

НАРУШЕНИЯ В РЕГУЛЯТОРНОЙ СЕТИ КОНКУРЕНТНО-ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ РНК И РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОПУХОЛЕЙ ПРЯМОЙ КИШКИ

**Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г., Зинькович М.С., Савченко Д.А.,
Шляхова О.В., Фаткина Н.Б., Удаленкова И.А., Гаппоева М.А., Толмачева Е.А.**
*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: k.denees@yandex.ru*

Несмотря на многолетнее совершенствование алгоритмов лучевой терапии опухолей прямой кишки полный клинический ответ достигается лишь у небольшого числа пациентов, что связано с формированием радиорезистентности злокачественных клеток. Сейчас, как никогда ранее, актуально проведение комплексного исследования, интегрирующего различные молекулярные параметры и позволяющего как объяснить ряд молекулярных механизмов радиорезистентности, так и предложить перечень новых маркеров. В последнее десятилетие с помощью высокопроизводительного секвенирования было показано существование регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК, состоящей из длинных некодирующих РНК, микроРНК и мРНК. Поэтому целью исследования стал анализ особенностей функционирования регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК у больных раком прямой кишки, радиорезистентных и чувствительных к лучевой терапии. Исследование было выполнено на 100 пациентах с диагностированными злокачественными опухолями прямой кишки. Лучевая терапия проводилась на линейном ускорителе частиц Novalis TX по алгоритму: разовая очаговая доза 2.4 Гр до суммарной очаговой дозы 54.0 Гр. Для выделения РНК использовали парные фрагменты биопсии условно-нормальных и опухолевых тканей прямой кишки, полученные при видеокOLONOSКОПИИ. Анализ относительной представленности транскриптов мРНК, микроРНК и lncRNA оценивали методом RT-qPCR. Также был проведен биоинформационный анализ потенциальных взаимодействий исследуемым мРНК, микроРНК и lncRNA. Было установлено, что эффективность лучевой терапии связана с уровнем транскрипционной активности микроРНК (miR-195; miR-1273h; miR-6737; miR-6808; miR-3202; miR-5195; miR-4257; miR-5187; miR-149; miR-138; miR-6798; miR-6819; miR-4728; miR-1249; miR-557; miR-130b) и lncRNA (XIST, HELLPAR, NEAT1, AC008124.1, LINC01089, LINC01547 и VASH1-AS1), обеспечивающих эффективную регуляцию системы репарации ДНК (H2AX и RBBP-8) и апоптоза (BCL-2). Проведенное нами комплексное исследование особенностей регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК и эффективности лучевой терапии опухолей прямой кишки позволило установить как механизмы формирования радиорезистентности, так и её предикторы.

Ключевые слова: рак прямой кишки, мРНК, микроРНК, длинные некодирующие РНК, лучевая терапия, радиорезистентность, апоптоз, репарация ДНК

ABNORMALITIES IN THE COMPETITIVELY-INTERACTING RNA REGULATORY NETWORK AND RECTAL TUMORS RADIORESISTANCE

**Kutulin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G., Zinkovich M.S., Savchenko D.A.,
Shlyakhova O.V., Fatkina N.B., Udalenkova I.A., Gappoeva M.A., Tolmacheva E.A.**
National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: k.denees@yandex.ru

Despite the long-term improvement of algorithms for rectal tumors radiotherapy, a complete clinical response is achieved only in a small number of patients, which is associated with the formation of radioresistance of malignant cells. Now, more than ever, it is important to conduct a comprehensive study that integrates various molecular parameters and allows both to explain a number of radioresistance molecular mechanisms and to propose a list of new markers. In the last decade, using high-throughput sequencing, the existence of a regulatory network of competitively interacting RNAs, consisting of long non-coding RNAs, microRNAs, and mRNAs, has been shown. Therefore, the aim of the study was to analyze the features of the functioning of the competitively interacting RNAs regulatory network in patients with rectal cancer who are radioresistant and sensitive to radiation therapy. The study was performed on 100 patients diagnosed with rectal malignant tumors. Radiation therapy was carried out on a Novalis TX linear particle accelerator according to the algorithm: a single focal dose of 2.4 Gy to a total focal dose of 54.0 Gy. To isolate RNA, we used paired fragments of biopsy of conditionally normal and tumor tissues of the rectum obtained by video colonoscopy. Analysis of the relative abundance of mRNA, microRNA, and lncRNA transcripts was assessed by the RT-qPCR method. Also, a bioinformatic analysis of potential interactions with the studied mRNA, microRNA and lncRNA was carried out. It has been shown that the effectiveness of radiation therapy depends on the level of microRNA expression (miR-195; miR-1273h; miR-6737; miR-6808; miR-3202; miR-5195; miR-4257; miR-5187; miR-149; miR-138; miR-6798; miR-6819; miR-4728; miR-1249; miR-557; miR-130b) and lncRNA (XIST, HELLPAR, NEAT1, AC008124.1, LINC01089, LINC01547, and VASH1-AS1), providing efficient regulation of the DNA repair system (H2AX and RBBP-8) and apoptosis (BCL-2). Our comprehensive study of the features of the competitively interacting RNAs regulatory network and radiation therapy effectiveness for rectal tumors made it possible to establish both the mechanisms of the radioresistance formation and its predictors.

Keywords: rectal cancer, mRNA, micro-RNA, long non-coding RNA, radiation therapy, radioresistance, apoptosis, DNA repair

В 2020 г. было зарегистрировано более 310 тыс. смертей от рака прямой кишки (РПК), что делает данную нозологию лидирующей по показателю летальности среди других онкологических заболеваний [1]. Для облегчения симптомов и локального

контроля РПК в настоящее время применяется лучевая терапия (ЛТ) [2]. Несмотря на многолетнее совершенствование алгоритмов ЛТ РПК полный клинический ответ достигается лишь у небольшого числа пациентов, что связано с формированием радиорезистентности злокачественных клеток. За последние 30 лет был проведен внушительный объем исследований по изучению механизмов радиорезистентности и предложен значительный перечень её молекулярных маркеров, ни один из которых, однако, так и не вошёл в клиническую практику. В настоящее время, как никогда ранее, актуально проведение комплексного исследования, интегрирующего различные молекулярные параметры и позволяющего как объяснить ряд молекулярных механизмов радиорезистентности, так и предложить перечень новых маркеров.

В последнее десятилетие сложность человеческого генома была выявлена с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК [3]. Было показано существование регуляторной сети конкурирующих эндогенных РНК (ceRNA), состоящей из длинных некодирующих РНК (lncRNA), микроРНК (miRNA) и мРНК.

МикроРНК – это короткие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов, катализируя разрушение мРНК либо ингибируя трансляцию мРНК в белок. МикроРНК вносят значительный вклад в инициацию и развитие различных молекулярных событий, включая инициацию онкогенеза, прогрессирование и метастазирование опухолей, что делает микроРНК потенциальными биомаркерами для оценки прогрессирования и прогноза злокачественных опухолей кишечника. Хотя микроРНК регулируют экспрессию генов, кодирующих белки, главным образом посредством деградации или сайленсинга мРНК, появляется все больше свидетельств того, что микроРНК могут взаимодействовать с lncRNA, что, в свою очередь, также обеспечивает регуляцию экспрессии генов-мишеней [4]. Длинные некодирующие РНК (lncRNAs) – это РНК размером более 200 нуклеотидов, регулирующие биологическую активность клеток различными способами, включая транскрипционную регуляцию, посттранскрипционную регуляцию и регуляцию трансляции. lncRNA контролируют посттранскрипционную регуляцию, являясь компонентом сети ceRNAs и выступая в качестве молекулярной «губки» (сорбента) микроРНК [5, 6].

Участие регуляторной сети ceRNA в инициации и прогрессии опухолей кишеч-

ника было подтверждено в ряде исследований [7]. Однако роль дисбаланса регуляторной сети ceRNA (lncRNA – miRNA – mRNA) у больных раком прямой кишки и формированием радиорезистентности еще предстоит выяснить [8].

Изучение регуляторной сети микроРНК – длинные некодирующие РНК – мРНК имеет большое значение как для выяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе канцерогенеза, так и для создания панели новых биомаркеров [4].

Поэтому целью исследования стал анализ особенностей функционирования регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК (lncRNA, miRNA и мРНК) у больных раком прямой кишки, радиорезистентных и чувствительных к лучевой терапии.

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 100 пациентов (60 мужчин и 40 женщин в возрасте от 34 до 82 лет, медиана возраста $60,1 \pm 5,0$ лет) с диагностированным РПК (аденокарциномы), проходивших стационарное лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии» в 2019–2021 гг. ЛТ на линейном ускорителе частиц Novalis TX проводилась по стандартному протоколу (РОД 2.4 Гр, СОД 54.0 Гр). До проведения ЛТ всем пациентам была выполнена видеокOLONоскопия (ВКС), во время которой были получены парные фрагменты биопсии условно-нормальных и опухолевых тканей прямой кишки. Эти фрагменты в дальнейшем использовались для выделения РНК.

Выделение суммарных препаратов РНК, анализ уровня мРНК и микроРНК. Фрагменты тканей гомогенизировали в тризоле (QIAzol, Qiagen) при температуре 0–1 °С методом механического воздействия. Из полученных гомогенатов с помощью набора RNeasy Plus Universal Kits (Qiagen) проводили выделение суммарных препаратов РНК. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой-1, тем самым устраняя контаминацию геномной ДНК. На матрице очищенных препаратов РНК осуществляли синтез комплементарной ДНК, используя набор «РЕВЕРТА-Л» (Интерлабсервис, Россия).

Для оценки уровня транскриптов 19 генетических локусов использовали метод ПЦР в реальном времени (Real-Time qPCR, RT-qPCR) (табл. 1). Последовательности высоко-специфичных синтетических олигонуклеотидов были разработаны с использованием программы Primer-BLAST и базы данных GenBank (National Center for Biotechnology Information) (табл. 1).

