

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-116-129>

Модуляция активности генов гомологичной рекомбинации в опухолевых клетках молочной железы в модели *in vitro*

М.М. Цыганов^{1,2}, А.А. Фролова¹, Е.А. Кравцова¹, И.А. Цыденнова¹, М.К. Ибрагимова^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный 5;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2

Контакты: Матвей Михайлович Цыганов TsyganovMM@yandex.ru

Введение. Установлено, что наличие дефицита гомологичной рекомбинации в опухоли молочной железы связано с эффективностью лечения. При этом, несмотря на высокую химиочувствительность опухоли к ДНК-повреждающим агентам, полные патологические ответы на лечение очень редки. В основе этого процесса может лежать изменение соматического статуса *BRCA1*, т. е. происходят реверсия и возвращение аллеля дикого типа и восстановление функции репарации ДНК.

Цель исследования – оценить изменения хромосомных aberrаций и экспрессионного профиля основных генов гомологичной рекомбинации в клеточных моделях рака молочной железы под действием цисплатина и доцетаксела.

Материалы и методы. Исследование проведено на культурах опухолевых клеток рака молочной железы MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468. Модель лекарственной устойчивости на клетках была получена для двух препаратов – цисплатина и доцетаксела. Из клеточной суспензии РНК и ДНК выделяли с помощью наборов RNeasy Plus Mini Kit и QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) соответственно. Уровень экспрессии генов гомологичной рекомбинации оценивали с использованием обратнo-транскриптазной количественной полимеразной цепной реакции. Для определения наличия хромосомных aberrаций проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах.

Результаты. Показано восстановление нормальной копийности генов *BRCA1*, *CDK12*, *CHEK1* и *RAD51D* в MCF-7 под действием цисплатина. Для *BRCA2* и *PALB2* обнаружено появление амплификаций. Также продемонстрировано статистически значимое увеличение экспрессии генов *BRCA1* ($p = 0,04$), *BRCA2* ($p = 0,02$), *PALB2* ($p = 0,01$) и *RAD51D* ($p = 0,05$). В MDA-MB-231 показано, что все выявленные локусы с делециями, где локализованы гены *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* и *RAD54L*, под действием цисплатина восстанавливаются до нормальной копийности. Появление амплификаций зарегистрировано для генов *BRCA1*, *BRIP1*, *FANCL*, *RAD51B* и *PARP1*. Аналогичный результат показан для доцетаксела. Увеличение уровня экспрессии характерно для генов *BRCA1* ($p = 0,02$), *BRCA2* ($p = 0,02$), *CHEK2* ($p = 0,05$), *FANCL* ($p = 0,04$), *PALB2* ($p = 0,05$), *RAD51C* ($p = 0,02$) и *PARP1* ($p = 0,02$), что соответствует появлению амплификаций. В клеточной культуре MDA-MB-468 наблюдалось увеличение копийности только гена *BRCA1*. Действие доцетаксела полностью не оказывало влияния на данную клеточную культуру. Уровень экспрессии гена *BRCA1* повышался прямо пропорционально длительности действия препарата.

Заключение. Таким образом, проведенное исследование показало, что под действием цисплатина может происходить реверсия не только мутаций генов гомологичной рекомбинации, но и других нарушений.

Ключевые слова: рак молочной железы, клеточные культуры, BRCAness, дефицит гомологичной рекомбинации, экспрессия, делеция, амплификация, реверсия

Для цитирования: Цыганов М.М., Фролова А.А., Кравцова Е.А. и др. Модуляция активности генов гомологичной рекомбинации в опухолевых клетках молочной железы в модели *in vitro*. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):116–29.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-116-129>

Modulation of homologous recombination gene activity in breast tumor cells in an *in vitro* model

M.M. Tsyganov^{1,2}, A.A. Frolova¹, E.A. Kravtsova¹, I.A. Tsydenova¹, M.K. Ibragimova^{1,2}

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Kooperativny Line, Tomsk 634009, Russia;

²Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moscow Trakt, Tomsk 634050, Russia

Contacts: Matvey Mikhailovich Tsyganov TsyganovMM@yandex.ru

Introduction. It has been established that the presence of homologous recombination deficiency in a breast tumor is associated with the effectiveness of treatment. But despite the high chemosensitivity of the tumor to DNA-damaging agents, complete pathological responses to treatment are very rare. And this process may be based on a change in the somatic status of *BRCA1*, that is, a reversion and return of the wild-type allele occurs and the DNA repair function is restored.

Aim. To evaluate changes in the presence of chromosomal aberrations and the expression profile of the main genes of homologous recombination in cell models of breast cancer under the influence of cisplatin and docetaxel.

Materials and methods. The study was conducted on breast cancer tumor cell cultures: MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468. A cell model of drug resistance was obtained for two drugs: cisplatin and docetaxel. RNA and DNA were isolated from cell suspension using the RNeasy Plus Mini Kit and QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany), respectively. The expression level of homologous recombination genes was assessed using reverse transcription polymerase chain reaction. To assess the presence of chromosomal aberrations, microarray analysis was performed on DNA chips.

Results. Restoration of normal copy number for the *BRCA1*, *CDK12*, *CHEK1* and *RAD51D* genes in MCF-7 under the influence of cisplatin was shown. For *BRCA2* and *PALB2*, amplifications were detected. A statistically significant increase in the expression of the *BRCA1* ($p = 0.04$), *BRCA2* ($p = 0.02$), *PALB2* ($p = 0.01$) and *RAD51D* ($p = 0.05$) genes was also shown. MDA-MB-231 shows that all identified loci with deletions, where the *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* and *RAD54L* genes are localized, are restored to normal copy number by cisplatin. The appearance of amplifications was registered for *BRCA1*, *BRIP1*, *FANCL*, *RAD51B*, *PARP1*. A similar result was shown for docetaxel. An increase in the expression level is typical for the genes *BRCA1* ($p = 0.02$), *BRCA2* ($p = 0.02$), *CHEK2* ($p = 0.05$), *FANCL* ($p = 0.04$), *PALB2* ($p = 0.05$), *RAD51C* ($p = 0.02$), *PARP1* ($p = 0.02$), which corresponds to the appearance of amplifications. In the MDA-MB-468 cell culture, an increase in the copy number of only the *BRCA1* gene is observed. The effect of docetaxel has no effect on this cell culture. The level of *BRCA1* expression increases in direct proportion to the duration of drug action.

Conclusion. Thus, the study showed that under the influence of cisplatin, reversion of not only homologous recombination gene mutations, but also other disorders can occur.

Keywords: breast cancer, cell cultures, BRCAness, homologous recombination deficiency, expression, deletion, amplification, reversion

For citation: Tsyganov M.M., Frolova A.A., Kravtsova E.A. et al. Modulation of homologous recombination gene activity in breast tumor cells in an *in vitro* model. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):116–29. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-116-129>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время диагностика, лечение и профилактика рака молочной железы (PMЖ) у носителей мутаций генов *BRCA1* или *BRCA2* имеют ряд особенностей по сравнению с пациентами со спорадическим PMЖ. Рак данной локализации, фенотипически и генетически схожий с наследственной формой (*BRCA1*-ассоциированным PMЖ), обозначается как BRCAness (BRCA-подобные опухоли) [1]. При этом тактика лечения семейной формы PMЖ на сегодняшний день определена. Пациенты, имеющие герминальные мутации, обладают высокой чувствительностью к препаратам платины. Так, результаты последних метаанализов показали, что у больных с мутацией в гене *BRCA1/2*, которым проведена платиносодержащая неоадъювантная химиотерапия (ХТ), частота объективных ответов была значительно выше (отношение рисков (ОР) 1,91; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,48–2,47; $p < 0,00001$; $I^2 = 32$ %), как и показатели выживаемости без прогрессирования (ОР 1,13; 95 % ДИ 0,81–1,57; $p = 0,47$; $I^2 = 0$ %) и общей выживаемости (ОР 1,89; 95 % ДИ 1,22–2,92; $p = 0,004$; $I^2 = 0$ %) [2].

