



© А.А. Пономарева¹, А.Ю. Добродеев¹, А.С. Тарасова¹, С.Г. Афанасьев¹,
Д.Н. Костромицкий¹, С.В. Паталяк¹, Е.Ю. Рыкова^{2,3}, Н.В. Чердынцева¹

Циркулирующие ДНК-маркеры у больных раком прямой кишки на этапах комбинированного лечения и динамического наблюдения

¹Научно-исследовательский институт онкологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Российская Федерация

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный технический университет», г. Новосибирск, Российская Федерация

© Anastasia A. Ponomaryova¹, Alexey Yu. Dobrodeev¹, Anna S. Tarasova¹, Sergey G. Afanasiev¹,
Dmitriy N. Kostromitskiy¹, Stanislav V. Patalyak¹, Elena Yu. Rykova^{2,3}, Nadezhda V. Cherdyntseva¹

Circulating DNA-Markers in Rectal Cancer Patients at the Stages of Combined Treatment and Dynamic Follow-up

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, the Russian Federation

²Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, the Russian Federation

³Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, the Russian Federation

Введение. При выборе тактики лечения рака прямой кишки (РПК) большое внимание уделяется прогнозу и ранней диагностике рецидива заболевания. Известно, что злокачественная трансформация клеток сопровождается изменением профиля метилирования генома. При злокачественных новообразованиях в составе циркулирующей ДНК плазмы крови (цирДНК) и цирДНК, связанной с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), накапливаются фрагменты опухоль-ассоциированных ДНК, которые являются потенциальными онкомаркерами. Ранее было показано, что уровень метилирования ретроэлементов LINE-1 и генов *SEPTIN9*, *IKZF1* изменяется в цирДНК плазмы крови больных колоректальным раком, по сравнению со здоровыми донорами.

Цель. Изучение изменения уровня метилирования генов *SEPTIN9*, *IKZF1* и ретротранспозонов LINE-1 в цирДНК крови у больных РПК на этапах комбинированного лечения и динамического наблюдения с оценкой их прогностической значимости.

Материалы и методы. Образцы венозной крови были получены от 24 больных РПК до лечения, после предоперационной химиотерапии, через 10–15 дней после операции и далее каждые 3 мес. в рамках динамического наблюдения. Уровень метилирования выбранных маркеров определяли методом метил-специфической ПЦР в реальном времени.

Результаты. Уровень метилирования гена *SEPTIN9* в скп-цирДНК после химиотерапии снижался в 1,7 раза, после резекции опухоли — в 2,3 раза, по сравнению с показателями до лечения. В свою очередь уровень метилирования гена *IKZF1* в скп-цирДНК после комбинированного лечения снижался в 2 раза. Выявлено значимое увеличение уровня метилирования LINE-1 в скп-цирДНК в 1,6 раза после химиотерапии и в 3 раза после резекции опухоли, относительно исходных данных. В процессе динамическо-

Introduction. When selecting tactics for rectal cancer (RC) treatment, healthcare professionals consider the prognosis and early recurrence diagnosis. It is recognised that malignant cell transformation is accompanied by a change in the DNA methylation profile of the genome. In malignant neoplasms, fragments of tumor-associated DNA accumulate in the content of circulating blood plasma DNA (cirDNA) and cirDNA associated with the surface of blood cells (csb-cirDNA), which are potential cancer markers. Previous research has demonstrated alterations in the methylation levels of specific genes, including LINE-1 retroelements and *SEPTIN9*, *IKZF1*, in plasma circulating DNA (cirDNA) from the blood of colorectal cancer patients when compared to healthy donors.

Aim. To study the changes in the methylation level changes of the *SEPTIN9*, *IKZF1* genes and LINE-1 retrotransposons in cirDNA from blood of RC patients at the stages of combined treatment and dynamic follow-up with an assessment of their prognostic significance.

Materials and Methods. Venous blood samples were obtained from 24 RC patients before treatment, after preoperative chemotherapy, 10-15 days after surgery and then every three months as part of the dynamic follow-up. The methylation levels of the selected markers were determined by real-time methyl-specific PCR.

Results. The methylation level of the *SEPTIN9* gene in csb-cirDNA decreased by 1.7-fold following chemotherapy and by 2.3-fold following tumor resection, in comparison to the levels observed prior to treatment. In turn, methylation level of the *IKZF1* gene in csb-cirDNA decreased by 2-folds after the combined treatment. The study revealed a notable increase in the methylation level of the LINE-1 elements in csb-cirDNA, with a 1.6-fold rise after chemotherapy and a 3-fold rise after tumor resection, in comparison to the initial data. During the

го наблюдения у больных без рецидива РПК отмечалась стабилизация уровня метилирования всех маркеров. У больных с признаками прогрессирования данные маркеры показали повторные изменения, по сравнению с уровнем на 10–15-й день после операции.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности определения исследованных aberrантно метилированных ДНК-маркеров для оценки эффективности терапии и раннего выявления рецидивов РПК.

Ключевые слова: aberrантное метилирование ДНК; маркеры крови; рак прямой кишки; диагностика рецидивов; мониторинг

Для цитирования: Пономарева А.А., Добродеев А.Ю., Тарасова А.С., Афанасьев С.Г., Костромицкий Д.Н., Паталяк С.В., Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В. Циркулирующие ДНК-маркеры у больных раком прямой кишки на этапах комбинированного лечения и динамического наблюдения. *Вопросы онкологии*. 2024; 70(5): 910-919.-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-5-910-919

✉ Контакты: Пономарева Анастасия Алексеевна, anastasia-ponomaryova@rambler.ru

Введение

На протяжении последних лет рак прямой кишки (РПК) в России и мире занимает лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости и смертности [1, 2].

Основным методом лечения местнораспространенного РПК является комбинированный, который включает предоперационную лучевую или химиолучевую терапию с последующим оперативным вмешательством, что обеспечивает низкий процент локорегионарных рецидивов и высокие показатели выживаемости больных [3, 4]. Однако, несмотря на улучшение онкологических результатов, использование подобной стратегии у больных с поражением верхнеампулярного отдела прямой кишки лимитировано из-за риска развития лучевых реакций и повреждений [5]. С указанных позиций в настоящее время при раке верхнеампулярного отдела прямой кишки применяется новая тактика лечения, основанная на проведении на предоперационном этапе только системной химиотерапии без облучения, которая демонстрирует обнадеживающие результаты [6, 7], либо используется подход, при котором на первом этапе выполняется хирургическое лечение (upfront surgery) [8].