Таблица 1

Синтетические олигонуклеотиды для определения уровня транскриптов мРНК

| № | Праймеры | Последовательности праймеров | № | Праймеры | Последовательности праймеров |
|----|-----------|------------------------------|----|-----------|------------------------------|
| 1 | BRCA1(F) | ACCTGTCTCCACAAAAGTGTCT | 19 | KU70(F) | ACGTAGAGGGCGTTGATTGG |
| 2 | BRCA1(R) | ACACTGTGAAGGCCCTTTTA | 20 | KU70(R) | TGGCTACTGCTCACTTTGGCC |
| 3 | BRCA2(F) | AGTTGGCTGATGGTGGATGA | 21 | RAD50(F) | GCGTGCGGAGTTTGGAAATAG |
| 4 | BRCA2(R) | GGATCCACACCTGGAGTGCC | 22 | RAD50(R) | TTGAGCAACCTTGGGATCGT |
| 5 | CASP3(F) | CTGGAATATCCCTGGACAACAGT | 23 | RAP80(F) | GAGTGAGCAGGAAGCTAGGG |
| 6 | CASP3(R) | TCGACATCTGTACCAGACCGA | 24 | RAP80(R) | AGAAGGCCGCAACTATTCA |
| 7 | CASP8(F) | CTGAAGCAAACAGCCAGTGC | 27 | RNF168(F) | GCCAGTTCGTCTGCTCAGTA |
| 8 | CASP8(R) | GACCTCAATTCTGATCTGCTCAC | 28 | RNF168(R) | CTGCCGCCACCTTGCTTAT |
| 9 | CASP-9(F) | TGAGACCCTGGACGACATCT | 29 | H2AX(F) | AGGCCTCCCAGGAGTACTAA |
| 10 | CASP-9(R) | TCCCTTTCACCGAAACAGCA | 30 | H2AX(R) | CTGAAGCGGCTCAGCTCTTT |
| 11 | BAX(F) | GGGACGAACTGGACAGTAACA | 31 | ACTB(F) | AACCGCGAGAAGATGACCC |
| 12 | BAX(R) | GCTGCCACTCGGAAAAAGAC | 32 | ACTB(R) | AGCACAGCCTGGTAGCAAC |
| 13 | BCL-2(F) | GGATCCAGGATAACGGAGGC | 33 | GAPDH(F) | GTCAAGGCTGAGAACGGGAA |
| 14 | BCL-2(R) | GAAATCAAACAGAGGCCGCA | 34 | GAPDH(R) | TCGCCCCACTTGATTTTGGGA |
| 15 | P53(F) | TTGGAACCTCAAGGATGCCCA | 35 | B2M(F) | AGATGAGTATGCCTGCCGTG |
| 16 | P53(R) | CGGGAGGTAGACTGACCCCT | 36 | B2M(R) | CCATGATGCTGCTTACATGTCTC |
| 17 | MDM2(F) | TAGGAGATTTGTTGGCGTGC | 37 | RBBP-8(F) | ACCGAGGATTTGGCACTCTG |
| 18 | MDM2(R) | CCTGCTGATTGACTACTACCAA | 38 | RBBP-8(R) | TCCGAGATTGCCTCGGGATT |

RT-qPCR-смесь состояла из ПЦР-буфера (1x), dNTP (0,2 mM), MgCl₂ (1,5 mM), синтетических олигонуклеотидов (по 0,6 mM каждого), Taq-полимеразы (0,1 U/мкл) и комплементарной ДНК (15 нг). Амплификация кДНК проводилась в термочиклере CFX 96 (Bio-Rad) по следующему алгоритму: 94,0 °C – 240 с и далее 39 циклов:

94,0 °C – 9 с, 57 °C – 25 с, 72 °C – 45 с. Относительный уровень транскриптов мРНК (экспрессия генетических локусов) (ТА) вычисляли по формуле, учитывающей нормализацию по референсным генам (*GAPDH*, *ACTB* и *B2M*) и уровню мРНК соответствующих генов в образцах нормальной ткани:

$$TA = E^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{E^{(C(t)_{target}-C(t)_{reference})_{опухолевой\ ткани / \text{ медиана}}}}{E^{(C(t)_{target}-C(t)_{reference})_{нормальной\ ткани}}} [9].$$

Уровень относительной экспрессии микроРНК и lncRNA также оценивали методом RT-qPCR. Дизайн последовательностей синтетических олигонуклеотидов, необходимых для оценки экспрессии микроРНК, проводили, используя алгоритм Balcells I. Primer-BLAST использовали для дизайна праймеров на длинные некодирующие РНК. В качестве референса для определения экспрессии микроРНК и lncRNA использовали малую некодирующую РНК U6. Для оценки уровня представленности транскриптов микроРНК тотальную РНК конвертировали в кДНК в реакции обратной транскрипции с RT-праймерами одновременно с полиаденилированием [10].

Статистический и биоинформационный анализ выполняли в среде RStudio v. 8.10.173.987 на языке программирования R. Соответствие полученных данных закону нормального распределения оценивали с помощью критерия Шапиро – Уилка. Значимость межгрупповых отличий

определяли с использованием критерия Манна – Уитни (поправка Бонферрони). Взаимосвязи исследуемых показателей оценивали с использованием коэффициента корреляции Спирмена (r). Кластерный анализ выполняли с параметрами Hierarchical Clustering/Euclidean distance. Для группировки генетических локусов по биологическим функциям использовали алгоритм FMD (Functional module detection). Q-value вычисляли с помощью одностороннего точного критерия Фишера (поправка Бенджамини – Хохберга) [11].

Для биоинформационного скрининга микроРНК использовали алгоритм машинного обучения random forest (объединяет метод случайных подпространств и метод бэггинга Бреймана), позволяющий прогнозировать сайт связывания мРНК и микроРНК [12]. Участие дифференциально экспрессирующихся микроРНК в ключевых клеточных сигнальных путях оценивали с помощью ORA (Over-Representation Analysis) [13].

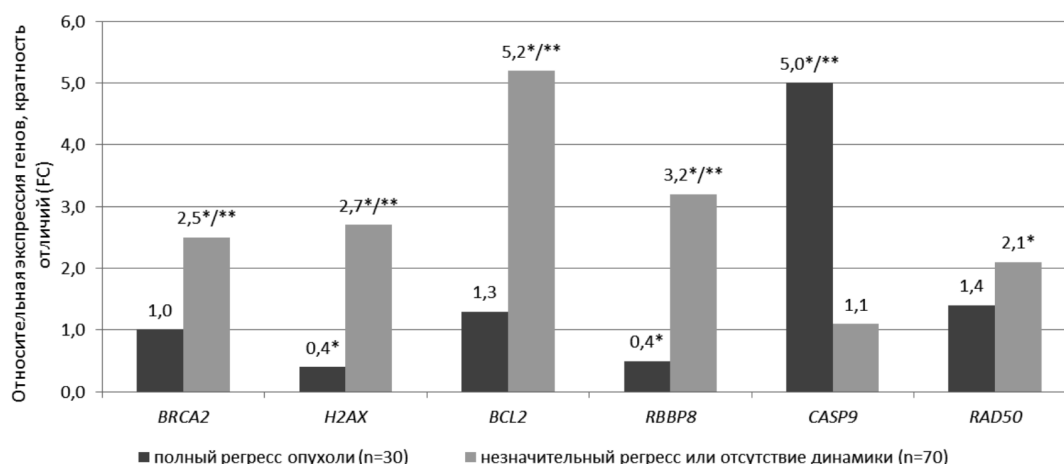


Рис. 1. Относительный уровень мРНК 6 генетических локусов в опухолевой ткани больных РПК с полным ответом на терапию (группа 1, n = 30) и частичным ответом/отсутствием ответа (группа 2, n = 70). * – статистически значимые отличия относительно условно-нормальной ткани прямой кишки ($p < 0,05$), ** – межгрупповые статистически значимые отличия ($p < 0.05$)

Анализ взаимодействия микроРНК и lncRNA проводили следующим образом:

1) из базы Gene Expression Omnibus были извлечены данные HITS-CLIP, PAR-CLIP и CLASH и обработаны с помощью FASTX-Toolkit v0.0.13, и далее проанализированы с использованием PARalyzer v1.1;

2) с помощью UCSC LiftOver Tool все координаты сайтов связывания были преобразованы в сборки hg19, mm9/mm10 и себ/ce10 соответственно. Геномные координаты консервативных сайтов-мишеней микроРНК, предсказанные TargetScan, miRanda/mirSVR, PITA, Pictar и RNA22, были также собраны и преобразованы в сборки hg19, mm9/mm10 и себ/ce10 с использованием LiftOver;

3) полученные на шаге 2 координаты сравнивали с ранее описанными кластерами CLIP с использованием BEDTools [4].

Результаты исследования и их обсуждение

Связь уровня мРНК и эффективности ЛТ. Данные по уровню мРНК 19 генов в образцах биопсии опухолевой ткани прямой кишки были подвергнуты кластерному анализу (Hierarchical Clustering/Euclidean distance), позволившему выделить два основных кластера: в кластере-1 у 80% образцов был повышен уровень мРНК гена CASP-9 и у 75% снижен уровень мРНК генов BCL-2, BRCA-2, RBBP-8, H2AX; в кластере-2 у 80% был снижен уровень мРНК CASP-9, а у 82% повышен уровень H2AX, BCL-2, BRCA-2, RBBP-8 и RAD50.

Комплексный анализ результатов радиотерапии 100 больных РПК дал следующие результаты: у 30 пациентов был получен полный ответ на терапию, у 45 пациентов – частичный ответ, и у 25 пациентов было зафиксировано отсутствие ответа на терапию. В биопсии опухолевого материала у пациентов с полным ответом на терапию был зафиксирован пониженный уровень мРНК генов H2AX и RBBP-8 в 2,50 и 2,00 раза ($p = 0,0048$), соответственно, и повышенный уровень мРНК CASP-9 в 5,00 раз ($p = 0,00078$). В опухолевом биопсийном материале у пациентов с частичным ответом/отсутствием ответа на ЛТ был повышен уровень мРНК генов BCL-2, BRCA-2, H2AX, RBBP-8 и RAD50 в 5,20 ($p = 0,00008$), 2,50 ($p = 0,0044$), 2,70 ($p = 0,0041$), 3,20 ($p = 0,0011$) и 2,10 ($p = 0,0051$) раза соответственно (рис. 1).

Таким образом, можно сделать вывод, что уровень мРНК локусов RAD50, BCL-2, BRCA-2, H2AX, CASP-9 и RBBP-8 связан с эффективностью радиотерапии, которая возрастает у больных РПК с гиперэкспрессией гена CASP-9 и гипоекспрессией генов H2AX и RBBP-8, и, наоборот, эффективность терапии падает при гиперэкспрессии генов RAD50, BCL-2, H2AX, RBBP-8 и BRCA-2.

