным регрессом опухоли.

Но следует отметить, что копияность только двух генетических локусов во вДНК статистически значимо ($p < 0,005$) отличалась в группе больных РПК с полным регрессом опухоли от этого показателя в группе больных РПК с незначительным регрессом опухоли: копияность гена *H2AX* была меньше в 15,7 раза, а копияность гена *RBVP8* была меньше в 11,5 раз.

Таким образом, было установлено, что повышенная копияность генов *H2AX* и *RBVP8* во вДНК больных РПК может являться потенциальным маркером радиорезистентности опухолей этого типа.

В ходе проведенных исследований два генетических локуса (*H2AX* и *RBVP8*) были отобраны для тестирования на вДНК плазмы крови на дополнительной группе, состоящей из 50 больных раком прямой кишки. Результаты этого тестирования, представленные в таблице 3, позволили разработать способ определения радиочувствительности опухолей прямой кишки на основании копияности этих генов.

Таблица 3 – Ответ больных РПК на лучевую терапию и интервал копияности генов во вДНК плазмы крови до лечения

Ответ на терапию	Уровень копияности <i>H2AX</i> ($\cdot 10^{-3}$)	Уровень копияности <i>RBVP8</i> ($\cdot 10^{-3}$)	Количество пациентов, n
Полный патоморфоз	<13,9	<23,7	19
Незначительный регресс	>13,9 но <17,0	>23,7 но <27,5	14
Отсутствие динамики	>17,0	>23,7 но <28,0	7
Прогрессирование (включая метастазы)	>20,4	>30	10

Сущность разработанного способа заключается в том, что образцы крови (10 мл крови и 3 мл 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,5, с 0,15 М NaCl и 50 мМ ЭДТА) разделяют на плазму и фракцию клеток центрифугированием в течение 20 минут при 400 g при 15°C. Из плазмы крови выделяют вДНК фенол-хлороформным методом и проводят амплификацию с высокоспецифичными праймерами для генов *H2AX*, *RBVP8* и *GAPDH*, анализируют первичные данные и вычисляют относительную копияность (rC) по формуле $2^{-\Delta Ct}$, где $\Delta Ct = Ct(H2AX \text{ или } RBVP8) - Ct(GAPDH)$. Затем сравнивают полученные

значения rC с прогностическими значениями копийности, и при значениях в интервале $rC_{H2AX} > (13,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-3}$ и $rC_{RBBP8} > (23,7 \pm 1,9) \cdot 10^{-3}$ у пациента диагностируют радиорезистентную форму рака прямой кишки, а при значениях в интервале $rC_{H2AX} < (13,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-3}$ и $rC_{RBBP8} < (23,7 \pm 1,9) \cdot 10^{-3}$ у пациента диагностируют чувствительную к лучевой терапии форму рака прямой кишки.

Заявленный способ осуществляется следующим образом:

На первом этапе образцы крови (10 мл крови и 3 мл 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,5, с 0,15 М NaCl и 50 мМ ЭДТА) разделяют на плазму и фракцию клеток центрифугированием в течение 20 минут при 400 g при 15⁰С. Из плазмы крови ДНК выделяют фенол-хлороформным методом в нашей модификации. К плазме крови добавляют равный объем лизирующего буфера (2% SDS и 1% меркаптоэтанол) и 20 мкл протеиназы К, инкубируют в термостате при 58⁰С 1 час. К полученному лизату добавляют равный объем щелочного фенола и хлороформа (соотношение 1:1), центрифугируют 20 минут 3000 об/мин. После разделения фаз отбирают водную фазу в отдельную стерильную пробирку. К водной фазе добавляют равный объем 95% изопропилового спирта и раствор 5М NaCl до концентрации 100 мМ, пробирку помещают в холодильник на -20⁰С на 60 минут. Далее центрифугируют 15 минут при 12700 об/мин, при -10⁰С, декантируют супернатант, а осадок промывают 80% этиловым спиртом, центрифугированием удаляют остатки этанола, высушивают осадок в твердотельном термостате и растворяют в 10 мМ ТЕ буфере. Концентрация полученных препаратов ДНК измеряется на флюориметре. Для проведения ПЦР-РВ концентрацию ДНК в каждом образце нормализуют до 0,5 нг/мкл.