Вместе с тем проблема прогрессирования РПК остается открытой и при выборе тактики лечения большое значение имеет оценка прогноза и ранняя диагностика рецидива заболевания. Интенсивное накопление фундаментальных знаний о патогенезе злокачественных опухолей позволяет использовать соответствующие молекулярные маркеры для оценки риска прогрессии. Показано, что в крови содержатся циркулирующие ДНК (цирДНК), отражающие молекулярные изменения, характерные для опухоли. На этом основании разработан новый

follow-up period, a stabilization of the methylation levels for all markers was observed in patients who did not experience a recurrence of RC. In patients with signs of progression, these markers showed repeated changes compared to the levels at 10–15 days after surgery.

Conclusion. The results demonstrate the potential for using the studied aberrantly methylated DNA markers to assess the efficacy of therapy and detect early signs of recurrence in RC cases.

Keywords: aberrant DNA methylation; blood markers; rectal cancer; relapse diagnosis; monitoring

For Citation: Anastasia A. Ponomaryova, Alexey Yu. Dobrodeev, Anna S. Tarasova, Sergey G. Afanasiev, Dmitriy N. Kostromitsky, Stanislav V. Patalyak, Elena Yu. Rykova, Nadezhda V. Cherdyntseva. Circulating DNA-markers in rectal cancer patients at the stages of combined treatment and dynamic follow-up. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2024; 70(5): 910-919. (In Rus).-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-5-910-919

малоинвазивный метод «жидкостной биопсии», который включает исследование образцов крови с целью выявления цирДНК, отражающих специфические молекулярные изменения, патогенетически значимые для опухоли. Значительный прогресс достигнут в разработке аналитических систем для выявления мутаций *EGFR* в цирДНК, с целью назначения таргетных препаратов [9].

Открытым остается вопрос об использовании цирДНК для диагностики и мониторинга эффективности терапии рака. Анализ aberrантно метилированных последовательностей в цирДНК крови представляется одним из наиболее перспективных подходов к созданию эффективной диагностической системы [10]. Aberrантно метилированные цирДНК, отражающие эпигенетические нарушения, характерны для всех типов и стадий развития опухоли, обнаруживаются в крови независимо от того, где локализована опухоль. Аналитические особенности их детекции позволяют выявлять эти ДНК при помощи ПЦР и технологий секвенирования в современных медицинских диагностических лабораториях [10]. Показано, что частота выявления эпигенетических aberrаций (метилирования) при онкологических заболеваниях выше, чем частота соматических мутаций [11, 12]. При колоректальном раке (КРР) в опухолевой ткани показано значимое изменение уровня метилирования ретротранспозонов (*LINE-1*) и однокопийных генов *BMP3*, *SEPTIN9*, *BCAT1*, *GRASP*, *IKZF1*, *IRF4*, *TMEFF2*, *ALX4* [13, 14].

В настоящее время доступны только 3 коммерческих набора для детекции метилированных последовательностей в составе цирДНК: EpiproColon (Epigenomics, Germany) (ген *SEPTIN9*) 75–81 %, ColoDefense test (VersaBio, Kunshan, China) (гены *SEPTIN9*, *SDC2*) и SpecColon stool test (China) (гены *SFRP2*, *SDC2*).

Основная область применения данных тестов — диагностика и скрининг КРР). Данные тесты характеризуются низкими показателями чувствительности для аденом толстой кишки (45–60 %), для КРР I–II стадий (75–81 %) [15, 16]. В связи с этим в настоящей работе планируется применение подхода, предполагающего использование комбинации метилированных маркеров: определение уровня метилирования ретроэлементов в сочетании с однокопийными генами, что позволяет повысить чувствительность анализа [17].

Большинство исследований эпигенетических нарушений при КРР направлено только на оценку диагностической значимости метилированных маркеров в плане постановки диагноза и выполнено на образцах опухолевых тканей. Это не позволяет широко использовать данный метод в клинической практике после проведения хирургического лечения. При этом нет сведений о характере изменений статуса метилирования в составе цирДНК крови в зависимости от прогноза заболевания и ответа на проводимую противоопухолевую терапию. Поэтому актуальным является использование метода «жидкостной биопсии», позволяющего выявлять на ранних стадиях молекулярно-генетические изменения, ассоциированные с развитием опухоли.

Анализ уровня метилирования последовательностей в цирДНК в последнее время интенсивно развивается и рассматривается как одно из перспективных направлений поиска клинически значимых онкомаркеров КРР. Представляется важным определить применимость циркулирующих маркеров, которые выявлены для КРР [13, 14] в качестве дополнительных критериев прогноза клинического течения и раннего выявления рецидивов при РПК. Следует отметить, что у онкологических больных накапливаются фрагменты опухоль-ассоциированных ДНК в составе внеклеточной, связанной с поверхностью клеток крови, ДНК (скп-цирДНК), которые являются потенциальными онкомаркерами [18]. Ранее показано, что фракция скп-цирДНК является более информативным источником материала для оценки статуса метилирования, по сравнению с цирДНК плазмы [19]. Поэтому объектом нашего исследования была скп-цирДНК крови и были выбраны маркеры, известные в качестве дополнительных критериев ранней диагностики для КРР (гены *SEPTIN9*, *SDC2*, *NDRG4*, *APC*, *IKZF1*, *BCA1*, *FOXA1*, *RASSF1A*, *VIM*, *BMP3*, *FIT*, *SNAP91*) [13]. Цель — изучение изменений уровня метилирования генов *SEPTIN9*, *IKZF1* и ретроэлемента LINE-1 в цирДНК крови у больных РПК на этапах комбинированного лечения и динамического наблюдения с оценкой их прогностической значимости.