Связь уровня микроРНК и эффективности ЛТ. Биоинформационный скрининг позволил обнаружить 1927 микроРНК, потенциально взаимодействующих с генетическими локусами H2AX, BCL-2, BRCA-2, RAD50, CASP-9 и RBBP-8. Из 1927 только

для 109 микроРНК было подтверждено взаимодействие с соответствующими генами-мишенями в базе данных miRDB (рис. 2). При этом 44 микроРНК образовывали наиболее прочные комплексы с соответствующими генами-мишенями (минималь-

ная свободная энергия взаимодействия в паре микроРНК – мРНК): 18 микроРНК для гена *RAD50*, 12 микроРНК для *CASP-9*, 9 микроРНК для гена *BCL-2*, 2 микроРНК для *BRCA-2*, 2 микроРНК для *H2AFX*, 1 микроРНК для *RBBP-8* (табл. 2).

Таблица 2

МикроРНК, выявленные при биоинформационном скрининге*

| МикроРНК | Ген-мишень | Координаты в геноме | | Энергия | miRDB | |
|-------------|---------------|---------------------|-------|---------|-------|---|
| | | начало | конец | | | |
| miRNA-1249 | <i>BCL-2</i> | 3468 | 3517 | -30.1 | + | |
| miRNA-6861 | | 3474 | 3513 | -29.6 | + | |
| miRNA-8052 | | 4393 | 4412 | -29.3 | + | |
| miRNA-324 | | 4680 | 4700 | -28.6 | + | |
| miRNA-6820 | | 1670 | 1701 | -28.1 | + | |
| miRNA-4717 | | 2322 | 2364 | -28.0 | + | |
| miRNA-3943 | | 2750 | 2774 | -27.8 | + | |
| miRNA-557 | | 2549 | 2584 | -27.6 | + | |
| miRNA-4690 | | 2147 | 2172 | -27.3 | + | |
| miRNA-6757 | | <i>BRCA-2</i> | 10786 | 10812 | -25.7 | + |
| miRNA-7151 | | | 10797 | 10825 | -25.1 | + |
| miRNA-6779 | | <i>CASP-9</i> | 1482 | 1537 | -34.3 | + |
| miRNA-1273h | 2555 | | 2590 | -33.1 | + | |
| miRNA-6812 | 2593 | | 2622 | -30.6 | + | |
| miRNA-6737 | 1329 | | 1347 | -30.1 | + | |
| miRNA-661 | 1516 | | 1552 | -29.8 | + | |
| miRNA-6799 | 2609 | | 2656 | -29.7 | + | |
| miRNA-6893 | 2442 | | 2484 | -28.5 | + | |
| miRNA-6819 | 1329 | | 1347 | -27.0 | + | |
| miRNA-6874 | 2505 | | 2535 | -26.6 | + | |
| miRNA-4728 | 2906 | | 2925 | -26.3 | + | |
| miRNA-6808 | 1588 | | 1610 | -26.2 | + | |
| miRNA-30b | 1967 | | 1987 | -25.6 | + | |
| miRNA-3202 | <i>H2AFX</i> | | 620 | 639 | -20.3 | + |
| miRNA-5195 | | | 1478 | 1504 | -23.8 | + |
| miRNA-130b | <i>RBBP-8</i> | | 3196 | 3215 | -23.7 | + |
| miRNA-195 | <i>RAD50</i> | | 4473 | 4495 | -21.6 | + |
| miRNA-340 | | | 7439 | 7465 | -21.6 | + |
| miRNA-497 | | 7937 | 7955 | -21.7 | + | |
| miRNA-4257 | | 4983 | 4995 | -21.9 | + | |
| miRNA-5187 | | 5263 | 5294 | -22.1 | + | |
| miRNA-149 | | 6304 | 6325 | -22.6 | + | |
| miRNA-6769a | | 7407 | 7432 | -22.7 | + | |
| miRNA-5010 | | 6718 | 6737 | -23.1 | + | |
| miRNA-4533 | | 4505 | 4523 | -23.9 | + | |
| miRNA-6856 | | 5076 | 5107 | -23.9 | + | |
| miRNA-138-1 | | 6188 | 6209 | -24.2 | + | |
| miRNA-433 | | 5013 | 5034 | -24.4 | + | |
| miRNA-3911 | | 6964 | 6988 | -24.4 | + | |
| miRNA-3691 | | 5368 | 5391 | -24.6 | + | |
| miRNA-4786 | | 6889 | 6915 | -25.7 | + | |
| miRNA-6758 | | 5054 | 5108 | -26.0 | + | |
| miRNA-6865 | | 6715 | 6736 | -29.0 | + | |
| miRNA-6798 | | 5134 | 5170 | -30.4 | + | |

* – представлены только микроРНК, валидированные в базе данных miRDB с минимальной свободной энергией взаимодействия микроРНК – мРНК.

соответственно, высокий уровень их транскриптов должен способствовать снижению уровня мРНК инициаторной каспазы каспазы-9, необходимой для запуска апоптоза.

Уровень miRNA-6757 в опухолевой ткани у больных РПК с низкой эффективностью радиотерапии был ниже в 5,00 ($p = 0,0009$) раз и 4,41 ($p = 0,0040$) раза относительно собственной нормальной ткани и опухолевой ткани пациентов с высокой эффективностью терапии соответственно. Геном-мишенью данной микроРНК является *BRCA-2*, и снижение уровня её транскриптов должно приводить к увеличению уровня мРНК *BRCA-2* (рис. 1). Уровень miRNA-1273h, miRNA-6737, miRNA-661, miRNA-4728, miRNA-30b и miRNA-6808 был снижен в 2,50 ($p = 0,00001$), 3,32 ($p = 0,0004$), 1,71 ($p = 0,0005$), 5,00 ($p = 0,0001$), 1,80 ($p = 0,0019$) и 5,00 ($p = 0,00013$) раза соответственно в опухолевой ткани пациентов с полным ответом на терапию относительно нормальной ткани.

В группе больных РПК с высокой эффективностью ЛТ выявлены статистически значимые ($p < 0,05$) изменения в уровне микроРНК miRNA-5195 и miRNA-3202. Так в опухолевой ткани уровень транскриптов miRNA-3202 был в 4,50 раза выше, чем в нормальной ткани, и в 3,00 раза выше, чем в опухолевой ткани у больных РПК с низкой эффективностью терапии. Уровень miRNA-5195 был в 1,80 раза выше по сравнению с нормальной тканью и в 3,60 раза выше, чем уровень в опухолевой ткани у больных РПК с низкой эффективностью ЛТ (рис. 3). Данные микроРНК могут взаимодействовать с мРНК гистонового белка *H2AX*, запускающего конформационную модификацию хроматина при повреждении ДНК под воздействием ионизирующего излучения [15]. Поэтому высокий уровень miRNA-3202/miRNA-5195 может способствовать снижению уровня мРНК *H2AX*, и наоборот.

В ходе проведенного исследования также обнаружено, что в опухолевой ткани у больных РПК с высокой эффективностью терапии повышен уровень miRNA-130b в 4,00 раза ($p = 0,000014$) относительно нормальной ткани и снижен уровень этой микроРНК в 2,00 раза ($p = 0,000195$) в опухолевой ткани у больных с низкой эффективностью терапии. Соответственно, у больных первой группы уровень miRNA-130b в 8,00 раза выше ($p = 0,00022$) по сравнению с уровнем у больных второй группы, что может приводить к снижению уровня мРНК гена *RBBP-8* (регулирует пролиферацию

клеток) у больных с высокой эффективностью ЛТ и повышению его уровня у больных РПК с низкой эффективностью терапии (рис. 1).

Из 18 микроРНК таргетирующих ген *RAD50*, в опухолевой ткани прямой кишки aberrantную экспрессию имеют только 8 (miRNA-195-5p, miRNA-5187-5p, miRNA-149-5p, miRNA-138-1-3p, miRNA-433-3p, miRNA-3911, miRNA-6865-5p, miRNA-6798-5p).

Так, экспрессия miRNA-195-5p относительно нормальной ткани прямой кишки в 2,40 ($p = 0,0045$) раза выше у больных с полным регрессом опухоли и в 5,00 раз ($p = 0,0003$) ниже у больных с неполным регрессом опухоли. При этом между этими группами отличия в экспрессии miRNA-195-5p составляют 12,00 раз ($p = 0,00004$) (рис. 3). Экспрессия miRNA-5187-5p и miRNA-149-5p повышена в 4,30 и 5,10 раз ($p = 0,00015$) в опухолевой ткани у больных с полным ответом на терапию относительно нормальной ткани. Отличие между двумя группами больных по экспрессии этих микроРНК составляет 2,80 раза ($p = 0,0001$). Экспрессия miRNA-138-1-3p, miRNA-433-3p и miRNA-3911 статистически значимо ($p < 0,05$) повышена у больных с полным регрессом относительно экспрессии в нормальной ткани в 2,50; 2,10 и 3,40 раза соответственно. Экспрессия miRNA-6798-5p относительно нормальной ткани прямой кишки в 3,90 ($p = 0,00075$) раза выше у больных с полным регрессом опухоли и в 10,00 раз ($p < 0,00022$) ниже у больных с частичным регрессом опухоли. При этом между этими группами отличия в экспрессии miRNA-6798-5p составляет 39,00 раз ($p = 0,000002$) (рис. 3). Экспрессия miRNA-6865-5p снижена в 3,30 раза ($p = 0,003$) в опухолевой ткани у больных с неполным регрессом опухоли относительно нормальной ткани прямой кишки.

Так как микроРНК имеют большое количество генов-мишеней [16], то для дифференциально экспрессирующихся микроРНК в опухолевых тканях двух групп больных РПК был проведен анализ ORA (Over-Representation Analysis, табл. 3, рис. 4).

Согласно Over-Representation Analysis, дифференциально экспрессирующиеся в двух группах пациентов микроРНК не только оказывают влияние на уровень мРНК генетических локусов *BCL-2*, *CASP-9*, *BRCA-2*, *RAD50*, *H2AX* и *RBBP-8*, но и контролируют ключевые для выживания и пролиферации опухолевых клеток сигнальные пути (табл. 3, рис. 4).

