

На правах рукописи

ДЖУМАНИЯЗОВА ЭНАР

**ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА И МОЛЕКУЛЯРНЫХ
СИГНАТУР ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ГОЛОВЫ И ШЕИ ДО И ПОСЛЕ
ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТОННОЙ ТЕРАПИИ**

1.5.22. Клеточная биология

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Российский Университет Дружбы Народов имени Патриса Лумумбы"

Научные руководители:

кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Медицинского Института, заведующая лабораторией молекулярной патофизиологии НИИ молекулярной и клеточной медицины, Российский Университет Дружбы Народов имени Патриса Лумумбы

Вишнякова Полина Александровна

кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Медицинского Института Российского Университета Дружбы Народов имени Патриса Лумумбы, ведущий научный сотрудник отделения протонной фотонной терапии, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Гордон Константин Борисович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения радиотерапии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Алиева Севил Багатуровна

доктор медицинских наук, профессор, руководитель научно-исследовательского отдела молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Боженко Владимир Константинович

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1

Защита состоится «__» 2026 г. в __ на заседании диссертационного совета ПДС 0300.027 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6, зал №3

С диссертацией можно ознакомиться в Учебно-научном информационном библиотечном центре (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайтах <https://vak.minobrnauki.gov.ru/> и <https://www.rudn.ru/science/dissoviet/>

Автореферат разослан «__» 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета ПДС 0300.027

доктор биологических наук

Косырева Анна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Согласно данным, опубликованным GLOBOCAN (2020), плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) занимает шестое место в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в мире [Sung и др., 2021]. Чаще ПРГШ встречается у мужчин старше 50 лет [Barsouk и др., 2023], однако с начала 21 века выявлена тенденция к росту заболеваемости среди молодых трудоспособных людей, что значительно повышает социальную значимость заболевания [Näsmäki и др., 2015]. На долю ПРГШ приходится около 450 000 смертей в год [Sung и др., 2021], при этом заболеваемость ПРГШ продолжает расти и по прогнозам увеличится примерно до 1,08 миллиона новых случаев в год уже к 2030 году [Ferlay и др., 2019]. Так, в 2018 году в онкологические центры Российской Федерации поступило около 48 000 больных ПРГШ, а в 2023 году этот показатель превысил 65 000 человек [А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой, 2024]. Клинически ПРГШ характеризуется поздней диагностикой, частыми рецидивами и относительно низкой 5-летней выживаемостью как при локализованной, так и при распространенной стадии заболевания (69 и 34% соответственно) [Sung и др., 2021].

Примерно 75% пациентов с ПРГШ назначается лучевая терапия (ЛТ) в качестве основного или в составе комплексного лечения [Alfouzan, 2021]. При этом область головы и шеи является очень сложной для проведения облучения, ввиду анатомических особенностей. Основным методом ЛТ, применяемым в рутинной практике, является фотонная терапия (ФТ). Благодаря усовершенствованию данного метода удалось значительно повысить точность облучения и его эффективность. Однако дозиметрический выигрыш привел к увеличению частоты и выраженности острых лучевых реакций (мукозитов, радиоэпидермитов и др.) [Gutiantov и др., 2016]. Это обуславливает острую необходимость в поиске оптимального варианта ЛТ для улучшения исходов и качества жизни пациентов с ПРГШ. Наиболее перспективным подходом для решения данной задачи выступает протонная терапия (ПТ) [Yan и др., 2023]. Применение ПТ позволяет снизить дозы облучения в окружающих тканях, а следовательно, решить ряд важных задач радиотерапии—улучшить результаты лечения, снизив вероятность возникновения ранних и поздних лучевых реакций, и увеличить тем самым как показатели долгосрочной выживаемости, так и качества жизни пациента [Gordon, Smyk, Gulidov, 2021; Lautenschlaeger и др., 2019; Uemura и др., 2022]. Дозиметрические и физические преимущества ПТ позволяют снизить частоту развития тяжелых лучевых реакций. В свою очередь, минимизация осложнений ЛТ позволяет проводить противоопухолевое лечение непрерывно, что принципиально важно для пациентов с ПРГШ. На сегодняшний день известно, что основными причинами локорегионарных рецидивов выступают: большой объем первичной опухоли, метастазирование в лимфатические узлы и наличие перерывов во время проведения ХЛТ. Mollnar и соавт. в своем обзоре 2021 года [Mollnar и др., 2021] показали, что при изменении режима химиотерапии показатель объективного ответа практически не меняется ($p=0,468$). В то же время пауза в проведении ЛТ снижает этот показатель с 88% до 55% ($p=0,003$), пятилетняя безрецидивная выживаемость снижается с 50% до 20% ($p\leq 0,001$). Геворков А. Р. и соавторы в исследовании 2020 года опубликовали схожие данные [Gevorkov и др., 2020]. В их работе показатель пятилетней безрецидивной выживаемости в группе, где перерыв в ЛТ превышал месяц, был на 27% ниже, чем в группе, где перерывов удалось избежать.

Широкому клиническому распространению ПТ препятствует, во-первых, малое количество радиобиологических исследований, посвященных радиоиндуцированным эффектам, а во-вторых, высокая стоимость протонных установок [Jumaniyazova и др., 2023a]. Для дальнейшего успешного развития метода ПТ необходимо проведение в первую очередь фундаментальных радиобиологических исследований. На сегодняшний день

количество работ, посвященных оценке биологических эффектов ПТ на опухолевые клетки ПРГШ и на их транскриптом ограничено. В рамках данного исследования оценивается эффект ПТ не только на клетки опухолевой ткани, но и на клетки ткани перитуморальной области. Это важно, поскольку именно ткань перитуморальной области рассматривается в качестве источника локорегионарных рецидивов при солидных опухолях [Aran и др., 2017; Коса и др., 2024; Slaughter, Southwick, Smejkal, 1953]. Фундаментальные исследования радиоиндуцированных эффектов ПТ на клеточном и молекулярно-генетическом уровнях позволяют определить дифференциальные сигнатуры для персонализированного подбора оптимального варианта и режима ЛТ, что может значительно улучшить результаты лечения и качество жизни пациентов с ПРГШ.

Степень разработанности темы

Представление о том, что перитуморальная ткань является «здоровой» было оспорено еще в 1953 году, когда Slaughter et al. предположили, что высокая частота рецидивов плоскоклеточного рака полости рта обусловлена тем, что перитуморальная ткань подвергается воздействию того же канцерогенного фактора, что и сама опухоль, что приводит к появлению так называемых «областей опухолеобразования» или «поля канцеризации» (англ. «field cancerization») [Коса и др., 2024; Slaughter, Southwick, Smejkal, 1953]. Именно с этим явлением связали высокую склонность к развитию местных рецидивов после лечения и высокую вероятность развития первично-множественных опухолей в области головы и шеи [Slaughter, Southwick, Smejkal, 1953]. Доказано, что перитуморальная ткань (обычно в пределах 2 см от видимого края опухоли) имеет промежуточный транскриптомный профиль между опухолевой и нормальной тканью, причем, источником этих изменений является опухоль, к сигналам которой перитуморальная ткань оказалась высокочувствительна [Aran и др., 2017]. Некоторые исследователи предлагают использовать термин «макроокружение опухоли» применительно к гистологически сохраненной, но измененной на молекулярном уровне ткани вблизи опухолевого очага [Коса и др., 2024]. На сегодняшний день количество работ, посвященных исследованию ткани перитуморальной области, в частности ПРГШ, и ее ответам на разные виды противоопухолевого лечения ограничено [Michot и др., 2023; Shen и др., 2020].

Как было сказано выше, уже известно, о клинических преимуществах ПТ по сравнению с ФТ [Lin и др., 2020], [Manzar и др., 2020]. Однако опыт применения ПТ для лечения ПРГШ остается ограниченным. Это связано с тем, что большинство исследований, оценивающих эффекты ПТ фокусируются либо на других гистологических типах опухолей головы и шеи, либо проводятся в условиях повторного облучения, что лишает возможности объективной оценки эффектов воздействия протонов на опухолевую ткань [Dagan и др., 2016; Lee и др., 2020; Romesser и др., 2016]. Кроме этого, в доступной литературе практически отсутствуют исследования, посвященные биологическим эффектам ПТ при ПРГШ на клеточном уровне и на уровне транскриптома. Отсутствуют какие-либо сведения об эффектах ПТ и на ткани перитуморальной области. Это позволяет говорить об отсутствии у нас представления о радиоиндуцированных эффектах в опухолевой и перитуморальной тканях ПРГШ на клеточном и молекулярном уровнях при ПТ, что обуславливает актуальность данного исследования.

Цель исследования: Морфофункциональная характеристика тканей опухоли и перитуморальной области плоскоклеточного рака головы и шеи при облучении протонами для определения маркеров ответа на протонную терапию.

Задачи исследования

1. Сравнение клеточного состава опухолевой ткани и ткани перитуморальной области методами гистологического, иммуногистохимического анализа и проточной цитофлуориметрии до и после облучения сканирующим пучком протонов.

2. Исследование транскриптома опухолевой и перитуморальной тканей до и после облучения сканирующим пучком протонов методом секвенирования нового поколения.
3. Клинико-инструментальная оценка эффектов протонной терапии для определения групп пациентов с хорошим и плохим ответом на лечение.
4. Определение молекулярно-генетических сигнатур, ассоциированных с ответом пациентов на протонную терапию на основании сопоставления результатов транскриптомного анализа и клинических эффектов.

Диссертация соответствует паспортам научных специальностей 1.5.22. Клеточная биология, пунктам 1, 8, 14, 18 и 3.1.6. Онкология, лучевая терапия по пунктам 2, 7.

Научная новизна

Впервые охарактеризованы изменения клеточного состава опухолевой и перитуморальной тканей ПРГШ, индуцированные сканирующим пучком протонов.

Впервые проведен транскриптомный анализ клеток ПРГШ и клеток ткани перитуморальной области до и после облучения сканирующим пучком протонов и описаны изменения активности сигнальных каскадов.

На основании сопоставления клинических эффектов ПТ и результатов транскриптомного анализа в перитуморальной ткани выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены *KR1*, *KR6B* и *KR16* у пациентов ПРГШ с благоприятным и неблагоприятным ответом на ПТ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенная работа в рамках диссертационного исследования обладает существенной фундаментальной и прикладной значимостью. Выявленные особенности ответа опухолевой ткани и ткани перитуморальной области на облучение сканирующим пучком протонов позволяют не только расширить понимание биологических эффектов ПТ, но и усовершенствовать подходы к противоопухолевой терапии (ЛТ и ХЛТ).

В ходе исследования клинические и радиоиндуцированные эффекты оценивались у пациентов ранее не получавших ЛТ, что позволяет объективно оценить изменения на уровне транскриптома клеток опухоли и перитуморальной области, индуцированные ПТ.