Материалы и методы

Характеристика больных РПК

В пилотное проспективное исследование включено 24 больных РПК с поражением верхнеампулярного отдела. В период с 2019 по 2023 гг. на базе НИИ онкологии Томского НИМЦ все больные получили комбинированное лечение, которое включало предоперационную химиотерапию по схеме FOLFOX 6 и радикальную операцию (передняя резекция прямой кишки).

Средний возраст больных составил $60 \pm 5,6$ лет (36–75). Общее состояние больных по шкале ECOG — 0–1 балла. Распространенность опухолевого процесса соответствовала II В и III В клиническим стадиям — 2 (8,3 %) и 22 (91,7 %) больных соответственно (табл. 1). Гистологический тип опухоли — аденокарцинома, в большинстве случаев с низкой степенью злокачественности (Low grade) — 87,5 %. Вовлеченность циркулярной границы резекции (CRM+) и наличие экстрамуральной сосудистой инвазии (EMVI+), по данным МРТ, отмечено в 16,7 % и 25 % случаев соответственно.

Основным критерием эффективности предоперационной химиотерапии являлся клинический, патоморфологический ответ опухоли и выживаемость больных. Клинический эффект оценивался на основании данных МРТ с использованием шкалы RECIST 1.1. Патоморфологический ответ изучался при помощи системы, предложенной А.М. Mandard Оценка выживаемости больных произведена с учетом частоты и сроков развития местных рецидивов, отдаленных метастазов и летальных исходов.

Контрольные обследования больных после завершения комбинированного лечения проводились каждые 3 мес. и включали видеоколоноскопию, МРТ органов малого таза, СКТ органов грудной и брюшной полости.

Для прогноза и мониторинга течения заболевания проведен анализ уровня метилирования циркулирующих маркеров в крови больных РПК. Материалом для исследования послужила венозная кровь. Забор крови производился до начала лечения, после предоперационной химиотерапии, через 10–15 дней после операции и далее каждые 3 мес. в рамках динамического наблюдения.

Выделение цирДНК и бисульфитная конверсия

Кровь (8 мл) забирали в вакуумные пробирки для сбора венозной крови BD Vacutainer. Далее кровь разделяли на плазму, клетки крови и связанные с поверхностью клеток фракции ДНК. Фракции цирДНК, связанной с поверхностью клеток (скп-цирДНК), были получены, как описано ранее [19]. Клетки крови инкубировали с 9 мл PBS, содержащими 5 мМ ЭДТА (5 мин., при $t = 25$ °C). Клетки осаждали центрифугированием и

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика больных, абс.ч. (%)
Table 1. Clinical and morphological characteristics of patients, abs.h (%)

Критерий		Количество больных (n = 24)
Возраст		60 ± 5,6 лет (36–75)
Общее состояние больных по шкале ECOG, баллы	0	19 (79,2)
	1	5 (20,8)
Пол	мужчины	17 (70,8)
	женщины	7 (29,2)
Стадия, cTNM	II B (cT4aN0M0)	2 (8,3)
	III B (cT3–4aN0M0)	22 (91,7)
Глубина инвазии опухоли, cT	cT3	11 (45,8)
	cT4a	13 (54,2)
Состояние лимфоузлов, cN	cN0	2 (8,3)
	cN1	22 (91,7)
Аденокарцинома, степень злокачественности	Low grade	21 (87,5)
	High grade	3 (12,5)
Медиана дистального полюса опухоли, см		11 (8–14)
Циркулярная граница резекции (CRM) по МРТ	Положительная	4 (16,7)
	Отрицательная	20 (83,3)
Экстрамуральная сосудистая инвазия (EMVI) по МРТ	Да	6 (25)
	Нет	18 (75)

Таблица 2. Последовательности праймеров и зондов, применяемых в количественной метил-специфичной ПЦР
Table 2. Sequences of primers and probes used in the quantitative methyl-specific PCR

Ген	Последовательность 5'-3'
<i>SEPTIN9</i> -F	AAATAATCCCATCCAACTA
<i>SEPTIN9</i> -Rev	GATT-TEG-GTTGTTTATTAGTTATTATGT
<i>SEPTIN9</i> -Blocker	GTTATTATGTTGGATTTTGTGGTTAATGTGTAG-SpC3
<i>SEPTIN9</i> -Probe	FAM-TTAACCGCGAAATCCGAC-BHQ1
<i>IKZF1</i> -F	GACGACGTATTTTTTCGTGTTTC
<i>IKZF1</i> -Rev	GCGCACCTCTCTCGACCG
<i>IKZF1</i> -Probe	FAM-TTTGTATCGGAGTAGCGATTTCGGGAG-BHQ1
LINE-1-F	TTTTGGAATAGGTGTGGTGT
LINE-1-Rev	ACTTACACTCCCACACAATA
LINE-1-Probe	FAM-TTGAAAAGCGTAATATTCGGGTGGGAGTGATT-BHQ-1

инкубировали с равным объемом 0,25 % раствора трипсина. Затем проводили инактивацию фермента посредством добавления ингибитора трипсина (4 мин., при t — 25 °C). Плазму, PBS/ЭДТА и трипсиновые элюаты центрифугировали в течение 20 мин. при 800 × g и хранили замороженными при t –40 °C. Скуп-цирДНК выделяли из приготовленной смеси (3 мл PBS/ЭДТА и 1 мл трипсинового элюата) с использованием набора QIAmp DNA Micro kit (Qiagen, США) и модифицировали бисульфитом натрия с последующей очисткой с использованием набора «EZ DNA Methylation-Direct Kit» (Zymo Research, США).

Количественная метил-специфичная ПЦР

Концентрацию метилированных фрагментов генов *SEPTIN9* [20], *IKZF1* [21] определяли с помощью TaqMan ПЦР. Каждую реакцию про-

водили в конечном объеме 25 мкл, содержащем 2,5 мкл ДНК, 60 нМ специфического праймера для каждого гена, 30 нМ флуоресцентного зонда для каждого гена, 1 ед. ДНК-полимеразы, 10-кратный буфер для ПЦР и 25 нм dNTP, 50 нМ MgCl. Программа ПЦР включала следующие этапы: нагрев при t 95 °C — 10 мин., затем амплификацию в течение 40 циклов в следующем режиме: денатурация при t 95 °C — 10 сек., отжиг и детекция флуоресцентного сигнала при t 56 °C — 10 сек. для гена *SEPTIN9* и при t 60,4 °C — 10 сек. для гена *IKZF1*. Амплификация проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Концентрацию рассчитывали по калибровочной кривой, полученной путем последовательных разведений стандартной, полностью метилированной бисульфит-конвертированной ДНК человека с известной

концентрацией (Zymo Research, США) (100 % – 80 % – 25 % – 13 % – 6 % – 3 % – 1 %).