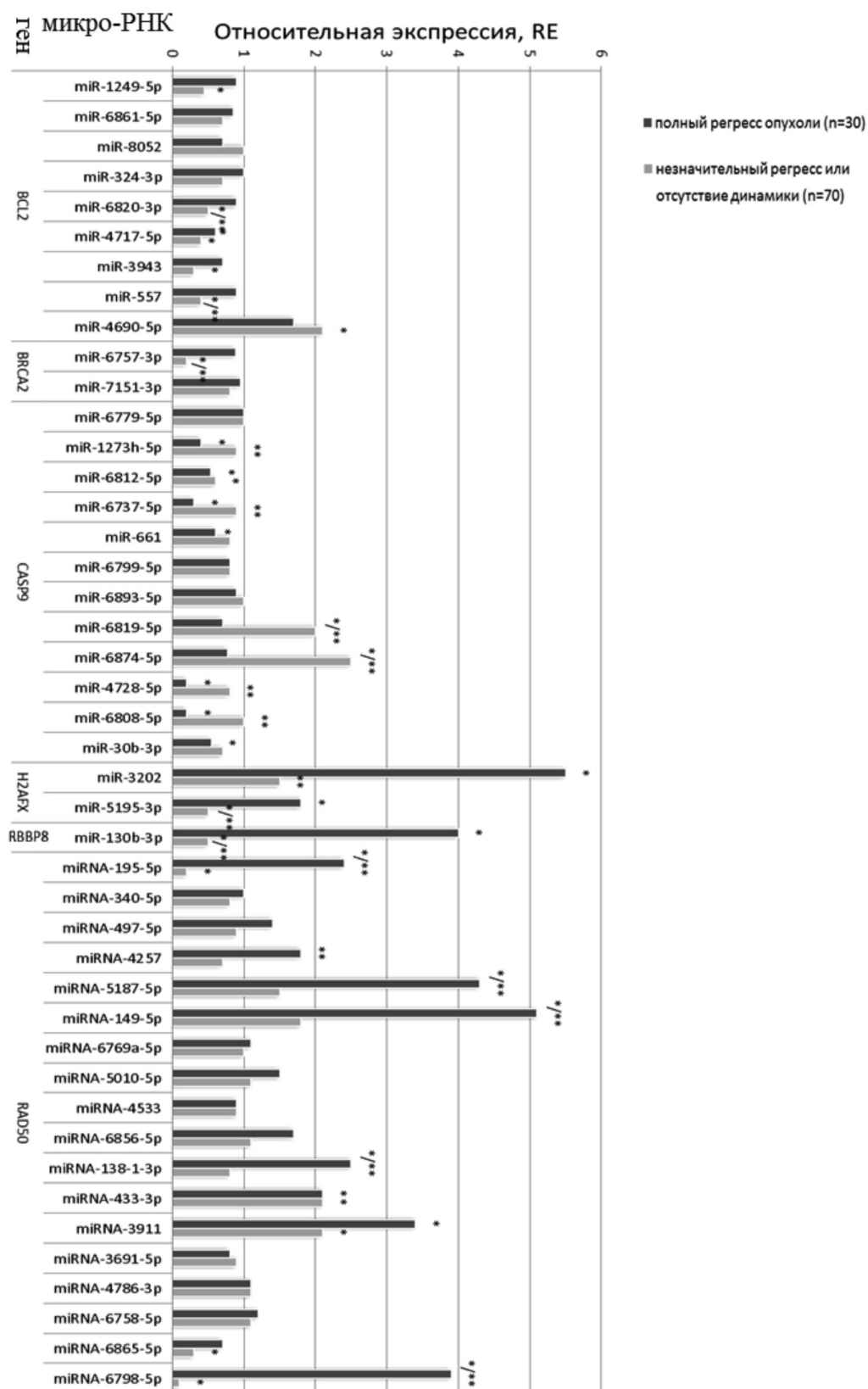


Рис. 3. Транскрипционный профиль микроРНК опухолевой ткани в двух группах больных РПК с разной эффективностью терапии. * – статистически значимые отличия относительно нормальной ткани ($p < 0,05$), ** – статистически значимые отличия между группами ($p < 0,05$)

Таблица 3

Представленность в сигнальных путях микроРНК с дифференциальной экспрессией

| Сигнальный путь | P-value | МикроРНК |
|--|-----------|---|
| ECM-receptor interaction | 5,53e-6 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-149; miRNA-138-1; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| Notch signaling pathway | 1,87e-5 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-149; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| Protein digestion and absorption | 2,98e-4 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| Glutathione metabolism | 7,10e-4 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-5187; miRNA-149; miRNA-138-1; miRNA-6798; miRNA-4728; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6808 |
| Oxidative phosphorylation | 9,45e-4 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-149; miRNA-138-1; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| RIG-I-like receptor signaling pathway | 0,001412 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-5187; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b |
| Phosphatidylinositol signaling system | 0,0021463 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-5187; miRNA-149; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b |
| Apoptosis – multiple species | 0,0023771 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-149; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b |
| Phagosome | 0,0023569 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-149; miRNA-138-1; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells | 0,0028218 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-5187; miRNA-149; miRNA-138-1; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| Estrogen signaling pathway | 0,0037057 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-5187; miRNA-149; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| Inflammatory mediator regulation of TRP channels | 0,0040433 | miRNA-195; miRNA-5187; miRNA-149; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b |
| Pyrimidine metabolism | 0,0044015 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-149; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-130b |
| Inositol phosphate metabolism | 0,0046988 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-149; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b |
| Necroptosis | 0,0049473 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-5187; miRNA-149; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| Cell cycle | 0,0061424 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-5187; miRNA-149; miRNA-138-1; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |

Окончание табл. 3

| Сигнальный путь | P-value | МикроРНК |
|---|-----------|---|
| ErbB signaling pathway | 0,0059231 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-149; miRNA-138-1; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| Parathyroid hormone synthesis, secretion and action | 0,0064135 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-149; miRNA-138-1; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| Ribosome biogenesis in eukaryotes | 0,0057282 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-149; miRNA-138-1; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| VEGF signaling pathway | 0,0077348 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-5187; miRNA-149; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b |
| C-type lectin receptor signaling pathway | 0,0081841 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-5187; miRNA-149; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-557; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-130b |
| Phospholipase D signaling pathway | 0,0088879 | miRNA-195; miRNA-4257; miRNA-149; miRNA-138-1; miRNA-6798; miRNA-6819; miRNA-4728; miRNA-1249; miRNA-1273h; miRNA-6737; miRNA-6808; miRNA-3202; miRNA-5195; miRNA-130b |
| Nitrogen metabolism | 0,0097981 | miRNA-195; miRNA-5187; miRNA-149; miRNA-4728; miRNA-1273h; miRNA-6808 |

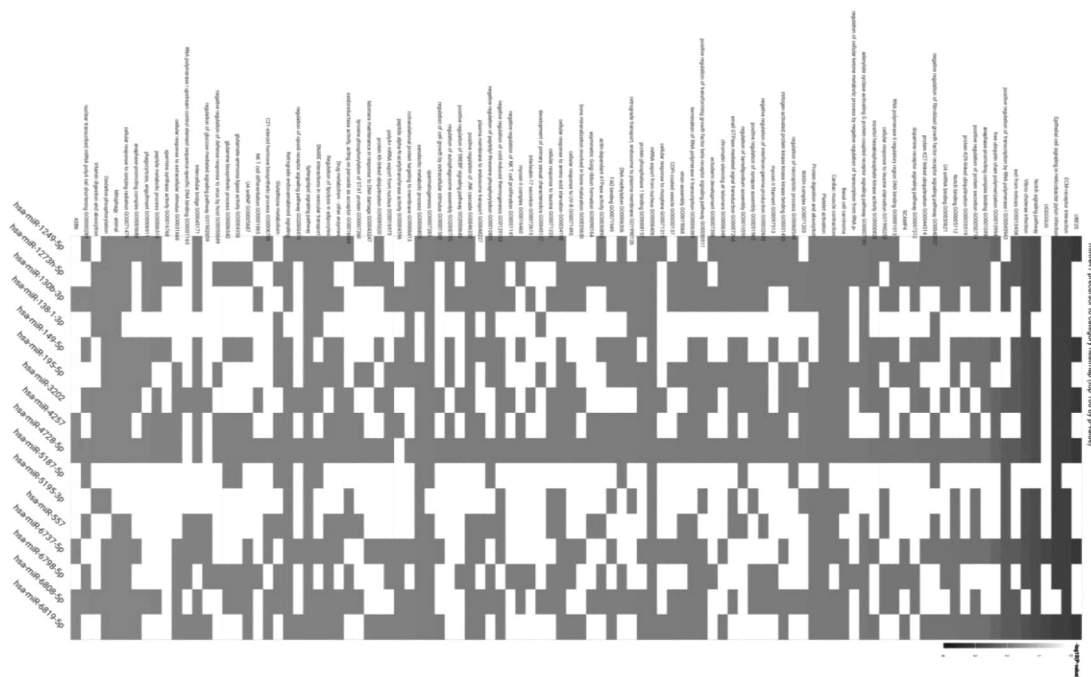


Рис. 4. Визуализация результатов ORA, представленных в табл. 3

Таким образом, радиочувствительность опухолевой ткани прямой кишки, определяющая эффективность лучевой терапии, также связана с уровнем микроРНК miRNA-195, miRNA-4257, miRNA-5187, miRNA-149,

miRNA-138, miRNA-6798, 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.

Биоинформационный скрининг потенциального взаимодействия микроРНК и длинных некодирующих РНК. Применение биоинформационных алгоритмов позволило выявить для пяти дифференциально экспрессирующихся микроРНК (miR-130b, miR-149, miR-195, miR-1249, miR-5195) взаимодействие с 202 длинными некодирующими РНК (табл. 4).