Аmplification проводят в 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей 3 нг вДНК, 0,20 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl₂, 1x ПЦР-буфер, 1x краситель EvaGreen, и 0,1 е.а./мкл реакционной смеси ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus*, и по 600 нМ прямого и обратного праймеров для референсного гена или гена-мишени.

Количественную ПЦР-РВ амплификацию проводят на термоциклере по следующей программе: $t=95^{\circ}\text{C}$ в течение 4 мин. 40 циклов: $t=95^{\circ}\text{C}$ в течение 10 с, $t=58^{\circ}\text{C}$ (чтение сигнала) в течение 30 с, $t=72^{\circ}\text{C}$ в течение 30 с.

Относительная копийность генов *H2AX* и *RBBP8* вычисляется

следующим образом: рассчитывается C_t для целевого (*H2AX* или *RBBP8*) и референсного локуса (*GAPDH*), далее рассчитывается величина $\Delta C_t = C_t(\text{целевой локус}) - C_t(\text{референсный локус})$; копияность целевого локуса относительно референсного (rC) рассчитывается по формуле $2^{-\Delta C_t}$.

Сравниваются полученные значения rC с интервалом прогностического коэффициента копияности: при значениях $rC_{H2AX} > (13,9 \pm 0,8) * 10^{-3}$ и $rC_{RBBP8} > (23,7 \pm 1,9) * 10^{-3}$ у пациента диагностируют радиорезистентную форму рака прямой кишки; при значениях $rC_{H2AX} < (13,9 \pm 0,8) * 10^{-3}$ и $rC_{RBBP8} < (23,7 \pm 1,9) * 10^{-3}$ у пациента диагностируют чувствительную к лучевой терапии форму рака прямой кишки.

ВЫВОДЫ

1. Ретроспективный анализ эффективности комбинированного лечения 561 больного раком прямой кишки выявил, что она зависит от стадии заболевания и радиорезистентности опухолей, выявляемой в 9,8% исследованных случаев.

2. Селективное выживание опухолевых клеток в модельном эксперименте в условиях облучения на линейном ускорителе (СОД 25 Гр и 35 Гр) ассоциировано с повышенной копияностью и экспрессией генов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8* *CASP9* и сниженной копияностью и экспрессией гена *BCL2*.

3. Риск развития летального исхода у больных раком прямой кишки и снижение общей выживаемости при низкой эффективности лучевого лечения ассоциированы с повышением экспрессии и копияности генов *BRCA2*, *H2AX*, *BCL2*, *RBBP8* в опухолевой ткани и снижением транскрипционной активности и копияности гена *CASP9*.

4. Показатели копияности двух генетических локусов *H2AX* и *RBBP8* во вДНК плазмы крови имеют высокий диагностический потенциал и при значениях в интервале $rC_{H2AX} > (13,9 \pm 0,8) * 10^{-3}$ и $rC_{RBBP8} > (23,7 \pm 1,9) * 10^{-3}$ позволяют диагностировать радиорезистентную форму рака прямой кишки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для определения радиорезистентных форм рака прямой кишки рекомендуем на дооперационном этапе использовать разработанный нами