Концентрацию метилированных фрагментов LINE-1 (LINE-1-met, последовательность 251–331, GenBank X52235, ORFI регион) определяли с помощью TaqMan ПЦР. Кроме того, определяли концентрацию фрагментов LINE-1, не содержащих CpG-сайты (LINE-1-Ind, последовательность 162925–163131, GenBank AL162574.14) методом ПЦР с использованием флуоресцентного красителя EvaGreen (Biotium, USA). Амплификация проводилась на приборе

CFX96 (Bio-Rad, США). Протокол и условия реакций были описаны ранее [19]. Уровень метилирования LINE-1 вычисляли по следующей формуле: LINE-met/(LINE-1 met + LINE-1 Ind). Последовательности праймеров и зондов, использованных в ПЦР, представлены в табл. 2.

Статистический анализ данных проводили с использованием программ Statistica 8.0 (Манна – Уитни тест, метод Каплана – Майера для оценки выживаемости) и MedCalc software (Ostend, Belgium) (однофакторный дисперсионный анализ — One-way ANOVA).

Таблица 3. Результаты комбинированного лечения, абс.ч. (%)
Table 3. Results of combined treatment, abs.h (%)

Критерий		Количество больных (n = 24)
Количество курсов предоперационной химиотерапии, медиана		4 (3–6)
Клинический ответ опухоли	Полный регресс	---
	Частичный регресс	21 (87,5)
	Стабилизация	3 (12,5)
	Прогрессирование	---
Хирургический доступ	Лапароскопический	17 (70,8)
	Открытый	7 (29,2)
Вид операции	Передняя резекция прямой кишки	24 (100)
	Операция Гартмана	---
	БПЭ	---
Характер операции	R0	24 (100)
	R1	---
Глубина инвазии опухоли, урТ	урТ0	2 (8,3)
	урТ1	1 (4,2)
	урТ2	8 (33,3)
	урТ3	5 (20,8)
	урТ4а	8 (33,3)
Состояние лимфоузлов, урN	урN0	17 (70,8)
	урN1	4 (16,7)
	урN2	3 (12,5)
Патоморфологический ответ опухоли	TRG 1	2 (8,3)
	TRG 2	3 (12,5)
	TRG 3	5 (20,8)
	TRG 4	14 (58,3)
	TRG 5	---
Адьювантная химиотерапия	Да	10 (41,7)
	Нет	14 (58,3)

Таблица 4. Уровень метилирования LINE-1 элементов и генов SEPTIN9, IKZF1 в скп-цирДНК крови больных РПК

Table 4. Methylation level of LINE-1 elements and SEPTIN9, IKZF1 genes in csb-cirDNA from the blood of RC patients

Точки наблюдения	Уровень метилирования LINE-1*		Уровень метилирования SEPTIN9*		Уровень метилирования IKZF1*	
	До лечения / после химиотерапии	p = 0,05	До лечения / после операции	p = 0,04	До лечения / после операции	p = 0,06
До лечения / после химиотерапии	27 ± 7 %	p = 0,05	57 ± 10 %	p = 0,04	38 ± 8 %	p = 0,06
	42 ± 10 %		34 ± 7 %		27 ± 7 %	
До лечения / после операции	27 ± 7 %	p = 0,03	57 ± 10 %	p = 0,03	38 ± 8 %	p = 0,04
	81 ± 17 %		25 ± 7 %		19 ± 5 %	

* Mean ± SD.

Результаты

Непосредственные результаты комбинированного лечения больных РПК представлены в табл. 3. Всем больным была проведена предоперационная химиотерапия в количестве 3–6 курсов (медиана — 4). При оценке эффекта химиотерапии клинико-рентгенологический ответ опухоли был представлен следующим образом: частичный регресс — 21 (87,5 %) и стабилизация — 3 (12,5 %). Радикальные операции (R0) в объеме передней резекции прямой кишки были выполнены у всех больных (100 %). Послеоперационной летальности не было. Полный патоморфологический ответ опухоли зафиксирован у 2 (8,3 %) больных. Адъювантная химиотерапия (при урТ4 и/или урN+) проведена 10 (41,7 %) больным — общая продолжительность лечения до 6 мес., включая время предоперационной химиотерапии. Медиана наблюдения за больными составила 27 (8–48) мес. Несмотря на проводимую адъювантную химиотерапию у 4 (16,7 %) больных было выявлено прогрессирование РПК: в 2 (8,3 %) случаях — при урТ4aN+, EMVI+, TRG4 зафиксированы отдаленные метастазы в печень и легкие и в 2 (8,3 %) случаях — при урТ4aN+, CRM+, TRG4 развились местные рецидивы. В связи с этим у 1 (4,2 %) больного была выполнена брюшно-промежностная экстирпация прямой кишки, у 3 (12,5 %) больных проводилась паллиативная химиотерапия, из них 1 (4,2 %) больной умер от прогрессирования.

Уровень метилирования циркулирующих маркеров в крови до и после комбинированного лечения

При анализе уровня метилирования циркулирующих маркеров в крови у больных РПК (в 92 % случаев — 22/24) (табл. 4) выявлено статистически значимое увеличение уровня метилирования LINE-1 в скп-цирДНК в 1,6 раза после предоперационной химиотерапии и в 3 раза после резекции опухоли относительно значений до начала лечения ($p \leq 0,05$).

После проведения предоперационной химиотерапии уровень метилирования гена *SEPTIN9* в скп-цирДНК у больных РПК (в 71 % случаев — 17/24) статистически значимо снижается в 1,7 раза, а после резекции опухоли — в 2,3 раза, по сравнению с показателями до лечения ($p \leq 0,05$).