Выявленные дифференциально экспрессированные гены *KR1*, *KR6B* и *KR16* у пациентов с благоприятным и неблагоприятным ответом на облучение ПТ могут послужить основой для создания диагностической тест-системы с целью персонализированного подбора ЛТ.

Материалы и методы исследования

Материалом для изучения служили биоптаты ткани опухоли и перитуморальной области, полученные от 80 пациентов с ПРГШ. Строение и клеточный состав опухолевой ткани и ткани перитуморальной области были исследованы методами гистологического, морфометрического, иммуногистохимического анализа, а также методом проточной цитометрии.

Облучение пациентов проводили в Медицинском радиологическом научном центре им. А. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России на комплексе протонной терапии «Прометеус».

После облучения сканирующим пучком протонов суммарной очаговой дозой (СОД) 10 изоГр повторно были получены и исследованы биоптаты опухолевой и перитуморальной тканей, и оценены радиоиндуцированные изменения строения и клеточного состава тканей. Кроме этого, проведен транскриптомный анализ клеток ткани опухоли и ткани перитуморальной области до и после ПТ методом секвенирования нового поколения с последующей биоинформационической обработкой полученных данных. Выявленные

дифференциально экспрессированные гены были верифицированы с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Клинические эффекты ПТ оценивали с помощью инструментальных методов исследования таких как, компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ) по критериям RECIST.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Ткань перитуморальной области имеет схожее клеточное строение и схожий радиоиндуцированный ответ на протонное облучение в СОД 10 изоГр с опухолевой тканью, что свидетельствует о ее репрезентативности и возможности использования для определения ответа пациентов с ПРГШ на ПТ.
2. Протонное облучение индуцировало подавление сигнальных каскадов, ассоциированных с иммунным ответом, пролиферацией, подвижностью клеток и подавление метаболических процессов как в опухолевой, так и в перитуморальной ткани. Дополнительно в опухолевой ткани выявлено снижение активности сигнальных каскадов, ассоциированных с ангиогенезом и активация кадгеринового сигнального пути после облучения протонами. В перитуморальной области отмечено подавление процессов кератинизации и активация процессов, ассоциированных с ответом на повреждающее воздействие, а также усиление метаболизма противоопухолевых лекарственных препаратов.
3. Гены *KR1*, *KR6B* и *KR16* могут быть рассмотрены в качестве потенциальных биомаркеров-предикторов ответа пациентов с ПРГШ на ПТ. Повышенная экспрессия генов *KR1*, *KR6B* и *KR16* в клетках ткани перитуморальной области связана с неблагоприятным прогнозом и исходом у пациентов с ПРГШ, в то время как их пониженная экспрессия связана с благоприятным прогнозом.

Личный вклад соискателя заключается в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Степень достоверности и внедрение результатов исследования в клиническую практику

Достоверность результатов работы подтверждена объемом проведенных исследований и репрезентативностью выборки пациентов (80 пациентов с ПРГШ), полученные результаты проанализированы с помощью современных методов статистического анализа.

Результаты исследования внедрены в образовательную программу кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Медицинского Института, а также исследовательскую деятельность НИИ молекулярной и клеточной медицины Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы.

Апробация диссертации

Апробация диссертации состоялась 17 октября 2025 года на заседании (протокол №1). Базовые положения диссертационной работы опубликованы в материалах, доложены и обсуждены на следующих научных конференциях: IX и X Международный Молодежный Медицинский Конгресс (Санкт-Петербург, 2022 и 2023 гг.), Международный молодёжный форум-2023 (Ставрополь, 2023), XXVII Российский онкологический конгресс (Москва, 2023), VIII Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2023) Алмазовский молодежный форум-2024 (Санкт-Петербург, 2024).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из них 7 статей в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук, а также 5 тезисов в материалах конференций и 2 патента.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 205 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы (работ в т.ч. отечественных и зарубежных, всего 368 источников). Диссертация содержит 49 рисунков и 29 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты: Работа выполнена на образцах ткани (опухолевой и ткани перитуморальной области) от 80 пациентов с ПРГШ. Материал был получен из МРНЦ им. А.Ф. Цыба, г. Обнинск, или МНИОИ им. П. А. Герцена, г. Москва, (филиалы ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России). Исследование соответствует этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинской Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Критерии включения пациентов в исследование: мужчины и женщины старше 18 лет; морфологически и/или рентгенологически верифицированный диагноз плоскоклеточного рака в области головы и шеи; общее состояние по шкале Карновского не менее 70 баллов; наличие информированного согласия на участие в исследовании.

Облучение пациентов сканирующим пучком протонов: Облучение пациентов сканирующим пучком протонов проведено с использованием горизонтально фиксированного активного сканирующего пучка протонов в положении сидя на комплексе ПТ «Прометеус» (производство ЗАО «Протон», Россия), (регистрационное удостоверение РЗН 2015/3242 от 28.12.2017). Всем пациентам ежедневно выполнялась верификация положения с использованием встроенного конусно-лучевого компьютерного томографа. Толщина срезов составляла 1 мм. Фиксацию пациента осуществляли с помощью усиленной термопластической маски и подголовников.

Оценка клинических эффектов ПТ: С целью оценки локального контроля (стабилизация, частичная или полная регрессия) опухоли в течение всего периода наблюдения, на сроках 3, 6, 9, 12 месяцев после ПТ пациентам были проведены инструментальные методы исследования КТ или МРТ области головы и шеи. В течение и после проведения ПТ у пациентов регистрировались наличие или отсутствие постлучевых осложнений в ходе физикального осмотра и опроса.

Забор опухолевой ткани и ткани перитуморальной области: Материал для проведения запланированного объема исследований был получен от пациента путем забора диагностической щипковой биопсии или получен в ходе проведения хирургического этапа лечения. В качестве образцов перитуморальной ткани использовались биоптаты визуально неизмененной ткани на расстоянии от 0.8-1.5 см от видимого края опухоли. Забор тканей осуществлялся в объеме не менее 3-5 мм³.

Гистологическое исследование: Для обзорной гистологии препараты изготавливали по стандартной методике и окрашивали гематоксилином и эозином или по методу Маллори (все реактивы Bio-Optica, Италия). Подсчет площади, занимаемой опухолевой паренхимой, проводили с помощью графического редактора Adobe Photoshop (Adobe Systems, США) не менее, чем на 10 случайным образом выбранных полях зрения для каждого образца при увеличении ×400. Для иммуногистохимического исследования (ИГХ) криосрезы (7 мкм) получали на криотоме CM1900 (Leica, Германия). Результат окрашивания оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B (Leica Microsystems, Германия).

Иммуногистохимическое исследование: С целью проведения ИГХ исследования и идентификации маркеров различных клеток, согласно протоколу производителя Abcam (Великобритания), срезы были окрашены антителами против: vimentin (ab8978), E-Cadherin (ab1416), KR17 (ab53707), KR5 (ab52635), KR10 (ab76318), Ki-67 (ab15580), p63 (ab53039), CD44 (ab243894), KR13 (PAB875Hu01), ALDH1A1 (PAE824Hu01), Pdpn (PAC719Hu01), SCCA1/SCCA2 (PAB814Hu02), CD68 (DF7518). В качестве вторых антител использовали donkey anti-mouse IgG H&L (FITC) (ab97029), donkey anti-rabbit IgG H&L (FITC) (ab6798) или donkey anti-rabbit IgG H&L (PE) (ab7007). DAPI (Sigma, Япония) использовался для окрашивания ядер. В ходе морфометрического анализа препаратов подсчитывали общее

количество клеток в 10 случайных полях зрения и принимали данное число за 100%. Далее считали количество клеток, экспрессирующих тот или иной маркер с помощью программного обеспечения Fiji для анализа биологических изображений [Schindelin и др., 2012], полученное значение переводили в проценты.

Проточная цитофлуориметрия: Для детекции внутриклеточных маркеров (Vimentin) осуществляли пермеабилизацию и фиксацию клеток при помощи набора Inside Stain kit (Miltenyi Biotec, США) согласно протоколу производителя. Для определения поверхностных маркеров 100 тыс. клеток ресуспендировали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера с 1% BSA (сывороточного альбумина). Далее клеточную суспензию инкубировали со следующими антителами: анти-CD146 (130-092-851, Miltenyi Biotec, США) анти-CD206 (130-095-131, Miltenyi Biotec, США), анти-CD68 (130-114-462, Miltenyi Biotec, США), анти-CD86 (130-116-160, Miltenyi Biotec, США), анти-vimentin (MA1-19656, Invitrogen), анти-EpCAM (MA1-10197, Invitrogen), анти-CD90 (130-117-388, Miltenyi Biotec, США) в концентрации, рекомендованной производителем, в течение одного часа при комнатной температуре в темноте. После окрашивания клетки отмывали путем центрифугирования в 1 мл фосфатно-солевого буфера в режиме 1500 g 10 минут. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера и затем анализировали на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США). Анализ и обработка полученных данных проводилась при помощи программного обеспечения CellQuest и Flowing Software.

РНК-секвенирование: Полученные биоптаты ткани подвергали гомогенизации с тефлоновыми бусинами в QIAZOL (Qiagen, Германия) с последующим выделением РНК набором RNA Clean & Concentrator (Zymo Research, США). Количество РНК оценивали с помощью прибора Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies, США). Далее из 1 мкг РНК для секвенирования на платформе Illumina были приготовлены библиотеки с использованием набора TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 с этапом обогащения в 10 циклов согласно инструкций производителя. Качество РНК и полученных библиотек было проверено с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tec. Inc., США). Параметр RIN для РНК составлял не менее 7. Концентрацию библиотек оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Финальные варианты библиотек объединяли в эквимолярных пропорциях перед секвенированием на платформе Illumina HiSeq 2500 с использованием парно-концевых прочтений по пятьдесят оснований. Параметр Q20 для всех образцов составил более 97%, а количество прочтений в среднем равнялось 60,2 млн на образец. Сырые прочтения были обработаны с использованием программного обеспечения RTA 1.17.21.3 и Casava 1.8.2 (Illumina).