Как правило, для лечения пациентов без герминальных мутаций используется стандартная тактика лечения, которая не всегда может быть эффективной. Тем не менее установлено, что в предполагаемых подгруппах BRCAness, т. е. у больных с дефицитом гомологичной рекомбинации (ГР), может наблюдаться чувствительность к платине и/или другим ДНК-повреждающим агентам. При этом предполагается, что расширение механизмов формирования BRCA-подобных опухолей в процессе канцерогенеза и прогрессии делает опухоли чувствительными к ДНК-повреждающим агентам; это перестает быть «выгодным» опухоли при воздействии химиопрепаратов. Иначе говоря, под действием терапии механизмы BRCAness должны нарушаться, а резистентные клоны, лишенные дефицита *BRCA*, наоборот, формироваться. В исследовании А.Р. Sokolenko и соавт. [3] установлено, что, несмотря на высокую химиочувствительность и быстрое уменьшение опухоли яичника с герминальной мутацией *BRCA* после неоадъювантной ХТ, полные патологические ответы на лечение очень редки. Авторы показали, что в основе этого процесса может лежать изменение соматического статуса *BRCA1* [4].

При проведении неоадьювантной ХТ происходят реверсия и возвращение аллеля дикого типа гена, что вызывает восстановление функциональной активности *BRCA1* и формирование химиорезистентности опухоли, или под селективным действием соединений платины происходит пролиферация уже существующих клонов, несущих дикий аллель гена *BRCA1*.

Согласно нашей рабочей гипотезе, опухоли, в частности новообразования молочной железы, не обусловленные наличием герминальных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, обладают выраженной внутриопухолевой гетерогенностью в отношении соматического статуса данных генов и генов ГР в целом. В связи с этим под действием ХТ могут происходить элиминация чувствительных опухолевых клонов (например, с делециями генов ГР) и распространение и/или замещение уже существующих опухолевых клонов, несущих в себе амплификации генов ГР. Во втором случае возможно возникновение новых мутационных изменений в генах под селективным действием ХТ, в том числе амплификация локуса 17q21.31, содержащего ген *BRCA1*, даже если изначально в опухоли была его аллельная делеция. Таким образом, широкий спектр нарушений механизмов ГР делает опухоли все более чувствительными к ДНК-повреждающим агентам, и это перестает быть «выгодным» опухоли уже при непосредственном воздействии химиопрепаратов. Иначе говоря, под влиянием терапии механизмы BRCAness должны претерпевать обратные канцерогенезу процессы и будут нарушаться. За счет этого формируются резистентные клоны, лишенные дефицита *BRCA*, способные переживать повреждающую ДНК ХТ. И это может являться одним из первых механизмов восстановления функциональности *BRCA1*.

Цель исследования — оценка хромосомных аберраций и экспрессионного профиля основных генов ГР в клеточных моделях РМЖ под действием цисплатина и доцетаксела.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на культурах опухолевых клеток РМЖ MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН Санкт-Петербург). После разморозки клетки культивировали в чашках Петри во влажной среде, содержащей 5 % CO₂, при температуре 37 °С. Для культивирования клеток использовали полные питательные среды RPMI-1640 и DMEM 1 г/л (ООО «ПанЭко», Россия), содержащие 10 % термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки (Biosera, Франция) и 5 % антибиотика (пенициллина, стрептомицина) (ООО «ПанЭко», Россия). Перед 3-м пассажем при достижении 90 % конfluence оценивали жизнеспособность клеточных культур с помощью автоматического счетчика клеток Luna-II (Logos Biosystems, Корея) с последующим проведением экспериментов.

Определение полулетальной дозы. Для определения полулетальной дозы (ЛД₅₀) к препарату платины (цисплатин, 1 мг/мл, «Келун Казфарм», Казахстан) клетки культивировались в 96-луночных планшетах, куда при достижении 70 % конfluence добавляли цисплатин в концентрациях 10, 20, 30 и 40 мкг/мл. Жизнеспособность клеток измерена с помощью МТТ-теста через 24 ч после воздействия препаратом. Для этого к клеткам добавляли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид тетразолий (МТТ, ООО «ПанЭко», Россия) в конечной концентрации 5 мг/мл, затем клетки инкубировали в течение 4 ч. После инкубации осадок растворяли диметилсульфоксидом (ДМСО, ООО «ПанЭко», Россия) с последующим измерением оптической плотности полученных растворов с помощью спектрофотометра (Thermo Scientific Multiskan FC, США) на длине волны 620 нм и определяли процент жизнеспособных клеток относительно группы контроля (клетки без препарата).

Аналогичную процедуру проводили для препарата доцетаксел (1 мг/мл, новотакс, BIOCAD, Россия) в концентрациях 30, 35, 40, 45 и 50 мкг/мл. Для оценки пролиферативной активности клеток использовали систему многопараметрического анализа клеточных культур в режиме реального времени — RTCA iCELLigence. Для этого клетки вносили в планшеты (общее число лунок — 16, число лунок на группу — 4) в концентрации 40 тыс./лунку (объем лунки 700 мкл), затем инкубировали при 37 °С во влажной среде с 5 % CO₂ в течение 24 ч с фиксацией клеточного индекса каждый час. После окончания инкубации проводили анализ полученных данных с помощью программного обеспечения RTCA Data Analysis Software 1.0.

Разработка моделей химиорезистентного клона. Модель лекарственной устойчивости на клетках РМЖ была получена для двух препаратов — цисплатина и доцетаксела. Клетки линий MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 высаживали в культуральные флаконы площадью 150 см² в концентрации от 500 тыс. до 1 млн в зависимости от скорости пролиферации. При достижении конfluence в 70 % к клеткам добавляли препараты в ранее определенной концентрации ЛД₅₀: цисплатин (10 и 40 мкг/мл), доцетаксел (40 мкг/мл). Инкубация с препаратом выполнялась в течение 24 ч, после чего осуществляли смену среды с последующим культивированием клеток до достижения 90 % конfluence (от 7 до 14 дней). Далее проводили снятие клеток и повторный посев в культуральные флаконы перед следующей обработкой препаратом.

Для создания клинической ситуации цикл обработки клеток препаратами в ЛД₅₀ повторяли 3 раза после восстановления клеточной пролиферации. В качестве контроля использовали необработанные клетки, содержащиеся в питательной среде с добавлением ДМСО. Повторение процедуры создания модели химиорезистентного клона для каждой клеточной линии выполняли не менее 3 раз.