В свою очередь после проведенного комбинированного лечения, включающего предоперационную химиотерапию и радикальную операцию, уровень метилирования гена *IKZF1* в скп-цирДНК у больных РПК (в 58 % случаев — 14/24) снижается в 2 раза, относительно данных до начала лечения ($p \leq 0,05$).

Показано, что в 83,3 % случаев (20/24) снижение уровня метилирования генов *IKZF1* (уровень менее 38 %), *SEPTIN9* (уровень менее 57 %) и повышение уровня метилирования LINE-1 (уровень более 57 %) было ассоциировано с безрецидивной выживаемостью (рис. 1). В качестве порогового значения уровня метилирования было выбрано среднее значение уровня метилирования для генов *IKZF1*, *SEPTIN9* и последовательностей LINE-1 в скп-цирДНК крови у больных РПК.

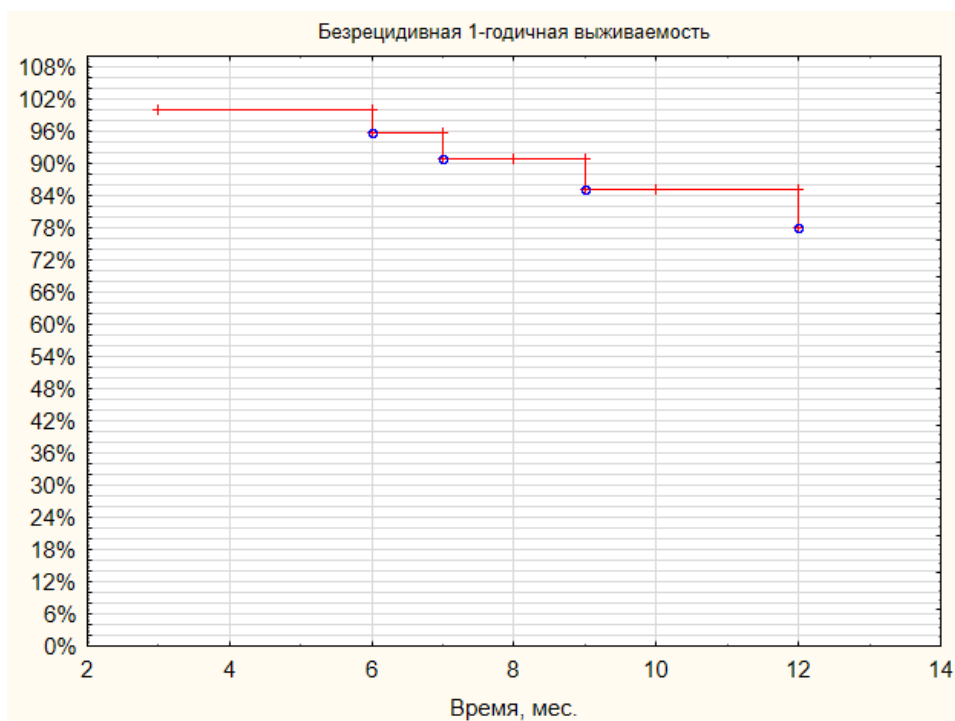


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных РПК
Fig. 1. Relapse-free survival of RC patients

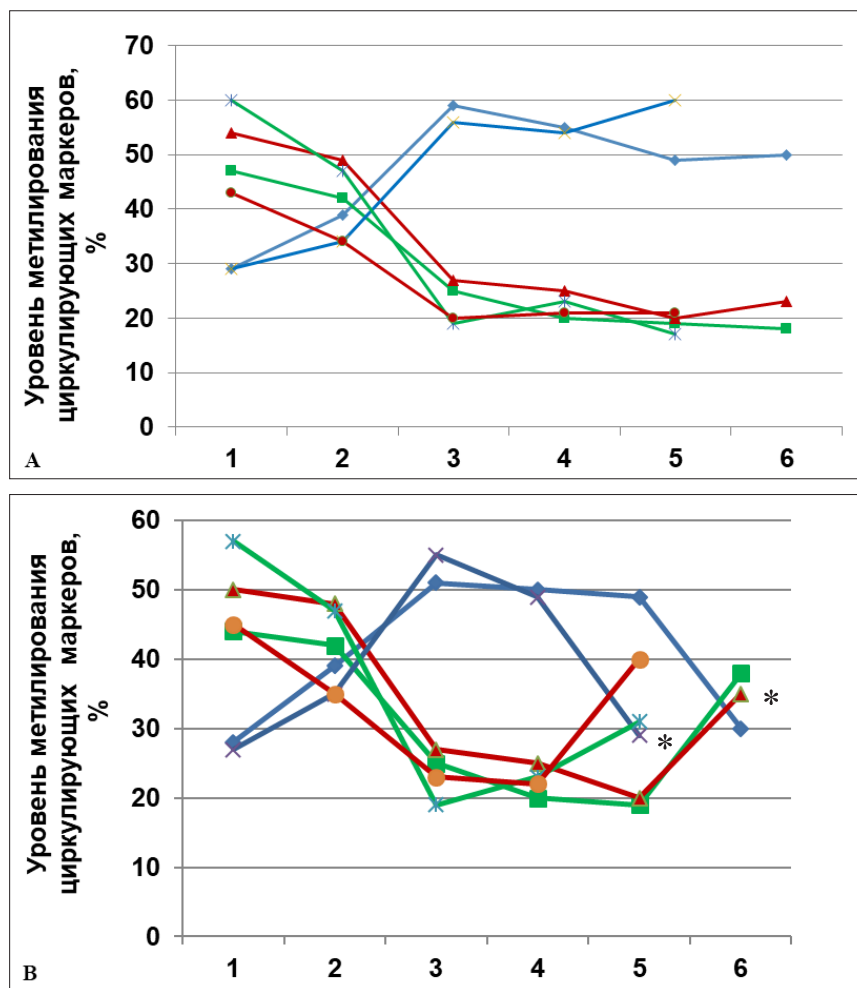


Рис. 2. Уровень метилирования для LINE-1 элементов, генов *SEPTIN9*, *IKZF1* в скп-цирДНК у больных РПК на этапах динамического наблюдения. А — без прогрессирования заболевания, В — при прогрессировании (синий — LINE-1 элементы, зеленый — ген *SEPTIN9*, коричневый — ген *IKZF1*); 1 — до лечения, 2 — после химиотерапии, 3 — на 10–15 сут. после операции, 4 — через 6 мес. после операции, 5 — через 9 мес., 6 — через 1 год. *время подтверждения клинического рецидива (по данным инструментальных методов обследования)