Биоинформационический анализ: Для получения матриц экспрессий из fastq файлов использовался пайплайн nf-core/rnaseq версии 3.0. Пайплайн запускался с референсным геномом GRCh38, выравнивание проводилось с помощью инструмента STAR, а квантификация с помощью Salmon. Анализ дифференциальной экспрессии проводился между образцами до и после облучения. Анализ дифференциальной экспрессии был проведен независимо с помощью нескольких инструментов DESeq2, EBSeq, limma-voom, NOISeq и edgeR для каждого из которых были получены таблицы с оценкой дифференциальной экспрессии. Полученные результаты сравнивались с помощью Hobotnica. По итогам сравнения DESeq2 показал лучшие результаты при сравнении образцов до и после облучения. Анализ обогащения был выполнен с помощью программного обеспечения PANTHER 17.0 и Enrichr.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ): После выделения тотальной РНК, используя случайные гексануклеотидные праймеры и РНК-зависимую ДНК-полимеразу синтезировали одноцепочечную молекулу кДНК с помощью набора MMLV RT Kit (ЕвроГен, Россия). Полученную кДНК использовали для приготовления реакционной смеси для ПЦР-РВ. Для оценки уровней экспрессии выбранных генов KR1,

KR6b, *KR16* в сервисе Primer-BLAST были подобраны праймеры. Праймеры были синтезированы компанией Евроген (Россия). Экспрессию генов определяли методом ПЦР-РВ с использованием детектирующего амплификатора ДТпрайм (ДНК-Технология, Россия) по стандартной методике.

Статистические методы обработки данных: Анализ данных проводили с использованием статистического пакета программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Для сравнения данных были применены параметрические методы (t-критерий) с записью центральных показателей выборок в виде среднего арифметического плюс среднеквадратическое отклонение ($M \pm s$). Для установления значимости данные, полученные в ходе транскриптомного анализа, подвергали анализу с помощью парного критерия Стьюдента, для множественного сравнения использовалась поправка Бонферрони совместно с критерием Вальда (критерий крайнего пессимизма). Критерий значимости был установлен на уровне $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение клеточного состава опухолевой ткани и ткани перитуморальной области до и после облучения сканирующим пучком протонов

На первом этапе работы была охарактеризована морфология полученных образцов опухоли и перитуморальной ткани ПРГШ разной анатомической локализации. На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, была выявлена характерная для плоскоклеточного рака картина: обильный инвазивный рост в подлежащие ткани опухолевых клеток в виде округлых скоплений, тяжей или отдельных клеток. Во всех случаях в опухолевой ткани подтверждена обширная инвазия опухолевых клеток в собственную пластинку слизистой оболочки, базальная мембрана частично или полностью разрушена (Рисунок 1,2). Образцы ткани перитуморальной области были представлены фрагментами слизистой оболочки различных органов, покрытыми многослойным ороговевающим или неороговевающим эпителием. Во всех случаях в перитуморальной ткани сохранена нормальная архитектоника, многослойный эпителий ограничен от собственной пластинки слизистой оболочки сохранной базальной мембраной (Рисунок 1,2).

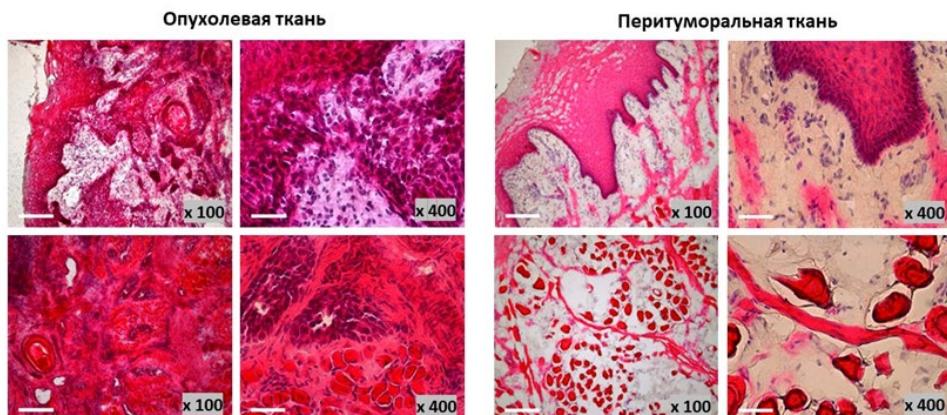


Рисунок 1 – Плоскоклеточный рак боковой поверхности языка и перитуморальная ткань, срез боковой поверхности тела языка. Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия. Длина масштабного отрезка 100 мкм и 50 мкм

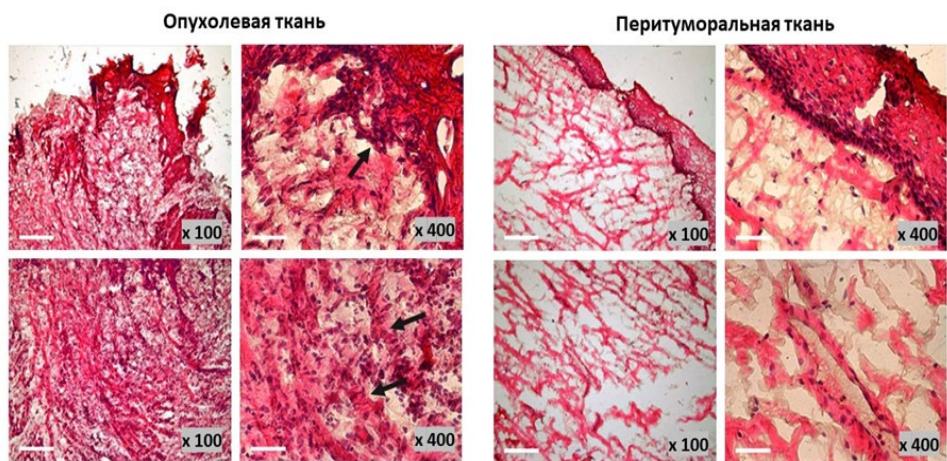


Рисунок 2 – Плоскоклеточный рак дна полости рта и перитуморальная ткань дна полости рта. Окрашивание гематоксилином и эозином. Светлопольная микроскопия. Длина масштабного отрезка 100 мкм и 50 мкм

В ходе сравнительной оценки уровня 11 маркеров: Е-кадгерина (трансмембранный гликопротеин эпителиальных клеток), Vimentin (белок промежуточных филаментов клеток мезодермального происхождения), KR5, KR17, KR10 (белки, из которых построены промежуточные филаменты эпителиальных клеток), CD44, ALDH1A1 (маркеры опухолевых стволовых клеток (ОСК)), Ki-67 (ядерный антиген-маркер клеточной пролиферации), p63 (ядерный белок регулятор экспрессии множества генов), CD68 (панмакрофагальный маркер), CD206 (маркер макрофагов M2), –было подтверждено, что ни один из них не является опухоль-специфическим и не может изолированно использоваться на этапе диагностики данного ЗНО [Soboleva и др., 2024]. Однако, экспрессия CD44, ALDH1A1, Ki-67, p63 статистически значимо была выше в образцах ПРГШ, а ткань перитуморальной области отличалась большей экспрессией CD68 (Таблица 1), (Рисунок 3). Инфильтрация CD68 макрофагами свойственна для ПРГШ [Jumaniyazova и др., 2022].

Таблица 1 – Сравнение уровня маркеров между опухолевой тканью ПРГШ и перитуморальной тканью, * – $p < 0,05$.

Экспрессия	Опухолевая ткань, % $M \pm s$ n=50	Перитуморальная ткань, % $M \pm s$ n=50	Оценка различий, пороговое значение 0,05, p
Е-кадгерин	77,6±4,7	83,4±2,4	0,0832
Vimentin	18,9±3,6	22,4±1,7	0,2551
KR5	95,4±3,4	98,0±1,5	0,4134
KR17	97,1±2,1	94,0±2,3	0,4124
KR10	22,2±3,3	13,6±2,4	0,1324
CD44	85,6±2,4	68,4±1,5	0,0246*
ALDH1A1	87,2±2,8	63,3±2,6	0,0010*
Ki-67	52,1±3,6	25,7±3,8	0,0003*
p63	49,3±1,4	21,0±3,9	0,0038*
CD68	12,3±1,6	26,7±4,1	0,0060*
CD206	13,1± 2,4	17,5±2,7	0,2076

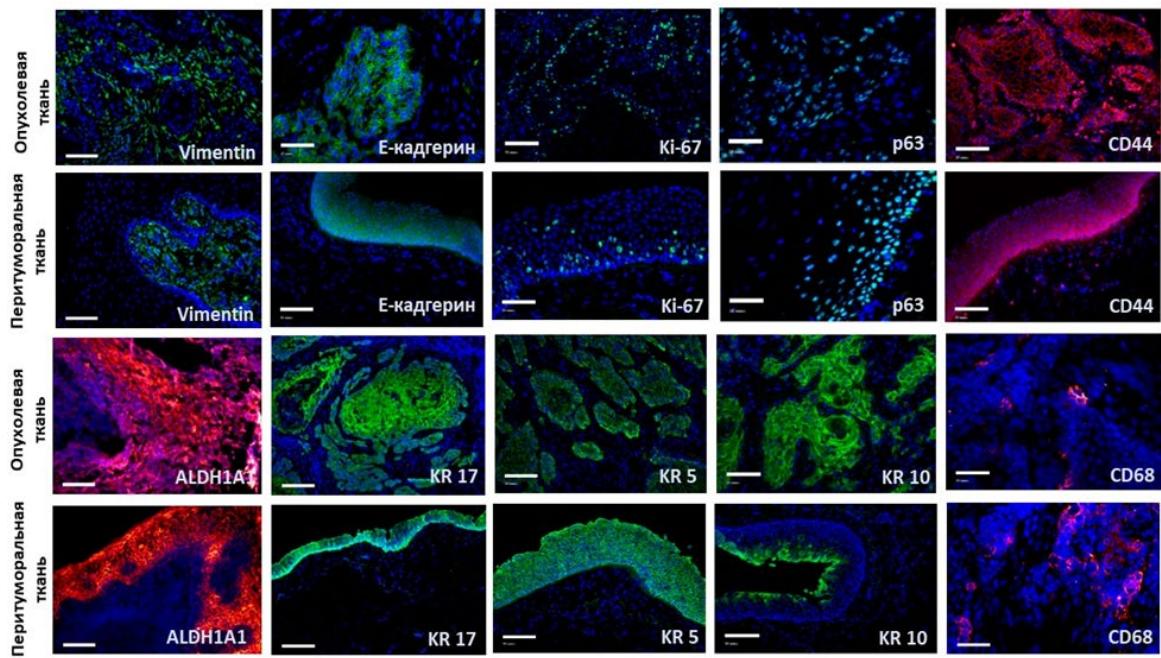


Рисунок 3 – Иммуногистохимическое исследование маркеров в тканях опухоли и перитуморальной области ПРГШ. Ядра клеток докрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия, $\times 200$ и $\times 400$. Длина масштабного рисунка 200 мкм и 50 мкм. * – $p < 0,05$

В ходе сравнения полученных иммунофенотипов клеток образцов ПРГШ и образцов ткани перитуморальной области значимых различий выявлено не было. Установленный фенотип клеток ткани перитуморальной области EpCAM+, Vimentin+, KR5+ свидетельствует о наличии эпителиальных клеток, находящихся в трансформированном состоянии, в частности, в состоянии эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [Usman и др., 2021]. Кроме того, такой фенотип характерен для циркулирующих опухолевых клеток [Huang и др., 2021], чье присутствие возможно в ткани перитуморальной области. С точки зрения клеточного состава образцы тканей обеих групп были схожи и состояли из клеток преимущественно эпителиальной и мезенхимальной природы. Среди клеток иммунной компоненты преобладали антигенпрезентирующие клетки (Рисунок 4,5).