Таблица 4

Перечень длинных некодирующих РНК и взаимодействующих с ними микроРНК

| МикроРНК | Линч-мишень | Последовательность микроРНК | Выравнивание | Последовательность длинной некодирующей РНК |
|-----------------|--------------|-----------------------------|--------------|---|
| hsa-miR-130b-3p | LINC01087 | uacGGGAAAGUAGUAACGUGAc | : : | uauUCGUCUGGACAUUGCACUu |
| | AC016717.2 | uaCGGGAAAGUAGUAACGUGAc | : : | agGUCUUGUUAUC-UUGCACUa |
| | AC109588.1 | uacgggaaagUAGUAACGUGAc | : | uacuuauaaAACCUUGCACUc |
| | AC124016.2 | uacgggAAAGUAGUAACGUGAc | : : | auagggUUUUAAU-UUGCACUg |
| | LINC01091 | uacgggaaAGUAGUAACGUGAc | : : | gccuaggeUGGUC-UUGCACUc |
| | AL591030.1 | uacgggaAAGUAGUAACGUGAc | : : | gacagaaUAUAAU-UUGCACUa |
| | AP003469.4 | uacgggaaaguagUAACGUGAc | | uauucagccuggaAUUGCACUa |
| | AL845472.1 | uaCGGGA--AAGUAGUAACGUGAc | : : : | ugGCCUUCAUCCCUAGUUGCACUa |
| | PCAT5 | uacGGGAAAGUAGU--AACGUGAc | : : | ucuCCCUGCUGACAUUUGCACUu |
| | LINC00839 | uacGGGA--AA-GUAGUAACGUGAc | | uccCCCUGAUUCCACAUUGCACUu |
| | NEAT1 | uacGGGAAAGUAGUAACGUGAc | : : : | ggaCUGUUCUGUCCUUGCACUg |
| | LINC01089 | uacGGGAAAGUAGUAACGUGAc | : : : | gcuUCCAACCUCAUUGCACUg |
| | AL355338.1 | uacgggaAAGUAGUAACGUGAc | | cugagacUGCACCAUUGCACUc |
| | VASH1-AS1 | uacgggaaAGUA--GUAACGUGAc | | agccgagaUCAUGCCAUGCACUc |
| | AC142472.1 | uaCGGGAAAGUAGU---AACGUGAc | | cuGACAUUCCAGCACGUUUGCACUg |
| | LINC01476 | uacGGGAAAGUAGU-AACGUGAc | | aucCCAUGACAUGAUUUGCACUc |
| | LINC00667 | uacGGGAAAGUAGUAACGUGAc | : : : : | aaucUCUAU-GCCUUUGCACUg |
| | ILF3-AS1 | uacgggAAAGUAGUAACGUGAc | | ccgagaUUGCUCCAUUGCACUc |
| | CTD-3093M3.1 | uacgggaaaguagUAACGUGAc | | uauuuguaaaaaUUGCACUu |
| | LINC02575 | uacgggaaaGUAGUAACGUGAc | | acucauaaaCA-CUUUGCACUc |
| | XIST | uacgggaAAGUAGU-AACGUGAc | | uaaacaUUC-UCAGUUGCACUu |
| hsa-miR-149-5p | AL645608.1 | ccCUCACUUCUGUC-CUCGGUCu | : : : : : | cgGGAUGGAGGCGGGAGAGCCAGg |
| | LINC01356 | cccucacuucUGUGCCUCGGUCu | | uuuuauaccACCAGGAGCCAGu |
| | BLACAT1 | cccUCACUUCUGUGCCUCGGUCu | : | agcACUGA--GUCGGGAGCCAGg |
| | AC007878.1 | cccucACUUCUGUGCCUCGGUCu | : | cagccUGGGCA-ACAGAGCCAGg |
| | AC009237.14 | cccucACUUCUGUGCCUCGGUCu | : | gaagcacAAGGCUGAGAGCCAGu |
| | MIR4435-2HG | cccUCACUUCUG--UG-CCUCGGUCu | : | uccAGUAAUUGCUAAUGGGAGCCAGu |
| | AC079922.2 | cccUCAC-UUCUGUGCCUCGGUCu | : : | ugcAGUGUGACCCUUGAGCCAGu |
| | AC097468.3 | ccCUCACUUCUGUGCCUCGGUCu | | auGAAUGACCCAAAGGAGCCAGg |
| | AC109779.1 | ccCUCACUUCUGUC---CUCGGUCu | : : : : : | guGGCUGCUGGUAUGCAUGAGCCAGc |
| | AC131235.4 | cccucACUUCUGUC---CUCGGUCu | : : : | uuuaUUGCUGGUAUGCCAGAGCCAGa |
| | MUC20-OT1 | cccucACUUCUGUGCCUCGGUCu | : : : : : | uguuUAGGGGUA-GGAGCCAGg |
| | AC024132.1 | cccUC-ACUUCUGUGCCUCGGUCu | : : : : | cucAGCUGGACCAGAAGAGCCAGa |
| | SNHG8 | cccuCACUU--CUGU--GCCUCGGUCu | | ccccGAGAACCUCAGUUUGAGCCAGa |
| | SCAMP1-AS1 | cccUC-ACUUC--UGUGCCUCGGUCu | | cuuAGAUGAAGCUACAGGGAGCCAGa |
| | LINC01554 | cccucacuucuguGCCUCGGUCu | | cgcagcuacucCUGAGCCAGc |
| | LINC01848 | ccCUCACUUCUGUGCCUCGGUCu | : : | uuGAG-GGAGCAAUGGAGCCAGc |
| | AC094104.1 | cccuCACUUCUGUGCCUCGGUCu | : : | gaacGUGGGGA-AGUGAGCCAGg |
| | C5orf66-AS1 | cccuCACUUCUGUGCCUCGGUCu | | aaccGUGCAGUGCCAGAGCCAGa |
| | AL390955.2 | cccucACUUCUGUGCCUCGGUCu | : : : | cuccUGGAGG-A--GAGCCAGc |
| | AC092171.3 | ccCUCACUUCUGUGCCUCGGUCu | : : | ggGAGCGGAGGC-CGAGCCAGc |
| | AC005537.1 | ccCUCA-CUUCUGUGCCUCGGUCu | : : | ggGCGUAGGACCCUCCAGCCAGg |
| | AC078846.1 | cccucACUUCUGUG--CCUCGGUCu | : : : | acaaaaAAGGUGCCUUGAGCCAGa |

Продолжение табл. 4

| Ми-кроРНК | Лична-мишень | Последовательность микроРНК | Выравнивание | Последовательность длинной некодирующей РНК |
|----------------|--------------|-----------------------------|--------------|---|
| | AL158152.1 | cccUCACU-UCUG--UGCCUCGGUCu | : : | uucAUUGAUAGGUUGAUUGAGCCAGa |
| | AL365199.1 | cccucaCUUCUGU-GCCUCGGUCu | : : | acccaaGGUGUAUUGGAGCCAGg |
| | LINC01468 | cccucaCUUCUGUGC--CUCGGUCu | : | aaacugGAAGAUGAGGAAGAGCCAGc |
| | OLMALINC | cccucacuucUGUGCCUCGGUCu | : | gcuccucgccAGGCUGAGCCAGg |
| | C10orf91 | cccucacuucugucCUCGGUCu | | cacaggcgugaaGAGCCAGu |
| | NEAT1 | cccUCACUUC-UGUG-C-CUCGGUCu | | aaaAGGAAAGUACCCUGAGAGCCAGu |
| | MALAT1 | ccCUCACUUCUGUGCCUCGGUCu | : | agGAAAAGAGUCCAGGAGCCAGu |
| | AC012531.1 | cccucacuucugGCCUCGGUCu | | uccucugcuauCUGAGCCAGg |
| | AC023794.6 | cccucacuucUGUGCCUCGGUCu | | ccaccucugcCACAGAGCCAGg |
| | HELLPAR | cccUCACUU-CUGUGCCUCGGUCu | : | aaaAGUAAUGAUGGUGAGCCAGg |
| | AC125603.2 | cccucacuucugGCCUCGGUCu | | ugcagcuucacucCUGAGCCAGc |
| | LINC00943 | ccCUCACUUCUGUGCCUCGGUCu | : | caGGCUGA--GCAAGGAGCCAGu |
| | LINC01257 | cccUCACUUCUGUGCCUCGGUCu | : : : | cgcGGUGCGGGAGCAGAGCCAGc |
| | AF111169.1 | cccucaCUUCUG-UGCCUCGGUCu | : | ggggcaGAACACUGGGGAGCCAGg |
| | VASH1-AS1 | ccCU-CACUUCUGU-GCCUCGGUCu | : : | caGAUGUUGCUGCAGCUGAGCCAGa |
| | LINC02288 | cccuCACUUCUGUGCCUCGGUCu | | cccuGUCUAGA-A-GGAGCCAGu |
| | DRAIC | ccCUCAC-UUCUGUGCCUCGGUCu | : | cuGAGAGCGCGGCAC-GAGCCAGa |
| | LINC02188 | cccUCACUUCUGUGCCUCGGUCu | : : | gaaGGUGUAGA-GGAGAGCCAGg |
| | RP1-178F10.3 | cccucacuucUGUGCCUCGGUCu | : | aucgaggucAUCAUGGAGCCAGc |
| | AC068512.1 | cccucacuUCUGUGCCUCGGUCu | : : | ggccuacAGCUUUGGAGCCAGg |
| | AC006504.5 | cccUCACUUC-UGUGCCUCGGUCu | : | uccAGGCAUGUGUCCUGAGCCAGg |
| | AL121894.2 | cccucACUUCUGUGCCUCGGUCu | : | ccccUGAGGCCAGUGAGCCAGa |
| | LINC00895 | cccucaCUUCUG-UGCCUCGGUCu | : : | uuuuGAGGGCUGAAGAGCCAGc |
| | OGFRP1 | ccCUCACUUCUGUGC-CUCGGUCu | : | guGACUUGUGCGAAGUGAGCCAGg |
| | MIRLET7BHG | cccUCACUUC-UGUGCCUCGGUCu | : | gaaACUGAGGCCAGAGAGCCAGg |
| | XIST | cccucacuUCUGUGCCUCGGUCu | : | ccugggccAGUC-UUGAGCCAGc |
| | FTX | cccucaCUUCUGUGCCUCGGUCu | : | ugcgcaGAACUCCCGAGCCAGc |
| | LINC00630 | cccucacuucugcCUCGGUCu | | ugucugucacuuuaGAGCCAGu |
| | DANT2 | cccucacuucugGCCUCGGUCu | | uauaaacgcucucCUGAGCCAGu |
| | MIR503HG | cccucacuucUGUGCCUCGGUCu | : | guacggucccCCUGGAGCCAGa |
| hsa-miR-195-5p | AL645608.3 | cgGUUAUAAAGAC---ACGACGAu | | ccCCAGAGCUCUGCCUCUGUCUg |
| | AL031281.2 | cggUUAUA-AAGACACGACGAu | | gugAUUAUCUCCUCUGUCUa |
| | AL691459.1 | cgguuuaaagacACGACGAu | | uuagaaagagaaUGCUGCUa |
| | RP6-206117.2 | cgGUUAUAAAGACACGACGAu | | ccCAAUUUUAC--UGCUGCUg |
| | RASAL2-AS1 | cgguuuaaaAGACACGACGAu | | cgguccgggUCUCUGUCUc |
| | MIR29B2CHG | cgguuuaaagacACGACGAu | | acugcagagaaUGCUGCUc |
| | LINC01703 | cgguuuaaagacACGACGAu | | cgguuuagagauUGCUGCUg |
| | AC108488.1 | cgguuuaaagacACGACGAu | | gcuuuugaagaaUGCUGCUg |
| | AC010969.2 | cggUUAUAAAGACACGACGAu | : | uggGGUCUUGCUAUGCUGCUc |
| | AC104794.2 | cgguuuaaaGACACGACGAu | | gcuauccagcu-UGCUGCUa |
| | AC073046.1 | cgguuuaAAAGAC----ACGACGAu | | gaucuccUUUCUGAGGGCUGUCUg |
| | AC019069.1 | cgGUUAUAAAGACACGACGAu | : | gcCUGUA-GUCCUCUGUCUc |
| | TEX41 | cgguuuaaagacACGACGAu | | agaugcauaaaUGCUGCUu |
| | LINC02478 | cgguuuaAAAGACACGACGAu | | uuccuccUUUCU-UGCUGCUa |
| | AC016717.2 | cgGUUAUAAAGACACGACGAu | | agCAAUAGUUCAGUGUCUGCUc |
| | AC097634.1 | cggUUAUA-AAGAC--ACGACGAu | : | aaaAAGAUCUUAGAUUGCUGCUa |
| | LINC02035 | cgguuuaaagacACGACGAu | | gcuuuacuuuaaUGCUGCUu |
| | AC107068.1 | cggUUAUAAAGAC---ACGACGAu | | uguuAUCAUCCUGGGAUGUCUGCUu |
| | LINC02434 | cgguuuaaagacACGACGAu | | ggaggaccagauUGCUGCUu |
| | AC106799.3 | cgGUU-AUAAAGACACGACGAu | | aaCAAUUCUUCUUUGCUGCUu |
| | AC093297.2 | cgGUUAUAAAGAC---ACGACGAu | : | ugCAACCGCUUUGGAUUGCUGCUu |
| | AC010245.2 | cgguuuaAAAGACACGACGAu | | cuuuccAUUGAUCUGUCUg |
| | EPB41L4A-AS1 | cgguuuaaagacACGACGAu | | cugaaguguagacUGCUGCUa |