Выделение РНК. После экспериментов суспензии опухолевых клеток помещали в раствор RNeasy lysis buffer (Qiagen, США). Из клеточной суспензии с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) выделяли РНК в соответствии с инструкцией производителя. Концентрация РНК измерялась с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрация составила от 50 до 100 нг/мкл. Целостность РНК оценивали с использованием капиллярного электрофореза на приборе Tape Station (Agilent Technologies, США) и набора R6K Screen Tape (Agilent Technologies, США). Индекс целостности РНК (RIN) составил 5,6–8,4.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из опухолевых клеток с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрация ДНК измерялась с использованием флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, USA). Концентрация составила от 50 до 120 нг/мкл. Целостность ДНК оценивалась с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) с использованием набора Agilent Genomic DNA ScreenTape.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени. Уровень экспрессии генов *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RAD54L*, *PARP1* оценивали с помощью обратнотранскрипционной количественной ПЦР в режиме реального времени по технологии TaqMan на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Австралия). Для оценки уровня экспрессии исследуемых генов были использованы коммерческие наборы праймеров и зондов («ДНК-синтез», Россия). Полимеразную цепную реакцию ставили в 3 репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (SibEnzyme, Россия); 300 нМ прямого и обратного праймеров; 200 нМ зонда; 2,5 мМ $MgCl_2$; 19 SE-буфер (67 мМ Tris-HCl pH 8,8 при 25 °C; 16,6 мМ $(NH_4)_2SO_4$; 0,01 % Tween-20); 2,5 ед. HotStart Taq полимеразы (SibEnzyme, Россия) и 50 нг комплементарной ДНК (кДНК). Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл при 94 °C, 10 мин — предварительная денатурация; 40 циклов — 1-й шаг 10 с при 94 °C, и 2-й шаг — 20 с при 60 °C. В качестве референсных генов использовали 2 гена: *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase) и *ACTB* (β -actin); уровень их экспрессии нормализовался по отношению к экспрессии данных генов в норме и измерялся в условных единицах. Относительная экспрессия генов оценена с помощью метода Pfaffl [5]. В качестве калибратора использовали усредненные данные по ПЦР, полученные от анализа РНК, выделенной из 30 образцов нормальной ткани молочной железы.

Микроматричный анализ. Для оценки наличия хромосомных aberrаций (CNA — copy number aberrations of DNA) выполняли микроматричный анализ на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности

CytoScan™ HD Array (Affymetrix, США), которые содержали 1 млн 900 тыс. непалиморфных маркеров для анализа aberrаций числа копий. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, США). Для обработки результатов микрочипирования использовали программу Chromosome Analysis Suite 4.3 (Affymetrix, США). С ее помощью в хромосомах определяли несбалансированные хромосомные aberrации — делеции (loss) и амплификации (gain).

Поскольку в образцах опухолевой ткани обязательно присутствуют стромальные элементы и другие нормальные клетки, в полученной ДНК высок процент нормальной геномной ДНК. Микрочип CytoScan™ HD Array позволяет выявить 5 % и более мутантной ДНК. Мутантная опухолевая ДНК определялась на фоне нормальной ДНК. Процент мутантной ДНК — статус числа копий (CN-state) — колебался от 15 до 88 %. Нормальная копияность генов определялась как 2 копии на геном. Для делеций регистрировалась потеря 1 копии гена, для амплификации — увеличение копияности до 2 и 4 вариантов.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое и среднюю квадратичную ошибку. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона—Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения изменений спектра нарушений генов ГР при индукции резистентности к препаратам платины и таксанам условно были отобраны клеточные линии с наличием дефицита ГР (MCF-7 и MDA-MB-231) и без такового (MDA-MB-468) (табл. 1, 2). При отборе клеточных культур мы оценили наличие хромосомных aberrаций в исследуемых генах (см. табл. 1, 2) и их экспрессию в клеточных культурах РМЖ до воздействия химиопрепаратами (рис. 1).

Согласно данным, представленным в табл. 1 и 2, в клеточных культурах MCF-7 и MDA-MB-231 наблюдается наличие делеций в 31,2 % случаев (в том числе и в *BRCA1*), что также соотносится с экспрессионным портретом. MDA-MB-468 показано полное отсутствие делеций и наличие в 25 % случаев амплификаций генов *ATM*, *CHEK1*, *RAD54L* и *PARP1*, что также коррелирует с высокой экспрессией данных генов (см. рис. 1). Таким образом, согласно рабочей гипотезе в клеточной культуре с наличием дефицита ГР под действием препаратов будет происходить сужение спектра нарушений генов ГР и возможное развитие структурной и функциональной компенсаторности дефицита ГР, что приводит к развитию резистентности к ДНК-повреждающим агентам.

Таблица 1. Наличие хромосомных aberrаций в генах системы гомологичной рекомбинации в исследуемых клеточных культурах MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468

Table 1. Presence of chromosomal aberrations in the genes of the homologous recombination system in the studied cell cultures MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468

Ген Gene	MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-468
BRCA1	Del	N	N
BRCA2	N	Del	N
ATM	Del	N	Ampl
BARD1	N	Del	N
BRIP1	Ampl	N	N
CDK12	Del	N	N
CHEK1	Del	N	Ampl
CHEK2	N	Del	N
FANCL	N	N	N
PALB2	N	Del	N
PPP2R2A	N	N	N
RAD51B	Ampl	N	N
RAD51C	Ampl	N	N
RAD51D	Del	N	N
RAD54L	N	Del	Ampl
PARP1	N	N	Ampl

Примечание. Del — делеция; n — нормальная копийность; ampl — амплификация.
Note. Del — deletion; n — normal copy number; ampl — amplification.

Таблица 2. Частота встречаемости aberrаций числа копий ДНК в исследуемых клеточных культурах MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468, абс. (%)

Table 2. Frequency of occurrence of DNA copy number aberrations in the studied cell cultures MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468, abs. (%)

Хромосомная aberrация Chromosomal aberration	MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-468
Делеция Deletion	5 (31,2)	5 (31,2)	0 (0)
Нормальная копийность Normal copy number	8 (50,0)	11 (68,8)	12 (75,0)
Амплификация Amplification	3 (18,8)	0 (0)	4 (25,0)
Дефицит гомологичной рекомбинации Homologous recombination deficiency	Есть Yes	Есть Yes	Нет No

Далее проводилось создание модели химиорезистентного клона, для которой культуры клеток MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 подвергались трем последовательным циклам обработки исследуемыми препаратами в ЛД₅₀. Каждый цикл включал 24-часовое культивирование клеток с химиотерапевтическими агентами. По истечении этого периода препарат удаляли, меняли питательную среду и культивировали клетки до достижения 90 % конфлюэнтности и повто-

рения цикла обработки. С помощью МТТ-теста и RTCA-iCELLigence предварительно были отобраны оптимальные дозы препаратов: ЛД₅₀ цисплатина для MCF-7 составила 10 мкг/мл, для MDA-MB-231 — 40 мкг/мл и для MDA-MB-468 — 20 мкг/мл, доцетаксела — 50, 50 и 40 мкг/мл соответственно. После воздействия препаратами наблюдалась значительная гибель клеток, что в конечном счете приводило к образованию отдельных колоний в течение нескольких дней. При