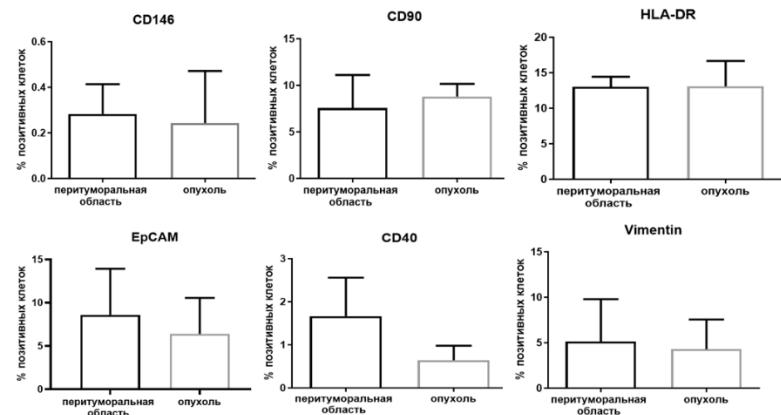


Рисунок 4 – Сравнение процента клеток, положительных по маркерам CD146, CD90, HLA-DR, EpCAM, CD40 и Vimentin в ткани перитуморальной ткани и опухолевой ткани

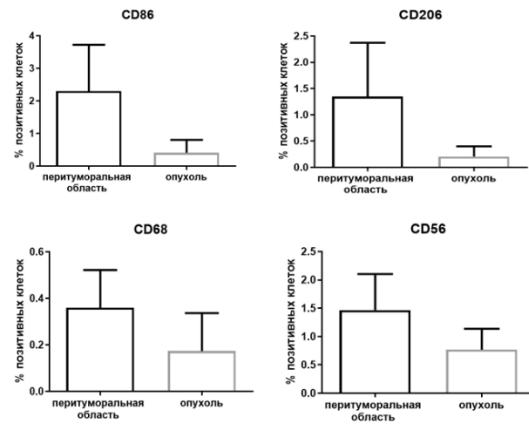


Рисунок 5 – Сравнение процента клеток, положительных по маркерам CD86, CD206, CD68, CD56 в ткани перитуморальной области и опухолевой ткани

Оценка изменений клеточного состава опухолевой и перитуморальной тканей ткани после облучения сканирующим пучком протонов

Во всех исследованных образцах после облучения сканирующим пучком протонов СОД 10 изоГр (5 фракций облучения по 2 Гр) был оценен лечебный (постлучевой) патоморфоз. После ПТ СОД 10 изоГр отмечается изменение соотношение площади опухолевая паренхима/строма. На препаратах можно отметить снижение количества клеток в опухолевой паренхиме и нарушение ее организации. Изменение формы клеток и их ядер может служить признаком начинающегося апоптоза. Площадь свободная от опухолевой паренхимы увеличивалась в среднем в 1,2-1,5 раза (Рисунок 6).

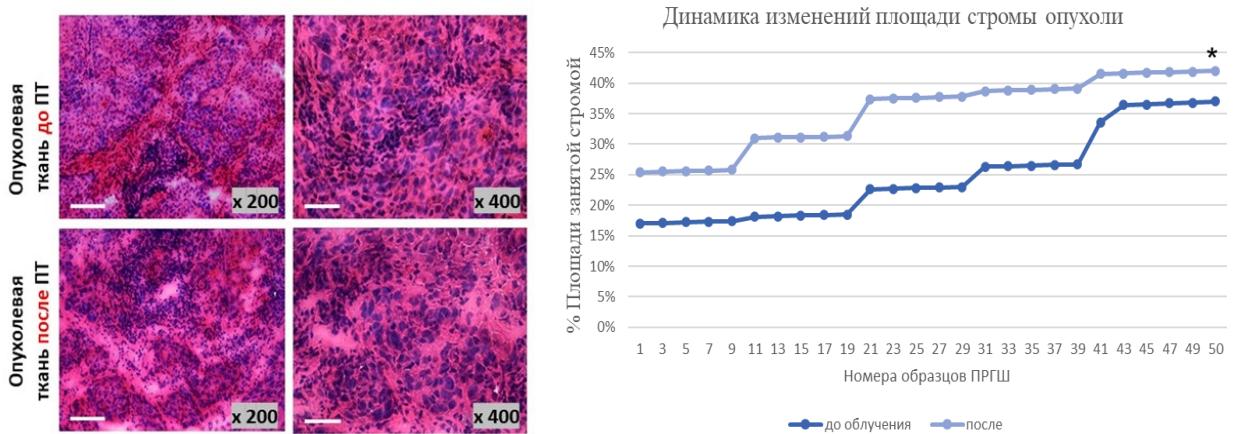


Рисунок 6 – Оценка динамики изменения площади стромы ПРГШ после облучения сканирующим пучком протонов в СОД 10 изоГр. * – $p < 0,05$

В опухолевой ткани ПРГШ после ПТ отмечено снижение уровня маркеров Vimentin, KR17, KR5, KR10, ALDHA1, Ki-67, p63, Pdpn, SCCA и увеличение CD68 (Рисунок 7,8).

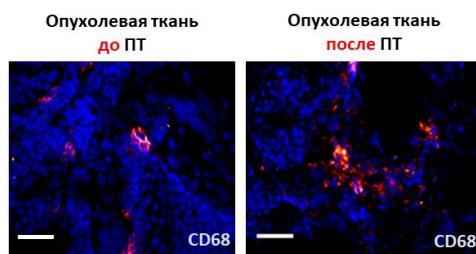
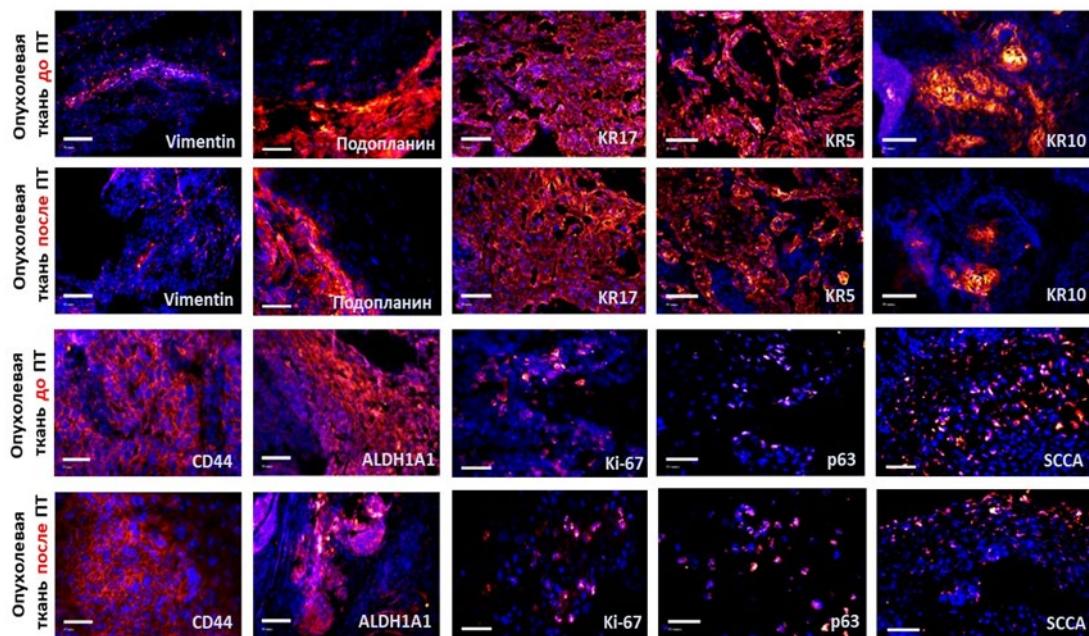


Рисунок 7 – Иммуногистохимическое исследование маркеров в тканях ПРГШ до и после ПТ. Ядра клеток докрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия, $\times 200$ и $\times 400$. Длина масштабного рисунка 200 мкм и 50 мкм

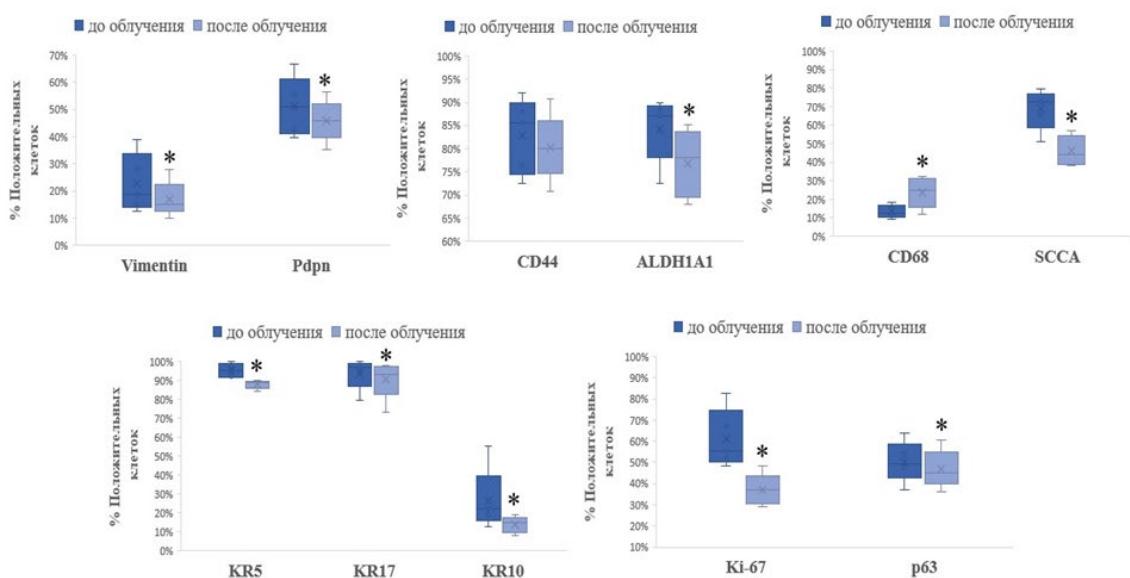


Рисунок 8 – Результирующие данные ИГХ исследования образцов ПРГШ до и после облучения сканирующим пучком протонов. * – $p < 0,05$

В образцах облученной ткани перитуморальной области не обнаружено ярко выраженных изменений (атрофии эпителиальных клеток, очагов некроза, разрастания

фибриновых волокон, кровоизлияний в результате повреждения стенок сосудов, обширной лимфо-гистиоцитарной инфильтрации и т.д.) по сравнению с необлученными образцами, однако отмечено увеличение соотношения площадей стромы/паренхима (Рисунок 9).