способ: вычислять относительную копиюность генов *H2AX* и *RBBP8* следующим образом: рассчитывается C_t для целевого (*H2AX* или *RBBP8*) и референсного локуса (*GAPDH*), далее рассчитывается величина $\Delta C_t = C_t(\text{целевой локус}) - C_t(\text{референсный локус})$; копиюность целевого локуса относительно референсного (rC) рассчитывается по формуле $2^{-\Delta C_t}$. Полученные значения (rC) сравниваются с интервалом прогностического коэффициента копиюности. При значениях $rC_{H2AX} > (13,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-3}$ и $rC_{RBBP8} > (23,7 \pm 1,9) \cdot 10^{-3}$ у пациента диагностируют радиорезистентную форму рака прямой кишки, при значениях $rC_{H2AX} < (13,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-3}$ и $rC_{RBBP8} < (23,7 \pm 1,9) \cdot 10^{-3}$ у пациента диагностируют чувствительную к лучевой терапии форму рака прямой кишки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Современные схемы лучевой терапии и биомаркеры радиорезистентности опухолевых клеток прямой кишки / Н.Г. Васильченко, Д.С. Кутилин, Н.Н. Тимошкина, Д.С. Потемкин, С.И. Полуэктов, М.А. Гусарева, Н.Г. Кошелева, К.И. Солдатова, А.Ю. Максимов, О.И. Кит, Ю.С. Сидоренко // Сибирский онкологический журнал. – 2019; – Т.18, №6. – С.105-113. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2019-18-6-105-113>
2. Влияние транскрипционной активности генов, регулирующих репарацию ДНК, на эффективность лучевой терапии опухолей прямой кишки / Д.С. Кутилин, Н.Г. Кошелева, М.А. Гусарева, Д.А. Харагезов, В.А. Донцов, С.И. Полуэктов, Т.В.Зема, Н.А. Лиман, О.В. Шляхова, И.А. Удаленкова // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 6.; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29353> (дата обращения: 18.06.2020).
3. Копиюность генов как фактор радиорезистентности клеток аденокарциномы толстой кишки линии HT-29 / Д.С. Кутилин, Н.Г. Кошелева, М.А. Гусарева, Д.С. Потемкин, С.И. Полуэктов, А.В. Дашков, Д.О. Каймакчи, В.А. Носов, У.М. Газиев, В.М. Легостаев // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 5; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29224> (дата обращения: 18.06.2020).
4. Молекулярно-морфологические эффекты пролонгированной

лучевой терапии при раке прямой кишки / И.А. Новикова, Е.А. Дженкова, А.В. Шапошников, М.А. Гусарева, Д.А. Харагезов, М.Н. Дурицкий, А.В. Дашков, В.Е. Колесников, А.В. Снежко, Д.О. Каймакчи, Э.А. Мирзоян, С.И. Полуэктов, В.А. Донцов, О.Н. Статешный // *Современные проблемы науки и образования*. – 2020. – № 2; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29685> (дата обращения: 18.06.2020).

5. Влияние различных доз лучевой терапии на выживаемость клеток аденокарциномы толстой кишки линии HT-29 / Д.С. Кутилин, Н.Г. Кошелева, А.Ю. Максимов, М.А. Гусарева, Е.С. Бондаренко, А.Б. Сагакянц, В.А. Донцов, П.Н. Габричидзе, М.Н. Черняк, Ф.Н. Гречкин, С.С. Мезенцев, Е.П. Ульянова, С.И. Полуэктов // *Современные проблемы науки и образования*. – 2019. – № 3; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28918> (дата обращения: 18.06.2020).

6. Cancer stem cells in colorectal tumors of various extents / Elena Yurievna Zlatnik, Oleg Ivanovich Kit, Inna Arnoldovna Novikova, Elena Petrovna Ulianova, Oksana G. Shulgina, Pavel B. Shulikov, Anton G. Milakin, **Sergey Poluektov**, Dmitry O. Kaymakchi, Fedor N. Grechkin // *J Clin Oncol*. 36, 2018 (suppl; abstr e15659)

7. Frequency of somatic mutations in the KRAS gene in patients of the South Russia diagnosed with colorectal cancer / Dmitry Yu. Gvaldin, Oleg I. Kit, Ekaterina P. Omelchuk, Dmitry O. Kaymakchi, **Sergey I. Poluektov**, Dmitry Sergeevich Petrov, Vladimir E. Kolesnikov, Liubov Yu Vladimirova // *J Clin Oncol*. 37, 2019 (suppl; abstr e15081)