Продолжение табл. 4

| Ми- кроРНК | Линча- мишень | Последовательность микроРНК | Выравни- вание | Последовательность длинной некодирующей РНК |
|---------------|------------------|-----------------------------|-------------------|--|
| | LINC01184 | cgGUUAUA--AAGAC-ACGACGAu | : : | uuUAGUGUCAUUAUGUUGCUGCUa |
| | HCG17 | cgguaauaaagacACGACGAu | | ugcuuugcccgcUGCUGCUg |
| | LINC00473 | cgguaUAAA-GAC--ACGACGAu | | agggccAUUCCUGUUUGCUGCUu |
| | AC004852.2 | cgGUUAUAAA-AGACACGACGAu | | uuCAAAAUUGCCACUGCUGCUg |
| | AC005537.1 | cgGUUAUAAAAGACACGACGAu | | cuCAAUAAAAU--UGCUGCUa |
| | AC118758.3 | cgguaauaaagACACGACGAu | | caggccuagcgUUUGCUGCUu |
| | AC003092.1 | cgGUUA-UA-AAGACACGACGAu | | cuCACUCAUCUGCUAUGCUGCUg |
| | CASC9 | cgguaauaaagACACGACGAu | | agauggacacaUUUGCUGCUu |
| | RNF139-AS1 | cgguaUAAAAGACACGACGAu | | uugguUAUUU-AAUGCUGCUu |
| | PVT1 | cgguaauaaAGAC-ACGACGAu | | uuugcuucUCCUGUUGCUGCUa |
| | C9orf163 | cgguaauaaaGACACGACGAu | | ccugguggggCUUUGCUGCUu |
| | LINC00707 | cgguaUAAAAGAC--ACGACGAu | | cugcAGACAUCUGGACUGCUGCUu |
| | LINC00843 | cgguaauAAAGACACGACGAu | | uccccguUCUGUGUGCUGCUg |
| | AC022400.5 | cgguaauAAAGACACGACGAu | | uccccguUCUGUGUGCUGCUg |
| | AL132656.2 | cgGUUAUAAAAGACACGACGAu | | aaCCACAUUCC--UGCUGCUg |
| | AL160290.2 | cggUUAUAAAAGACACGACGAu | : | cagAGGAGCUCGUGCUGCUa |
| | AL158835.1 | cgguaUAAAAGACACGACGAu | | auucUAUUCAUUUGCUGCUg |
| | NEAT1 | cgguaauaaagacACGACGAu | | cucgccuacacgcUGCUGCUg |
| | AC008124.1 | cggUUA--UAAAGACACGACGAu | | caaAAUCCAAUCCU-UGCUGCUg |
| | AC024884.2 | cgguaauaaAGACACGACGAu | | cagcuuugUACUAUGCUGCUc |
| | HELLPAR | cgguaauaaAGACACGACGAu | | ugcucaaaUCAUUGCUGCUu |
| | AC055713.1 | cgguaUAAA-AGACACGACGAu | | uuggcUAUUUUAUUAUGCUGCUa |
| | LINC00943 | cgguaauAAAGACACGACGAu | | uagucacUCCUCUGCUGCUg |
| | AL139327.2 | cgguaUAAAAGAC-ACGACGAu | | uuuuuuUUUCCAGAUGCUGCUg |
| | AL138820.1 | cgguaauAAAGACACGACGAu | | ucuuugccUUACU-UGCUGCUu |
| | LINC00639 | cgGUUAUA-AAGACACGACGAu | : | ugUAAGAUGUGAUUUGCUGCUc |
| | AL355916.1 | cgguaauaaAGACACGACGAu | | ucucugaccUCAGUGCUGCUg |
| | AL049775.1 | cgguaauaaagacACGACGAu | | gaggcugugggaaUGCUGCUu |
| | MEG3 | cgGU-UAUAAAAGACACGACGAu | : | caCACAUUGGCCUUGCUGCUg |
| | MEG8 | cgguaauaaaGACACGACGAu | | auuuuaccacCU-UGCUGCUg |
| | AL117190.1 | cgguaauaaaGACACGACGAu | | auuuuaccacCU-UGCUGCUg |
| | LINC00638 | cgGUUAUAAAAGACACGACGAu | | gcCCAGCUGUCCAUGCUGCUg |
| | FAM30A | cgguaauaaagacACGACGAu | | agagggaagggaUGCUGCUg |
| | AC012236.1 | cgguaauaaagacACGACGAu | | agagaggggcaccUGCUGCUa |
| | AC020661.1 | cggUUAUAAAAGACACGACGAu | | ugaAAGACAU-UGUGCUGCUg |
| | IQCH-AS1 | cgGUUAUAAAAGACACGACGAu | | ucCAAUGAUUGUGGUGACGUGCUGCUa |
| | AC068338.2 | cggUUAUAAAAGACACGACGAu | | acaAAGAUAAAC-CUGCUGCUg |
| | LINC02128 | cgguaauaaaGAC--ACGACGAu | | uccgucagacCUGCCUGCUGCUu |
| | LINC00922 | cgguaauaaagacACGACGAu | | agccugugagguUGCUGCUg |
| | AC040162.3 | cgGUUAUAAAAGACACGACGAu | | ugCUAUA-AACACUGCUGCUu |
| | LINC01572 | cgguaUAAAAGAC-ACGACGAu | | uaucaUAUACCCGUGCUGCUa |
| | AC133540.1 | cgguaauaaAGAC--ACGACGAu | | ccuuggccUGCUGGUGCUGCUc |
| | FENDRR | cggUUAUAAAAGACACGACGAu | | aggAAUA-UCCUGCAACCUGCUGCUc |
| | AC126696.3 | cgguaauaaAGAC-ACGACGAu | | aaagcuccaUCGGCUGCUGCUg |
| | LINC00324 | cgguaauaaAGACACGACGAu | | uccgcccguUAU-UGCUGCUc |
| | RP1- 178F10.3 | cgguaauaaagacACGACGAu | | uucguuuggcgcUGCUGCUg |
| | AC129926.1 | cgGUU-AUAAAAGAC-ACGACGAu | : : | ucCAGCUGCCUCUGCUGCUGCUg |
| | SNHG25 | cgguaUAAAAGACACGACGAu | | ugucAUCGUCCU-UGCUGCUu |
| | LINC00511 | cggUUAUAAA-GACACGACGAu | : : | gaaAGUGUUUCCUCUGCUGCUa |
| | AC090772.3 | cggUUAUAAAAGAC--ACGACGAu | | gugACUUUUGGUGGAUGCUGCUg |
| | AC068473.5 | cgguaauAAAGACACGACGAu | | uuuugacUAUCUCUGCUGCUu |
| | LINC00662 | cggUUAUAAAAGAC-ACGACGAu | | cugAAUGGUACUGCUGCUGCUg |
| | SCGB1B2P | cgguaauaaagacACGACGAu | | cuagcucccgcUGCUGCUg |
| | LINC00665 | cgGUUAUAAAAG-ACACGACGAu | : : | gaUACUGCUCCUUUGCUGCUu |
| | AC010624.2 | cgguaauaaaGAC-ACGACGAu | | ggucccccaCUGCUGCUGCUa |
| | AC005261.1 | cgguaauaaagacACGACGAu | | cacugauuaaacUGCUGCUu |
| | AL035252.3 | cgguaauaaAGACACGACGAu | | cucuagcccUCACUGCUGCUu |