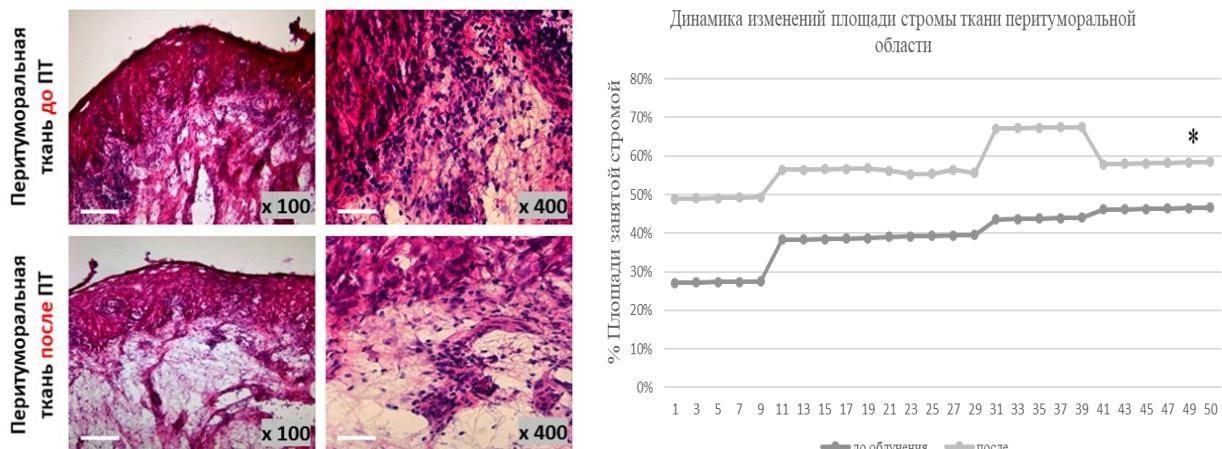
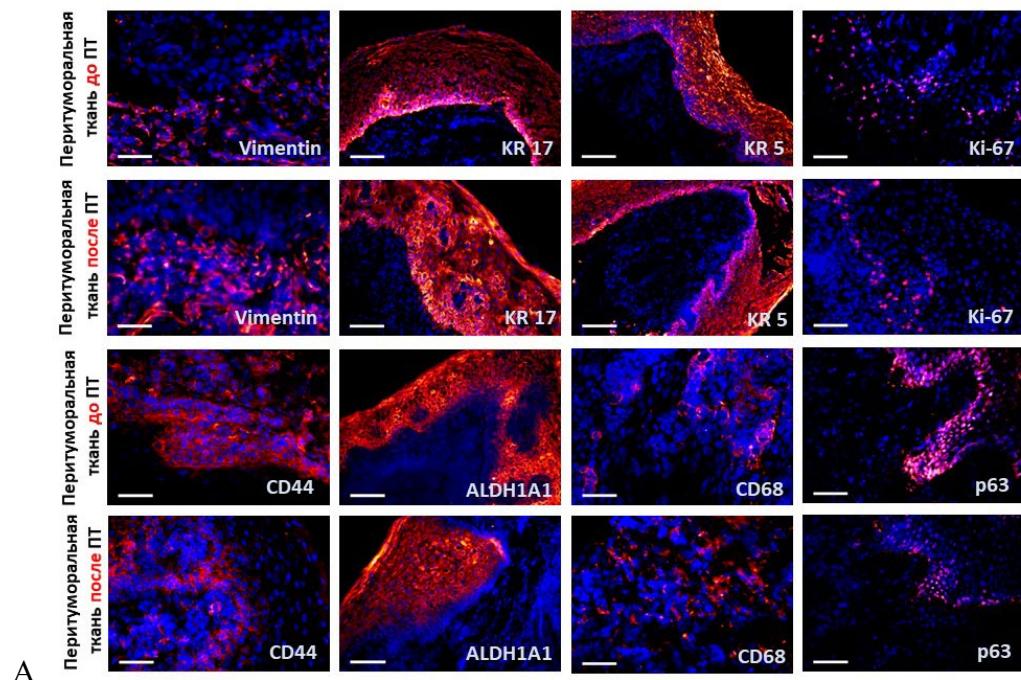


Рисунок 9 – Сравнительная оценка площади стромы в ткани перитуморальной области ПРГШ до и после облучения сканирующим пучком протонов в СОД 10 изоГр. * – $p < 0,05$

В образцах ткани перитуморальной области ПРГШ после ПТ отмечено статистически значимое снижение уровня маркеров KR5, CD44, ALDH1A1, Ki-67, p63 и увеличение уровня Vimentin и CD68 (Рисунок 10).



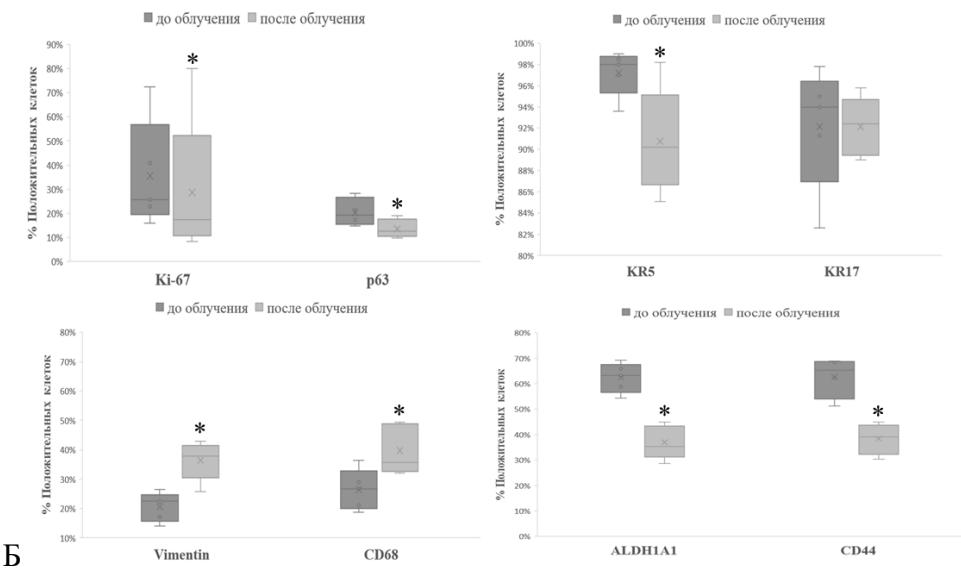


Рисунок 10 – А–Иммуногистохимическое исследование маркеров в тканях ПРГШ до и после ПТ. Ядра клеток докрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия, $\times 200$ и $\times 400$.

Длина масштабного рисунка 200 мкм и 50 мкм;

Б–Результирующие данные ИГХ исследования образцов ткани перитуморальной области до и после облучения сканирующим пучком протонов в СОД 10 изоГр. * – $p < 0,05$

После ПТ в тканях опухоли и перитуморальной области наблюдались схожие изменения: увеличение стромального компонента, состоящего преимущественно из аморфного вещества. Можно с осторожностью утверждать, что это проявления инициации радиационно-индуцированного фиброза [Fijardo и др., 2024]. Снижение процента Ki-67+клеток свидетельствует о подавлении пролиферации клеток, CD44 и ALDHA1– снижении количества ОСК. ПТ приводило к увеличению CD68+ клеток в опухолевой ткани и в ткани перитуморальной области, что соответствует данным, опубликованным в литературе [Genard и др., 2018].

Исследование транскриптома опухолевой и перитуморальной тканей до и после облучения сканирующим пучком протонов методом секвенирования нового поколения

В ходе транскриптомного анализа опухолевой ткани ПРГШ после проведения ПТ было обнаружено 1414 значимо дифференциально экспрессированных генов и нами было выделено десять генов, с максимально повышенной и максимально пониженной экспрессией. Наименьшая экспрессия после протонного облучения была отмечена в следующих генах *CLEC4E*, *IGHV2-70*, *P2RX1*, *SLC5A3*, *MYBPC1*, *SP1*, *FCRLA*, *KIAA0125*, *IGHV2-26*, *IGHV2-5*. Наибольшая экспрессия в образцах биопсий ПРГШ после протонного облучения была отмечена в генах: *PIK3R2*; *CTD-3074O7.11*; *GOLGA6L9*; *GP1BB*; *NPIPA2*; *RP11-96O20.4*; *AC008132.13*; *SNX31*; *RPI-127D3.4*; *RPL21P119*. Среди выявленных генов с повышенной и пониженной экспрессией после ПТ есть как гены, ассоциированные с опухолеобразованием, и с описанной ролью при ПРГШ, так и гены с неизвестной функцией. Так, например, среди генов низкоэкспрессированных после ПТ можно выделить ген *SP1*, который сверхэкспрессируется в опухолевых клетках и, в большинстве случаев, активирует гены, которые усиливают пролиферацию, инвазию и химиорезистентность [Jumaniyazova и др., 2024a]. Для определения принадлежности значимо высоко- и низкоэкспрессированных генов к тем или иным сигнальным путям был проведен анализ обогащения для каждой из этих групп генов (Таблица 2,3).

Таблица 2 – Наиболее значимые сигнальные пути ПРГШ, ассоциированные с низкоэкспрессированными генами, после протонного облучения (полученные с помощью программного обеспечения PANTHER)

Биологические процессы	У человека в норме	В образцах	Обогащение кратности	p-value	Вероятность ложноположительных результатов
Продукция иммуноглобулинов GO:0002381	46	10	8.49	1.09E-06	2.91E-04
Продукция цитокинов макрофагами GO:0010935	38	7	7.20	1.16E-04	1.38E-02
Миграция нейтрофилов GO:1902624	35	6	6,70	5.03E-04	3.77E-02
Активность рецептора МНС класса II GO:0032395	10	5	19.53	2.32E-05	1.68E-02
Интегриновый сигнальный путь P00034	200	17	3.32	3.42E-05	2.73E-03
Активация STAT5 R-HSA-9702518.2	10	4	15,63	3.15E-04	1.60E-02
Передача сигналов PDGF R-HSA-186797.5	54	8	5.79	1.48E-04	9.44E-03
Активация MAPK R-HSA-2871796.3	89	11	4,83	4.03E-05	3.14E-03

В ходе анализа обогащения после протонного облучения в клетках ПРГШ отмечено подавление активности процессов, ассоциированных с иммунными реакциями (снижение активности процессов сборки пептидного антигена с белковым комплексом МНС класса II, выработка иммуноглобулинов, продукция цитокинов макрофагами, миграции нейтрофилов, снижение миграции В и Т лимфоцитов); среди подавленных сигнальных каскадов – каскад STAT5; отмечено снижение активности сигнального пути РТК2, передачи сигналов PDGF; снижение CD22-опосредованной регуляции BCR; подавление активации MAPK, ответственных за опухолевое прогрессирование [Jumaniyazova и др., 2024b].