Fig. 2. Methylation level for LINE-1 elements, *SEPTIN9*, *IKZF1* genes in csb-cirDNA from the blood of RC patients at the stages of dynamic observation. A — without disease progression, B — with progression (blue — LINE-1 elements, green — *SEPTIN9* gene, brown — *IKZF1* gene); 1 — before treatment, 2 — after chemotherapy, 3 — on 10–15 days after surgery, 4 — 6 month after surgery, 5 — after 9 months, 6 — after 1 year. *time of confirmation of clinical recurrence (in accordance with instrumental survey methods)

Характер изменения уровня метилирования циркулирующих маркеров в крови на этапах динамического наблюдения

После завершения комбинированного лечения у 24 больных был продолжен анализ данных маркеров на этапах динамического наблюдения.

Было показано, что у 20 (83,3 %) больных без признаков прогрессирования заболевания уровень метилирования для генов *SEPTIN9*, *IKZF1* и LINE-1 элементов в скп-цирДНК не отличался от значений на 10–15 сут. после операции.

У 4 (16,7 %) больных через 6, 7, 9 и 12 мес. после завершения лечения во время контрольных обследований было установлено увеличение уровня метилирования генов *SEPTIN9*, *IKZF1* и снижение уровня метилирования LINE-1 элементов в скп-цирДНК по сравнению с уровнем на 10–15 сут. после резекции опухоли. При этом по результатам инструментальных методов об-

следования, признаков прогрессирования заболевания на данный момент выявлено не было. В связи с обнаруженными изменениями уровня метилирования циркулирующих маркеров в крови у этих больных через 1–2 мес. (медиана — 1,5) были проведены дополнительные контрольные обследования с использованием инструментальных методов, которые позволили клинически подтвердить прогрессирование РПК. На рис. 2 представлены в качестве примера случаи 2-х больных с признаками прогрессирования заболевания и 2-х больных без прогрессирования РПК.

При этом до начала комбинированного лечения различий по уровню метилирования для 3-х исследуемых метилированных маркеров в группе больных с рецидивом РПК (4/24) и в группе больных без признаков прогрессирования РПК (20/24) выявлено не было ($p \geq 0,05$).

Обсуждение

В исследовании К.А. Szigeti и соавт. выявлено снижение уровня метилирования LINE-1 в цирДНК больных КРР, по сравнению со здоровыми лицами. Было показано, что анализ уровня метилирования LINE-1 в цирДНК позволяет дифференцировать больных КРР от здоровых лиц с чувствительностью 67 % и специфичностью 90 % [22]. У больных раком легкого также установлено значительное снижение уровня метилирования LINE-1 в образцах скп-цир ДНК, по сравнению со здоровыми донорами [19]. Однако в литературе отсутствуют данные относительно изменений уровня метилирования LINE-1 в цирДНК крови в ответ на противоопухолевую терапию.

В настоящем исследовании было выявлено значительное повышение уровня метилирования LINE-1 у больных РПК после комбинированного лечения, по сравнению с уровнем до начала лечения ($p \leq 0,05$). Важно, что при прогрессировании РПК, установленном нами на этапах динамического наблюдения при помощи клинико-инструментальных методов обследования, отмечалось снижение уровня метилирования LINE-1. Вероятно, что низкий уровень метилирования LINE-1 ассоциирован с наличием опухоли, о чем также свидетельствует его увеличение после проведения комбинированного лечения. По нашим данным, изменения уровня метилирования LINE-1 в цирДНК крови могут служить информативным маркером рецидива при РПК. Поскольку ранее показано, что комбинированное определение уровня метилирования ретроэлементов в сочетании с однокопийными генами повышает чувствительность анализа при раке легкого [17], в настоящей работе у больных РПК был проанализирован уровень метилирования двух известных маркеров КРР – генов *SEPTIN9* и *IKZF1*.

Метилированный ген *SEPTIN9* (*mSEPTIN9*) показал высокий потенциал в качестве маркера мониторинга КРР в сочетании с компьютерной томографией [23]. Метилирование гена *mSEPTIN9* в периферической крови было связано с клинико-морфологическими и молекулярными характеристиками больных КРР (глубина инвазии, стадия TNM, статус *TP53*, статус MMR, статус *BRAF*, статус *PIK3CA*) [24]. Ранее установлено, что уровень *mSEPTIN9* снижается после радикальной резекции опухоли у больных КРР [25]. В связи с этим метилированный *SEPTIN9* является потенциальным маркером прогноза течения заболевания и раннего выявления рецидивов КРР [26–28].

Мы показали снижение уровня метилирования гена *SEPTIN9* в скп-цирДНК крови больных РПК после проведения предоперационной хими-

отерапии и радикальной операции относительно уровня до лечения ($p \leq 0,05$). В процессе мониторинга послеоперационный уровень метилирования гена *SEPTIN9* не изменялся в случае ремиссии заболевания, но существенно повышался у больных с прогрессированием РПК. Полученные данные подтверждают потенциальную прогностическую значимость этого маркера, как для эффективности противоопухолевого лечения, так и для прогноза клинического течения РПК.

Диагностическая значимость определения метилированного *IKZF1* при КРР была показана ранее [29, 30]. Наличие метилированного *IKZF1* в цирДНК плазмы крови у больных КРР в послеоперационном периоде связано с высоким риском развития рецидивов и низкими показателями выживаемости больных [13, 29, 30]. На сегодняшний день тест, включающий анализ метилированного гена *IKZF1* в комбинации с геном *BCAT1* (COLVERA™), доступен в США в виде лабораторного теста (LDT), разработанного для выявления резидуальной опухоли и мониторинга рецидивирующего КРР [31].