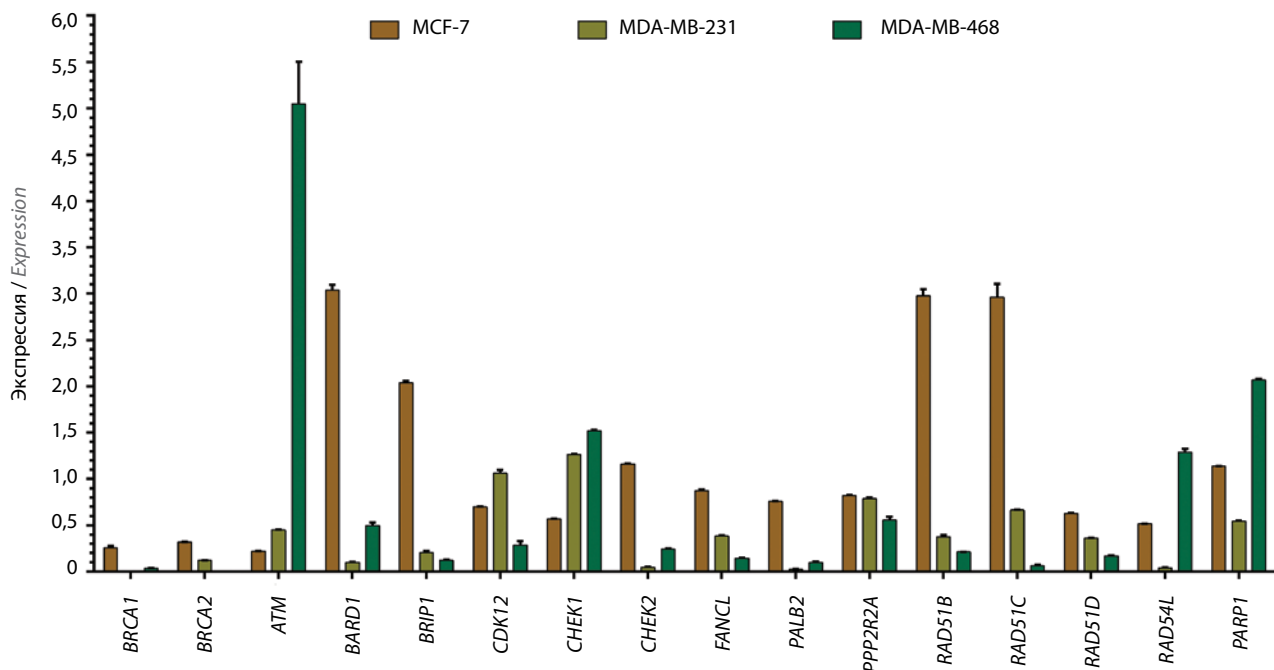


Рис. 1. Конститутивный уровень экспрессии генов системы гомологичной рекомбинации в исследуемых клеточных культурах
Fig. 1. Initial level of expression of genes of the homologous recombination system in the studied cell cultures

достижении 90 % конфлюэнтности одну часть клеточной суспензии брали для анализа изменения активности генов ГР, а другую снова пересеивали в культуральные флаконы для повторения воздействия препаратами.

При анализе генетического ландшафта опухолевых клеток РМЖ обнаружены изменения, вызванные селективным действием химиопрепаратов. Установлено изменение aberrаций числа копий ДНК для генов *BRCA1*, *BRCA2*, *CDK12*, *CHEK1*, *PALB2* и *RAD51D* в MCF-7. Показано сужение спектра нарушений для *BRCA1*, *CDK12*, *CHEK1* и *RAD51D* (восстановление нормальной копийности). К 3-му пассажу обнаружены амплификации генов *BRCA2* и *PALB2* (табл. 3). Следует отметить, что доцетаксел не оказывал такого действия, и частота встречаемости делеций и амплификаций не изменялась за исключением гена *PARP1*, у которого в конечной точке наблюдалось появление делеции (табл. 4). Для MDA-MB-231 также был проведен аналогичный анализ, который тоже показал изменение хромосомных aberrаций генов системы ГР в сторону увеличения копийности (см. табл. 3). В частности, продемонстрировано, что все выявленные локусы с делециями, где локализованы гены *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* и *RAD54L*, с течением времени под действием цисплатина восстанавливаются до нормальной копийности. При этом для остальных генов, например *BRCA1*, наблюдается увеличение копийности, так же как и для *BRIP1*, *FANCL*, *RAD51B* и *PARP1*. Для трех генов — *ATM*, *CHEK1* и *RAD51D* — характерно появление делеции. Следует отметить, что возникновение амплификаций в исследуемых генах наблюдалось сразу после 1-го пассажа и сохранялось на протяжении всего действия препарата, что «выгодно» опухолевым

клеткам и позволяет им быть более устойчивыми к повреждению ДНК. Аналогичный результат показан для доцетаксела (см. табл. 4). При этом частота амплификаций к 3-му пассажу оказалась выше (62,5 %) по сравнению с действием цисплатина (37,5 %). Делеции генов также восстанавливаются до нормальной копийности, кроме гена *CHEK2*, делеция в котором сохраняется на протяжении всего действия препарата.

В заключение была проанализирована клеточная культура опухолевых клеток молочной железы MDA-MB-468, в которой полностью отсутствовали делеции в генах ГР, в 4 генах наблюдались амплификации: *ATM*, *CHEK1*, *RAD54L*, *PARP1*, остальные гены имели нормальную копийность (см. табл. 3). Таким образом, согласно рабочей гипотезе под воздействием ДНК-повреждающих агентов изменение параметров исследуемых генов будет минимальным, поскольку опухолевые клетки не имеют дефицита в репаративной активности ДНК. В данном случае под влиянием цисплатина происходит увеличение копийности только гена *BRCA1*. Через 24 ч и после 1-го пассажа детектируются делеции в генах *PALB2* и *PPP2R2A*, но на 2-м и 3-м пассажах они элиминируются. Действие доцетаксела полностью не оказывает влияния на данную клеточную культуру (см. табл. 4).

Равно как и изменение CNA под действием препарата, изменяется и экспрессия исследуемых генов. Несмотря на то что данная величина вариабельна, наглядно было показано статистически значимое увеличение экспрессии генов *BRCA1* ($p = 0,04$), *BRCA2* ($p = 0,02$), *PALB2* ($p = 0,01$) и *RAD51D* ($p = 0,05$) от нативного варианта к 3-му пассажу в MCF-7. Это может свидетельствовать об активации процесса ГР (рис. 2, а). Причем при воздействии доцетаксела изменения экспрессии

Таблица 3. Наличие хромосомных aberrаций в генах системы гомологичной рекомбинации в клеточных культурах MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 под действием цисплатина в разные промежутки воздействия препарата

Table 3. The presence of chromosomal aberrations in the genes of the homologous recombination system in cell cultures MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 under the influence of cisplatin at different periods of exposure to the drug