Анализ обогащения низкоэкспрессированных генов с помощью платформы Enrichr выявил подавление сигнальных путей, связанных с процессами повышения уровня цитозольного кальция, сокращением поперечнополосатой мышечной ткани, гомеостазом тромбоцитов, транспортом глюкозы, желчных солей, органических кислот, ионов металлов, аминосоединений.

В ходе анализа обогащения высокоеэкспрессируемых генов, было выявлено ограниченное количество сигнальных путей, ассоциированных с ними (Таблица 3).

Таблица 3 – Наиболее значимые сигнальные пути ПРГШ, ассоциированные с высокоэкспрессированными генами, после протонного облучения (полученные с помощью программного обеспечения PANTHER)

Биологические процессы	У человека в норме	В образцах	Обогащение кратности	p-value	Вероятность ложноположительных результатов
Сигнальный путь кадгерина P00012	166	14	5.41	7.90E-07	1.26E-04
Формирование ороговевающей оболочки R-HSA-6809371.5	129	14	6,96	4.57E-08	1.14E-04

Среди активированных сигнальных каскадов после протонного облучения обращает на себя внимание активация сигнального пути кадгеринов, белков клеточных контактов, что говорит о снижении вероятности метастазирования [Ren и др., 2016].

Анализ обогащения сигнальных путей на платформе Enrichr, ассоциированных с высокоэкспрессированными генами выявил активацию следующих процессов в образцах ПРГШ после протонного облучения: активация агрегации тромбоцитов, активация гликопротеинов 1b-IX-V, активация сигнального пути IL-9, активация сигнального пути Tie-2, CD28-зависимая активация PI3K/Akt, активация сигнального пути TRAIL.

В ходе транскриптомного анализа ткани перитуморальной области ПРГШ после проведения ПТ было обнаружено 1540 значимо дифференциально экспрессированных генов и нами было выделено десять генов, с максимально повышенной и максимально пониженной экспрессией. Наименьшая экспрессия после протонного облучения была отмечена в следующих генах: *OR2B11; TNFSF12-TNFSF13; AC012615,1; GYS2; AC009469,1; RP11-96O20,4; DNA11; PPBP; RPL36A-HNRNPH2; AC020663,1*. Наибольшая экспрессия в образцах ткани перитуморальной области после протонного облучения была отмечена в генах: *UGT1A10; AC008738,1; SEPT1; CTD-3074O7,11; RP11-1012A1,4; BIVM-ERCC5; GPR89B; SAP25; AC037459,4; RP11-1084J3,4*. Для обоих групп генов был проведен анализ обогащения (Таблица 4, 5).

Таблица 4 – Сигнальные пути клеток ткани перитуморальной области, ассоциированные с низкоэкспрессированными генами, после протонного облучения (полученные с помощью программного обеспечения PANTHER)

Биологические процессы	У человека в норме	В образцах	Обогащение кратности	p-value	Вероятность ложноположительных результатов
Сшивка пептидов GO:0018149	22	6	9.58	2.63E-05	1.27E-02
Кератинизация GO:0031424	82	15	6.42	9.41E-09	1.41E-04
Воспалительная реакция GO:0006954	570	38	2.34	1.27E-06	1.91E-03
Адаптивный иммунный ответ GO:0002250	681	39	2.01	4.94E-05	2.00E-02
Клеточная подвижность GO:0048870	1143	55	1.69	1.53E-04	4.50E-02
Цитокины PC00083	103	11	3.76	1.65E-04	8.07E-03

Среди подавленных сигнальных путей выявлены сигнальные каскады, ассоциированные с иммунным ответом, кератинизацией и клеточной подвижностью.

Анализ обогащения низкоэкспрессированных генов на платформе Enrichr выявил обогащение сигнальных путей, ассоциированных со следующими процессами: биосинтез гликогена; взаимодействие интерлейкина-7 в иммунном ответе; метаболизм гликогена, крахмала, сахарозы, глюкозы; связывание хемокинов с хемокиновыми рецепторами; обогащение сигнального пути TWEAK и AMPK, что свидетельствует о снижение метаболического потенциала клеток и подавлении ангиогенеза [Wang и др., 2022a].

В ходе анализа обогащения сигнальных путей, ассоциированных с высокоэкспрессированными генами в клетках ткани перитуморальной области выявлена схожая тенденция с клетками опухолевой ткани – активированных сигнальных путей обнаружено ограниченное количество (Таблица 5).

Таблица 5 – Сигнальные пути клеток ткани перитуморальной области, ассоциированные с низкоэкспрессированными генами, после протонного облучения (полученные с помощью программного обеспечения PANTHER)

Биологические процессы	У человека в норме	В образцах	Обогащение кратности	p-value	Вероятность ложноположительных результатов
Биологическое окисление R-HSA-211859.4	220	14	3.90	1.66E-05	4.35E-02

Анализ обогащения высокоэкспрессированных генов на платформе Enrichr, продемонстрировал активацию сигнальных путей, связанных с метаболизмом лекарственных препаратов-иринотекана и метаболизма тамоксифена; метаболизма аскорбата и альдара; процесса глюкуронирования; пентозных и глюкуронатных превращений; обмена порфиринов и хлорофилла; метаболизм ретинола; активирован биосинтез стероидных гормонов. Выявленные сигнальные каскады отражают реакцию клеток на стрессовое воздействие [Gak и др., 2015], [Peng и др., 2023].

В ходе транскриптомного анализа клеток ткани перитуморальной области была отмечена схожая тенденция с изменениями, выявленными в опухолевых клетках: превалировало количество подавленных сигнальных путей, что свидетельствует о снижении функционального потенциала клеток [Jumaniyazova и др., 2024b]. При этом, обращает на себя внимание подавление сигнальных путей, преимущественно связанных с иммунными реакциями, а также схожая тенденция с опухолевой тканью снижения метаболических процессов в клетках. В недавнем биоинформационическом анализе изменений ПРГШ до и после ЛТ, Guan et al. также выявили снижение инфильтрации опухоли иммунными клетками и снижение их миграционной активности [Guan, Liu, Zheng, 2024].

Клинико-инструментальная оценка эффектов протонной терапии для определения групп пациентов с хорошим и плохим ответом на лечение

Ввиду того, что сохранную РНК удалось выделить из 80% образцов ткани опухоли и перитуморальной области (24 из 30), в данную часть исследования были включены 24 пациента с впервые выявленным и морфологически верифицированным нерезектабельным по первичному очагу и/или лимфоколлекторам ПРГШ, все пациенты ранее не получали ЛТ. После завершения первого этапа противоопухолевого лечения производилась оценка ответа опухоли по критериям RECIST 1.1. При выявлении у пациента полного и частичного ответа продолжалось лечение уже с радикальной целью (самостоятельная ЛТ протонами или конкурентная ХЛТ цисплатин/протоны). В случае стабилизации или прогрессирования опухолевого прогресса принималось решение о смене тактики лечения. У большинства

пациентов наблюдался высокий уровень объективного ответа опухоли на лечение, он был зарегистрирован у 2/3 пациентов - 16 человек (66,6%). Из них полный ответ (CR) отмечен у 12 (50%) человек, частичный (PR) – у 4 больных (16,6%). Стабилизация размеров опухоли достигнута у 6 (25%) человек. Дальнейшее прогрессирование опухолевого процесса отмечено лишь у небольшой части пациентов (2 человека, 8,3%). Общая выживаемость без привязки к сроку наблюдения составляет 87,5%, при этом уровень локального контроля составил 76,2%. Медиана наблюдения составила 18 месяцев. Все пациенты были разделены на две группы. К группе с благоприятным прогнозом были отнесены пациенты с полным и частичным ответом на проводимое лечение. К группе с неблагоприятным прогнозом отнесены пациенты с продолженным ростом опухоли и стабилизацией опухолевого процесса на фоне ПТ.

Сравнение транскриптомного профиля клеток опухолевой и перитуморальной тканей пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом и поиск дифференциальных сигнатур

Дифференциальную экспрессирующуюся сигнатуру в транскриптомных профилях опухолевой ткани выявлены не были, но были найдены в ткани перитуморальной области. При сравнении ткани перитуморальной области у пациентов с неблагоприятным прогнозом после облучения по сравнению с образцами до облучения было получено 19282 дифференциальную экспрессированных генов, из которых значимые различия экспрессии были отмечены в случае 134 гена по данным алгоритма DESeq2 R. При анализе обогащения и рассмотрении генов-ключевых участников сигнальных каскадов выявлены дифференциальную экспрессирующуюся гены *KR1*, *KR6B*, *KR16* между группами пациентов хорошо ответивших на ПТ и оставшихся к ней резистентными.

Таблица 6 – Список сигнальных путей высокоэкспрессированных генов в образцах перитуморальной области у пациентов с неблагоприятным прогнозом: после облучения vs до облучения

Наиболее значимый процесс	Гены	Классификатор
Кератинизация	<i>KR6B</i> , <i>SPRR2G</i> , <i>KR76</i> , <i>KR16</i> , <i>KR1</i> , <i>KR6C</i> , <i>LCE3D</i>	GO biological process complete
Организация промежуточных филаментов	<i>KR6B</i> , <i>KR10</i> , <i>KR76</i> , <i>KR16</i> , <i>KR1</i> , <i>KR6C</i>	GO biological process complete
Защитная реакция на другие организмы	<i>RSAD2</i> , <i>IFI6</i> , <i>WFDC12</i> , <i>RNASE7</i> , <i>KR16</i> , <i>KR1</i> , <i>CD207</i> , <i>C4A</i> , <i>DEFB103B</i>	GO biological process complete
Кератинизация	<i>KR6B</i> , <i>KR10</i> , <i>KR76</i> , <i>KR1</i> , <i>KR6C</i>	GO molecular function complete
Кератиновые филаменты	<i>KR6B</i> , <i>KR10</i> , <i>KR76</i> , <i>KR16</i> , <i>KR1</i> , <i>KR6C</i>	GO cellular component complete
Кератинизация	<i>DSG1</i> , <i>KR6B</i> , <i>KR10</i> , <i>SPRR2G</i> , <i>KR76</i> , <i>KR16</i> , <i>KR1</i> , <i>KR6C</i>	Reactome pathways

Таблица 7 – Список сигнальных путей низкоэкспрессированных генов в образцах перитуморальной области у пациентов с благоприятным прогнозом: после облучения vs до облучения

Наиболее значимый процесс	Гены	Классификатор
Организация промежуточных филаментов	<i>EPPK1, KR6B, KR16, KR14, KR6C</i>	GO biological process complete
Структурный компонент цитоскелета	<i>KR6B, KR16, KR14, TUBB3</i>	GO molecular function complete
Кератиновые филаменты	<i>EPPK1, KR6B, KR16, KR14, KR6C</i>	GO cellular component complete
Промежуточные филаменты	<i>EPPK1, KR16, KR14</i>	PANTHER Protein Class

С целью подтверждения выявленных молекулярных сигнатур был выполнен мультиплексный ПЦР-РВ для анализа относительной экспрессии выбранных генов до и после облучения был выполнен у 10 пациентов (5 пациентов с плохим прогнозом и 5 пациентов с хорошим прогнозом), (Рисунок 11).