Полученные в настоящей работе результаты подтверждают значимость определения метилирования гена *IKZF1* как прогностического маркера при РПК. Мы показали, что уровень метилирования *IKZF1* в скп-цирДНК крови у больных РПК был снижен после проведенной противоопухолевой терапии, по сравнению с уровнем до лечения ($p \leq 0,05$). Кроме того, при мониторинге в случае отсутствия признаков прогрессирования заболевания сохранялся низкий уровень метилирования *IKZF1*, а при рецидиве РПК регистрировалось его увеличение.

Заключение

Получены новые данные о связи молекулярно-генетических маркеров, сопряженных с наличием опухоли, на основе циркулирующих эпигенетических ДНК-маркеров крови, с прогрессированием заболевания, что свидетельствует об их перспективности в качестве прогностических маркеров для больных РПК.

Ранее была показана значимость этих маркеров для диагностики КРР. По нашим данным, неблагоприятный исход заболевания у больных РПК характеризуется увеличением уровня метилирования генов *SEPTIN9*, *IKZF1* и снижением уровня метилирования LINE-1 элементов, по сравнению с уровнем, который отмечался на 10–15 сут. после операции. В связи с этим для трансляции в клиническую практику, необходимы дальнейшие исследования на независимой выборке с целью подтверждения значимости анализа уровня метилирования двух маркеров *SEPTIN9* и LINE-1 для оценки эффективности

предоперационной химиотерапии при проведении комбинированного лечения РПК и мониторинга течения заболевания.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом по биомедицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ. Протокол № 9 от 21.10.2019. Все процедуры с вовлечением больных были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией по правам человека в редакции 2013 г. Все больные подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the Cancer Research Institute, Tomsk NRMС. Protocol № 9 dated 21 October 2019 (No. 9). All procedures performed in studies involving human participants were conducted in accordance with the ethical standards set out in the Declaration of Helsinki Protocol (2013). All patients provided written informed consent to participate in the study.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке федерального бюджетного проекта FWNR-2022-0016. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ (№ 22-15-00212 от 13.05.2022 «Транскриптомные и протеомные маркеры для прогноза и эффективности терапии метастатического рака толстой кишки») (<https://rscf.ru/en/project/22-15-00212/>).

Financing

The work was funded by the Federal Budget Project FWNR2022-0016. The study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00212 of 13 May 2022 «Transcriptomic and proteomic markers for the prognosis and effectiveness of therapy for metastatic colon cancer») (<https://rscf.ru/en/project/22-15-00212/>).

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Пономарева А.А., Рыкова Е.Ю. — проведение молекулярно-генетических исследований, анализ данных, написание статьи;

Добродеев А.Ю. — анализ данных, написание статьи; Тарасова А.С., Костромицкий Д.Н., Паталяк С.В. — клиническое обследование больных, сбор анамнеза и забор биологического материала;

Афанасьев С.Г. — редактирование статьи;

Чердынцева Н.В. — анализ данных, редактирование статьи. Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразил(и) согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

Authors' contributions

All the authors made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version prior to publication.

Ponomaryova A.A., Rykova E.Yu. — conducted molecular-genetic research, analyzed data and contributed to drafting of the article;

Dobrodeev A.Yu. — analyzed the data and contributed to the drafting of the article;

Tarasova A.S., Kostromitsky D.N., Patalyak S.V. — conducted clinical examinations of patients, collected anamnesis and biological material;

Afanasiev S.G. — was responsible for editing the article;

Cherdyntseva N.V. — conducted an analysis of the data and edited the article.

All authors have approved the final version of the article prior to publication, agreed to assume responsibility for all aspects of the work, implying proper review and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М. 2022; 252.-DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-5-5-13. [Malignant tumors in Russia in 2021 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova. Moscow. 2022; 252.-DOI: <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2023-22-5-5-13>. (In Rus)].
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3): 209-249.-DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
3. Oronsky B., Reid T., Larson C., et al. Locally advanced rectal cancer: The past, present, and future. *Semin Oncol.* 2020; 47(1): 85-92.-DOI: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2020.02.001>.
4. Bahadoer R., Dijkstra A., Ettent B., et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase3 trial. *Lancet Oncol.* 2021; 22: 29-42.-DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30555-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30555-6).
5. Deng Y., Chi P., Lan P., et al. Neoadjuvant modified FOLFOX6 with or without radiation versus fluorouracil plus radiation for locally advanced rectal cancer: final results of the Chinese FOWARC trial. *J Clin Oncol.* 2019; 37(34): 3223-3233.-DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.18.0230937:3223-3233>.
6. Невольских А.А., Авдеенко В.А., Белохвостова А.С., et al. Неoadъювантная химиотерапия как альтернатива лучевой терапии в лечении больных прогностически неблагоприятным раком прямой кишки. *Колопроктология.* 2022; 21(2): 91-104.-DOI: <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2022-21-2-91-104>. [Nevolskikh A.A., Avdeenko V.A., Belohvostova A.S., et al. Neoadjuvant chemotherapy without radiation therapy for rectal cancer with negative prognosis. *Koloproktologia.* 2022; 21(2): 91-104.-DOI: <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2022-21-2-91-104>. (In Rus)].
7. Добродеев А.Ю., Тарасова А.С., Афанасьев С.Г., et al. Результаты комбинированного лечения с предоперационной химиотерапией больных раком верхнеампулярного отдела прямой кишки. *Колопроктология.* 2023; 22(4): 45-52.-DOI: <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2023-22-4-45-52>. [Dobrodeev A.Yu., Tarasova A.S., Afanasiev S.G., et al. Outcomes of multimodal treatment including preoperative chemotherapy for upper rectal cancer. *Koloproktologia.* 2023; 22(4): 45-52.-DOI: <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2023-22-4-45-52>. (In Rus)].
8. Wang Y., Wang X., Chen J., et al. Comparative analysis of preoperative chemoradiotherapy and upfront surgery in the treatment of upper-half rectal cancer: oncological benefits, surgical outcomes, and cost implications. *Updates Surg.* 2024; 76(3): 949-62.-DOI: <https://doi.org/10.1007/s13304-023-01744-9>.