8. Copy number variation and expression of CT-genes in patients with colorectal cancer / Yuriy A. Gevorkyan, Denis S. Kutilin, Oleg I. Kit, Natalya V. Soldatkina, Dmitry A. Kharagezov, Andrey V. Dashkov, Dmitry O. Kaymakchi, **Sergey I. Poluektov**, Vladimir E. Kolesnikov, Vladimir A. Dontsov, Roman E. Tolmakh, Sergei A. Ilchenko, Oleg N. Stateshny, Dmitry S. Petrov, Fedor N. Grechkin, Nairi B. Oganyan, Ellada Mirzoyan, Yuriy A. Fomenko // *J Clin Oncol*. 38: 2020 (suppl; abstr e16104)

9. High frequency of c-KIT genetic variants in exons 9, 11, 13 and 17 and PDGFRA in exon 18 in gastric GIST tumors / Ekaterina P. Omelchuk, Dmitry Yu.

Gvaldin, Natalya N. Timoshkina, Liubov Yu Vladimirova, Yuriy A. Gevorkyan, Natalya V. Soldatkina, Dmitry A. Kharagezov, Andrey V. Dashkov, Dmitry O. Kaymakchi, **Sergey I. Poluektov**, Vladimir E. Kolesnikov, Vladimir A. Dontsov, Roman E. Tolmakh, Sergei A. Ilchenko, Oleg N. Stateshny, Dmitry S. Petrov, Fedor N. Grechkin, Nairi B. Oganyan, Valeriy V. Kolesnikov, Ellada Mirzoyan // J Clin Oncol. 38: 2020 (suppl; abstr e23525)

10. YsRNA aberrant expression in colorectal cancer patients / Inna A. Novikova, Denis S. Kutilin, Natalya N. Timoshkina, **Sergey I. Poluektov**, Roman E. Tolmakh, Andrey V. Dashkov, Dmitry Haragezov, Evgeniy N. Kolesnikov, Vladimir A. Dontsov, Natalya V. Soldatkina, Dmitry S. Petrov, Yuriy A. Gevorkyan, Oleg Ivanovich Kit // J Clin Oncol. 38: 2020 (suppl; abstr e13525)

11. Features of iso-miR expression in colon tumor tissue / Natalya N. Timoshkina, Denis S. Kutilin, Inna A. Novikova, **Sergey I. Poluektov**, Roman E. Tolmakh, Andrey V. Dashkov, Dmitry Haragezov, Evgeniy N. Kolesnikov, Vladimir A. Dontsov, Dmitry S. Petrov, Natalya V. Soldatkina, Oleg Ivanovich Kit // J Clin Oncol 38: 2020 (suppl; abstr e13518)

12. Трансанальная эндоскопическая хирургия при опухолях прямой кишки / О.И. Кит, Ю.А. Геворкян, Н.В. Солдаткина, Д.А. Харагезов, А.В. Дашков, **С.И. Полуэктов**, Д.О. Каймакчи, М.Н. Дурицкий, О.Н. Статешный П.Н. Габричидзе // Исследования и практика в медицине. – 2019. – Т.6, № 5. – С. 147.

13. Лапароскопические комбинированные оперативные вмешательства при метастатическом колоректальном раке / О.И. Кит, Ю.А. Геворкян, Н.В. Солдаткина, Д.А. Харагезов, **С.И. Полуэктов**, В.Е. Колесников, Д.О. Каймакчи, А.В. Дашков, Д.С. Петров, М.Н. Дурицкий, О.Н. Статешный // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т. 9, № 3-S1. – С. 108-109.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РПК	– рак прямой кишки;
ЛТ	– лучевая терапия;
ТМЭ	– тотальная мезоректумэктомия
СОД	– суммарная очаговая доза