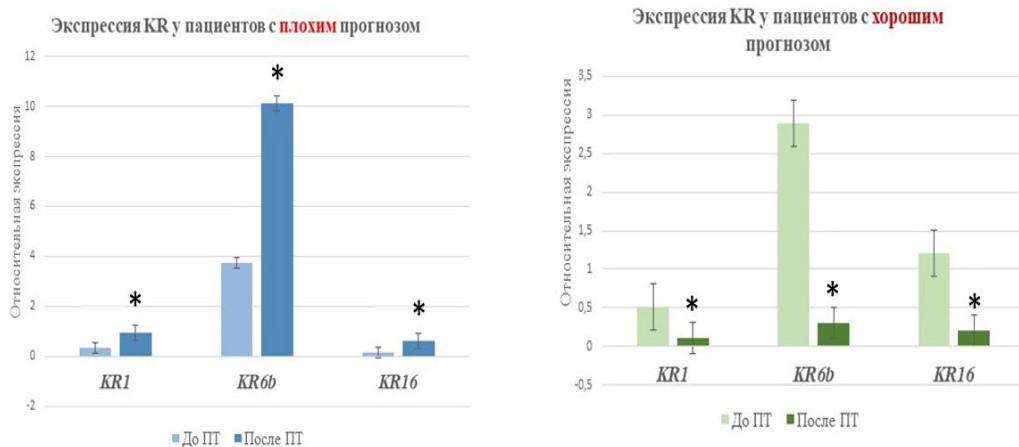


Рисунок 11 – Оценка изменения экспрессии *KR1*, *KR6b*, *KR16* в ткани перитуморальной области ПРГШ до и после облучения сканирующим пучком протонов в СОД 10 изоГр у пациентов с плохим и хорошим клиническим прогнозом

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная диссертационная работа посвящена изучению радиоиндуцированных эффектов ПТ в опухолевой и перитуморальной тканях ПРГШ. В ходе сравнения строения ткани опухоли и ткани перитуморальной области выявлено, что вне зависимости от места забора биоптата опухоли, все образцы характеризовались характерными фигурами плоскоклеточного рака, а образцы ткани перитуморальной области были гистологически сохранны, т. е. архитектоника ткани была схожа со здоровой тканью. Далее проведена сравнительная оценка уровня 13 маркеров: E-кадгерин, Vimentin, KR5, KR17, KR10, KR13, Ki-67, p63, CD44, ALDHA1, CD68, в опухолевой и перитуморальной тканях. При анализе результатов исследования образцов ткани перитуморальной области были выявлены маркеры, указывающие на наличие ОСК, а также клеток в состоянии ЭМП. С точки зрения клеточного состава образцы тканей обеих групп были идентичны и состояли из клеток преимущественно эпителиальной и мезенхимальной природы. Среди клеток иммунной компоненты преобладали антигенпрезентирующие клетки.

Облучение сканирующим пучком протонов СОД 10 изоГр опухолевой ткани и ткани перитуморальной области приводило к увеличению площади, занятой стромальным компонентом; в обеих тканях отмечено выраженное снижение уровня маркера клеточной пролиферации Ki-67, снижение уровня маркеров ОСК: CD44 и ALDHA1. Чуть менее выраженное снижение уровня KR5, KR17, KR10 отмечено в образцах ПРГШ, в перитуморальной ткани экспрессия KR17 не менялась, что можно связать с адаптационной реакцией клеток на повреждающее действие ПТ. В образцах опухолевой ткани после облучения протонами отмечено снижение доли Pdpr+, SCCA+, Vimentin+ клеток и увеличение количества CD68+ макрофагов. В образцах ткани перитуморальной области было отмечено увеличение количества Vimentin+ и CD68+ клеток.

Далее была произведена оценка изменений на уровне транскриптома клеток опухолевой ткани и клеток ткани перитуморальной области. В ходе анализа обогащения сигнальных путей в клетках опухолевой ткани и ткани перитуморальной области обращает на себя внимание превалирование числа подавленных сигнальных путей над активированными, что свидетельствует о подавлении функционального потенциала клеток. Протонное облучение СОД 10 изоГр в клетках опухолевой ткани индуцировало подавление активности сигнальных путей, ассоциированных с иммунным ответом. В данном исследовании облучение протонами ПРГШ оказывало также подавляющее воздействие на интегриновый, PDGF, STAT5, PTK2 сигнальные каскады; ингибировало транспорт глюкозы, аминокислот и солей в опухолевых клетках. Одновременно с подавлением вышеперечисленных сигнальных каскадов отмечена активация кадгеринового сигнального пути в ПРГШ. В ходе транскриптомного анализа клеток ткани перитуморальной области была отмечена схожая тенденция с изменениями, выявленными в опухолевых клетках: превалировало количество подавленных сигнальных путей. При этом, обращает на себя внимание подавление сигнальных путей, связанных с иммунными реакциями: подавление активности цитокинов, иммуноглобулинов и хемокинов, подавлялось развитие воспалительной реакции. Это может свидетельствовать о снижении функционального потенциала клеток иммунной компоненты. Протонное облучение инициировало в клетках ткани перитуморальной области снижение активности метаболизма сахарозы, глюкозы, крахмала, гликогена, внутриклеточного кальция, что свидетельствует о снижении метаболизма в клетках. Среди активированных сигнальных путей в клетках перитуморальной области обращает на себя внимание усиление метаболизма противоопухолевых лекарственных препаратов. Метаболизм аскорбата и альдараата является важным путем метаболизма углеводов, который защищает клетки от окислительного повреждения, активация этого процесса может объясняться адаптацией клеток к повреждающему воздействию протонов.

В ходе оценки клинических эффектов ПТ пациенты были разделены на 2 группы: хорошо ответившие на проводимую ПТ и оставшиеся резистентными/относительно резистентными к ней. В ходе сравнения транскриптомных профилей пациентов обеих групп в перитуморальной ткани были выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены (*KR1*, *KR6B*, *KR16*), которые могут быть рассмотрены в качестве потенциальных предикторов ответа на ПТ. Клиническую значимость выявленных дифференциальных сигнатур клеток ткани перитуморальной области еще предстоит подтвердить. Сама перспектива использовать для прогнозирования ответа на лечение ткани перитуморальной области имеет важное преимущество -минимизация повреждения опухолевой ткани, которое в свою очередь может привести к ряду неблагоприятных последствий в ходе лечения. Согласно полученным результатом, повышенная экспрессия генов *KR1*, *KR6B* и *KR16* в ткани перитуморальной области связана с плохим ответом пациентов с ПРГШ на ПТ, в то время как их пониженная экспрессия связана с благоприятным прогнозом и назначение таким пациентам ПТ будет оправдано.

ВЫВОДЫ

1. Вне зависимости от анатомической локализации все образцы плоскоклеточного рака головы и шеи имели схожее морфологическое строение и клеточный состав. Несмотря на гистологическую картину, соответствующую нормальной ткани, в образцах перитуморальной ткани были выявлены опухолевые стволовые клетки CD44+, ALDH1A1+ (которые служат источником локорегионарных рецидивов). Облучение сканирующим пучком протонов в СОД 10 изоГр индуцировало увеличение площади стромального компонента как в тканях опухоли, так и перитуморальной области, снижало пролиферативный потенциал опухолевых стволовых клеток, а также усиливало инфильтрацию CD68+ макрофагов.

2. В ходе транскриптомного анализа биоптатов плоскоклеточного рака головы и шеи после протонной терапии обнаружено подавление активности иммунной компоненты опухоли, ангиогенеза, ингибирование пролиферации опухолевых клеток, отмечена активация кадгеринового сигнального пути.

3. Транскриптомный анализ ткани перитуморальной области ПРГШ после протонной терапии продемонстрировал подавление процессов кератинизации, клеточной подвижности, активности иммунной компоненты; и активацию сигнальных путей, связанных с ответом на повреждающее воздействие.

4. После проведенной протонной терапии общая выживаемость пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи без привязки к сроку наблюдения составила 87,5%, при этом уровень локального контроля составил 76,2%. Медиана наблюдения составила 18 месяцев. Выживаемость на 1-ом году составила 91,7%, на 2-ом году наблюдения – 87,5%. Основные события (рецидив и/или смерть) пациента чаще происходили на 1-м году наблюдения, на 2-ом году риск наступления события заметно снижается.