9. Knebel F.H., Bettoni F., da Fonseca L.G., et al. Circulating tumor DNA detection in the management of anti-EGFR therapy for advanced colorectal cancer. *Front Oncol.* 2019; 22(9): 170.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00170>.
10. Dai X., Ren T., Zhang Y., Nan N. Methylation multiplicity and its clinical values in cancer. *ERMM.* 2021; 23(e2): 1-10.-DOI: <https://doi.org/10.1017/erm.2021.4>.
11. Guo M., Peng Y., Gao A., et al. Epigenetic heterogeneity in cancer. *Biomark Res.* 2019; 7: 23.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s40364-019-0174-y>.
12. Tulsyan S., Aftab M., Sisodiya S., et al. Molecular basis of epigenetic regulation in cancer diagnosis and treatment. *Front Genet.* 2022; 13: 885635.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.885635>.
13. Kong C., Fu T. Value of methylation markers in colorectal cancer (Review). *Oncol Rep.* 2021; 46(2): 177.-DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2021.8128>.
14. Sun X., Guo Y., Zhang Y., et al. Colon cancer-related genes identification and function study based on single-cell multi-omics integration. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 789587.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.789587>.
15. Lamb Y.N., Dhillon S. Epi proColon 2.0 CE: a blood-based screening test for colorectal cancer. *Mol Diagn Ther.* 2017; 21(2): 225-232.-DOI: <https://doi.org/10.1007/s40291-017-0259-y>.
16. Zhao G., Liu, X., Liu Y., et al. Methylated SFRP2 and SDC2 in stool specimens for colorectal cancer early detection: a cost-effective strategy for Chinese population. *J Cancer.* 2021; 12: 2665-2672.-DOI: <https://doi.org/10.7150/jca.52478>.
17. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Gervas P.A., et al. Aberrant methylation of LINE-1 transposable elements: a search for cancer biomarkers. *Cells.* 2020; 9(9): 2017.-DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9092017>.
18. Rykova E.Y., Ponomaryova A.A., Zaporozhchenko I.A., et al. Circulating DNA-based lung cancer diagnostics and follow-up: looking for epigenetic markers. *Transl Cancer Res.* 2018; 7(S2): S153-S170.-DOI: <https://doi.org/10.21037/tcr.2018.02.08>.
19. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Azhikina T.L., et al. Long interspersed nuclear element-1 methylation status in the circulating DNA from blood of patients with malignant and chronic inflammatory lung diseases. *Eur J Cancer Prev.* 2021; 30(2): 127-131.-DOI: <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000601>.
20. Warren J.D., Xiong W., Bunker A.M., et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med.* 2011; 9: 133.-DOI: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-133>.
21. Pedersen S.K., Symonds E.L., Baker R.T., et al. Evaluation of an assay for methylated BCAT1 and IKZF1 in plasma for detection of colorectal neoplasia. *BMC Cancer.* 2015; 15: 654.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1674-2>.
22. Szigeti K.A., Kalmár A., Galamb O., et al. Global DNA hypomethylation of colorectal tumours detected in tissue and liquid biopsies may be related to decreased methyl-donor content. *BMC Cancer.* 2022; 22(1): 605.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09659-1>.
23. Sun J., Fei F., Zhang M., et al. The role of mSEPT9 in screening, diagnosis, and recurrence monitoring of colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2019; 19(1): 450.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5663-8>.
24. Sun J., Xu J., Sun C., et al. Screening and prognostic value of methylated septin9 and its association with clinicopathological and molecular characteristics in colorectal cancer. *Front Mol Biosci.* 2021; 8: 568818.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.568818>.
25. Jin S., Zhu D., Shao F., et al. Efficient detection and post-surgical monitoring of colon cancer with a multi-marker DNA methylation liquid biopsy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021; 118(5): e2017421118.-DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2017421118>.
26. Huang M., He J., Lai W., et al. Methylated septin 9 gene is an important prognostic marker in stage II and stage III colorectal cancer for evaluating local recurrence or distant metastasis after surgery. *BMC Gastroenterol.* 2022; 22(1): 87.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s12876-022-02172-6>.
27. Lu P., Zhu X., Song Y., et al. Methylated septin 9 as a promising biomarker in the diagnosis and recurrence monitoring of colorectal cancer. *Dis Markers.* 2022; 2022: 7087885.-DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/7087885>.
28. Yuan Z., Wang S., Ni K., et al. Circulating methylated SEPT9 DNA analyses to predict recurrence risk and adjuvant chemotherapy benefit in stage II to III colorectal cancer. *Med Sci Monit.* 2022; 28: e937757.-DOI: <https://doi.org/10.12659/MSM.937757>.
29. Nassar F.J., Msheik Z.S., Nasr R.R., Temraz S.N. Methylated circulating tumor DNA as a biomarker for colorectal cancer diagnosis, prognosis, and prediction. *Clin Epigenetics.* 2021; 13(1): 111.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01095-5>.
30. Pedersen S.K., Symonds E.L., Roy A.C., et al. Detection of methylated BCAT1 and IKZF1 after curative-intent treatment as a prognostic indicator for colorectal cancer recurrence. *Cancer Med.* 2023; 12(2): 1319-1329.-DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.5008>.
31. Murray D.H., Symonds E.L., Young G.P., et al. Relationship between post-surgery detection of methylated circulating tumor DNA with risk of residual disease and recurrence-free survival. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018; 144(9): 1741-1750.-DOI: <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2701-x>.

Поступила в редакцию / Received / 01.04.2024

Прошла рецензирование / Reviewed / 08.04.2024

Принята к печати / Accepted for publication / 11.04.2024

Сведения об авторах / Author's information / ORCID

Анастасия Алексеевна Пономарева / Anastasia A. Ponomaryova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2060-4840>.
 Алексей Юрьевич Добродеев / Alexey Yu. Dobrodeev / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2748-0644>.
 Анна Сергеевна Тарасова / Anna S. Tarasova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6247-3434>.
 Сергей Геннадьевич Афанасьев / Sergey G. Afanasiev / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4701-0375>.
 Дмитрий Николаевич Костромицкий / Dmitriy N. Kostromitsky / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5691-2349>.
 Станислав Викторович Паталяк / Stanislav V. Patalyak / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9468-1980>.
 Елена Юрьевна Рыкова / Elena Yu. Rykova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7394-0181>.
 Надежда Викторовна Чердынцева / Nadezhda V. Cherdyntseva / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1526-9013>.