Ген Gen	MCF-7, цисплатин (10 мкг/мл) MCF-7, cisplatin (10 µg/ml)					MDA-MB-231, цисплатин (40 мкг/мл) MDA-MB-231, cisplatin (40 µg/ml)					MDA-MB-468, цисплатин (40 мкг/мл) MDA-MB-468, cisplatin (40 µg/ml)				
	Исходные CNA Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 3	Исходные CNA Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 3	Исходные CNA Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 3
BRCA1	Del	Del	N	N	N	N	N	Ampl	N	Ampl	N	N	N	Ampl	Ampl
BRCA2	N	N	Ampl	N	Ampl	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N	N
ATM	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Del	Del	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
BARD1	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N	N
BRIP1	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
CDK12	Del	Del	Del	N	N	N	N	Ampl	Del	Del	N	N	N	N	N
CHEK1	Del	Del	Del	N	N	N	N	Ampl	Del	Del	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
CHEK2	N	N	N	N	N	Del	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N
FANCL	N	N	N	N	N	N	N	Ampl	N	Ampl	N	N	N	N	N
PALB2	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Del	Del	N	N	N	N	Del	Del	N	N
PPP2R2A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N
RAD51B	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
RAD51C	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
RAD51D	Del	Del	Del	N	N	N	N	Ampl	Del	Del	N	N	N	N	N
RAD54L	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
PARP1	N	N	N	N	N	N	N	Ampl	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	Ampl	Ampl

Примечание. Здесь и в табл. 4: 1-й пассаж – через 2 нед после воздействия (после 1-й дозы препарата); 2-й пассаж – после 2-й дозы препарата; 3-й пассаж – после 3-й дозы препарата; CNA – aberrации числа копий ДНК.
Note. Here and in table 4: passage 1 – 2 weeks after exposure (after 1st dose of the drug); passage 2 – after the 2nd dose of the drug; passage 3 – after the 3rd dose of the drug; CNA – copy number aberrations of DNA.

Таблица 4. Наличие хромосомных aberrаций в генах системы гомологичной рекомбинации в клеточных культурах MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 под действием доцетаксела в разные промежутки воздействия препарата
Table 4. The presence of chromosomal aberrations in the genes of the homologous recombination system in cell cultures MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 under the influence of docetaxel at different periods of exposure to the drug

Ген Gen	MCF-7, доцетаксел (50 мкг/мл) MCF-7, docetaxel (50 µg/ml)					MDA-MB-231, доцетаксел (50 мкг/мл) MDA-MB-231, docetaxel (50 µg/ml)					MDA-MB-468, доцетаксел (50 мкг/мл) MDA-MB-468, docetaxel (50 µg/ml)				
	Исходные CNA Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 3	Исход- ные CAN Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 3	Исходные CAN Original CNAs	Через 24 ч In 24 h	1-й пассаж Passage 1	2-й пассаж Passage 2	3-й пассаж Passage 4
BRCA1	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
BRCA2	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N	N
ATM	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
BARB1	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N	N
BRIP1	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
CDK12	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
CHEK1	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
CHEK2	N	N	N	N	N	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	N	N	N
FANCL	N	N	N	N	N	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
PALB2	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	N	N	N	N	N
PPP2R2A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
R4D51B	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
R4D51C	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
R4D51D	Del	Del	Del	Del	Del	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	N	N	N	N	N
R4D54L	N	N	N	N	N	Del	Del	N	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl
PARP1	N	N	N	N	Del	N	N	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl	Ampl

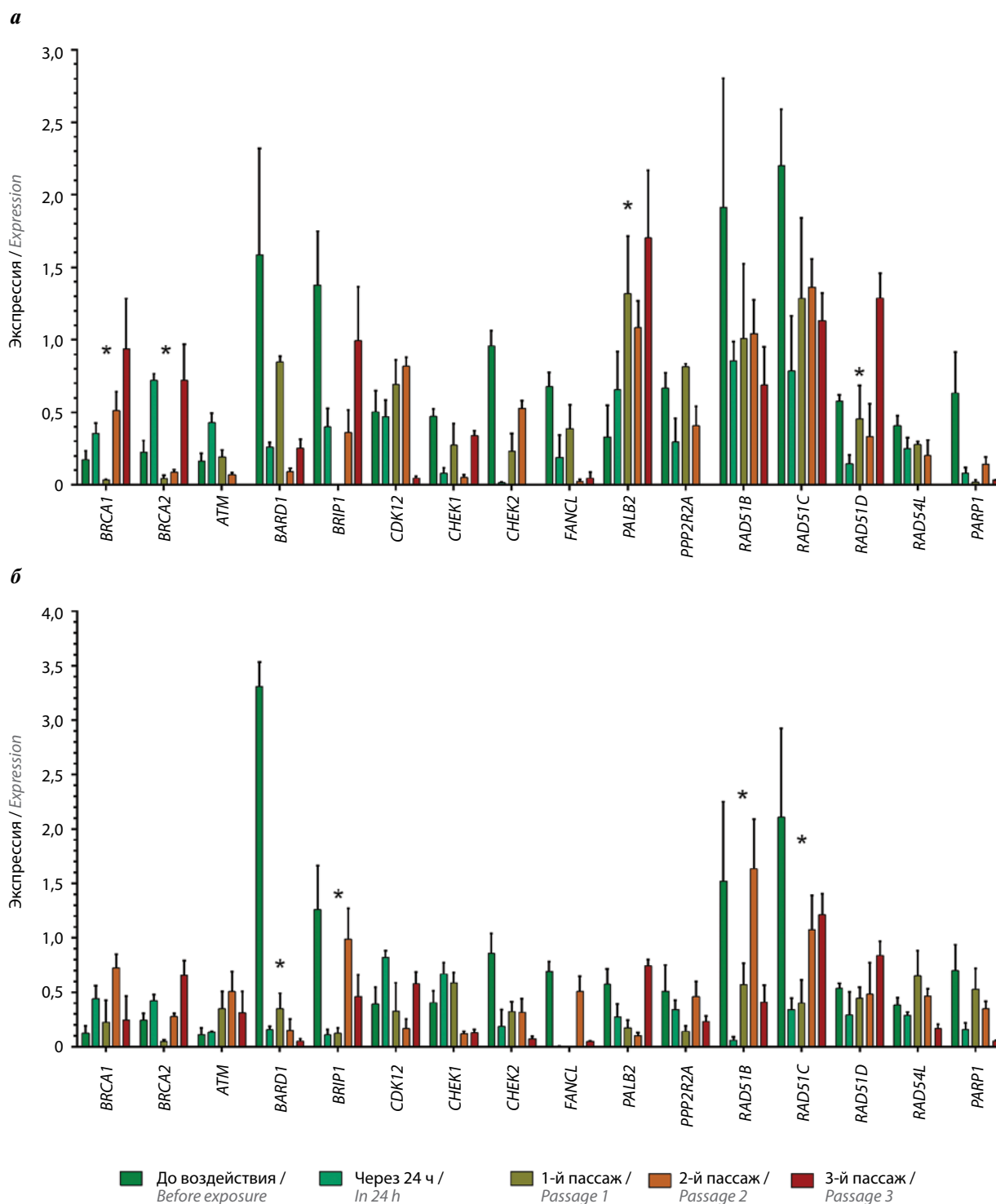


Рис. 2. Уровень экспрессии генов системы гомологичной рекомбинации в клеточной культуре MCF-7 до воздействия препарата и через временные промежутки после него: а – данные для цисплатина; б – данные для доцетаксела. 1-й пассаж – через 2 нед после воздействия (после 1-й дозы препарата); 2-й пассаж – после 2-й дозы препарата; 3-й пассаж – после 3-й дозы препарата. Звездочкой помечены статистически значимые различия между группами