5. При сравнении транскриптомных профилей пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом после протонной терапии в перитуморальной ткани были выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены *KR1*, *KR6B* и *KR16*. Повышенная экспрессия генов *KR1*, *KR6B* и *KR16* связана с неблагоприятным прогнозом и плохим ответом пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи на протонную терапию, в то время как их пониженная экспрессия связана с благоприятным прогнозом и назначение таким пациентам протонной терапии будет оправдано.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

1. **Джуманиязова Э.Д.**, Вишнякова П.А., Чиркова М.В., Карпулевич Е.А., Еремина И.З., Гордон К.Б., Каприн А.Д., Фатхудинов Т.Х. Исследование транскриптома плоскоклеточного рака головы и шеи после протонного облучения. Бюллетень сибирской медицины. 2024;23(1):37-47. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-1-37-47>
2. Soboleva A, Arutyunyan I, **Jumaniyazova E**, Vishnyakova P, Zarubina D, Nimatov E, Elchaninov A, Fatkhudinov T. Gene-Expression Patterns of Tumor and Peritumor Tissues of Smoking and Non-Smoking HPV-Negative Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Biomedicines*. 2024 Mar 21;12(3):696. doi: 10.3390/biomedicines12030696
3. **Jumaniyazova E**, Aghajanyan A, Kurevlev S, Tskhovrebova L, Makarov A, Gordon K, Lokhonina A, Fatkhudinov T. *SP1* Gene Methylation in Head and Neck Squamous Cell Cancer in HPV-Negative Patients. *Genes (Basel)*. 2024 Feb 23;15(3):281. doi: 10.3390/genes15030281
4. **Jumaniyazova E**, Lokhonina A, Dzhalilova D, Kosyreva A, Fatkhudinov T. Role of Microenvironmental Components in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Pers Med*. 2023 Nov 17;13(11):1616. doi: 10.3390/jpm13111616
5. Gordon K, Gulidov I, Smyk D, Semenov A, Golubev K, Lemaeva A, Koryakin S, **Jumaniyazova E**, Vishnyakova P, Eremina I, Fatkhudinov T, Kaprin A. Upright proton therapy for esthesioneuroblastoma: a single-institution experience. *Front Oncol*. 2024 Jan 30;14:1348291. doi: 10.3389/fonc.2024.1348291
6. **Jumaniyazova E**, Smyk D, Vishnyakova P, Fatkhudinov T, Gordon K. Photon- and Proton-Mediated Biological Effects: What Has Been Learned? *Life (Basel)*. 2022 Dec 22;13(1):30. doi: 10.3390/life13010030.
7. Arutyunyan I, **Jumaniyazova E**, Makarov A, Fatkhudinov T. In Vitro Models of Head and Neck Cancer: From Primitive to Most Advanced. *J Pers Med*. 2023 Nov 3;13(11):1575. doi: 10.3390/jpm13111575

Другие публикации

1. Э. Д. **Джуманиязова**, П. А. Вишнякова, Т. Х. Фатхудинов Транскриптомные изменения плоскоклеточного рака головы и шеи после облучения протонами в дозе 10 изоГр // Злокачественные опухоли. – 2023. – Том 13. С.238-239
2. **Джуманиязова Э.Д.** Изменение иммунной компоненты плоскоклеточного рака головы и шеи после облучения протонами// Трансляционная медицина. – 2024. – С.256-257
3. **Джуманиязова Э.Д.**, Вишнякова П.А., Фатхудинов Т.Х. Экспрессия генов в клетках плоскоклеточного рака головы и шеи// Успехи молекулярной онкологии, Том 10, №4, – 2023. – С. 15-16
4. **Джуманиязова Э.Д.** Оценка экспрессии генов в опухолях головы и шеи// Санкт-Петербургские научные чтения-2022. Сборник тезисов IX Международного Молодежного Медицинского Конгресса. Санкт-Петербург, 2022. С.70 -71.
5. **Джуманиязова Э.Д.**, Вишнякова П.А., Фатхудинов Т.Х. Изменение сигнальных путей плоскоклеточного рака головы и шеи после протонного облучения//Неделя науки - 2023. Материалы Международного молодёжного форума. Ставрополь, 2023. С 260-262.
6. Фатхудинов Т.Х., Арутюнян И.В., Макаров А.В., Ельчанинов А.В., Вишнякова П.А., Лохонина А.В., Фаддеева С.Ю., Мелкова С.О., Гордон К.Б., Корякин С.Н., Лычагин А.А., Сабуров В.О., Казаков Е.И., Артемова Д.А., Соболева А.Г., Каприн А.Д., **Джуманиязова Э.** Способ получения тканеинженерной *in vitro* модели плоскоклеточного рака головы и шеи человека. Патент на изобретение RU № 2825474 С1; Опубл.26.08.2024; Бюл. №24
7. Фатхудинов Т.Х., Арутюнян И.В., Макаров А.В., Ельчанинов А.В., Лохонина А.В., Вишнякова П.А., Фаддеева С.Ю., Мелкова С.О., Артемова Д.А., Соболева А.Г., **Джуманиязова Э.**, Гордон К.Б., Корякин С.Н., Лычагин А.А., Сабуров В.О., Казаков Е.И., Каприн А.Д. Патент № RU 2798548 С1. Способ получения многокомпонентных сфероидов для *in vitro* моделирования высоко- и умеренно дифференцированного плоскоклеточного рака кожи или органов головы и шеи человека : № 2022129672 : заявл. 16.11.2022 : опубл. 23.06.2023.

**ДЖУМАНИЯЗОВА ЭНАР
(РФ)**

**ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА И МОЛЕКУЛЯРНЫХ
СИГНАТУР ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ГОЛОВЫ И ШЕИ ДО И ПОСЛЕ
ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТОННОЙ ТЕРАПИИ**

В работе проведена сравнительная оценка клеточного строения опухолевой и перитуморальной тканей ПРГШ до облучения и описаны радиоиндуцированные ответы тканей на протонную терапию (ПТ) СОД 10 изоГр. Во всех образцы опухолевой ткани вне зависимости от места забора биоптата опухоли, выявлена характерная для плоскоклеточного рака картина: обильный инвазивный рост в подлежащие ткани опухолевых клеток в виде округлых скоплений, тяжей или отдельных клеток; образцы ткани перитуморальной области гистологически схожи со здоровой тканью: сохранившая архитектоника многослойного эпителия, который отделен от собственной пластиинки слизистой базальной мембраной. В ходе сравнительной оценки уровня 13 маркеров (Е-кадгерин, Vimentin, KR5, KR17, KR10, KR13, Ki-67, p63, CD44, ALDHA1, CD68), в опухолевой и перитуморальной тканях выявлены статистически значимые различия уровня CD44, ALDHA1, Ki-67, p63, CD68. Отмечена схожая тенденция изменений в опухолевой и перитуморальной тканях после ПТ СОД 10 изоГр: увеличение площади, занимаемой стромальным компонентом. После облучения в опухолевой ткани отмечено снижение экспрессии маркеров: Vimentin, Pdpn, SCCA, KR5, KR17, KR10, ALDHA1, Ki-67, p63 и увеличение CD68. В ткани перитуморальной области после облучения протонами отмечено снижение уровня KR5, Ki-67, p63, CD44, ALDHA1 и увеличение Vimentin, CD68. В ходе транскриптомного анализа клеток ПРГШ после ПТ обнаружено подавление активности сигнальных каскадов, связанных с иммунным ответом, ангиогенезом, ингибирование пролиферации опухолевых клеток, отмечена активация кадгеринового сигнального пути. Транскриптомный анализ клеток ткани перитуморальной области ПРГШ после протонной терапии продемонстрировал подавление процессов кератинизации, клеточной подвижности, активности сигнальных каскадов, связанных с иммунным ответом, в то же время, выявлена активация сигнальных путей, связанных с ответом на повреждающее воздействие. У большинства пациентов наблюдался высокий уровень объективного ответа опухоли на ПТ, он был зарегистрирован у 2/3 пациентов - 16 человек (66,6%). Из них полный ответ (CR) отмечен у 12 (50%) человек, частичный (PR) – у 4 больных (16,6%). Стабилизация размеров опухоли достигнута у 6 (25%) человек. Дальнейшее прогрессирование опухолевого процесса отмечено лишь у небольшой части пациентов (2 человека, 8,3%). Общая выживаемость без привязки к сроку наблюдения составляет 87,5%, при этом уровень локального контроля составил 76,2%. Медиана наблюдения составила 18 месяцев. Далее пациенты были разделены на две группы: с благоприятным прогнозом (пациенты с полным и частичным ответом) и с неблагоприятным прогнозом (пациенты с продолженным ростом опухоли и стабилизацией опухолевого процесса на фоне ПТ). В ходе сравнения транскриптомных профилей пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом были выявлены дифференциальные молекулярно-генетических сигнатуры в клетках ткани перитуморальной области. Согласно полученным данным, повышенная экспрессия генов *KR1*, *KR6B* и *KR16* связана с неблагоприятным прогнозом и плохим ответом пациентов с ПРГШ на ПТ, в то время как их пониженная экспрессия связана с благоприятным прогнозом и назначение таким пациентам ПТ будет оправдано.

JUMANIYAZOVA ENAR

(RF)

INVESTIGATION OF THE CELLULAR COMPOSITION AND MOLECULAR SIGNATURES OF OF THE HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA BEFORE AND AFTER EXPOSURE TO PROTON THERAPY

The work carried out a comparative assessment of the cellular structure of the tumor and peritumoral tissues of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) before irradiation and described the radio-induced tissue responses to proton therapy (PT) TRD 10 isoGray. In all samples of tumor tissue, regardless of the location of the tumor biopsy, a pattern characteristic of squamous cell carcinoma was revealed: abundant invasive growth of tumor cells into the underlying tissues in the form of rounded clusters, strands or individual cells; tissue samples of the peritumoral region are histologically similar to healthy tissue: preserved architectonics of the multilayer epithelium, which is separated from its own plate by a mucous basement membrane. A comparative assessment of the levels of 13 markers (E-cadherin, Vimentin, KR5, KR17, KR10, KR13, Ki-67, p63, CD44, ALDHA1, CD68) revealed statistically significant differences in the levels of CD44, ALDHA1, Ki-67, p63, CD68 in tumor and peritumoral tissues. A similar trend of changes in the tumor and peritumoral tissues after PT TRD 10 isoGray was noted: an increase in the area occupied by the stromal component. After irradiation, there was a decrease in the expression of markers in the tumor tissue: Vimentin, Pdpn, SCCA, KR5, KR17, KR10, ALDHA1, Ki-67, p63 and an increase in CD68. In the tissue of the peritumoral region, after proton irradiation, there was a decrease in the levels of KR5, Ki-67, p63, CD44, ALDHA1 and an increase in Vimentin, CD68. During transcriptomic analysis of HNSCC cells after PT, suppression of the activity of signaling cascades associated with the immune response, angiogenesis, inhibition of tumor cell proliferation, and activation of the cadherin signaling pathway were detected. Transcriptomic analysis of tissue cells of the peritumoral region of the HNSCC after proton therapy demonstrated suppression of keratinization processes, cellular motility, and activity of signaling cascades associated with the immune response, at the same time, activation of signaling pathways associated with the response to damaging effects was revealed. The majority of patients had a high level of objective tumor response to PT, it was registered in 2/3 of patients - 16 people (66.6%). Of these, complete response (CR) was observed in 12 (50%) patients, partial response (PR) – in 4 patients (16.6%). Tumor size stabilization was achieved in 6 (25%) patients. Further progression of the tumor process was noted only in a small proportion of patients (2 people, 8.3%). The overall survival rate without reference to the follow-up period is 87.5%, while the level of local control was 76.2%. The median follow-up was 18 months. Further, the patients were divided into two groups: with a favorable prognosis (patients with complete and partial response) and with an unfavorable prognosis (patients with continued tumor growth and stabilization of the tumor process on the background of PT). During the comparison of transcriptomic profiles of patients with favorable and unfavorable prognosis, differential molecular genetic signatures were revealed in the tissue cells of the peritumoral region. According to the data obtained, increased expression of the *KR1*, *KR6B*, and *KR16* genes is associated with an unfavorable prognosis and poor response of patients with HNSCC to PT, while their decreased expression is associated with a favorable prognosis and the appointment of PT to such patients would be justified.