Окончание табл. 4

| Ми-кроРНК | Лncпа-мишень | Последовательность микроРНК | Выравнивание | Последовательность длинной некодирующей РНК |
|-----------------|--------------|-----------------------------|--------------|---|
| | SMIM25 | cgguuauaaagacACGACGAu | | ccacugccaccacUGCUGCUc |
| | AP001432.1 | cgGUUAUAAAGACACGACGAu | : | cuCAGU-CAUCACUGCUGCUu |
| | LINC01547 | cgguuauaaAGACACGACGAu | | cggccccgUCCUCUGCUGCUg |
| | AP001476.1 | cgguuauaaagacACGACGAu | | cggcgagcccgUGCUGCUc |
| | AP000547.3 | cgGUUAUAAAGAC-ACGACGAu | ::: | ccCGGUA--CCUGCUGCUGCUc |
| | BX890604.1 | cgguuauaaagacACGACGAu | | cgaggccggcgUGCUGCUa |
| | FAM239A | cgguuauaaagacACGACGAu | | cgaggccggcgUGCUGCUa |
| | FAM239B | cgguuauaaagacACGACGAu | | uaccuggggccguUGCUGCUu |
| | XIST | cgGUUAUAAAGACACGACGAu | | gcCAAUUUGUUUGCUGCUc |
| | MIR503HG | cggUUUAUAAAGACACGACGAu | : | uugAAUGACUGUAUGCUGCUu |
| hsa-miR-1249-3p | AC239800.3 | acuucuuccecccCUUCCCGCa | | gacucugaaccaGAAGGGCGg |
| | AL391069.4 | acuucuuccecccCUUCCCGCa | | cgcuggguuccuaGAAGGGCGc |
| | TERC | acuucuuccecccCUUCCCGCa | | uaaccuuaacuGAGAAGGGCGu |
| | AC008392.1 | acuucuuccecccCUUCCCGCa | | ccucaguacuguaaAAGGGCGg |
| | LINC01547 | acuucuuccecccCUUCCCGCa | | ucggcuucagaauAAGGGCGc |
| | XIST | acuucuuccecccCUUCCCGCa | | ucugcaguuaagcuAAGGGCGu |
| hsa-miR-5195-3p | LINC01355 | ucGGGGGAGUCU-C-UUGACCUa | : | caCACUUUAAAUGUAACUGGAu |
| | AL365181.2 | ucgggggagUCU-CUUGACCUa | : | agaacagcgGGAGGAACUGGAg |
| | AC097634.1 | ucGGGGGAGUC--U-CUUGACCUa | ::: | uuCUUUUUCAGUAAUCAACUGGAa |
| | MUC20-OT1 | ucggggGAGUCUCUUGACCUa | : | caugggCUGGGCCAACUGGAa |
| | AC093297.2 | ucggggGAGUCUC--UUGACCUa | : | uuuagaaUAGGGGCAAACUGGAa |
| | AL008729.2 | ucGGGGGAGUCUC-UUGACCUa | : | gaCACCCAGGAAGCAACUGGAa |
| | AC008080.1 | ucGGGGGAGUCUCUUGACCUa | : | cagCUCCU--GA-AACUGGAa |
| | AC016831.5 | ucgggGAGUCUCUUGACCUa | : | cuuugCUUCCCAUAACUGGAa |
| | CASC9 | ucgGGGGAGUCUCUUGACCUa | : | gaaCCUUUC---AACUGGAa |
| | PVT1 | ucggGGGAGUCUCUUGACCUa | : | guugCCAUCUGGGAACUGGAu |
| | C9orf170 | ucgggggagUCUCUUGACCUa | | auguggggAGAGAACUGGAg |
| | LINC00707 | ucgggggaGUCUCUUGACCUa | | ugcagugcCAGAAAACUGGAa |
| | LINC01468 | ucGGGGGAGUCUCUUGACCUa | : : | caCUCCAUUGUA-AACUGGAa |
| | MALAT1 | ucgggggaGUCUCUUGACCUa | :: | guuugaagUGGAAAACUGGAa |
| | AP003486.1 | ucgggggagucUCUUGACCUa | | uacaagaaguuGAACUGGAu |
| | AC008124.1 | ucgggggAGUCUCUUGACCUa | | gaugugaUGAGA-AACUGGAg |
| | AC083805.1 | ucGGGGGAGUCUCUUGACCUa | : | gcCCAACUUCCUAACUGGAg |
| | ATP2B1-AS1 | ucGGGGGAGUCUCUUGACCUa | ::: | cuCUUAAUUCAGAACUGGAa |
| | HELLPAR | ucgggggagucUCUUGACCUa | | cauacguaucauuAACUGGAa |
| | MAPKAPK5-AS1 | ucGGGGGAGUCUCUUGACCUa | : : | uaCUCCUUCUGCCAACUGGAa |
| | LINC01089 | ucgggggagucUCUUGACCUa | | gaaacuagauuAAAACUGGAa |
| | MEG3 | ucGGGGGAGUCUCUUGACCUa | : | caCCUGCU-AGCAAACUGGAg |
| | IQCH-AS1 | ucgggggagucUCUUGACCUa | | uagaaaauacaccAACUGGAa |
| | LINC00052 | ucgggggagucUCUUGACCUa | | aaaaccuauagccAACUGGAg |
| | AC092127.1 | ucgGGGGAGUCU-C--UUGACCUa | : : | agaCCUUUUUGGAAGGCUUAAACUGGAu |
| | AC005920.3 | ucgggggaGUCUCUUGACCUa | :: | agagugaaUGGUGAACUGGAc |
| | LINC00662 | ucgggggagucUCUUGACCUa | | auuuuuauauaAAAACUGGAa |
| | AC012313.1 | ucgggggagucUCUUGACCUa | | caugaguuccecccAACUGGAg |
| | BX640515.1 | ucgGGGGAGUCU---CUUGACCUa | : : | uugCUUCUAAGGAUUAACUGGAa |
| | LINC01671 | ucggGGGAGUCUCUUGACCUa | | gaagCCCAGAGAGAACUGGAc |
| | BX890604.1 | ucggggGAGUCU--CUUGACCUa | | gagaugCUGAGAAGGAACUGGAg |
| | LINC01204 | ucggGGGAGUCUCUUGACCUa | | cugaCCAUCA-CUAACUGGAu |
| | JPX | ucgggggagUC-UC-UUGACCUa | | ucaaggaagaAGGAACUGGAa |

Для miR-130b предсказано взаимодействие с 21 lncRNA, для miR-149 – с 90 lncRNA, для miR-1249 – с 6 lncRNA и для miR-5195 – с 33 lncRNA. Из этого перечня длинных некодирующих РНК 24 взаимодействовали с несколькими микроРНК дифференциально

экспрессирующимися у больных с разной эффективностью ЛТ (табл. 5, рис. 5).

Дальнейшим этапом работы стал анализ представленности транскриптов 24 lncRNA в биологических образцах двух групп больных РПК.

Таблица 5

Перечень длинных некодирующих РНК 24, взаимодействующих с несколькими микроРНК, дифференциально экспрессирующимися у больных с разной эффективностью ЛТ

| lncRNA | Число микроРНК взаимодействующих с lncRNA | МикроРНК |
|--------------|---|--|
| XIST | 4 | hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-1249-3p |
| HELLPAR | 3 | hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-5195-3p |
| NEAT1 | 3 | hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p |
| AC005537.1 | 2 | hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p |
| AC008124.1 | 2 | hsa-miR-195-5p, hsa-miR-5195-3p |
| AC016717.2 | 2 | hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-195-5p |
| AC093297.2 | 2 | hsa-miR-195-5p, hsa-miR-5195-3p |
| AC097634.1 | 2 | hsa-miR-195-5p, hsa-miR-5195-3p |
| BX890604.1 | 2 | hsa-miR-195-5p, hsa-miR-5195-3p |
| CASC9 | 2 | hsa-miR-195-5p, hsa-miR-5195-3p |
| IQCH-AS1 | 2 | hsa-miR-195-5p, hsa-miR-5195-3p |
| LINC00662 | 2 | hsa-miR-195-5p, hsa-miR-5195-3p |
| LINC00707 | 2 | hsa-miR-195-5p, hsa-miR-5195-3p |
| LINC00943 | 2 | hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p |
| LINC01089 | 2 | hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-5195-3p |
| LINC01468 | 2 | hsa-miR-149-5p, hsa-miR-5195-3p |
| LINC01547 | 2 | hsa-miR-195-5p, hsa-miR-1249-3p |
| MALAT1 | 2 | hsa-miR-149-5p, hsa-miR-5195-3p |
| MEG3 | 2 | hsa-miR-195-5p, hsa-miR-5195-3p |
| MIR503HG | 2 | hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p |
| MUC20-OT1 | 2 | hsa-miR-149-5p, hsa-miR-5195-3p |
| PVT1 | 2 | hsa-miR-195-5p, hsa-miR-5195-3p |
| RPI-178F10.3 | 2 | hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p |
| VASH1-AS1 | 2 | hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-149-5p |

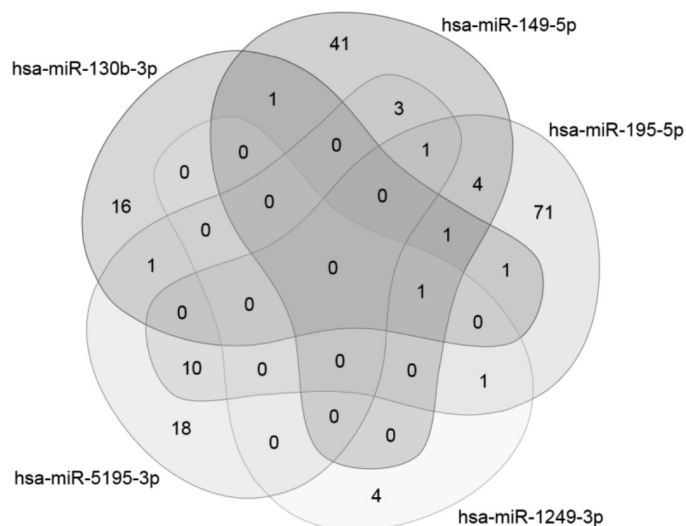


Рис. 5. Диаграмма Эйлера – Венна перекрывающихся взаимодействий 5 микроРНК и 202 длинных некодирующих РНК

Особенности экспрессии lncRNA и эффективность лучевой терапии. Анализ относительной представленности транскриптов длинных некодирующих РНК показал дифференциальные отличия по этому показателю двух групп пациен-

тов с разным ответом на ЛТ. Так, у больных с полным ответом на лучевую терапию обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение представленности транскриптов lncRNA XIST, HELLPAR, NEAT1, AC008124.1 и AC016717.2 в 2,5;

3,3; 2,0; 2,0 и 5,0 раз соответственно относительно нормальной ткани, а у больных с частичным ответом/ отсутствием ответа на лучевую терапию обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение представленности транскриптов lncRNA *XIST*, *HELLPAR*, *NEAT1*, *AC008124.1*, *LINC01089*, *LINC01547* и *VASH1-AS1* в 1,9; 2,9; 3,5; 3,7; 2,6; 4,7 и 1,9 раза соответственно относительно нормальной ткани. При этом между двумя группами пациентов по уровню представленности транскриптов lncRNA *XIST*, *HELLPAR*, *NEAT1*, *AC008124.1*, *AC016717.2*, *LINC01089*, *LINC01547* и *VASH1-AS1* также наблюдались статистически значимые отличия ($p < 0,05$) в 4,8; 9,7; 7,0; 7,4; 5,0; 3,1; 4,8 и 2,2 раза соответственно (рис. 6). Таким образом, полученные данные по представленности транскриптов длинных некодирующих РНК позволяют смоделировать сеть молекулярных взаимодействий, лежащих в основе радиорезистентности опухолевых клеток.