Fig. 2. Level of expression of genes of the homologous recombination system in the MCF-7 cell culture before exposure to the drug and at time intervals after exposure: а – data for cisplatin; б – data for docetaxel. Passage 1 – 2 weeks after exposure (after 1st dose of the drug); passage 2 – after the 2nd dose of the drug; passage 3 – after the 3rd dose of the drug. Statistically significant differences between groups marked with an asterisk

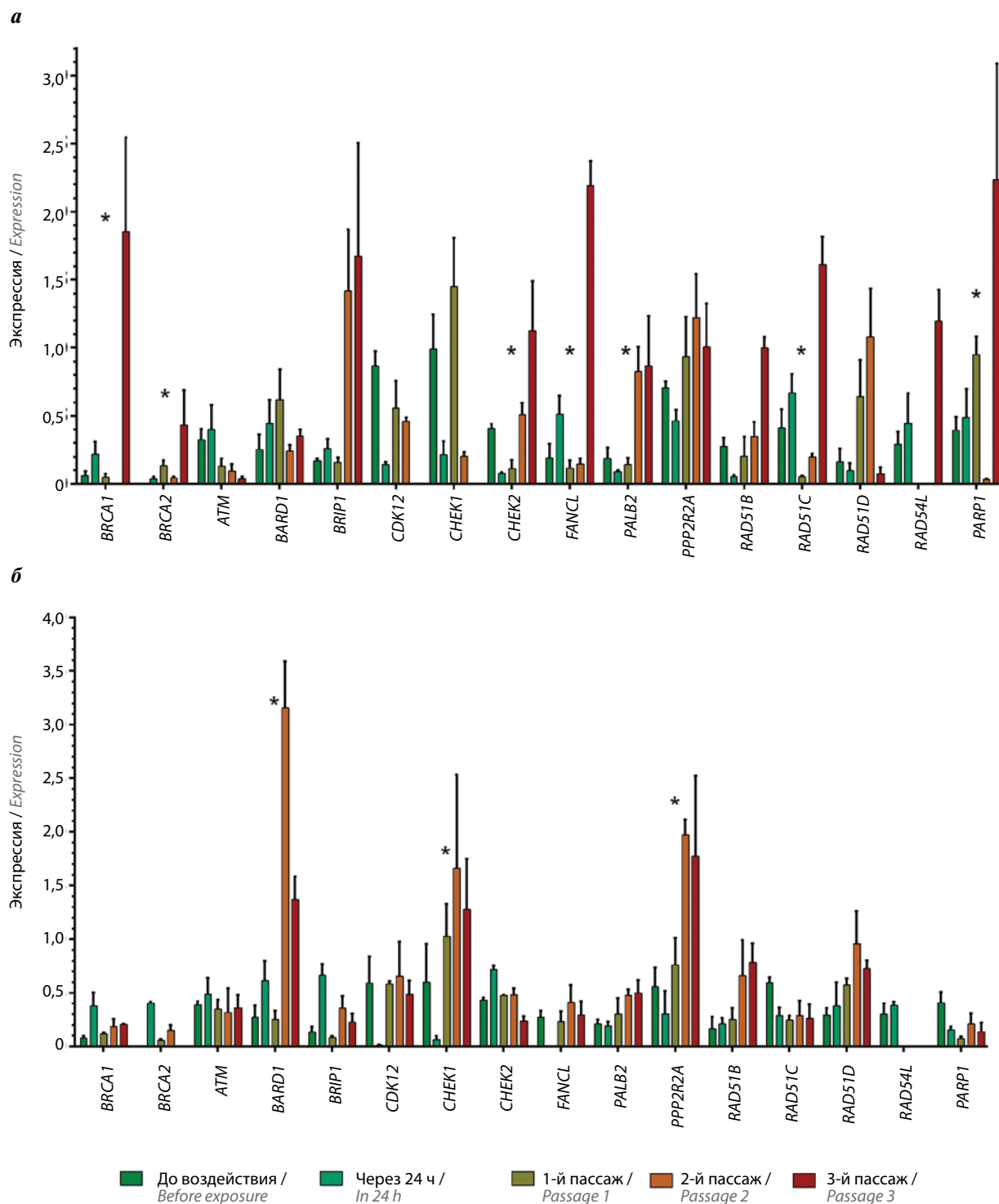


Рис. 3. Уровень экспрессии генов системы гомологичной рекомбинации в клеточной культуре MDA-MB-231 до воздействия препарата и через временные промежутки после воздействия: а — данные для цисплатина; б — данные для доцетаксела. 1-й пассаж — через 2 нед после воздействия (после 1-й дозы препарата); 2-й пассаж — после 2-й дозы препарата; 3-й пассаж — после 3-й дозы препарата. Звездочкой помечены статистически значимые различия между группами

Fig. 3. Level of expression of genes of the homologous recombination system in the MDA-MB-231 cell culture before exposure to the drug and at time intervals after exposure: а — data for cisplatin; б — data for docetaxel. Passage 1 — 2 weeks after exposure (after 1st dose of the drug); passage 2 — after the 2nd dose of the drug; passage 3 — after the 3rd dose of the drug. Statistically significant differences between groups marked with an asterisk

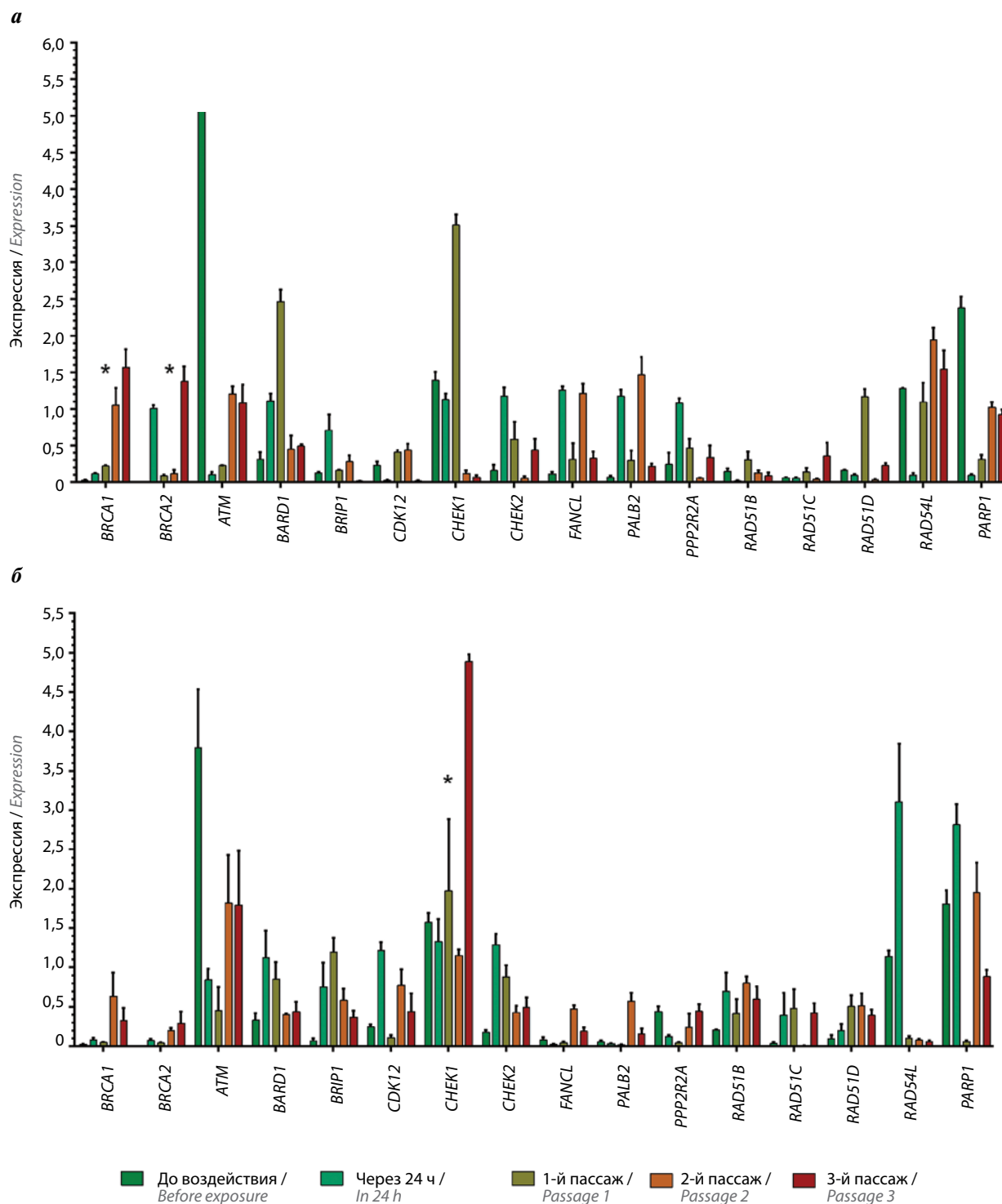


Рис. 4. Уровень экспрессии генов системы гомологичной рекомбинации в клеточной культуре MDA-MB-468 до воздействия препарата и через временные промежутки после воздействия: а – данные для цисплатина; б – данные для доцетаксела. 1-й пассаж – через 2 нед после воздействия (после 1-й дозы препарата); 2-й пассаж – после 2-й дозы препарата; 3-й пассаж – после 3-й дозы препарата. Звездочкой помечены статистически значимые различия между группами

Fig. 4. Level of expression of genes of the homologous recombination system in the MDA-MB-468 cell culture before exposure to the drug and at time intervals after exposure: а – data for cisplatin; б – data for docetaxel. Passage 1 – 2 weeks after exposure (after 1st dose of the drug); passage 2 – after the 2nd dose of the drug; passage 3 – after the 3rd dose of the drug. Statistically significant differences between groups marked with an asterisk

практически не обнаруживаются. Изначально высокий уровень экспрессии характерен для *BARD1* ($p = 0,03$), *BRIP1* ($p = 0,02$), *RAD51B* ($p = 0,02$) и *RAD51C* ($p = 0,05$). При воздействии препарата наблюдается снижение экспрессии данных генов. Для остальных генов ГР ее уровень в среднем приближен к нормальному (рис. 2, б).

Анализ экспрессии в культуре MDA-MB-231 показал увеличение к 3-му пассажу уровня *BRCA1* ($p = 0,02$), *BRCA2* ($p = 0,02$), *CHEK2* ($p = 0,05$), *FANCL* ($p = 0,04$), *PALB2* ($p = 0,05$), *RAD51C* ($p = 0,02$) и *PARP1* ($p = 0,02$), что соответствует появлению амплификаций в данных генах (рис. 3, а). Несмотря на то что под действием доцетаксела также происходит изменение генетического ландшафта клеточной культуры, экспрессионный портрет исследуемых генов значительно не изменяется. Так, уровень экспрессии *BRCA1* не превышает 1, что ниже, чем в нормальных клетках молочной железы; это также характерно для остальных генов. Исключение составляют такие гены, как *BARD1* ($p = 0,02$), *CHEK1* ($p = 0,03$) и *PPP2R2A* ($p = 0,08$). Для них характерны гиперэкспрессия во 2-м пассаже и незначительное снижение экспрессии к 3-му пассажу (рис. 3, б).

На последнем этапе оценена экспрессия исследуемых генов в клеточной культуре MDA-MB-468. Уровень экспрессии *BRCA1* увеличивался прямо пропорционально длительности действия препарата (рис. 4, а) и к 3-му пассажу стал в 2 раза больше, чем в клетках, не подверженных воздействию ($p = 0,02$). Стоит обратить внимание, что под действием доцетаксела наблюдается сильная вариация в экспрессии генов. Только для *CHEK1* установлено увеличение экспрессии ($p = 0,01$), для многих генов показано увеличение экспрессии через 24 ч после, через 2 ч воздействия препаратом и после 2-й его дозы, затем наблюдается снижение уровня экспрессии до начальных значений (рис. 4, б).

Таким образом, на клеточных культурах было установлено снижение количества нарушений генов ГР под действием цисплатина. При этом клеточные культуры, имеющие делеции и низкую экспрессию в генах ГР, восстанавливали копийность, а в некоторых случаях проявляли развитие структурной (амплификации, ир-регуляция экспрессии) компенсаторности дефицита ГР. Важно отметить, что изменения параметров генов ГР наступают через длительное воздействие препарата, преимущественно уже через 2 нед наблюдаются первичные изменения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашей работы показали, что под селективным действием цисплатина может происходить изменение генетического ландшафта и экспрессионного портрета генов ГР. В недавнем исследовании изучена чувствительность 12 клеточных культур РМЖ при наличии/отсутствии у них фенотипа BRCAness [6]. В частности, показано, что BRCA-подобные клетки демонстрируют слабую положительную корреляцию с чувствительностью к доцетакселу ($r = 0,377$; $p = 0,039$).

Также обнаружена отрицательная корреляция между BRCA-подобными клетками и чувствительностью к цисплатину ($r = -0,407$; $p = 0,013$).

В настоящее время BRCA-подобные опухоли исследуют не только в качестве прогностического биомаркера, но и как новую терапевтическую стратегию. Интересные результаты были получены А. Мин и соавт. (2015) и С. Мио и соавт. (2019), которые установили, что индукция фенотипа BRCAness может быть достигнута за счет эпигенетического подавления *BRCA1/2* и усиления активности химиопрепаратов [7, 8]. Согласно полученным данным, низкая эффективность препаратов платины может быть связана с тем, что ГР восстанавливается под действием неoadъювантной ХТ [9]. Другие авторы показали, что совокупное воздействие ХТ является наиболее вероятным фактором вторичных генетических изменений [10]. Например, циклофосамид, обычно используемый у пациентов с карциномой молочной железы, является агентом, сшивающим ДНК, и теоретически может индуцировать или определять восстановление *BRCA1/2* дикого типа аналогично соединениям платины. Подтверждением этому служат результаты исследования больных с опухолью яичников: 13 из 46 рецидивирующих карцином имели вторичную мутацию генов *BRCA1/2* по сравнению с 2 из 64 первичных карцином ($p = 0,0003$) [11]. При этом в 12 из 26 платинорезистентных рецидивов наблюдались вторичные мутации, восстанавливающие генотип *BRCA1/2* по сравнению с 1 из 19 платиночувствительных рецидивов ($p = 0,003$). Авторы предположили, что вторичные мутации могут присутствовать в первичной карциноме из-за нестабильности генома и уже затем выбиваться с помощью ХТ. Кроме этого, вторичные мутации могут встречаться в редких клетках первичной карциномы. Но остается открытым вопрос: существуют ли вторичные мутации, восстанавливающие *BRCA1/2* при первичном раке яичников без проведения ХТ [11].