Нарушения в регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК. Предыдущие этапы исследования позволили нам собрать необходимую информацию по всем компонентам регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих эндогенных РНК (ceRNA), включая длинные некодирующие РНК (lncRNA), микроРНК (miRNA) и мРНК (экспрессия генов).

Комплексный анализ данных, представленных выше, позволил нам сформировать следующую модель (рис. 7). Снижение представленности транскриптов lncRNA *XIST*, *HELLPAR*, *NEAT1*, *AC008124.1* и *AC016717.2* у больных с полным ответом на лучевую терапию приводит

к снижению эффективности взаимодействия lncRNA и таргетирующих их микроРНК (hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-1249-3p, hsa-miR-5195-3p). Нарушение образования комплекса lncRNA-микроРНК приводит к увеличению количества свободных микроРНК hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p и hsa-miR-5195-3p и их эффективному взаимодействию с генами-мишенями (мРНК). Соответственно снижается представленность транскриптов генов-мишеней микроРНК hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p – *RBBP8* и miR-5195-3p – *H2AX*, а следовательно, происходит снижение эффективности репарации ДНК.

Противоположный эффект наблюдается у больных с плохим ответом на ЛТ. Увеличение представленности транскриптов lncRNA *XIST*, *HELLPAR*, *NEAT1*, *AC008124.1*, *LINC01089*, *LINC01547* и *VASH1-AS1* у этих больных приводит к увеличению эффективности взаимодействия lncRNA и микроРНК (hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-1249-3p, hsa-miR-5195-3p). Образование комплекса lncRNA-микроРНК приводит к снижению количества свободных микроРНК hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p и hsa-miR-5195-3p и снижению их взаимодействия с генами-мишенями (мРНК).

Соответственно увеличивается представленность транскриптов генов-мишеней микроРНК hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-195-5p – *RBBP8* и miR-5195-3p – *H2AX*, а следовательно, происходит увеличение эффективности репарации ДНК и формирование радиорезистентности (рис. 7).

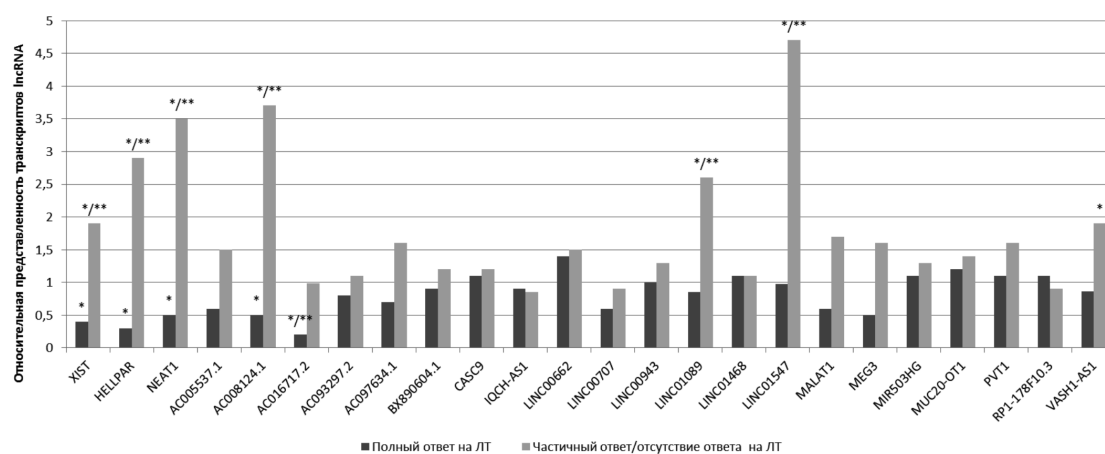


Рис. 6. Относительная представленность (относительно нормальной ткани) транскриптов длинных некодирующих РНК в опухолевой ткани прямой кишки двух групп больных с полным или частичным ответом / отсутствием ответа на ЛТ. * – статистически значимые отличия относительно нормальной ткани ($p < 0,05$), ** – межгрупповые статистически значимые отличия ($p < 0,05$)

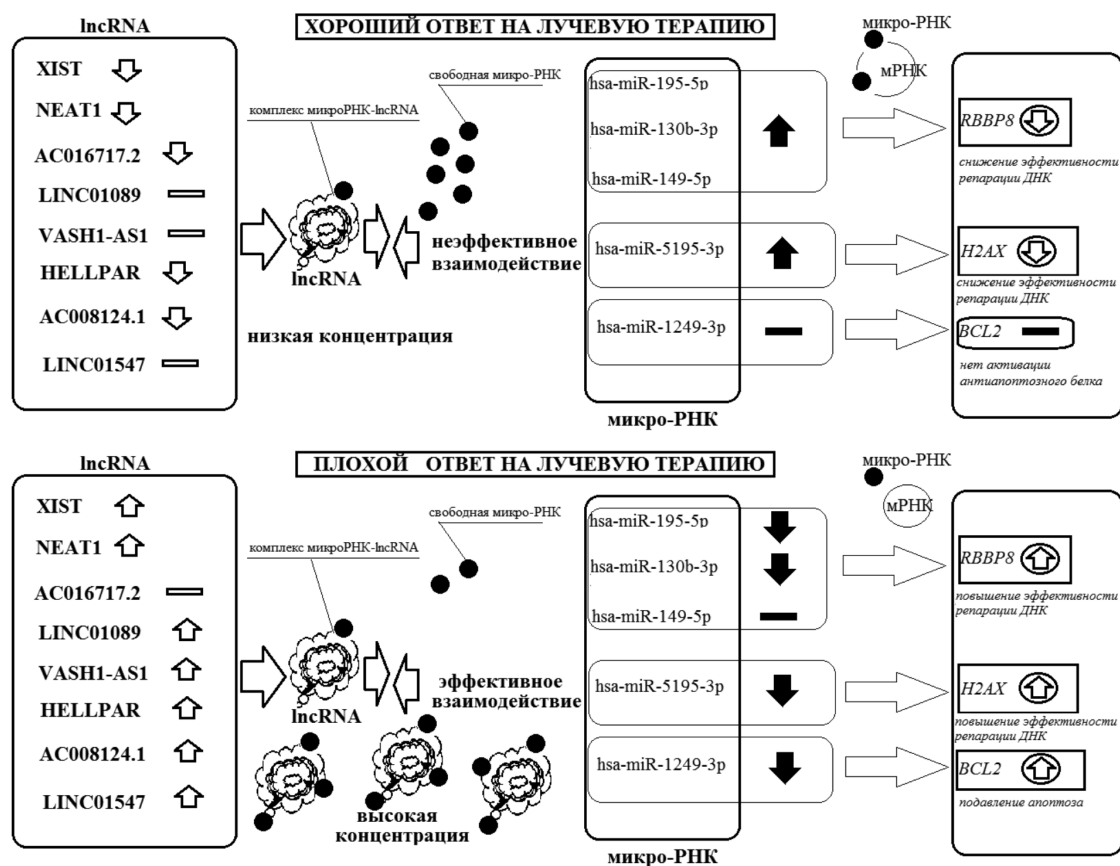


Рис. 7. Особенности регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК у больных с разным ответом на ЛТ

Заключение

Комплексный анализ особенностей регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК и эффективности лучевой терапии опухолей прямой кишки позволил установить как механизмы формирования радиорезистентности, так и её предикторы. Эффективность лучевой терапии злокачественных опухолей прямой кишки связана с уровнем микроРНК (miR-195; miR-1273h; miR-6737; miR-6808; miR-3202; miR-5195; miR-4257; miR-5187; miR-149; miR-138; miR-6798; miR-6819; miR-4728; miR-1249; miR-557; miR-130b) и lncRNA (XIST, HELLPAR, NEAT1, AC008124.1, LINC01089, LINC01547 и VASH1-AS1), обеспечивающих эффективную регуляцию систем репарации ДНК (*H2AX* и *RBBP-8*) и апоптоза (*BCL-2*).

Исследование выполнено в рамках государственного задания «Поиск предикторов радиорезистентности рака прямой кишки и разработка персонализированных неoadьювантных 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. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=30384> (дата обращения: 15.09.2021).
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. Schwartz M.H., Wang H., Pan J.N., Clark W.C., Cui S., Eckwahl M.J., Pan D.W., Parisien M., Owens S.M., Cheng B.L., Martinez K., Xu J., Chang E.B., Pan T., Eren A.M. Microbiome characterization by high-throughput transfer RNA sequencing and modification analysis. Nat Commun. 2018. V. 9. P. 5353.
4. Новикова И.А., Тимошкина Н.Н., Кутилин Д.С. Дифференциальная экспрессия микроРНК в опухолевых и нормальных тканях толстой кишки // Якутский медицинский журнал. 2020. № 4 (72). С. 74–82.
5. Cao C., Zhang T., Zhang D., Xie L., Zou X., Lei L., Wu D., Liu L. The long noncoding RNA, SNHG6-003, functions as a competing endogenous RNA to promote the progression of hepatocellular carcinoma. Oncogene. 2017. V. 36 (8). P. 1112–1122.
6. Бейлерли О.А., Гареев И.Ф., Павлов В.Н., Shiguang Z., Xin C., Кудряшов В.В. Экзосомальные длинные некодирующие

РНК как биомаркеры и терапевтические мишени при раке // Креативная хирургия и онкология. 2019. Т. 9 (4). С. 297–304.

7. Liu Q., Deng J., Wei X., Yuan W., Ma J. Integrated analysis of competing endogenous RNA networks revealing five prognostic biomarkers associated with colorectal cancer. *J Cell Biochem.* 2019. V. 120 (7). P. 11256.

8. Tang F., Lu Z., Wang J., Li Zh., Wu W., Duan H., He Zh. Competitive endogenous RNA (ceRNA) regulation network of lncRNAs, miRNAs, and mRNAs in Wilms tumour. *BMC Med Genomics.* 2019. V. 12. P. 194.

9. Kutilin D.S. Regulation of gene expression of cancer/testis antigens in colorectal cancer patients. *Molecular Biology.* 2020. V. 54 (4). P. 520–534.

10. 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. 707.

11. Krishnan A., Zhang R., Yao V., Theesfeld C.L., Wong A.K., Tadych A., Volfovskiy N., Packer A., Lash A., Troy-

anskaya 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.

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

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

14. 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.

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

16. 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.