Результаты ранее проведенного исследования показали, что наличие мутации *BRCA2* 5193C>G (Y1655X) в клеточной линии аденокарциномы яичника PEO1 определяет дефицит *BRCA2* и высокую чувствительность к цисплатину [12]. Обработка PEO1 цисплатином привела к восстановлению функционирования *BRCA2* вследствие появления другой вторичной мутации. Еще в одном исследовании установлено, что амплификации могут напрямую или опосредованно влиять на резистентность. Амплификация гена *NBN* в клетках РМЖ и яичников приводит к *BRCA1*-зависимой устойчивости к олапарибу [13]. Установлено, что применение ингибиторов фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) снижает экспрессию генов *BARD1* и *BRCA1* в клетках, устойчивых к тамоксифену, и повторно повышают их чувствительность к цисплатину как *in vitro* (MCF-7 и T47D), так и *in vivo* [14].

Таким образом, настоящее исследование показало, что под действием цисплатина может происходить

реверсия не только мутаций генов ГР, но и других нарушений. При этом данный механизм был описан *in vitro* на линии *BRCA2*-мутированного рака поджелудочной железы, но считался основным фактором развития резистентности при РМЖ, раке яичников, поджелудочной и предстательной желез [15–18]. Кроме того, реверсии, ассоциированные с резистентностью к РАР-ингибиторам и препаратам платины, обнаружены не только в генах *BRCA1/2*, но и в других генах ГР, таких как *RAD51C*, *RAD51D* и *PALB2* [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, было выявлено, что формирование резистентности к химиопрепаратам может происходить за счет не только реверсивных мутаций в генах *BRCA1/2*, но и изменения количества копий ДНК генов ГР. Кроме того, полученные данные указывают на необходимость исследования механизмов пульсирующей функциональности генов ГР в опухоли в процессе ее развития и лечения, что и может являться основным фактором формирования резистентности опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Turner N.C., Reis-Filho J.S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* 2006;25(43):5846–53. DOI: 10.1038/sj.onc.1209876
- Jia X., Wang K., Xu L. et al. A systematic review and meta-analysis of BRCA1/2 mutation for predicting the effect of platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer. *The Breast* 2022;66:31–9. DOI: 10.1016/j.breast.2022.08.012
- Sokolenko A.P., Savonevich E.L., Ivantsov A.O. et al. Rapid selection of BRCA1-proficient tumor cells during neoadjuvant therapy for ovarian cancer in BRCA1 mutation carriers. *Cancer Lett* 2017;397(1):127–32. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.03.036
- Sokolenko A.P., Bizin I.V., Preobrazhenskaya E.V. et al. Molecular profiles of BRCA1-associated ovarian cancer treated by platinum-based therapy: analysis of primary, residual and relapsed tumors. *Int J Cancer* 2020;146(7):1879–88. DOI: 10.1002/ijc.32776
- Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45
- Teraoka S., Muguruma M., Takano N. et al. Association of BRCA mutations and BRCAness status with anticancer drug sensitivities in triple-negative breast cancer cell lines. *J Surg Res* 2020;250:200–8. DOI: 10.1016/j.jss.2019.12.040
- Min A., Im S.-A., Kim D.K. et al. Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), enhances anti-tumor effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor olaparib in triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2015;17(1):1–13. DOI: 10.1186/s13058-015-0534-y
- Mio C., Gerratana L., Bolis M. et al. BET proteins regulate homologous recombination-mediated DNA repair: BRCAness and implications for cancer therapy. *Int J Cancer* 2019;144(4):755–66. DOI: 10.1002/ijc.31898
- Lord C.J., Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer* 2016;16(2):110–20. DOI: 10.1038/nrc.2015.21
- Fleming R.A. An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology. *Pharmacotherapy* 1997;17(5 Pt. 2):146–54.
- Norquist B., Wurz K.A., Pennil C.C. et al. Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas. *J Clin Oncol* 2011;29(22):3008–15. DOI: 10.1200/JCO.2010.34.2980
- Sakai W., Swisher E.M., Jacquemont C. et al. Functional restoration of BRCA2 protein by secondary BRCA2 mutations in BRCA2-mutated ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2009;69(16):6381–6. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1178
- Wu Z., Li S., Tang X. et al. Copy number amplification of DNA damage repair pathways potentiates therapeutic resistance in cancer. *Theranostics* 2020;10(9):3939–51. DOI: 10.7150/thno.39341
- Zhu Y., Liu Y., Zhang C. et al. Tamoxifen-resistant breast cancer cells are resistant to DNA-damaging chemotherapy because of upregulated BARD1 and BRCA1. *Nat Commun* 2018;9(1):1–11. DOI: 10.1038/s41467-018-03951-0
- Afghahi A., Timms K.M., Vinayak S. et al. Tumor *BRCA1* reversion mutation arising during neoadjuvant platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer is associated with therapy resistance. *Clin Cancer Res* 2017;23(13):3365–70. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2174
- Weigelt B., Comino-Méndez I., De Bruijn I. et al. Diverse *BRCA1* and *BRCA2* reversion mutations in circulating cell-free DNA of therapy-resistant breast or ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23(21):6708–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0544
- Pishvaian M.J., Biankin A.V., Bailey P. et al. BRCA2 secondary mutation-mediated resistance to platinum and PARP inhibitor-based therapy in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2017;116(8):1021–6. DOI: 10.1038/bjc.2017.40
- Goodall J., Mateo J., Yuan W. et al. Circulating cell-free DNA to guide prostate cancer treatment with PARP inhibition. *Cancer Discov* 2017;7(9):1006–17. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0261
- Feng L., Fong K.-W., Wang J. et al. RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. *J Biol Chem* 2013;288(16):11135–43. DOI: 10.1074/jbc.M113.457440

Вклад авторов

М.М. Цыганов: написание текста статьи;
А.А. Фролова: получение данных для анализа;
Е.А. Кравцова: обзор публикаций по теме статьи;
И.А. Цыденнова: анализ полученных данных;
М.К. Ибрагимова: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

M.M. Tsyganov: article writing;
A.A. Frolova: obtaining data for analysis;
E.A. Kravtsova: reviewing of publications of the article's theme;
I.A. Tsydenova: analysis of the obtained data;
M.K. Ibragimova: developing the research design.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.М. Цыганов / M.M. Tsyganov: <https://orcid.org/0000-0001-7419-4512>
А.А. Фролова / A.A. Frolova: <https://orcid.org/0000-0003-3297-1680>
Е.А. Кравцова / E.A. Kravtsova: <https://orcid.org/0000-0002-9022-7764>
И.А. Цыденнова / I.A. Tsydenova: <https://orcid.org/0000-0002-2716-3075>
М.К. Ибрагимова / M.K. Ibragimova: <https://orcid.org/0000-0001-8815-2786>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00169).

Funding. This research was funded by the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00169).

Статья поступила: 03.03.2024. **Принята к публикации:** 09.04.2024.

Article submitted: 03.03.2024. **Accepted for publication:** 09.04.2024.